

Tesis Doctoral

Hongos manchadores de albura en especies forestales exóticas y nativas de los Andes Patagónicos: taxonomía, patogenicidad y manejo

de Errasti, Andrés

2016-06-27

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

de Errasti, Andrés. (2016-06-27). Hongos manchadores de albura en especies forestales exóticas y nativas de los Andes Patagónicos: taxonomía, patogenicidad y manejo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

de Errasti, Andrés. "Hongos manchadores de albura en especies forestales exóticas y nativas de los Andes Patagónicos: taxonomía, patogenicidad y manejo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-06-27.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Hongos manchadores de albura en especies forestales exóticas y
nativas de los Andes patagónicos: taxonomía, patogenicidad y manejo**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Ciencias Biológicas

Lic. Andrés de Errasti

Director de Tesis: Dr. Rajchenberg, Mario

Consejera de estudios: Dra. López, Silvia Edith

Lugar de Trabajo: Centro Forestal CIEFAP. Esquel, Chubut.

Fecha de Defensa: 27/06/2016

Hongos manchadores de albura en especies forestales exóticas y nativas de los Andes patagónicos: taxonomía, patogenicidad y manejo

Palabras clave: cancrrosis, *Ceratocystis*, escolítidos, *Ophiostoma*, mancha azul, *Nothofagus*, Patagonia, *Pinus*.

Esta tesis constituye el primer relevamiento sistemático de hongos manchadores de albura de la Patagonia argentina. La ‘mancha de albura’ es una modificación de las propiedades ópticas de la madera como consecuencia de la colonización fúngica. El cuerpo (hifas) pigmentado del hongo penetra el parénquima radial y los tejidos vasculares ocasionando una mancha profunda. La mayoría de especies manchadoras pertenecen a los hongos ‘ofio stomatoides’. Este grupo polifilético dentro de los Ascomycota se encuentra asociado íntimamente con artrópodos, en particular, a escarabajos de corteza y ambrosía (Coleoptera: Scolytinae/Platypodinae). Existen casos bien documentados de patógenos primarios dentro del grupo (por ejemplo *Ceratocystis fagacearum*, *Ceratocystis fimbriata*, *Ophiostoma ulmi*), sin embargo, la mayoría de las especies manchan la madera recién cosechada, como saprobios. La madera manchada tiene un precio de venta menor y su aceptación en el mercado disminuye. Ante la falta de información en el país sobre la diversidad y biología de este grupo, se planificó su recolección y estudio en la Patagonia durante el período 2009-2014.

El relevamiento fue realizado durante 3 años. Se visitaron diferentes plantaciones y zonas de bosque nativo en las regiones cordilleranas de las provincias del Chubut, del Río Negro y del Neuquén. Los taxones fueron identificados mediante técnicas morfológicas y moleculares (regiones LSU, ITS, β -*Tubulina* y el factor *TEF 1- α*). Sus asociaciones con

insectos también fueron informadas. En base a la diversidad encontrada sobre árboles enfermos (*Nothofagus*, *Schinus*) se diagramaron ensayos para estimar la patogenicidad de algunos aislamientos sobre árboles sanos. Paralelamente, se caracterizó el ciclo del manchado en pináceas utilizadas por la industria forestal, intentando cuantificar la colonización fúngica en función del tiempo, para árboles apeados en distintas épocas del año.

Se coleccionaron 588 muestras de las que se obtuvieron 370 aislamientos. Estos fueron clasificados en 28 taxones: 18 taxones conocidos y 10 taxones nuevos para la ciencia. De los nuevos, 5 fueron descritos formalmente: *Huntiaella decorticans*, *Leptographium gestamen*, *Ophiostoma patagonicum*, *Ophiostoma peregrinum* y *Sporothrix cabralii*. El bosque andino-patagónico evidenció una importante diversidad con un 80% de taxones endémicos (12/15). Por el contrario, las plantaciones de pináceas estuvieron asociadas a especies que han sido introducidas junto con éstas, tal como se ha constatado en otras regiones del Hemisferio Sur. Los primeros datos moleculares de *Ophiostoma nothofagi* han permitido identificar un linaje independiente dentro de la familia Ophiostomataceae, cuyas características morfológicas y ecológicas particulares respaldan la posibilidad de erigir un género nuevo para ésta y otras especies relacionadas.

En los ensayos de patogenicidad a campo, *Huntiaella decorticans* colonizó satisfactoriamente árboles sanos, de acuerdo con los postulados de Koch. Su relación con escarabajos que se alimentan de savia fresca y la formación de una estructura tipo ‘pressure pad’ indican un comportamiento patogénico. Sin embargo, la formación de canchales fue consecuencia de lesiones localizadas y no de infecciones sistémicas típicas de un marchitamiento. Por el contrario *L. gestamen* y *O. patagonicum* no pudieron colonizar sus

hospedantes (*Nothofagus* spp. y *Schinus patagonicus*, respectivamente), por lo que serían saprobios oportunistas dispersados por escarabajos de ambrosía hacia hospedantes bajo estrés severo.

En las plantaciones de coníferas, *Ophiostoma piliferum* y *O. peregrinum* fueron las especies de mayor frecuencia, si bien la tasa de colonización de *Diplodia pinea* fue superior. Las dos primeras están asociadas a las especies de escarabajos *Hylurgus ligniperda* y *Orthotomicus laricis*. Las especies de *Grosmannia* fueron aisladas principalmente de *Hylastes ater*. Los ensayos a campo indican que los troncos estuvieron libres de mancha por 3 meses, independientemente de su época de apeo. A partir del tercer mes los árboles cosechados en primavera y, en menor medida en otoño, son altamente susceptibles al ataque de hongos ‘ofiofomatoides’, probablemente porque en esas épocas se producen los picos de vuelo de los escarabajos adultos. Las cosechas de verano son críticas si el rodal está afectado por *Diplodia*. La colonización de ésta especie, usualmente en estado latente dentro del tejido sano del hospedante, se ve favorecida por las altas temperaturas de la estación. El invierno es la época más favorable para la cosecha.

Ophiostoma peregrinum, especie que inicialmente fue reportada en el hemisferio Norte sobre *Betula* sp., mostró en la Patagonia una amplia distribución y frecuencia en plantaciones (inclusive colonizando hospedantes nativos) remarcando los peligros del comercio entre regiones distantes.

Sap-stain fungi on *Nothofagus* and *Pinus* from Patagonia: taxonomy, pathogenicity and management

Key words: ophiostomatoid fungi, *Ceratocystis*, *Ophiostoma*, canker, blue-stain.

This thesis comprehends the first survey of sap-stain fungi on exotic conifers and native broad-leaved species (*Nothofagus*) from Patagonia, Argentina. ‘Sap-stain’ is a dark discoloration of wood as a consequence of fungal colonization. Pigmented fungal hyphae penetrate the radial parenchyma and the vascular tissue, causing a deep stain. Most sap-stain species belong to the so-named ‘ophiostomatoid fungi’ a polyphyletic group of ascomycetes with similar morphology and taxonomic history. These species are adapted to arthropod dispersal, especially bark and ambrosia beetles (Coleoptera: Scolytinae/Platypodinae). Pathogens are well documented among sap-stain species (e.g. *Ceratocystis fagacearum*, *Ceratocystis fimbriata*, *Ophiostoma ulmi*). Nevertheless, most species are saprobes, colonizing timber after harvest. Stained wood has a lower market value and a decreased acceptance, causing major losses to the forest industry worldwide. Addressing the need to characterize ophiostomatoid diversity and biology in Patagonia, a five-year project was undertaken (2009-2014).

A three-year survey (2009-2012) in Neuquén, Río Negro and Chubut Provinces included milling companies, pine plantations and native forests. Species were collected and identified based on morphology and DNA sequence comparisons of multiple loci (LSU, ITS, β -Tubulin, TEF 1- α). Insect associates were also informed. Isolates obtained from diseased trees (*Nothofagus*, *Schinus*) were selected for pathogenicity trials. On pine

plantations, colonization of logs was estimated at different intervals, for logs harvested in different seasons. A total of 588 samples were collected, and 370 isolates were obtained. These were classified under 28 taxa: 18 known species and 10 new taxa. In the present study, 5 out of these new 10 species were described: *Huntia decorticans*, *Leptographium gestamen*, *Ophiostoma patagonicum*, *Ophiostoma peregrinum* and *Sporothrix cabralii*. *Nothofagus* forests include several, previously unknown, sap-stain taxa. The 80% of these (12/15) are considered to be endemic. On the other hand, species present on pine plantations have been most likely introduced, similarly to other Southern Hemisphere Countries. The first molecular data of *Ophiostoma nothofagi* strongly suggests the presence of an independent lineage within the Ophiostomataceae. Its morphological characteristics and ecological features also support the possibility to erect a new genus for this and other related taxa.

Huntia decorticans was able to colonize healthy trees in pathogenicity trials. Its relation to sap-feeding beetles (Coleoptera: Nitidulidae) as well as the formation of a 'pressure-pad' structure, points out a pathogenic capability. Nevertheless, the formation of cankers indicates a localized lesion and not a systemic colonization, typical of a wilted tree. On the contrary, *Leptographium gestamen* and *Ophiostoma patagonicum* could not colonize healthy trees and both species probably behave as opportunistic saprobes vectored by ambrosia beetles to severely stressed trees.

On pine plantations, the most frequent species were *Ophiostoma piliferum* and *O. peregrinum*. However, *Diplodia* registered higher colonization rates. The former ophiostomatoid species are associated to *Hylurgus ligniperda* and *Orthotomicus laricis* galleries. *Grosmannia* species were found in association with *Hylaster ater* galleries. At

every site logs were stain-free for 3 months, no matter which season they were harvested. After this period, harvest in spring (and sometimes autumn) is highly susceptible to ‘ophiostomatoid’ stain, probably because it is also beetle flying season. Summer harvest is critical if the stand is infected with *Diplodia*, because this endophytic fungus grows vigorously at high temperatures. Field trials indicate winter as the most favorable season to harvest.

Ophiostoma peregrinum, initially reported from the Northern Hemisphere associated with *Scolytus ratzeburgi* on *Betula*, evidenced a wide geographical distribution and host range (even on native species) in Patagonia, showing the risks associated to commercial trade between distant regions.

AGRADECIMIENTOS

- A mi familia toda, siempre presente.
- Especialmente a Sofia, quien ha sufrido esta tesis a diario.
- A Mario, quien a pesar de sus múltiples obligaciones siempre se ha dedicado con seriedad a su tarea Docente, de esta tesis en particular y de mi formación en general.
- Afectuosamente agradezco al Área de Protección Forestal del CIEFAP. A los amigos/as que conforman este excelente grupo de trabajo.
- A Silvia López, por aceptar ser mi consejera de estudios, por brindarme su apoyo y su cariño.
- A los integrantes del Centro Forestal CIEFAP quienes han enriquecido considerablemente mi trabajo.
- A Wilhelm de Beer, Jolanda Roux, Martin Coetzee y Michael Wingfield del Instituto FABI (Universidad de Pretoria, Sudáfrica) por la posibilidad de capacitarme y compartir una experiencia diferente.
- A Lynn Siegler y Margaret Dick de los herbarios DAOM y NZFS, respectivamente, por el envío del material solicitado.
- A Juan Pablo Casado (Corfone S.A.), Esteban Coliqueo (Ea. Quechuquina), Hugo Brockeroff (Ea. San Jorge), Luciano Taladriz (DGBYP Lago Puelo) y Martín Honorato (EEA INTA Esquel) por la asistencia durante los ensayos en las propiedades de las que son responsables.
- Al CONICET, el CIEFAP, la DGBYP del Chubut, a Parques Nacionales, el INTA, a Flora y Fauna de Chubut y Tierra del Fuego, por su apoyo financiero y su colaboración.

a Juan y Sofía

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	4
AGRADECIMIENTOS	7
INTRODUCCIÓN	13
OBJETIVOS	19
CAPÍTULO I “Taxonomía de los hongos ‘ofiostomatoides’ en los bosques andino patagónicos”	21
1.0 INTRODUCCIÓN	22
1.1 MATERIALES Y MÉTODOS	33
1.2 RESULTADOS	38
1.2.1 Ceratocystidaceae	38
Colección de muestras y análisis morfológico	38
Comparación de secuencias de ADN	38
1.2.2 Ophiostomataceae	45
Colección de muestras y análisis morfológico	45
Comparación de secuencias de ADN	48
1.3 TAXONOMÍA	64
1.3.1 Ceratocystidaceae	65
<i>Huntia decorticans</i> de Errasti & Z.W. de Beer sp. nov.	65
<i>Huntia</i> sp1	69
<i>Huntia</i> sp2	70

1.3.2 Ophiostomataceae	71
<i>Leptographium gestamen</i> de Errasti & Z.W. de Beer, sp.nov.	71
<i>Ophiostoma grandicarpum</i> (Kowalski & Butin) Rulamort	74
<i>Ophiostoma nothofagi</i> (Butin) Rulamort	75
<i>Ophiostoma novae-zelandiae</i> (L.J. Hutchison & J. Reid) Rulamort	78
<i>Ophiostoma patagonicum</i> de Errasti & Z.W. de Beer, sp.nov.	80
<i>Ophiostoma quercus</i> (Georgev.) Nannf.	83
<i>Ophiostoma valdivianum</i> (Butin) Rulamort	85
<i>Ophiostoma</i> sp1	87
<i>Ophiostoma</i> sp2	87
<i>Ophiostoma</i> sp3	88
<i>Sporothrix cabralii</i> de Errasti & Z.W. de Beer, sp. nov.	89
<i>Sporothrix</i> sp1	91
1.4 DISCUSIÓN	92
CAPÍTULO II “Taxonomía de los hongos manchadores de albura en plantaciones de coníferas exóticas de la región patagónica”	97
2.0 INTRODUCCIÓN	98
2.1 MATERIALES Y MÉTODOS	106
2.2 RESULTADOS	110
Colección de muestras y análisis morfológico	110
Comparación de secuencias de ADN	113
2.3 TAXONOMÍA	119
2.3.1 Dothideomycetes	119
Botryosphaeriaceae Theiss. & Syd.	119
<i>Diplodia pinea</i> (Desm.) Kickx	119
<i>Dothiorella sarmentorum</i> (Fr.) A.J.L. Phillips, A. Alves & J. Luque	121

Dothioraceae Theiss. & P. Syd.	123
<i>Sclerophoma pithyophila</i> (Corda) Höhn.	123
2.3.2 Leotiomycetes	125
Dermateaceae Fr.	125
<i>Pilidium concavum</i> (Desm.) Höhn.	125
2.3.3 Sordariomycetes	127
Coniochaetaceae Malloch & Cain	127
<i>Coniochaeta pulveracea</i> (Ehrh.) Munk	127
<i>Coniochaeta rhopalochaeta</i> A.I. Romero & Carmarán	128
Ceratocystidaceae Locq. ex Réblová, W. Gams & Seifert	130
<i>Endoconidiophora coerulescens</i> (Münch) B.K. Bakshi	130
Ophiostomataceae Nannf.	132
<i>Ophiostoma ips</i> (Rumbold) Nannf.	132
<i>Ophiostoma peregrinum</i> sp. nov. de Errasti & Rajchenberg	134
<i>Ophiostoma piliferum</i> (Fr.: Fr.) Syd.	137
<i>Ophiostoma subannulatum</i> Livingston & R.W. Davidson	139
<i>Grosmannia huntii</i> (R.C. Rob.) Zipfel, de Beer & M.J. Wingf.	141
<i>Grosmannia radiaticola</i> de Beer & M.J. Wingf.	143
<i>Graphilbum</i> sp1	145
DISCUSIÓN	147
CAPÍTULO III “Patogenicidad de hongos ‘ofiostomatoides’ en los bosques andino- patagónicos”	150
3.0 INTRODUCCIÓN	153
3.1 MATERIALES Y MÉTODOS	162
3.2 RESULTADOS	166
3.2.1 Complejo <i>Huntella decorticans</i>	166

3.2.2 <i>Leptographium gestamen</i>	168
3.2.3 <i>Ophiostoma patagonicum</i>	169
3.3 DISCUSIÓN	172
CAPÍTULO IV “Cronogramas de cosecha para lograr trozas libres de manchas de albura “	176
4.0 INTRODUCCIÓN	177
4.1 MATERIALES Y MÉTODOS	182
4.2 RESULTADOS	188
4.2.1 DGBYP Las Golondrinas	188
4.2.2 EEA INTA Esquel	191
4.2.3 Ea. San Jorge	195
4.2.4 CORFONE S.A.	198
4.2.5 Ea. Quechuquina	201
4.3 DISCUSIÓN	206
RESULTADOS Y CONCLUSIONES GENERALES	210
REFERENCIAS	215
ANEXO I..... CLAVES TAXONÓMICAS	227
ANEXO II.....PERMISOS DE RECOLECCIÓN	233

INTRODUCCIÓN

Los bosques templados del sur de Argentina y Chile

Los bosques templados del sur de Argentina y Chile se distribuyen en ambas vertientes de los Andes desde los 38° hasta los 55° de latitud Sur. Son altamente productivos en términos de biomasa (Barbour et al., 1980) con una temperatura media anual que varía entre 4°C y 12 °C. Su topografía establece gradientes marcados de precipitación y temperatura al mismo tiempo que su extensión (más de 2000 km) establece un gradiente latitudinal de dichos parámetros (Armesto et al., 1995). La riqueza de especies vegetales en estos bosques es menor a la reportada para bosques tropicales, aunque la diversidad de formas de vida y la dominancia de latifoliadas sobre coníferas los diferencian de muchos de los bosques templados del Hemisferio Norte (Armesto et al. 1995). Las especies del género *Nothofagus* son las más frecuentes y se distribuyen en dos grandes grupos: en los bosques siempre verdes, donde co-existen con otras especies arbóreas, y en los bosques puros o casi puros de especies deciduas (Veblen et al., 1996). En la antigüedad estos bosques estaban conectados con los de Tasmania y los de Nueva Zelanda a través de la Antártida, situación que fue modificándose a partir del período Terciario (Barron et al., 1981). Actualmente están geográficamente aislados de otras formaciones boscosas tropicales y subtropicales del continente, situación que se ha mantenido, por lo menos, durante todo el período Cuaternario. Uno de las consecuencias de este aislamiento es el alto grado de endemismos presente (Armesto et al., 1995).

El bosque andino-patagónico

Este tipo de bosque es más frecuente en la vertiente oriental de los Andes (lado argentino). Las especies de mayor distribución son *Nothofagus antartica* (G.Forst.) Oerst., *N. dombeyi* (Mirb.) Blume, y *N. pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser. En la provincia de Tierra del Fuego se encuentra *Nothofagus betuloides* (Mirb.) Oerst., y, en la provincia del Neuquén, *N. alpina* (Popp. & Endl.) Oerst. y *N. obliqua* (Mirb.) Oerst. (Donoso, 1994). Hacia el Este, en la zona de transición entre el bosque de *Nothofagus* y la estepa, son comunes los bosques de *Austrocedrus chilensis* (D.Don) Pic.Serm. & Bizzarri (Donoso, 1994). Los bosques andino-patagónicos o bosques deciduos están sujetos a un gradiente de precipitaciones muy marcado, que decrece del Oeste (3500 mm/año) hacia el Este (600 mm/año). Estos bosques cubren aproximadamente 2,6 millones de hectáreas (Inventario Nacional de Bosques Nativos, Dirección de Bosques-SAyDS, 2004). Al pertenecer a los bosques templados patagónicos, el bosque andino-patagónico comparte las características de aquellos, especialmente en lo referido al alto grado de endemismos. Dentro del Reino Fungi los estudios taxonómicos realizados evidencian desde un 30% hasta un 55% de especies endémicas, dependiendo de los grupos estudiados (Gamundi de Amos, 1975; Gamundi de Amos, 1986; Gamundi de Amos & Romero, 1998.; Rajchenberg, 2006; Gamundi & Amos, 2007; Greslebin, 2002).

Las plantaciones de coníferas exóticas

Las plantaciones de pináceas exóticas empleadas con fines comerciales constituyen el grueso del recurso destinado a la industria foresto-maderera en la Patagonia. Actualmente unas 75.000 ha han sido plantadas, la mayoría con pino ponderosa (*Pinus ponderosa*

Dougl.) y, en menor medida, pino oregón [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco], pino contorta (*Pinus contorta* Dougl.) y pino radiata (*Pinus radiata* D. Don.) (Loguercio & Deccechis 2006). Históricamente el pino se forestaba como reemplazo del bosque nativo, en zonas con una precipitación anual entre 800 y 1500 mm. A partir de la década 1990-2000 la tendencia ha sido forestar en zonas con precipitaciones anuales menores a 800 mm, entre el bosque nativo y la estepa. Las plantaciones de la Patagonia están sujetas a un clima templado. Esto implica una estacionalidad marcada, donde la mayor cantidad de precipitaciones ocurre en invierno. En consecuencia, las tareas de aprovechamiento no suelen llevarse a cabo durante todo el año, principalmente por la imposibilidad de transitar los caminos de acceso en aquella estación. La organización de la cosecha y el transporte se convierte en un aspecto crucial para abaratar costos y no sufrir pérdidas debido a manchas de albura, pudriciones o ataques de plagas.

El problema del 'sap-stain' y sus agentes etiológicos

Esta problemática de post-cosecha puede definirse como la modificación del color de la madera debido a la colonización fúngica (Seifert, 1993). Al invadir radialmente el tejido de árboles recién cosechados, las hifas oscuras de ciertos hongos tiñen en profundidad la madera. Esta modificación no afecta significativamente sus propiedades estructurales (Fleet et al., 2001), pero disminuye el valor comercial del producto y su competitividad frente a otros mercados, pudiendo incluso ser causa de restricciones cuarentenarias durante su exportación. Los organismos causales pertenecen a distintas clases dentro de los Ascomycota, particularmente a las clases Sordariomycetes y Dothideomycetes. La mayoría de los estudios taxonómicos de hongos manchadores se han referido exclusivamente a los hongos 'ofiostomatoides' (Hedgcock, 1906; Mathiesen-Käärik, 1960; Griffin, 1966;

Dowding, 1969; Olchowecki & Reid, 1974; Solheim, 1988; Jacobs & Wingfield, 2001). En menor medida, otros trabajos han incluido también a los diferentes estados asexuales de especies de las familias Botryosphaeriaceae Theiss. & Syd., Davidiellaceae Crous & U. Braun, Dothioraceae Theiss. & Syd., Herpotrichellaceae Munk y Pleosporaceae Nitschke (Chou & MacKenzie, 1988; Hutchison & Reid, 1988; Thwaites et al., 2005).

Los hongos ofiostomatoides

Los ‘hongos ofiostomatoides’ son un grupo polifilético con morfología convergente, probablemente homoplasias que reflejan su adaptación a la dispersión por artrópodos (De Beer et al., 2013b). La mayoría de las especies producen ascosporas o conidios en masas pegajosas que se depositan como pequeñas gotas en los ápices de los ascomas o conidióforos. Estos caracteres fueron considerados homólogos durante mucho tiempo por los taxónomos, quienes nombraron este grupo de acuerdo al nombre genérico considerado más adecuado para la época: *Ceratostomella* Sacc. (Hedgcock, 1906), *Ophiostoma* Syd. & P. Syd. (Sydow & Sydow, 1919) o *Ceratocystis* Ell. & Halst. (Bakshi, 1951). Con el correr del tiempo fue evidente que dichos caracteres habían evolucionado reiteradamente en diversos linajes (Jewell, 1974; Weijman & De Hoog, 1975; Harrington, 1981; De Hoog & Scheffer, 1984; Berbee & Taylor, 1992). Por ello surgió el término ‘hongos ofiostomatoides’ para referirse a un grupo con morfología, historia taxonómica y ecología similares, aunque estuviese conformado por géneros de diferentes órdenes (Wingfield et al., 1993; Seifert et al., 2013).

Patógenos

Dentro de los diferentes grupos de hongos manchadores hay especies que son capaces de colonizar árboles vivos y desencadenar enfermedades que causen la muerte del ejemplar. Se pueden mencionar especies responsables de eventos epidémicos en el Hemisferio Norte como, por ejemplo, el complejo *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf. Por otra parte, especies de la familia Botryosphaeriaceae, particularmente ciertos morfotipos de *Diplodia pinea* (Dcsmaz.) J. Kickx (Burgess et al., 2001), *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. y *Diplodia seriata* De Not. causan muerte apical regresiva y cancrrosis en diferentes hospedantes (Úrbez-Torres et al., 2008). En vista de ello, el estudio de la diversidad de hongos manchadores suele complementarse con estudios sobre la patogenicidad de los mismos, sobre todo si éstos son aislados de ejemplares enfermos.

Movimientos de hongos manchadores causados por el hombre

Las especies invasoras usualmente corresponden a organismos introducidos por el hombre en un nuevo ecosistema. En lo que concierne a hongos manchadores las principales fuentes de inóculo surgen del intercambio de material de propagación (semillas, esquejes, plantines), de trozas sin procesar y de embalajes de madera ('pallets') para exportación. Como se mencionara anteriormente, existen numerosos hongos 'ofistomatoides' que se comportan como patógenos. Entre estos casos, los más emblemáticos han surgido como resultado de la introducción de dichos hongos desde regiones distantes, como sucedió con *Ceratocystis fagacearum*, *C. platani*, *C. eucalypticola*, *Ophiostoma ulmi* y *Raffaelea lauricola*. Dada la complejidad del intercambio comercial entre regiones distantes y del creciente movimiento de personas alrededor del mundo, nuevas introducciones son esperables en el futuro.

Antecedentes de hongos manchadores en la región andino-patagónica

El sur de Sudamérica y en especial la Argentina no tienen estudios realizados sobre hongos manchadores relacionados al sector forestal, a excepción de Chile. En este último país se han realizado estudios, tanto sobre bosques nativos (Butin & Peredo, 1967; Butin, 1968; Butin & Aquilar, 1984) como en plantaciones de pino y eucalipto (Osorio, 1985; Peredo & Alonso, 1988; Zhou et al., 2004; Piontelli et al., 2006). Las identificaciones realizadas en los bosques chilenos necesitan una revisión profunda, a la luz de todo el conocimiento generado a partir de aquella época. Argentina posee 3 registros de hongos ‘ofiostomatoides’. Uno corresponde a la descripción de *Raffaelea santoroi* Guerrero, el hongo ambrosial de *Megaplatypus mutatus* (Chapuis), otro a la descripción de *Ophiostoma epigloeum* (Guerrero) de Hoog, creciendo sobre un políporo (Guerrero, 1966; Guerrero, 1971). El tercer registro corresponde a *Sporothrix schenckii*, aislado como resultado de una biopsia en un hospital (Marimon et al. 2006). No existe al momento un estudio detallado de estos hongos en plantaciones y bosques del país.

Ante la ausencia de estudios sobre hongos manchadores en Argentina, la necesidad de revisar los resultados obtenidos en Chile y comparar estos datos con los de otras regiones del mundo, se realizó el presente trabajo con el fin de estimar la diversidad de hongos manchadores de especies forestales nativas y exóticas de la región Patagónica. Asimismo se caracterizó la biología de taxones relacionados a eventos de mortalidad en áreas protegidas y al manchado de trozas en zonas productivas.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los hongos responsables del manchado de la albura y de patologías asociadas, en especies forestales exóticas y nativas en la Patagonia Argentina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar la taxonomía y la diversidad de hongos manchadores en especies forestales nativas de los bosques andino-patagónicos.
- Estudiar la taxonomía y la diversidad de hongos manchadores en especies forestales exóticas de la Patagonia.
- Caracterizar el potencial patogénico de los hongos manchadores coleccionados sobre árboles nativos enfermos.
- Estimar la colonización de la mancha de albura sobre trozas de *Pinus ponderosa* a través del tiempo, para trozas cosechadas en distintas épocas del año.

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Esta tesis está organizada, en tres secciones principales: la INTRODUCCIÓN, los OBJETIVOS y los RESULTADOS Y CONCLUSIONES GENERALES. La exposición detallada del trabajo realizado se presenta en cuatro Capítulos:

- I) El estudio de la taxonomía y de la diversidad de los hongos ofiostomatoides en hospedantes nativos
- II) El estudio de la taxonomía y de la diversidad de los hongos ofiostomatoides en hospedantes exóticos
- III) Los resultados de ensayos a campo para caracterizar la patogenicidad de hongos obtenidos de árboles enfermos
- IV) Los resultados de ensayos a campo para caracterizar la colonización de las manchas en trozas de pino según a) el tiempo transcurrido desde su cosecha y b) la época de apeo

Cada capítulo presenta (1) los antecedentes del problema poniendo en perspectiva el conocimiento actual, (2) las metodologías utilizadas (3) los resultados obtenidos, y (4) la discusión correspondiente a cada problema tratado.

CAPÍTULO I

Taxonomía de los hongos 'ofiostomatoides' en los bosques andino-patagónicos

Introducción

Los ‘hongos ofiostomatoides’ es un término conveniente para referirse a un grupo de ascomicetes (Ascomycota, Sordariomycetes) que comparten similitudes en su morfología, ecología e historia taxonómica (Wingfield et al., 1993; Wingfield et al., 2013a). Este grupo polifilético es considerado un ejemplo de convergencia de caracteres, presumiblemente debido a su co-evolución con artrópodos (De Beer et al., 2013b). Estos hongos incluyen patógenos primarios como *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf. (Brasier, 1991), *Ceratocystis fagacearum* (Bretz) J. Hunt (Kile, 1993), o *Leptographium wageneri* (W.B. Kendr.) M.J. Wingf. (Cobb, 1988) si bien la mayoría de las especies son saprobias, causantes de manchas de albura como *Ophiostoma piliferum* (Fr.) Syd. & P. Syd., *O. piceae* (Münch) Syd. & P. Syd. o *Endoconidiophora coerulescens* (Münch) B.K. Bakshi. Estas últimas ocasionan importantes pérdidas de post-cosecha a nivel mundial, en especial a la industria maderera dedicada a la explotación de especies de rápido crecimiento (Seifert, 1993).

Ceratocystis vs Ophiostoma

La taxonomía del grupo basada exclusivamente en caracteres morfológicos ha constituido un reto, debido al alto grado de convergencia de estos caracteres como adaptación a sus agentes de dispersión. Durante mucho tiempo los dos géneros principales dentro de los hongos ‘ofiostomatoides’, *Ceratocystis* Ellis & Halst. y *Ophiostoma* Syd. & P. Syd., fueron sinonimizados y posteriormente protagonistas de un intenso debate sobre cuál debería representar al grupo (De Beer & Wingfield, 2013a). Sin embargo, diversos estudios morfológicos posteriores sugirieron que los ‘hongos ofiostomatoides’ constituían un grupo

polifilético (de Hoog, 1974; Weijman & De Hoog, 1975), hipótesis confirmada posteriormente gracias a evidencias bioquímicas (Spencer & Gorin, 1971; Jewell, 1974), fisiológicas (Harrington, 1981) y moleculares (Berbee & Taylor, 1992; Hausner et al., 1992; Hausner et al., 1993b; Spatafora & Blackwell, 1994). De esta forma, *Ophiostoma* fue restringido a especies tolerantes a la cicloheximida con conidios cuya pared se construye por deposición apical o difusa (Kirk et al., 2008) dentro del orden Ophiostomatales Benny & Kimbr. *Ceratocystis* fue circunscripto para especies sensibles a la cicloheximida y con conidios cuya pared se construye por deposición en anillo (Minter et al., 1983) dentro del orden Microascales Luttr. ex Benny & R.K. Benj (Zipfel et al., 2006; De Beer & Wingfield, 2013a).

Ceratocystidaceae

La familia Ceratocystidaceae Locq. ex Réblová, W. Gams & Seifert pertenece al orden Microascales junto a otras 3 familias: Microascaceae Luttr. ex Malloch, Halosphaeriaceae E. Müll. & Arx ex Kohlm. y Gondwanamycetaceae Réblová, W. Gams & Seifert (Réblová et al., 2011). La familia Ceratocystidaceae abarca los géneros *Ambrosiella* Brader ex Arx & Hennebert, *Ceratocystis* Ellis & Halst., *Chalaropsis* Peyronel, *Davidsoniella* Z.W. de Beer, T.A. Duong & M.J. Wingf., *Endoconidiophora* Münch, *Huntiella* Z.W. de Beer, T.A. Duong & M.J. Wingf. y *Thielaviopsis* Went. (de Beer et al., 2014). *Chalara* fue circunscripto a especies del orden Leotiales (Leotiomycetes, Pezizomycotina), dado que la especie tipo, *Chalara fusidioides* Corda, está relacionada a este último orden. Otras especies como *C. adiposa* (E.J. Butler) C. Moreau, *C. fagacearum* (Bretz) J. Hunt, *C. major* (T.H. Beyma) C. Moreau y *A. ferruginea* L.R. Batra no están incluidas dentro de estos grandes grupos (Figura 1).

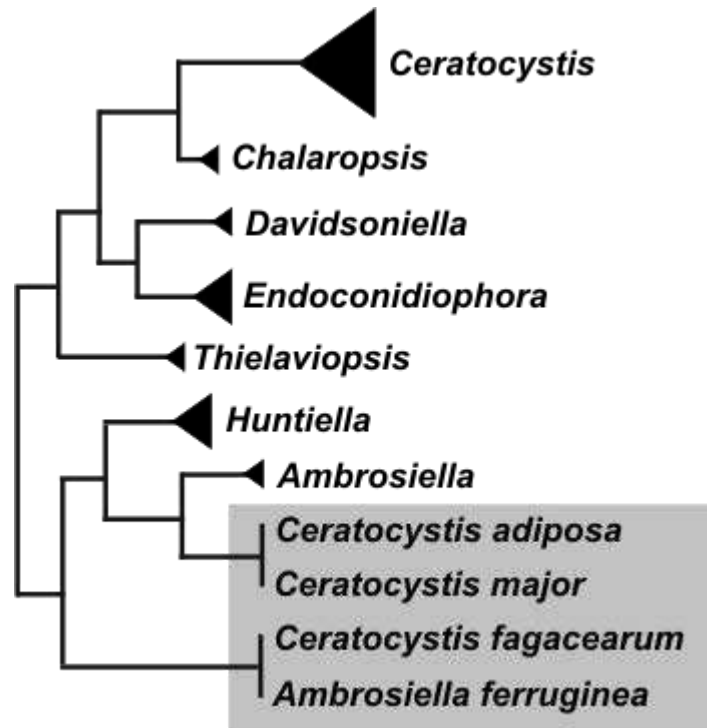


Figura 1. Esquemización de los géneros dentro de Ceratocystidaceae, según de Beer et al. (2014).

Ophiostomataceae

El orden Ophiostomatales estuvo siempre constituido por una sola familia: Ophiostomataceae Benny & Kimbr. Inicialmente incluía a *Ophiostoma* y estados asexuales relacionados. Entre ellos, *Graphium* Corda (sinemas) era una de las fases más frecuentes. Sin embargo, la especie tipo (*Graphium penicillioides* Corda) está filogenéticamente relacionada con *Microascales* Okada et al. (1998), motivo por el cual las especies que producen sinemas y que están emparentadas a los Ophiostomatales fueron transferidas al género *Pesotum* J.L. Crane & Schokn. *Ophiostoma* quedaba vinculado con *Leptographium* Lagerb. & Melin, *Hyalorhinocladiella* Upadhyay & Kendrick, *Pesotum*, *Raffaelea* Arx & Hennebert y *Sporothrix* Hektoen & C.F. Perkins. De Beer & Wingfield (2013), basados en la comparación de secuencias LSU e ITS de 266 taxones, publicaron una filogenia cuyos

resultados generales se esquematizan en la Figura 2. Este estudio identifica a *Ceratocystiopsis*, *Fragosphaeria*, *Graphilbum* Upadhyay & Kendr., y *Raffaelea* s. str. como linajes monofiléticos. *Leptographium* (incluyendo *Grosmannia*) sería polifilético conformado por, al menos, diez complejos de especies diferentes. *Ophiostoma* s.l. abarca los complejos de especies *O. ips*, *O. pluriannuatum* y *O. ulmi*, junto a varios grupos menores. El género *Sporothrix* ha de ser formalmente redefinido para incluir las especies previamente consideradas como el complejo *O. stenoceras/S. schenckii* junto a especies descritas en base a su fase sexual, previamente consideradas en *Ophiostoma* (De Beer & Wingfield, 2013a). Sin embargo algunas especies descritas morfológicamente como *Sporothrix* han sido claramente segregadas en un linaje diferente. El rango taxonómico de estas especies todavía necesita ser revisado, y a lo largo de este estudio nos referiremos a este grupo como el complejo *S. lignivora* (De Beer & Wingfield, 2013a).

Taxonomía del grupo bajo el código de nomenclatura aprobado durante el XVIII Congreso Internacional de Botánica en Melbourne, Australia.

La información emergente de las comparaciones de secuencias de ADN en este y otros grupos no solo ha permitido avanzar en las preguntas taxonómicas, sino que también ha facilitado la conexión entre distintas fases del ciclo de vida de un mismo organismo, previamente considerados organismos diferentes. En el último Congreso Internacional de Botánica realizado en 2011 en Melbourne, Australia, se aprobó el nuevo código de nomenclatura taxonómica (McNeill et al., 2012) que incluye la aplicación de la propuesta conocida como ‘un nombre = un hongo’, según la cual se recomienda utilizar un solo nombre para hongos pleomórficos cuyas diferentes fases poseían nombres distintos. Una

reunión posterior fue convocada en el Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) en Utrecht, Holanda, bajo la consigna ‘un hongo, ¿Cuál nombre?’, surgida de la controversia por la aplicación de la regla en casos concretos. En algunos géneros de hongos ‘ofiostomatoides’ la aplicación inmediata de la regla resultaría en un descalabro dentro de su taxonomía ya que, por ejemplo, *Sporothrix* tiene prioridad frente a *Ophiostoma*, motivando más de 100 combinaciones nuevas y cambios de nombre a especies emblemáticas como *Ophiostoma ulmi* u *O. piliferum*. Para lograr estabilidad y practicidad dentro de la taxonomía del orden Ophiostomatales, De Beer et al (De Beer & Wingfield, 2013a) recomiendan:

(1) Dejar las especies descritas bajo su nombre actual, sin nuevas combinaciones.

(2) Nombrar las especies nuevas del clado *Grosmannia penicillata* con el nombre genérico *Grosmannia*, las del clado *R. sulphurea* bajo *Raffalea* y el resto bajo *Leptographium*.

(3) Dentro de *Ophiostoma* s.l. se recomienda describir nuevas especies bajo *Ophiostoma*.

(4) En todos los casos el nombre debe ser aplicado sin importar si se está describiendo las fases sexuales o asexuales.

En el caso de la familia Ceratocystidaceae no se han enunciado recomendaciones taxonómicas luego de la vigencia, a partir del 2013, de la regla ‘un hongo = un nombre’.

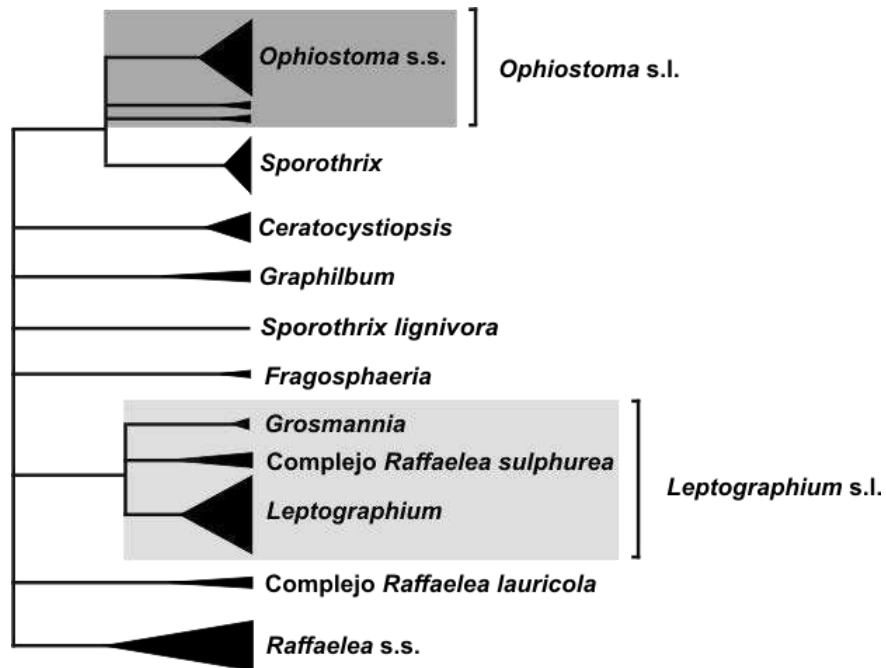


Figura 2. Esquemización de los géneros y complejos de especies principales dentro de la familia Ophiostomataceae (De Beer & Wingfield, 2013a).

Diversidad del grupo en Sudamérica

A lo largo del siglo pasado, los hongos ofiostomatoides fueron ampliamente estudiados en Norteamérica y Europa (Wingfield et al. 1993, Jacobs & Wingfield 2001). En estas dos últimas décadas numerosas especies nuevas han sido descritas sobre árboles nativos y exóticos en África (Roux et al., 2004; Zhou et al., 2006; de Meyer & De Beer, 2008; Kamgan Nkuekam et al., 2008; Grobbelaar et al., 2010; Kamgan Nkuekam et al., 2012; van Wyk et al., 2012), Asia del Este (Kirisits et al., 2013; Masuya et al., 2013; Zhou et al., 2013) y Australasia (Harrington et al., 2001; De Beer et al., 2003b; Kamgan Nkuekam et al., 2011; Thwaites et al., 2013) elevando el número de especies conocidas a más de 390 (De Beer et al., 2013a). En Sudamérica el número de especies reportadas es escaso. Sólo 43 especies han sido registradas (Tablas 1 y 2), de acuerdo a la bibliografía consultada. El

registro de especies citadas para Sudamérica puede llevar a la falsa conclusión de que esta porción del continente no alberga una gran diversidad de estos hongos. Sin embargo, más de la mitad de las especies no han sido reportadas fuera de Sudamérica (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Especies de Microascales reportadas para Sudamérica, resaltando (**negrita**) las especies que solo se conocen para dicha región

Especies	País	Hospedante	Referencia
<i>Ceratocystis adiposa</i> (Hedgcock) Moreau	Brasil	<i>Saccharum</i>	Rev. FONAIAP DIVULGA N°29
	Perú	<i>Saccharum</i>	http://sian.inia.gob.ve
<i>Ceratocystis cacaofunesta</i> Engelbrecht & Harrington	Brasil	<i>Theobroma</i>	(Engelbrecht & Harrington, 2005)*
	Colombia	<i>Theobroma</i>	(Engelbrecht & Harrington, 2005)*
	Ecuador	<i>Theobroma</i>	(Engelbrecht & Harrington, 2005)*
	Trinidad	<i>Theobroma</i>	(Engelbrecht & Harrington, 2005)*
<i>C. colombiana</i> M. van Wyk & M.J. Wingf.	Colombia	<i>Citrus, Coffea</i> <i>Schizolobium</i>	(van Wyk et al., 2010)*
<i>C. curvata</i> M. van Wyk & M.J. Wingf.	Colombia	<i>Eucalyptus</i>	(van Wyk et al., 2011b)*
<i>C. diversiconidia</i> M. van Wyk & M.J. Wingf.	Colombia	<i>Terminalia</i>	(van Wyk et al. 2011b)*
<i>C. ecuadoriana</i> M. van Wyk & M.J. Wingf.	Colombia	<i>Eucalyptus</i>	(van Wyk et al. 2011b)*
<i>C. fimbriata</i> s.l.	Colombia	<i>Citrus, Coffea</i>	(Barnes et al., 2003)*
	Uruguay	<i>Eucalyptus</i>	(Barnes et al., 2003)*
	Brasil	<i>Eucalyptus,</i> <i>Mangifera</i>	(Barnes et al., 2003)* (Ferreira et al., 2010)*
<i>C. fimbratomima</i> M. van Wyk & M.J. Wingf.	Venezuela	<i>Eucalyptus</i>	(van Wyk et al., 2009)*
<i>C. mangicola</i> M. van Wyk & M.J. Wingf.	Brasil	<i>Mangifera</i>	(van Wyk et al., 2011a)*
<i>C. mangivora</i> M. van Wyk & M.J. Wingf.	Brasil	<i>Mangifera</i>	(van Wyk et al., 2011a)*
<i>C. neglecta</i> M. van Wyk, Jol. Roux & C. Rodas	Colombia	<i>Eucalyptus</i>	(Rodas et al., 2008)*
<i>C. papillata</i> M. van Wyk & M.J. Wingf.	Colombia	<i>Schizolobium,</i> <i>Citrus</i>	(van Wyk et al., 2010)*

<i>Theobroma</i>			
<i>Coffea</i>			
<i>H. moniliformis</i> (Hedgc.) C. Moreau (como <i>C. moniliformis</i>)	Ecuador	<i>Schizolobium</i>	(van Wyk et al. 2011b)*
<i>H. sublaevis</i> M. van Wyk & M.J. Wingf. (como <i>C. sublaevis</i>)	Ecuador	<i>Eucalyptus</i>	(van Wyk et al. 2011b)*
<i>Terminalia</i>			
<i>Thielaviopsis basicola</i> (Berk. & Broome) Ferraris	Brasil	<i>Daucus</i>	(Dalbosco et al., 2003)
<i>Th. paradoxa</i> (Dade) C. Moreau	Brasil	<i>Cocos, Elaeis</i>	(Alves & Lourd, 1985) (Warwick & Passos, 2009) (Pinho et al., 2013)*
	Colombia	<i>Elaeis</i>	(Álvarez et al., 2012)*
	Ecuador	<i>Elaeis</i>	(Álvarez et al., 2012)*

* Estudios donde la identificación fue confirmada con estudios moleculares.

Tabla 2. Especies de Ophiostomatales reportadas para Sudamérica, resaltando (**negrita**) las especies que solo se conocen en dicha región

Especies	País	Hospedante	Referencia
<i>Ceratocystiopsis minuta</i> (Siemaszko) Upadhyay & Kendr.	Chile	<i>Pinus radiata</i>	(Zhou et al., 2004)*
<i>Grosmannia radiaticola</i> (J.J. Kim, Seifert & G.H. Kim) Zipfel, Z.W. De Beer & M.J. Wingf. (<i>as G. galeiforme</i>)	Chile	<i>P. radiata</i>	(Zhou et al., 2004)*, (Linnakoski et al., 2012)*
<i>G. huntii</i> (Rob.-Jeffr.) Zipfel, Z.W. De Beer & M.J. Wingf.	Chile	<i>P. radiata</i>	(Zhou et al., 2004)*
<i>Ophiostoma araucariae</i> (Butin) de Hoog & R.J. Scheff.	Chile	<i>Araucaria araucana</i>	(Butin, 1968) (Zipfel et al., 2006)*
<i>O. bragantinum</i> Pfenning & Oberw.	Brasil	Suelo	(Pfenning & Oberwinkler, 1993) (Madrid et al., 2010)*
<i>O. epigloeum</i> (Guerrero) de Hoog	Argentina	Basidioma <i>(Tremella)</i>	(Guerrero, 1971) (Hausner et al., 1993a)*
<i>O. grande</i> Samuels & E. Müll.	Brasil	Ascoma	(Samuels & Müller, 1978)

		(<i>Diatrype</i>)	
<i>O. ips</i> (Rumbold) Nannf.	Chile	<i>P. radiata</i>	(Zhou et al., 2004)*
<i>O. nothofagi</i> (Butin) Rulamort	Chile	<i>Nothofagus</i>	(Butin & Aquilar, 1984)
		<i>alpina,</i>	
	Chile	<i>N. dombeyi</i>	(Billings, 1993)
<i>O. quercus</i> (Georgev.) Nannf.	Brazil	Latifoliada	(De Beer et al., 2003b)*
		nativa	
	Chile	<i>P. radiata</i>	(Zhou et al., 2004)*
	Uruguay	<i>Eucalyptus</i> sp.	(Harrington et al., 2001)*
<i>O. piceae</i> (Münch) Syd. & Syd.	Brazil	<i>Grevillea</i>	(Mendes et al., 1998)
	Chile	<i>Fitzroya</i>	(Butin & Peredo, 1986)
	Chile	<i>Laurelia</i> spp.	(Billings, 1993)
	Chile	<i>N. dombeyi,</i>	(Butin & Aquilar, 1984)
	Chile	<i>N. pumilio</i>	(Billings, 1993)
	Chile	<i>P. elliotii,</i>	(Butin & Peredo, 1986)
	Chile	<i>P. radiata</i>	(Butin & Peredo, 1986)
			(Billings, 1993) (Harrington et al., 2001)*
<i>O. piliferum</i> (Fr.) Syd. & Syd.	Chile	<i>N. pumilio</i>	(Butin & Aquilar, 1984)
			(Billings, 1993)
	Chile	<i>P. radiata</i>	(Osorio, 1985)
<i>O. roraimense</i> Samuels & E. Müll.	Brasil	<i>Diatrype</i>	(Samuels & Müller, 1978)
		ascoma	
<i>O. stenoceras</i> (Robak) Nannf.	Colombia	<i>Eucalyptus</i>	(Andrieu et al., 1971)
		<i>grandis,</i> suelo	(De Beer et al., 2003a)*
	Uruguay	<i>E. globulus</i>	(De Beer et al., 2003a)*
<i>O. triangulosporium</i> Butin	Brasil	<i>A. angustifolia</i>	(Butin, 1978)
			(Hausner & Reid, 2003)*
<i>O. valdivianum</i> (Butin) Rulamort	Chile	<i>N. alpina,</i>	(Butin & Aquilar, 1984)
		<i>N. dombeyi</i>	(Billings, 1993)
<i>Pesotum</i> sp.	Chile	<i>P. radiata</i>	(Peredo & Alonso, 1988)

<i>Raffaelea santoroi</i> Guerrero	Argentina	<i>M. mutatus</i>	(Guerrero, 1966)
		sobre	(Giménez, 2009)
		latifoliadas	(Alfaro et al., 2007)
<i>Sporothrix brasiliensis</i> Marimon , Gené, Cano & Guarro	Brasil	Humano	(Marimon et al., 2007)*
<i>S. dimorphospora</i> (Roxon & S.C. Jong) Marimon, Gené, Cano & Guarro	Chile	Suelo	(Aghayeva et al., 2005)* (Madrid et al., 2010)*
<i>S. globosa</i> Marimon, Cano, Gené, D.A. Sutton, H. Kawas. & Guarro	Brasil	Humano	(de Oliveira et al., 2010)*
	Colombia	Humano	(Madrid et al., 2009)*
<i>S. inflata</i> de Hoog	Chile	Suelo	(de Hoog, 1974)1974 (Aghayeva et al., 2005)*
<i>S. mexicana</i> Marimon , Gené, Cano & Guarro	Brasil	Humano	(Rodriguez et al., 2013)*
<i>S. schenckii</i> Hektoen & C.F. Perkins	Argentina	Humano	(Ishizaki et al., 1998)* (Marimon et al., 2006)*
	Bolivia	Humano	(Marimon et al., 2006)*
	Chile	Humano	(Travassos & Lloyd, 1980)
	Colombia	Human	(Beer-Romero et al., 1989) (Marimon et al., 2006)*
	Peru	Humano	(Geldres et al., 1973) *
	Uruguay	Humano	(Andrieu et al., 1971) (Conti Díaz, 1989)
	Venezuela	Humano	(Beer-Romero et al., 1989) (Madrid et al., 2009)*
<i>Sporothrix</i> sp. (as <i>S. curviconia</i> de Hoog)	Chile	<i>P. radiata</i>	(Peredo & Alonso, 1988) De Beer et al. 2014**
<i>Sporothrix</i> sp.	Chile	<i>N. pumilio</i>	(Billings 1993)
<i>Sporothrix</i> sp.	Chile	<i>P. radiata</i>	(Peredo and Alonso 1998)

* Estudios donde la identificación fue confirmada con estudios moleculares. ** Este reporte de *S. curviconia* ha sido probado incorrecto. De Beer et al. (2014) demostraron que este aislamiento probablemente represente una nueva especie.

Diversidad del grupo en la Patagonia

Los hongos ‘ofiostomatoides’ de los bosques andino-patagónicos fueron solo relevados en la Patagonia chilena, a excepción de un registro en Argentina resultado de un estudio de micromicetes de la región (Sánchez, 2011). En dicho trabajo se reporta *H. moniliformis* (como *C. moniliformis*) sobre *Nothofagus pumilio* en la provincia del Chubut. Los trabajos realizados sobre el bosque nativo de Chile son previos y en una época donde *Ophiostoma* y *Ceratocystis* eran considerados sinónimos. Butin & Aquilar (1984) describieron dos especies sobre *Nothofagus*, *O. valdivianum* (Butin) Rulamort y *O. nothofagi* (Butin) Rulamort, y una sobre *Araucaria araucana* (Molina) Koch: *Ophiostoma araucariae* (Butin) de Hoog & R.J. Scheff. (Butin, 1968). También fue reportada la presencia de *H. moniliformis* en *A. araucana* (Butin & Peredo, 1967), de *O. piceae* sobre *Nothofagus* spp. (Butin & Aquilar, 1984) y *Fitzroya cupressoides* (Mol.) Johnston (Butin & Peredo, 1986), y de *O. piliferum* sobre *N. pumilio* (Butin & Aquilar, 1984). La presencia de *H. moniliformis*, *O. piceae* y *O. piliferum* sobre especies nativas de Chile fue también mencionada por Billings (Billings, 1993). Otros estudios sobre hongos ofiostomatoides en este país se enfocaron sobre *Pinus* y *Eucalyptus* spp. (Osorio, 1985; Peredo & Alonso, 1988; Zhou et al., 2004; Piontelli et al., 2006). No existen estudios de hongos ofiostomatoides en los bosques andino patagónicos de Argentina. Como se mencionó anteriormente, los trabajos previos en los bosques chilenos fueron realizados en una época donde *Ophiostoma* y *Ceratocystis* eran sinónimos. A excepción de *O. araucariae* (Zipfel et al., 2006), no hay datos moleculares de las otras especies que confirmen sus afinidades filogenéticas. Es clara la necesidad de un relevamiento y re-evaluación de los hongos ofiostomatoides en ambos países.

Objetivo

Estudiar la taxonomía de hongos ofiostomatoides en los bosques andino-patagónicos de Argentina.

Materiales y Métodos

Sitios de muestreo

Se relevaron 4 Parques Nacionales (v. gr., Los Alerces, Lago Puelo, Nahuel Huapi y Lanín) sitios en las provincias de Neuquén, Río Negro y Chubut en busca de hongos ofiostomatoides cada otoño de 2009, 2010 y 2011. También fueron relevados 4 sitios en la provincia del Chubut, aprovechados por la industria forestal o bajo aprovechamiento actual, durante las primaveras y veranos del mismo período: Chubut, Dto. Futaleufú, Corcovado (Mallín Grande), Lago Baguillt, Laguna Villarino, y Mina Huemules (Parcela Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco). Adicionalmente se realizó un viaje durante la primavera de 2010 a la Provincia de Tierra del Fuego, Departamento Río Grande, Lago Fagnano. En todos los casos las colecciones fueron realizadas según los permisos solicitados a tal fin a las autoridades correspondientes (ver Anexo II). Los árboles con síntomas de decaimiento, muertos o caídos, y que evidenciaron síntomas de infección de hongos ofiostomatoides, incluyendo decoloración de la madera y la producción de ascomas típicos, fueron incluidos en el muestreo.

Aislamientos

Las muestras de madera afectada coleccionadas fueron llevadas al laboratorio en bolsas plásticas nuevas y sin usar para mantener la humedad. Si presentaban estructuras reproductivas, se realizaban aislamientos mediante la transferencia de las masas de esporas en los ápices de los ascomas/conidias a una placa de Petri conteniendo 2% (p/v) agar malta (AM; 20 g agar, 20 g extracto de malta). Cuando no se encontraban estructuras reproductivas, el tejido vegetal era incubado en cámara húmeda por 5-25 días hasta inducir una esporulación evidente, luego de lo cual se realizaban los aislamientos como fue descrito anteriormente. Se obtuvieron cultivos axénicos mediante la transferencia del ápice de una hifa a otra placa de Petri con AM. Los mismos se encuentran depositados en el cepario del área de Protección del Centro Forestal CIEFAP (CIEFAP). Un subgrupo de aislamientos representativos fue depositado en la colección de cultivos (BAFCcc) y Herbario (BAFC) de la Universidad de Buenos Aires (CABA).

Morfología

Las características morfológicas fueron evaluadas sobre las estructuras formadas en cultivos de AM a los 7, 14 y 21 días, y sobre estructuras reproductivas presentes en el tejido del hospedante. Los cultivos fueron incubados a 25 °C en oscuridad. Los colores de las colonias fueron caracterizados utilizando la tabla de colores de Munsell (Munsell, 1912). Los conidióforos y ascomas fueron montados en portaobjetos con agua destilada, y agua destilada y floxina para su examen al microscopio óptico. Para la descripción de nuevas especies, se realizaron 50 medidas de cada carácter, para cada uno de los especímenes examinados. Los valores promedio (media), desvío estándar (ds), mínimos (min) y

máximos (max) son presentados para cada estructura como: (min-) media menos ds – media más ds (-max).

Extracción de ADN, PCR y secuenciación

El ADN fue extraído de micelio fúngico (100 mg) cultivado en 2 % (p/v) extracto de malta (EM; 20g extracto de malta, DIFCO), incubado durante 2 semanas a 25 °C, utilizando el kit de extracción de ADN Ultraclean® (MoBio, Carlsbad, CA) y siguiendo el protocolo del fabricante. Cuatro regiones fueron amplificadas para su secuenciación y posterior análisis filogenético. Parte del gen 28S de ADN ribosomal (LSU) fue amplificado con los primers LROR y LR5 (Vilgalys, 2013). La secuencia parcial del gen de la subunidad ribosomal pequeña (18S), las secuencias completas del espaciador transcripto interno (ITS1), subunidad ribosomal 5.8S, espaciador transcripto interno (ITS2) y la secuencia parcial de la subunidad ribosomal grande (28S), de aquí en más referido simplemente como ‘ITS’ fue amplificado con los primers ITS1-F e ITS4 (White et al., 1990). La región ITS2-LSU fue amplificada con los primers ITS3 y LR5 (White et al., 1990). Una porción del gen de la β -tubulina (BT2) fue amplificado con los primers Bt2a/Bt2b (O'Donnell & Cigelnik, 1997) y otra porción del mismo gen (BT1) con los primers Bt1a/Bt1b (Glass & Donaldson, 1995). La región correspondiente al factor de elongación 1- α (TEF) fue amplificada con los primers EF1F/EF1R (Jacobs et al., 2004). Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen total de 25 mL, los cuales consistieron de 2.5 mL de Buffer de reacción, 2.5 mM MgCl₂, 200 mM de cada dNTP, 0.2 mM de cada primer, 1 U FastStart Taq ADN Polimerasa (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) y 2 mL de una solución conteniendo ADN genómico diluido. Las amplificaciones fueron realizadas en un

termociclador Eppendorf MasterCyclerH gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemania) con las siguientes condiciones: un paso inicial de desnaturalización a 96 °C durante 2 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 60 s, y una extensión final a 72 °C durante 8 min. La amplificación de los respectivos genes fue confirmada en un gel de agarosa al 2 % (Roche diagnostics, Mannheim, Alemania) suplementado con Gelred™ (Biotium, Hayward, CA). Los productos de reacción fueron purificados mediante el agregado de Exonucleasa I (1.25 U) y Fosfatasa alcalina de camarón (Fermentas Life Sciences, Pittsburgh, PA) para digerir el exceso de primers y dNTPs, bajo una incubación inicial a 37 °C durante 15 min y posterior inactivación de las enzimas a 80 °C durante otros 15 min. Los productos de amplificación ya purificados fueron secuenciados utilizando el kit ‘Big DyeH Terminator 3.1 cycle sequencing premix’ (Applied Biosystems, Foster City, CA) realizando dos reacciones por muestra, una para cada primer. Las condiciones de las PCR de secuenciación consistieron en un paso inicial de desnaturalización a 96 °C durante 2 min, seguido por 35 ciclos, cada uno con un paso de 10 s a 96 °C, 55 °C durante 5 s y luego 2 min a 60 °C. Finalmente se realizó una extensión de 8 min a 72 °C. Los productos de la PCR de secuenciación fueron separados en un ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Todas las secuencias fueron revisadas manualmente y las secuencias consenso se contruyeron con el software MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011).

Análisis filogenético

Se realizaron búsquedas utilizando el algoritmo BLASTn para obtener secuencias similares del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Los números de acceso de estas secuencias

se informan en los árboles filogenéticos correspondientes (Figuras 3-10). Las matrices fueron compiladas utilizando MEGA 5.0.5. Los alineamientos fueron realizados en internet utilizando MAFFT 7 (Katoh, 2013) mediante las estrategias E-INS-i y FFT-NS-i y los parámetros por defecto. Todas las secuencias generadas en este estudio serán depositadas en GenBank, una vez aceptadas las publicaciones de referencia (Tabla 2). Las matrices fueron analizadas utilizando criterios de máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (MV) e inferencia Bayesiana (IB). Los análisis de MP fueron realizados con el software PAUP* 4.0b10 (Sinauer Associates, Sunderland, MA). Se empleó la estrategia de búsqueda heurística utilizando el algoritmo TBR con 10.000 secuencias de adición al azar. Todos los caracteres fueron considerados del mismo peso y los gaps como caracteres faltantes. La robustez de los árboles obtenidos fue evaluada mediante 1.000 réplicas de Bootstrap. Los análisis de MV fueron realizados utilizando el software PhyML 3.0 (Guidon & Gascuel, 2003). Los modelos de sustitución fueron seleccionados utilizando el criterio de información Akaike (CIA) en ModelTest 3.7 (Posada & Crandall, 1998). Los soportes estadísticos para cada nodo fueron estimados mediante 1.000 réplicas de Bootstrap. Para los análisis basados en IB, 4 cadenas MCMC corrieron simultáneamente desde un árbol inicial seleccionado al azar por 1.000.000 generaciones. Los árboles obtenidos eran almacenados en memoria cada 100 generaciones. Los árboles muestreados durante el 'burn in' (15%) fueron descartados, y las probabilidades a posteriori fueron calculadas utilizando la regla de mayoría de un árbol consenso generado mediante la utilización de los árboles restantes (excluido el 'burn in').

Resultados

I Ceratocystidaceae

Colección de muestras y análisis morfológico

Dieciocho aislamientos realizados en especies de *Nothofagus* presentaron características en cultivo, de sus ascomas y de sus estados asexuales típicos de *Ceratocystidaceae* (Tabla 3). Todos los aislamientos presentaron ascomas periteciales robustos con espinas cónicas en su vientre, hifas ostiolares divergentes en el ápice, ascosporas con forma de sombrero y una fase asexual con conidiogénesis por deposición de pared en anillo (“ring wall building”). Estas características son coincidentes con la descripción de las especies de *Huntia*. Dos aislamientos fueron seleccionados para secuenciar la región LSU, y 18 para las regiones ITS y BT1 (Tabla 4).

Comparación de secuencias de ADN

Los aislamientos obtenidos de *Nothofagus* generaron amplicones de 870, 579, 576 y 884 pb para las regiones LSU, ITS, BT1 y EF, respectivamente. Estas secuencias fueron comparadas con secuencias representativas de *Ceratocystidaceae* obtenidas del GenBank y analizadas en 4 matrices diferentes, una para cada región.

Tabla 3. Aislamientos de *Huntiella* obtenidos en el presente estudio (18). Número de aislamiento, hospedante y detalles de colección.

Especie	Aislamiento	Hospedante	Observaciones	
<i>H. decorticans</i> sp. nov.	BAFC4494cc	CIEFAP130	<i>N. pumilio</i>	Acanchadero
<i>H. decorticans</i> sp. nov.	BAFC4488cc	CIEFAP131	<i>N. pumilio</i>	Acanchadero
<i>H. decorticans</i> sp. nov.	BAFC4489cc	CIEFAP179	<i>N. dombeyi</i>	Más de un año en el piso
<i>H. decorticans</i> sp. nov.	BAFC4490cc	CIEFAP293	<i>N. dombeyi</i>	Árbol apeado recientemente
<i>H. decorticans</i> sp. nov.	BAFC4491cc	CIEFAP449	<i>N. dombeyi</i>	Árbol apeado recientemente
<i>H. decorticans</i> sp. nov.	BAFC4492cc	CIEFAP474	<i>N. dombeyi</i>	Árbol enfermo, esc. nitidúlidos y ambrosiales
<i>H. decorticans</i> sp. nov.	BAF4493cc	CIEFAP510	<i>N. pumilio</i>	Árbol enfermo, esc. nitidúlidos y ambrosiales
<i>Huntiella</i> sp1		CIEFAP76	<i>N. dombeyi</i>	Más de un año en el piso
<i>Huntiella</i> sp1		CIEFAP79	<i>N. pumilio</i>	Acanchadero
<i>Huntiella</i> sp1		CIEFAP134	<i>N. pumilio</i>	Acanchadero
<i>Huntiella</i> sp1		CIEFAP139	<i>N. pumilio</i>	Acanchadero
<i>Huntiella</i> sp1		CIEFAP207	<i>N. antarctica</i>	Árbol apeado recientemente
<i>Huntiella</i> sp1		CIEFAP209	<i>N. antarctica</i>	Árbol apeado recientemente
<i>Huntiella</i> sp1		CIEFAP215	<i>N. pumilio</i>	Más de un año en el piso
<i>Huntiella</i> sp1		CIEFAP217	<i>N. dombeyi</i>	Árbol apeado recientemente
<i>Huntiella</i> sp1		CIEFAP250	<i>N. dombeyi</i>	Árbol apeado recientemente
<i>Huntiella</i> sp1		CIEFAP306	<i>N. obliqua</i>	Más de un año en el piso
<i>Huntiella</i> sp2		CIEFAP40	<i>N. obliqua</i>	Árbol apeado recientemente

(*H.*= *Huntiella* *N.*=*Nothofagus*)

Tabla 4. Aislamientos de *Huntiella* de la Patagonia (18), incluidos en los análisis filogenéticos.

Especie	Aislamiento
<i>H. decorticans</i> sp. nov.	BAFC4494cc
<i>H. decorticans</i> sp. nov.	BAFC4488cc
<i>H. decorticans</i> sp. nov.	BAFC4489cc
<i>H. decorticans</i> sp. nov.	BAFC4490cc
<i>H. decorticans</i> sp. nov.	BAFC4491cc
<i>H. decorticans</i> sp. nov.	BAFC4492cc
<i>H. decorticans</i> sp. nov.	BAFC4493cc
<i>Huntiella</i> sp1	CIEFAP76
<i>Huntiella</i> sp1	CIEFAP79cc
<i>Huntiella</i> sp1	CIEFAP134
<i>Huntiella</i> sp1	CIEFAP139
<i>Huntiella</i> sp1	CIEFAP207
<i>Huntiella</i> sp1	CIEFAP209
<i>Huntiella</i> sp1	CIEFAP215
<i>Huntiella</i> sp1	CIEFAP217
<i>Huntiella</i> sp1	CIEFAP250
<i>Huntiella</i> sp1	CIEFAP306
<i>Huntiella</i> sp2	CIEFAP40cc

(*H.*= *Huntiella* *N.*=*Nothofagus*)

LSU

La matriz para la región LSU consistió en 587 caracteres, incluyendo los gaps. Para MP 516 caracteres resultaron no informativos. Fueron obtenidos ochenta y siete árboles de igual longitud (158 pasos), con valores de índice de consistencia (CI) y retención (RI) de 0.59 y 0.86, respectivamente. Para los análisis de MV e IB fue seleccionado un modelo

transicional (TiM3+I+G). Los aislamientos de Argentina (Figura 3, grupo A) están emparentados con las especies de *Huntia* y, junto a *C. fagacearum*, *C. adiposa* y *Ambrosiella* spp., formaron un linaje discreto, bien soportado, diferente de todos los grandes grupos presentes dentro del género. Las topologías de MV, MP e IB resultaron congruentes.

ITS

Luego del alineamiento, la matriz ITS consistió de 418 caracteres incluyendo los gaps (355 caracteres no informativos fueron excluidos para MP). Se obtuvieron 52 árboles de 158 pasos (CI=0.76, RI=0.94). El modelo de sustitución nucleotídica TVM+I+G fue seleccionado para análisis de máxima verosimilitud. Los resultados de la región ITS agruparon todas las cepas de Argentina en un grupo bien definido, cuyo linaje más cercano no pudo ser establecido con certeza. La cepa CIEFAP40 (*Huntia* sp2) queda por fuera del clado principal de las especies argentinas, aunque esta diferenciación carece de soporte estadístico (Figura 3).

BT1 & EF

El alineamiento de las secuencias BT1 produjo una matriz de 525 caracteres (418 no informativos). El árbol más parsimonioso (156 pasos) presentó un índice de consistencia de 0.85 y uno de retención de 0.96. Para los análisis basados en MV e IB fue seleccionado el modelo de sustitución TrN+G. La región BT1 confirmó el agrupamiento de las cepas argentinas en un clado bien diferenciado (Figura 4, grupo A) con excelentes soportes estadísticos. Este grupo evidenció cierta estructura interna, segregando 3 clados diferentes,

dos de ellos con soportes estadísticos aceptables. En cuanto a la región EF la matriz consistió de 379 caracteres, incluyendo los gaps. Mediante el análisis de MP (140 caracteres excluidos) se obtuvo un solo árbol (348 pasos, CI=0.89, RI= 0.97). Un modelo reversible (GTR + G) fue seleccionado para MV e IB. La topología del árbol basado en la región EF respalda los resultados obtenidos con BT1. La secuencia EF correspondiente al aislamiento CIEFAP40 no pudo ser obtenida en distintas oportunidades, razón por la cual no se encuentra en el filograma.

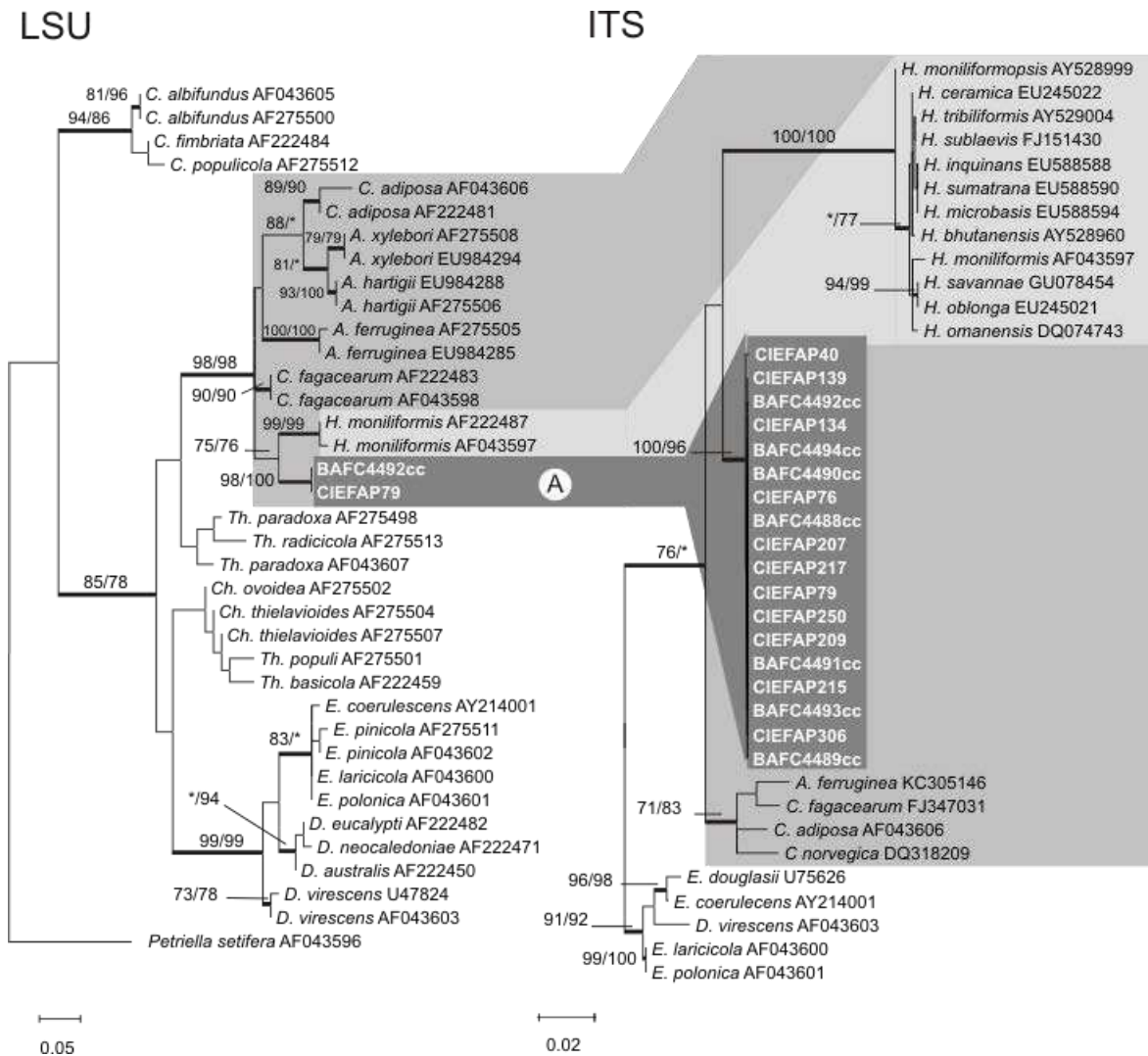


Figura 3. Filogramas obtenidos mediante MV de las regiones LSU e ITS de especies de Ceratocystidaceae (Genbank) y de las especies de la Patagonia (**negrita**). Los valores de bootstrap por encima de 70 están indicados en cada nodo como MP/MV. Las probabilidades a posteriori > 90, están indicadas en cada nodo por líneas gruesas. * = valores de bootstrap < 70. Barra de referencia = diferencia de nucleótidos entre taxones. Grupo A=especies de la Patagonia;

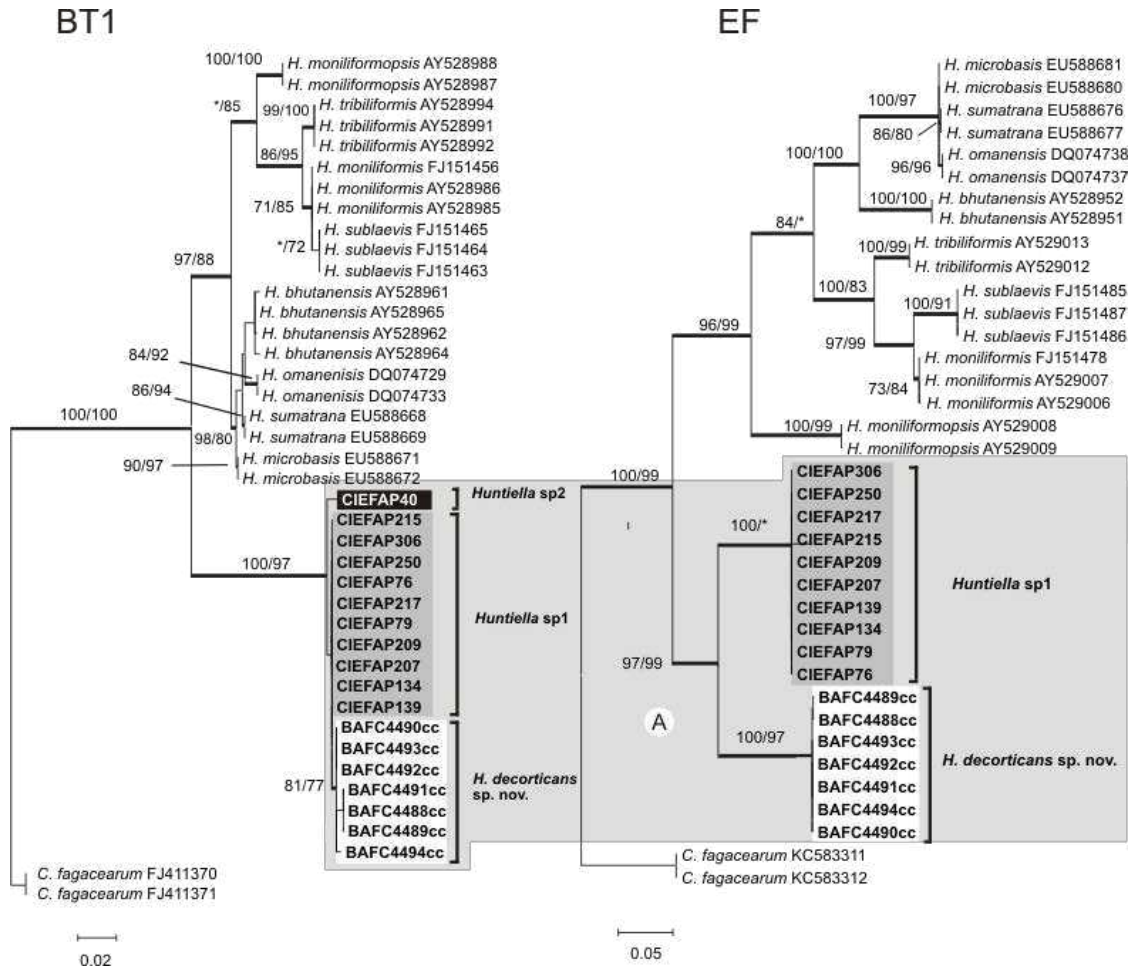


Figura 4. Filogramas (MV) obtenidos mediante la comparación de secuencias de las regiones BT1 y EF de especies de *Huntiella* (Genbank) y de los aislamientos del presente estudio (**negrita**). Los valores de bootstrap por encima de 70 están indicados en cada nodo como MP/MV. Las probabilidades a posteriori > 90, están indicadas en cada nodo por líneas gruesas. * = valores de bootstrap < 70. Barra de referencia = diferencia de nucleótidos entre taxones. Grupo A=especies de la Patagonia.

II Ophiostomataceae

Colección de muestras y análisis morfológico

Se procesaron un total de 364 muestras, de las cuales se obtuvieron 107 aislamientos de hongos ofiostomatoideos que correspondieron a especies de *Ophiostoma*, *Leptographium* y *Sporothrix* (Tabla 5). Noventa y uno fueron asignados a *Ophiostoma*. Éstos produjeron ascomas con ascosporas en forma de gajo de naranja y estados asexuales tipo-*Pesotum* (71 aislamientos) o tipo-*Sporothrix* (17 aislamientos), con excepción de 3 aislamientos que produjeron ascomas con ascosporas más pequeñas, en forma de luna creciente y un estado asexual tipo-*Sporothrix*. Todos estos aislamientos fueron obtenidos de madera manchada de *Nothofagus spp.*, *Schinus patagonicus*, *Tepualia stipularis*, galerías de escarabajos de corteza/ambrosía y escarabajos nitidúlidos. Se obtuvieron 16 aislamientos que no manifestaron su estado sexual en cultivo. Dichos aislamientos fueron identificados como *Sporothrix* (6) y *Leptographium* (10). Todos los aislamientos incluidos en *Sporothrix* y *Leptographium* fueron aislados de galerías de escarabajos ambrosiales en árboles del género *Nothofagus* recién cortados o enfermos.

Ante la imposibilidad de secuenciar la totalidad de las regiones para cada uno de los 107 aislamientos, se realizó una selección incluyendo aislamientos que abarcaran sus diferencias en cultivo, distintos hospedantes y zonas geográficas observadas (Tabla 6). De esta manera 16 aislamientos fueron seleccionados para

realizar los análisis filogenéticos de la región LSU (11 *Ophiostoma*, 3 *Sporothrix* y 2 *Leptographium*), 25 para la región ITS (19 *Ophiostoma*, 3 *Sporothrix* y 3 *Leptographium*) y 18 para la región BT (16 *Ophiostoma*, 2 *Sporothrix*). Además, se secuenciaron los cultivos tipo de *O. novae-zelandiae* (L.J. Hutchison & J. Reid) Rulamort, *S. nothofagi* Gadgill & M.A Dick y *O. valdivianum*, para fines de investigación y comparativos. El material de *O. novae-zelandiae* fue importado según permiso correspondiente (ver Anexo II), mientras que el material restante fue estudiado en el Forest & Agriculture Biotechnology Institute, Universidad de Pretoria, República de Sudáfrica.

Tabla 5. Listado de aislamientos de Argentina y de materiales tipo incluidos en los análisis filogenéticos. Hospedante, detalles de colección, número de aislamientos con las mismas características y número de aislamientos totales obtenidos.

Especies	Hospedante	Detalles de colección	Aislamiento
<i>L. gestamen sp. nov.</i>	<i>N. dombeyi</i>	Galería EA, árbol enfermo	CIEFAP482.2
<i>L. gestamen sp. nov.</i>	<i>N. pumilio</i>	Galería EA, árbol muerto	CIEFAP492
<i>L. gestamen sp. nov.</i>	<i>N. pumilio</i>	Galería EA, árbol muerto	CIEFAP505
<i>O. grandicarpum</i>	<i>N. dombeyi</i>	Madera muerta caída	CIEFAP402
<i>O. nothofagi</i>	<i>N. dombeyi</i>	Madera muerta caída	CIEFAP403
<i>O. nothofagi</i>	<i>N. dombeyi</i>	Madera muerta caída	CIEFAP440
<i>O. nothofagi</i>	<i>N. pumilio</i>	Madera muerta caída	CIEFAP490
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	<i>N. obliqua</i>	Madera caída	CIEFAP447
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	<i>N. pumilio</i>	Escarabajo nitidúlido	CIEFAP514.3
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	<i>N. pumilio</i>	Madera muerta caída	CIEFAP143
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	<i>Sc. patagonicus</i>	Madera muerta caída	CIEFAP513

<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	<i>N. pumilio</i>	Escarabajo nitidúlido	CIEFAP491.2
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	<i>N. pumilio</i>	Madera muerta caída	CIEFAP307
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	<i>N. dombeyi</i>	Árbol enfermo	CIEFAP526
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	<i>N. antarctica</i>	Madera muerta caída	CIEFAP512
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	<i>N. dombeyi</i>	Gal. EA, árbol muerto	CIEFAP482.1
<i>O. quercus</i>	<i>N. dombeyi</i>	Madera muerta caída	CIEFAP266
<i>O. novae-zelandiae</i>	<i>Podocarpus sp.</i>	Material Tipo	UAMH9559
<i>O. novae-zelandiae</i>	<i>N. obliqua</i>	Madera muerta caída	CIEFAP49
<i>O. valdivianum</i>	<i>N. pumilio</i>	Galería EA, árbol muerto	CIEFAP395
<i>O. valdivianum</i>	<i>N. pumilio</i>	Galería EA, árbol muerto	CIEFAP524
<i>O. valdivianum</i>	<i>N. dombeyi</i>	Material tipo	CBS454.83
<i>Ophiostoma sp1</i>	<i>N. dombeyi</i>	Galería EC árbol muerto	CIEFAP464
<i>Ophiostoma sp2</i>	<i>T. stipularis</i>	Madera muerta caída	CIEFAP426
<i>Ophiostoma sp3</i>	<i>N. dombeyi</i>	Madera muerta caída	CIEFAP260
<i>S. cabralii sp. nov.</i>	<i>N. pumilio</i>	Árbol muerto en pie	CIEFAP500
<i>S. cabralii sp. nov.</i>	<i>N. pumilio</i>	Galería EA, árbol muerto	CIEFAP491.1
<i>S. nothofagi</i>	<i>Nothofagus</i>	Material Tipo	NZFS518
<i>Sporothrix sp1</i>	<i>N. pumilio</i>	Galería EA, árbol muerto	CIEFAP469.1

(EA = Escarabajo de ambrosía EC = Escarabajo de corteza, L= *Leptographium* O=*Ophiostoma* S=*Sporothrix* N.= *Nothofagus* Sc. = *Schinus*, T. = *Tepualia*.)

Tabla 6. Aislamientos obtenidos en este estudio y materiales tipo incluidos en los análisis filogenéticos.

Especies	Aislamiento
<i>L. gestamen sp. nov.</i>	CIEFAP482.2
<i>L. gestamen sp. nov.</i>	CIEFAP492
<i>L. gestamen sp. nov.</i>	CIEFAP 505
<i>O. grandicarpum</i>	CIEFAP 402

<i>O. nothofagi</i>	CIEFAP 403
<i>O. nothofagi</i>	CIEFAP 440
<i>O. nothofagi</i>	CIEFAP 490
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	CIEFAP 447
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	CIEFAP 514.3
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	CIEFAP 143
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	CIEFAP 513
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	CIEFAP 491.2
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	CIEFAP 307
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	CIEFAP 526
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	CIEFAP 512
<i>O. patagonicum sp. nov.</i>	CIEFAP 482.1
<i>O. quercus</i>	CIEFAP 266
<i>O. novae-zelandiae</i>	UAMH9559
<i>O. novae-zelandiae</i>	CIEFAP 49
<i>O. valdivianum</i>	CIEFAP 395
<i>O. valdivianum</i>	CIEFAP 524
<i>O. valdivianum</i>	CMW449 = CBS 454.93
<i>Ophiostoma</i> sp1	CIEFAP 464
<i>Ophiostoma</i> sp2	CIEFAP 426
<i>Ophiostoma</i> sp3	CIEFAP 260
<i>S. cabralii sp. nov.</i>	CIEFAP 500
<i>S. cabralii sp. nov.</i>	CIEFAP 491.1
<i>S. nothofagi</i>	CMW37658 = NZFS518
<i>Sporothrix</i> sp1	CIEFAP 469.1

(L= *Leptographium* O=*Ophiostoma* S= *Sporothrix*)

Comparación de secuencias de ADN

LSU

La amplificación para todos los aislamientos resultó en fragmentos de 839 nucleótidos. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con 106 secuencias depositadas en GenBank que representaron todos los grupos dentro de Ophiostomatales de acuerdo con De Beer & Wingfield (2013a). El alineamiento proporcionó una matriz de 453 caracteres incluyendo gaps. Para el análisis de MP, 305 caracteres fueron excluidos. Los árboles más parsimoniosos constaron de 754 pasos (IC=0,32 e IR=0.7). Los análisis de MV e IB fueron realizados asumiendo un modelo transicional (TIM1+I+G) de acuerdo al criterio de información Akaike. Las topologías de los árboles obtenidos bajo MP, MV e IB fueron coincidentes. Uno de los filogramas obtenido mediante MV se esquematiza de forma general en la Figura 5 y, más detalladamente, en las Figuras 6, 7 y 8. Los diferentes análisis mostraron bajo soporte en los nodos basales. Los distintos géneros o complejos de especies están estadísticamente soportados, exceptuando *Leptographium*, *Raffaella* y *Sporothrix*. El análisis de la región LSU posicionó los 6 aislamientos identificados morfológicamente como *Ophiostoma* (CIEFAP514.3, CIEFAP143, CIEFAP464, CIEFAP266, CIEFAP49, CIEFAP426) en 4 grupos diferentes dentro del género *Ophiostoma* s.s (Figura 6, grupos A-D). CIEFAP395 y CIEFAP524 fueron incluidos dentro de *Ophiostoma* s.l., cercanos a *O. nigricarpum* (R.W. Davidson) de Hoog (Figura 6, grupo E). CIEFAP491.1 y CIEFAP500 se ubicaron dentro de *Sporothrix* (Figura 6, grupo F). CIEFAP469.1 se posicionó de forma aislada al igual que *S. lignivora* (Figura 7, grupo G). Los aislamientos CIEFAP402, CIEFAP403 y CIEFAP440 se posicionaron por fuera de los clados principales,

constituyendo linajes propios, si bien su morfología los posicionaba dentro de *Ophiostoma* s.l. (Figura 7, grupo H). La secuencia de un cultivo ex-tipo de *Sporothrix nothofagi* fue incluida en *Leptographium* s.l. (Figura 8, I) al igual que los aislamientos identificados morfológicamente como *Leptographium*: CIEFAP482.2, CIEFAP492, CIEFAP505 (Figura 8, J).

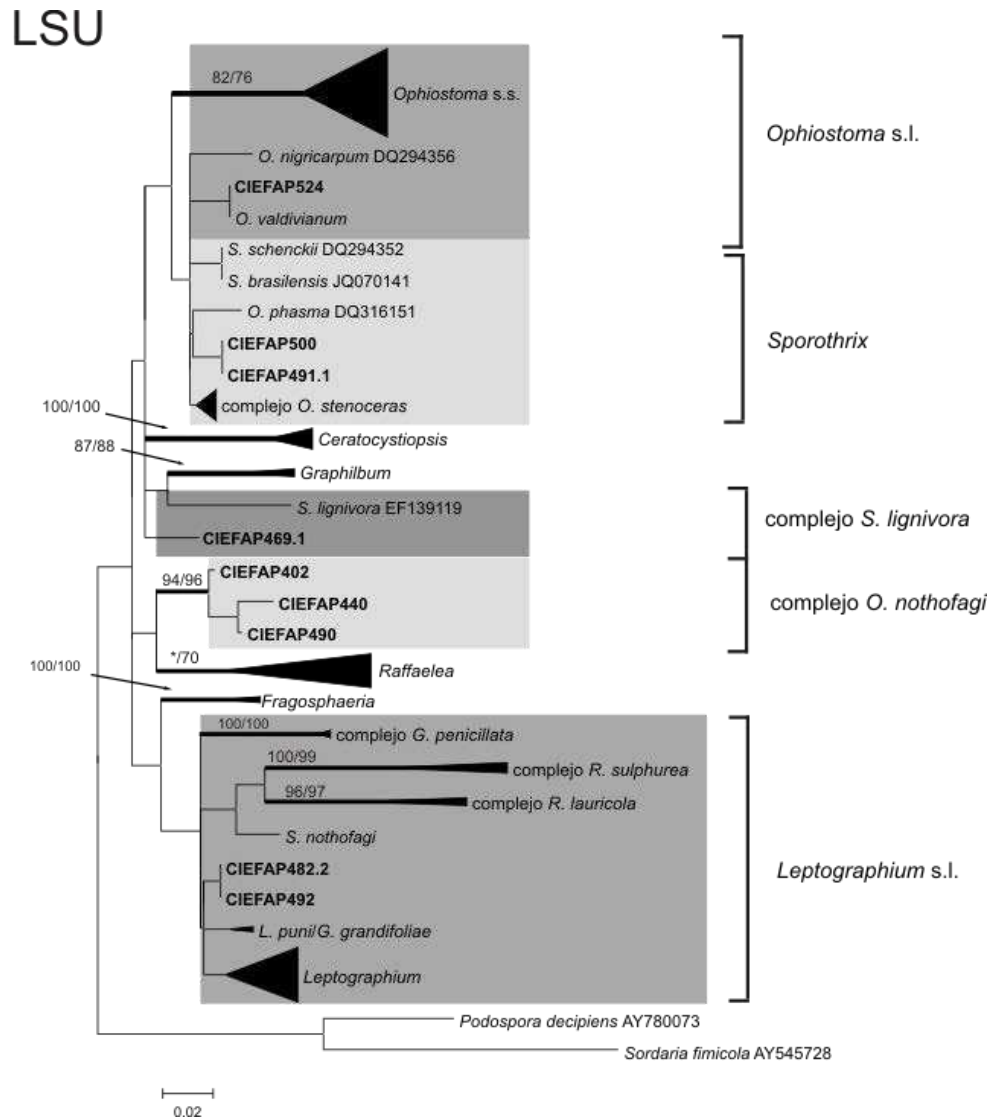


Figura 5. Esquema de uno de los filogramas de máxima verosimilitud del orden Ophiostomatales basados en la región LSU. Los grupos dentro de los recuadros incluyen aislamientos de la Patagonia. O.=*Ophiostoma*, L.=*Leptographium*, G.=*Grosmannia*, S.=*Sporothrix*. Barra de referencia = diferencia nucleotídica total entre los taxones.

LSU

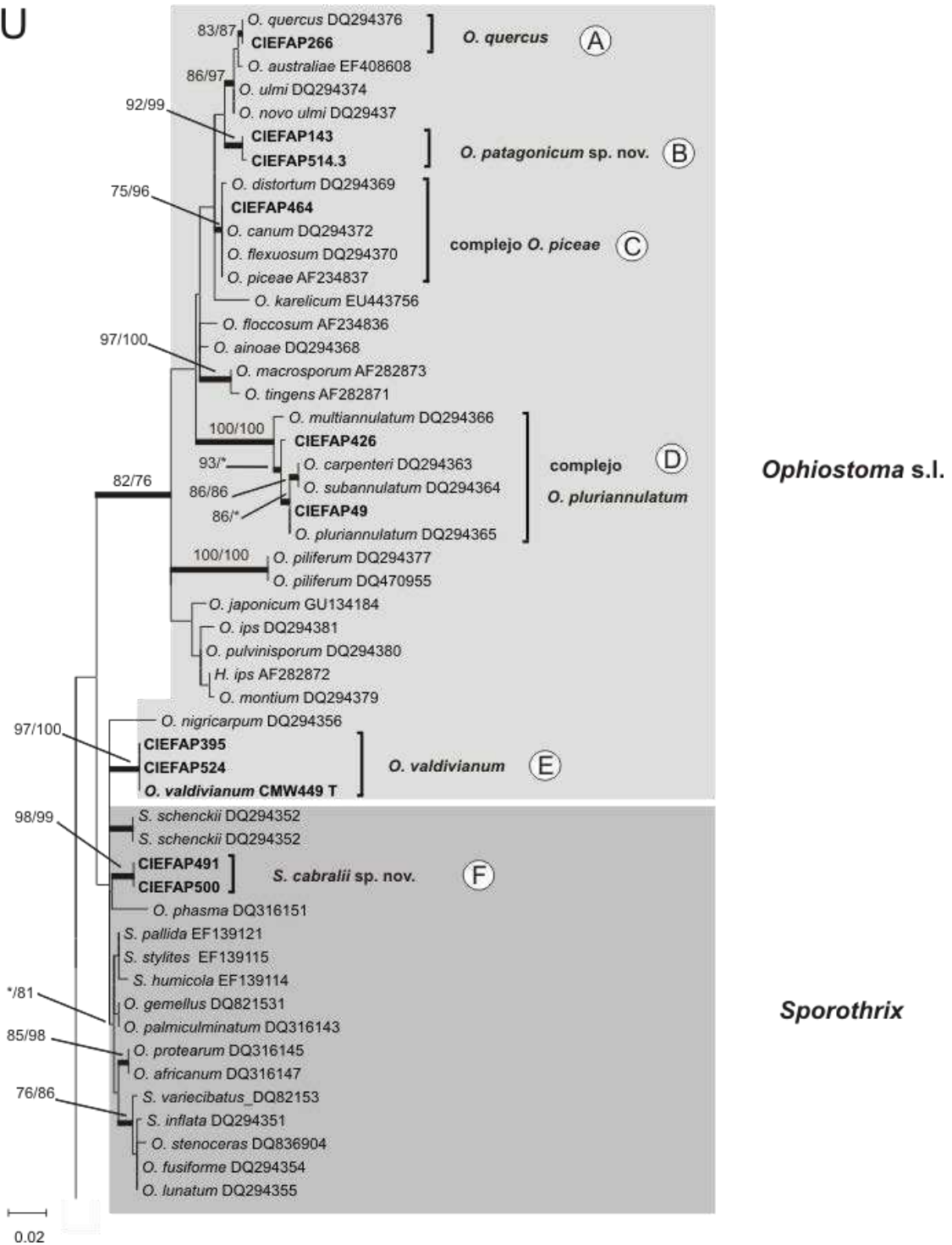


Figura 6. Ophiostomatales. Filograma (MV) de la región LSU. Detalle del tercio superior del árbol de la Figura 3. Los soportes estadísticos >70 están indicados en cada nodo (MP/MV). Valores < 70 indicados como *. Las probabilidades a posteriori >90 están indicadas mediante líneas de trazo grueso. Los nombres en negrita indican secuencias obtenidas en este estudio. Barra=diferencia nucleotídica total entre taxones. O.=*Ophiostoma*, H.=*Hyalorhinocladiella*, S.=*Sporothrix*.

LSU

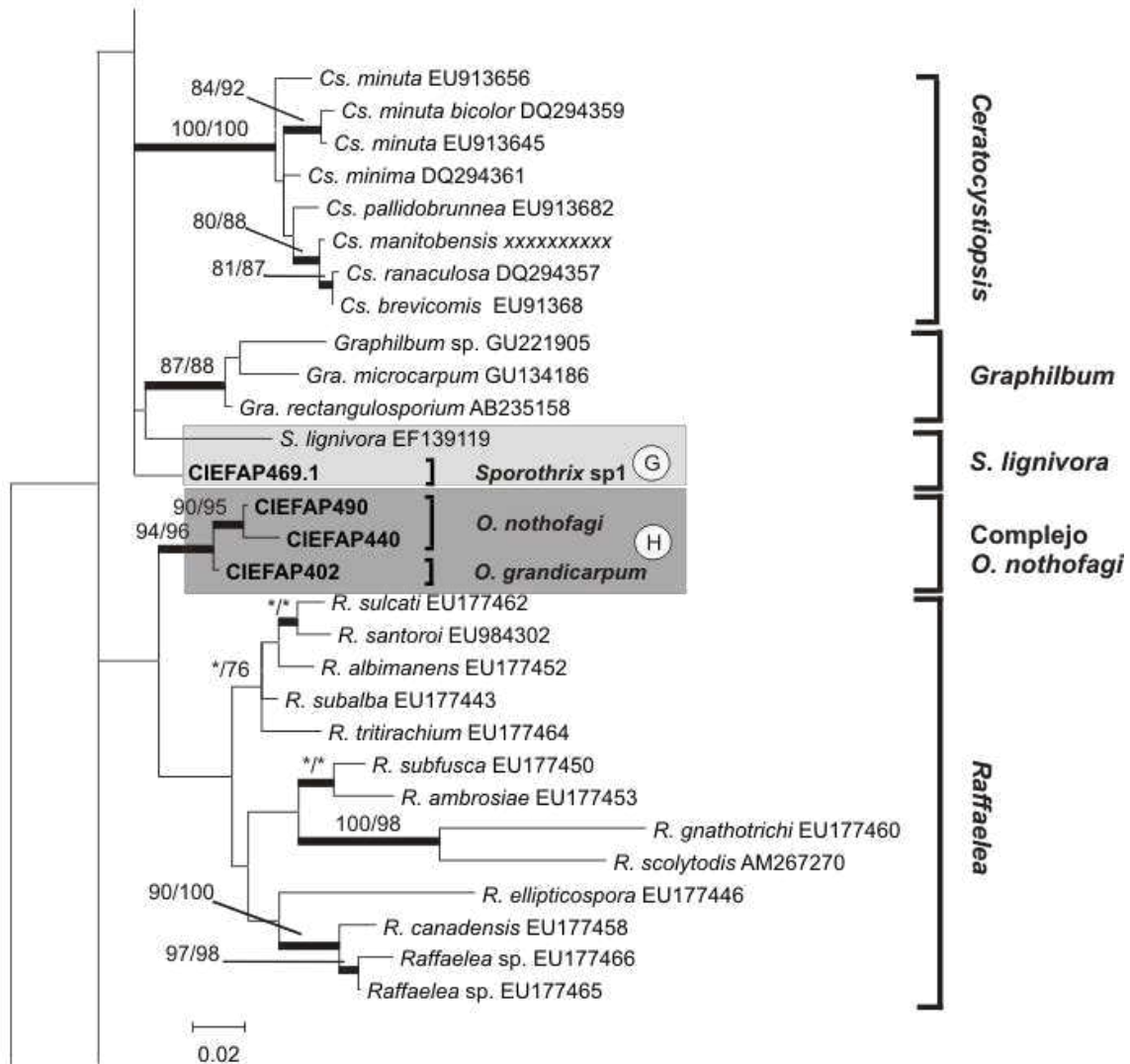


Figura 7. Filogenia (MV) del orden Ophiostomatales basada en la región LSU. Detalle del tercio medio del árbol esquematizado en la Figura 3. Los soportes estadísticos >70 están indicados en cada nodo (MP/MV). Valores < 70 indicados como *. Las probabilidades a posteriori >90 están indicadas mediante líneas de trazo grueso en cada nodo. Los nombres en negrita indican secuencias obtenidas en este estudio. O.=*Ophiostoma*, G.=*Grossmannia*, F.=*Fragosphaeria*, S.=*Sporothrix*. Barra de referencia = diferencia nucleotídica total entre los taxones.

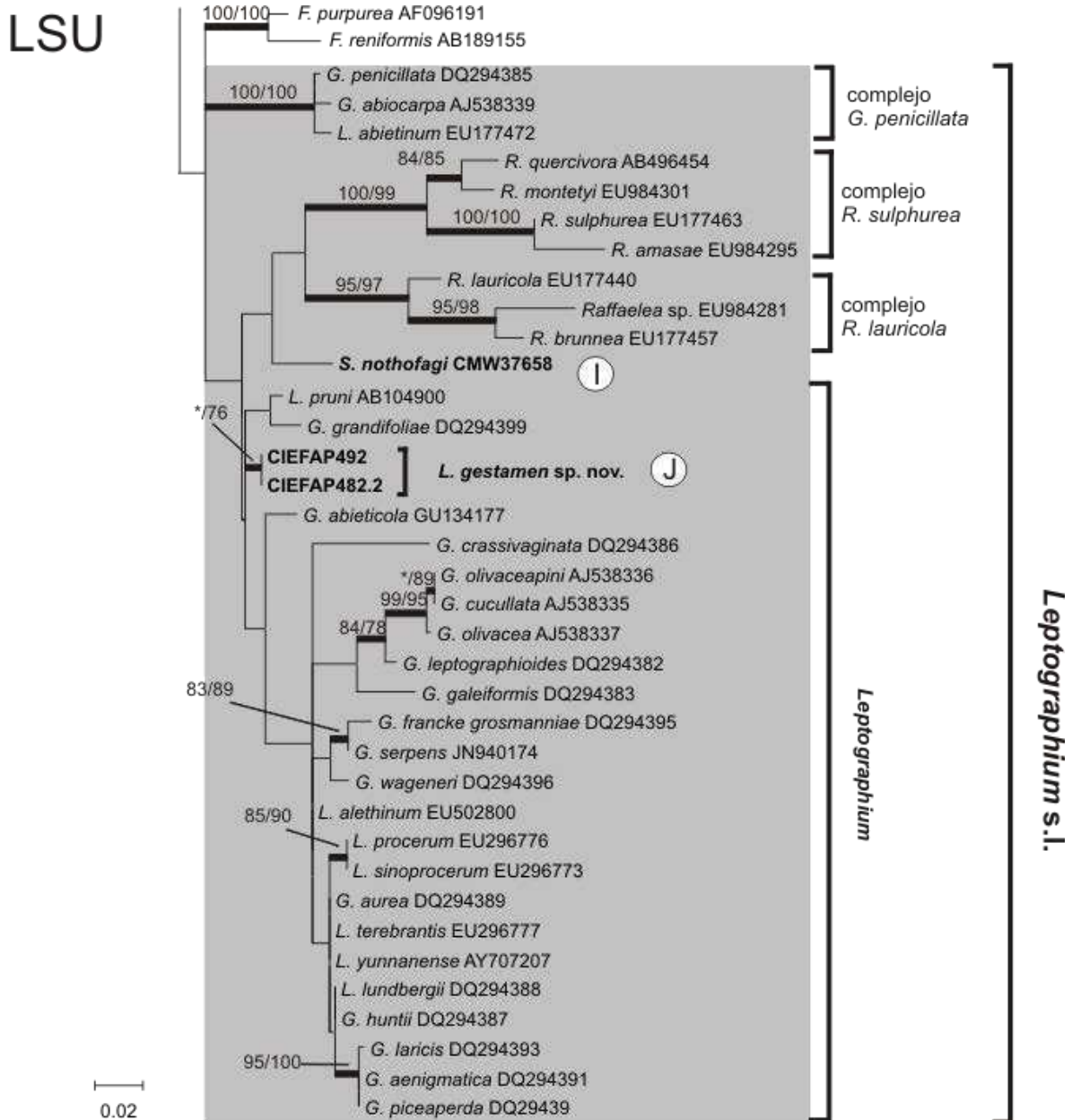


Figura 8. Filogenia del orden Ophiostomatales basada en la región LSU. Detalle del tercio inferior del árbol esquematizado en la Figura 3. Los soportes estadísticos >70 están indicados en cada nodo (MP/MV). Valores < 70 indicados como *. Las probabilidades a posteriori >90 están indicadas mediante líneas de trazo grueso en cada nodo. Los nombres en negrita indican secuencias obtenidas en este estudio. R.=*Raffaelea*, S.=*Sporothrix*. Barra de referencia = diferencia nucleotídica total entre los taxones.

ITS e ITS2-LSU

Las 26 secuencias ITS y ITS2-LSU fueron analizadas en 4 matrices diferentes. Los 15 aislamientos asignados a *Ophiostoma s.s.* generaron fragmentos de 587, 599, 621 y 635 pb. Estas secuencias fueron comparadas con 51 secuencias obtenidas del GenBank (Figura 9). El alineamiento resultó en un total de 757 caracteres seguido por un análisis en PAUP 4.0 (534 caracteres excluidos). Mediante MP se obtuvieron árboles de 790 pasos, IC=0.49 e IR=0.80. Los análisis de MV e IB fueron realizados asumiendo un modelo reversible (GTR+I+G). De forma similar a los resultados de LSU, los aislamientos de Argentina fueron segregados en cuatro grupos dentro de *Ophiostoma*: un aislamiento fue incluido en el grupo de especies cercanas a *O. ulmi* (CIEFAP266, Figura 9 grupo A), 9 aislamientos formaron un clado bien soportado en posición periférica al complejo *O. ulmi* (CIEFAP447-CIEFAP307, Figura 9 grupo B), un aislamiento fue posicionado cerca de *O. piceae* (CIEFAP464, Figura 9 grupo C) y 4 aislamientos fueron incluidos en el complejo de especies *O. pluriannulatum* (CIEFAP49, CIEFAP260, CIEFAP426, UAMH9559, Figura 9 grupo D).

Los aislamientos asignados a *Sporothrix* y a *Ophiostoma s.l.* produjeron fragmentos de 603 y 571 pb, respectivamente. La matriz se construyó con las secuencias obtenidas y 41 secuencias del Genbank. El alineamiento resultó en un total de 723 caracteres. Para MP, 447 caracteres fueron excluidos y los árboles de menor longitud realizaron 903 pasos (IC=0.52 e IR=0.77). Un modelo reversible (GTR+I) fue seleccionado para MV e IB. Los aislamientos CIEFAP395 y CIEFAP524 se posicionaron junto a *O. valdivianum* (Figura 10, grupo E). Los aislamientos CIEFAP500 y CIEFAP491.1 se agruparon de forma independiente, indicando la posibilidad de la existencia de un taxón nuevo (Figura 10,

grupo F). Estos aislamientos se posicionaron cercanos a *O. candidum* Kamgan, Jol. Roux & Z.W. de Beer, *O. proteasedis* Roets, M.J. Wingf. & Z.W. de Beer, *O. palmiculminatum* Roets, M.J. Wingf. & Z.W. de Beer, *O. gemellus* Roets, M.J. de Beer & Crous, *S. styllites* de Mey., Z.W. de Beer & M.J. Wingf., *S. humicola* de Mey., Z.W. de Beer & M.J. Wingf y *S. pallida* (Tubaki) Matsush. con buen soporte estadístico.

La secuencia ITS (632pb) correspondiente al cultivo CIEFAP469.1 fue muy similar a otra disponible en la base de datos, identificada como *Sporothrix* sp, y cercana al complejo *S. lignivora* (Figura 11, grupo G). Otras 3 secuencias, CIEFAP402, CIEFAP403, CIEFAP440 (530 bp), que no fueron incluidas en ninguno de los grandes grupos, presentaron una alta similitud con una secuencia proveniente de un cultivo de *O. grandicarpum* (Kowalski & Butin) Rulamort y, como esta última especie se considera cercana al complejo *S. lignivora* (Wingfield et al. 2013a), fueron las 4 incluidas en esta matriz. El género *Graphilbum* fue utilizado como grupo externo. El alineamiento resultó en un total de 661 caracteres seguido por un análisis en PAUP 4.0 (322 caracteres excluidos). Un total de 810 pasos se observaron en los árboles más cortos (IC=0.39 e IR=0.86). Los análisis de MV e IB fueron realizados asumiendo un modelo reversible (GTR+I+G). El aislamiento CIEFAP469.1 se agrupó junto a *Sporothrix* sp. WRCF-AW9, aislado de *Thuja* en Canadá (Lim et al., 2005) de forma periférica al complejo *S. lignivora* (Figura 11, grupo G). CIEFAP402 se agrupó con *O. grandicarpum* (Kowalski & Butin) Rulamort y ambas secuencias se posicionaron junto a los aislamientos de *O. nothofagi* (CIEFAP403 y CIEFAP440) conformando un clado independiente, cercano al complejo *S. lignivora* (Figura 11, grupo H).

Los 3 aislamientos denominados bajo el nombre *Leptographium* (CIEFAP482/492/505) generaron fragmentos de ITS2-LSU de 699 pb, y sus secuencias correspondientes fueron incluidas en una matriz con 71 secuencias del GenBank (Figura 12, grupo J). Los alineamientos resultaron en un total de 629 caracteres incluyendo gaps, seguido por un análisis en PAUP 4.0 (con 509 caracteres excluidos). Se registraron 43 árboles de igual parsimonia (400 pasos, IC=0.43 e IR=0.88). Los análisis de MV e IB fueron realizados en un modelo transicional (TIM3+I+G). Todos los análisis coincidieron en la separación de 3 clados: el complejo de especies *G. penicillata*, un segundo clado incluyendo *L. pruni* Masuya & M.J. Wingf. y *G. grandifoliae* (R.W. Davidson) M.J. Wingf. y un tercero conformado por el resto de las especies. Los aislamientos argentinos se agruparon dentro del clado de *L. pruni* y *G. grandifoliae* pero de forma independiente y con buen soporte estadístico, siendo distintos de otras especies de *Leptographium/Grosmannia*.

BT2

Los análisis de las secuencias de BT2 fueron realizados para *Ophiostoma* s.s. y para *Sporothrix*, ya que la resolución de las regiones previas no fue suficiente para una identificación a nivel específico. Las secuencias BT2 correspondientes a *Ophiostoma* s.s. fueron analizadas en dos matrices diferentes de acuerdo al arreglo de intrones del gen BT2: -/-/5 para *O. pluriannulatum* y 3/4/- para el resto de las especies. Estas últimas integraron una matriz junto a 60 secuencias descargadas del GenBank. Del alineamiento de 286 caracteres se excluyeron 202 para MP, obteniéndose 27 árboles de 268 pasos (IC=0.54 e IR=0.88). Los análisis de MV e IB fueron realizados asumiendo un modelo transversional

(TVM + G). Se identificó el aislamiento CIEFAP266 como *O. quercus* (Figura 9, grupo A). Estos resultados confirmaron el estatus de los aislamientos cercanos a CIEFAP143 como una nueva especie, *O. patagonicum* sp. nov., emparentada a *O. triangulosporum* Butin (Figura 9, grupo B). CIEFAP464 fue identificado como el mismo que *Ophiostoma* cf. *canum* (CMW29490), correspondiente a una cepa sin describir obtenida de *Scolytus ratzeburgii* Janson (Scolytidae) sobre *Betula* sp. (Linnakoski, 2009) en Noruega (Figura 9, grupo C).

La matriz BT2 para el complejo *O. pluriannulatum* consistió de 4 secuencias obtenidas en el presente estudio y de las 7 disponibles en el GenBank. El alineamiento resultó en un total de 372 caracteres incluyendo gaps, seguido por un análisis en PAUP 4.0 (con 323 caracteres excluidos). Los análisis de MV e IB fueron realizados asumiendo un modelo reversible (GTR+I+G). Lo que hasta el momento era identificado en los análisis previos como grupo 'D' (ver Figura 9) quedó claro que consistía en más de un taxón. El aislamiento CIEFAP49 se agrupó con *O. novae-zelandiae* y los aislamientos CIEFAP260 y CIEFAP426 no se agruparon con ninguna de las especies conocidas, su posición fue inconstante, alternando entre *O. multiannulatum* y *O. subannulatum*.

La matriz de BT2 para *Sporothrix* y *Ophiostoma* s.l. incluyó las secuencias de 4 aislamientos de Argentina, la secuencia del material ex-tipo de *O. valdivianum* y 60 especies del GenBank. Del alineamiento se obtuvieron 387 caracteres incluyendo gaps. Para MP, 211 caracteres fueron excluidos, 72 árboles de mayor e igual parsimonia fueron encontrados (704 pasos, IC=0.49 e IR=0.82). Los análisis de MV e IB fueron realizados asumiendo un modelo 'de 3 parámetros' con frecuencias diferentes (TPM3uf+I+G).

El análisis de la región BT2 indicó que los aislamientos CIEFAP395 y BAFC524 corresponden a la especie *O. valdivianum*, dado que conforman un mismo grupo con casi el 100% de soporte estadístico (Figura 10, grupo E). Este grupo reside dentro de *Ophiostoma* s.l. Por otro lado, los resultados indicaron que las secuencias del cultivo ex-tipo de *O. candidum* están cercanamente emparentadas con la de los aislamientos argentinos CIEFAP500 y CIEFAP491.1. En este caso, sin embargo, éstos aislamientos representan claramente taxones diferentes a *O. candidum* (Figura 10, grupo F).

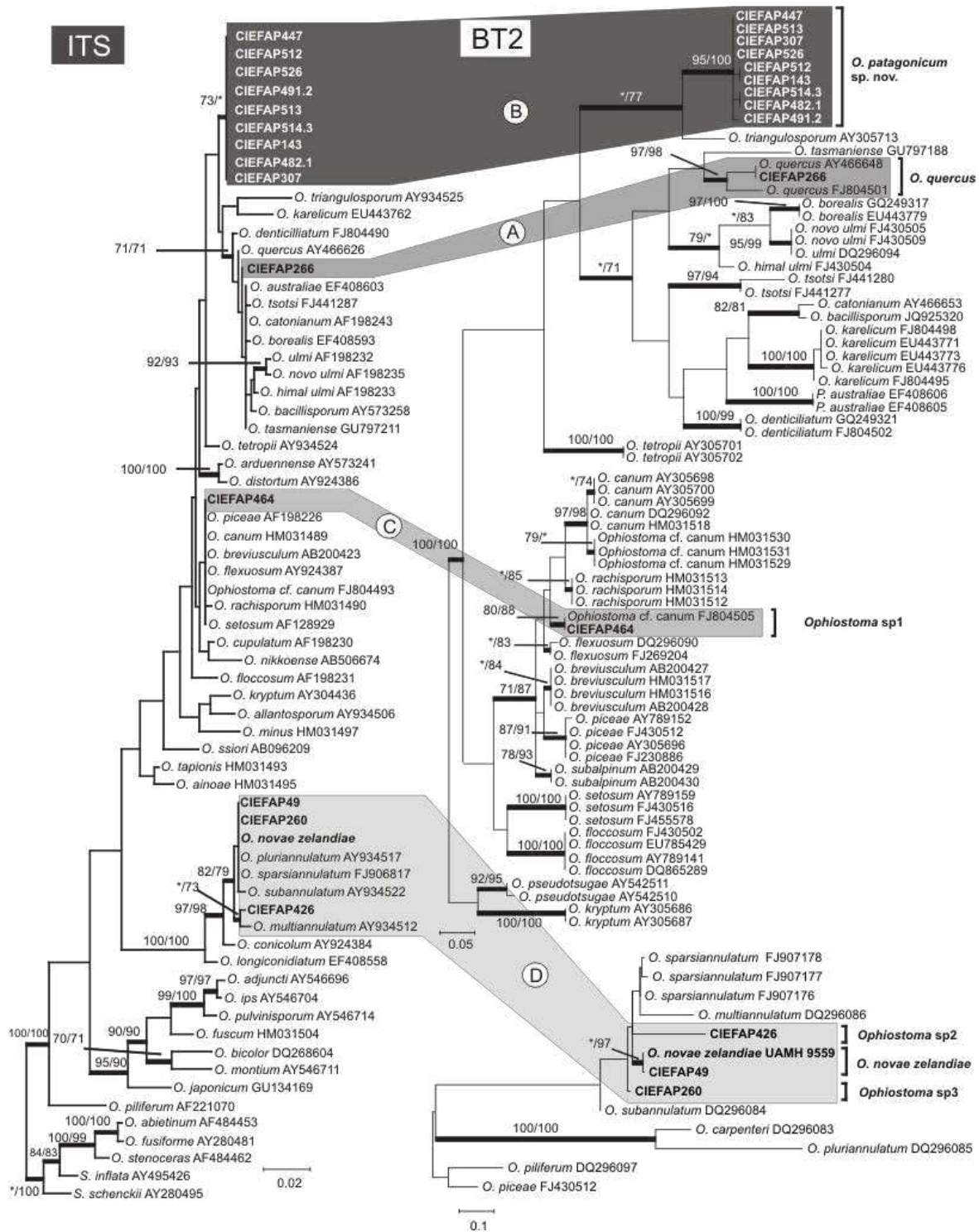


Figura 9. Filogenias de *Ophiostoma s.s* basados en la región ITS y BT2. Los soportes estadísticos >70 están indicados en cada nodo (MP/MV). Valores < 70 indicados como *. Las probabilidades a posteriori >90 están indicadas mediante líneas de trazo grueso en cada nodo. Los nombres en negrita indican secuencias obtenidas en este estudio. O.=*Ophiostoma* S.=*Sporothrix*. Barra de referencia = diferencia nucleotídica total entre los taxones.

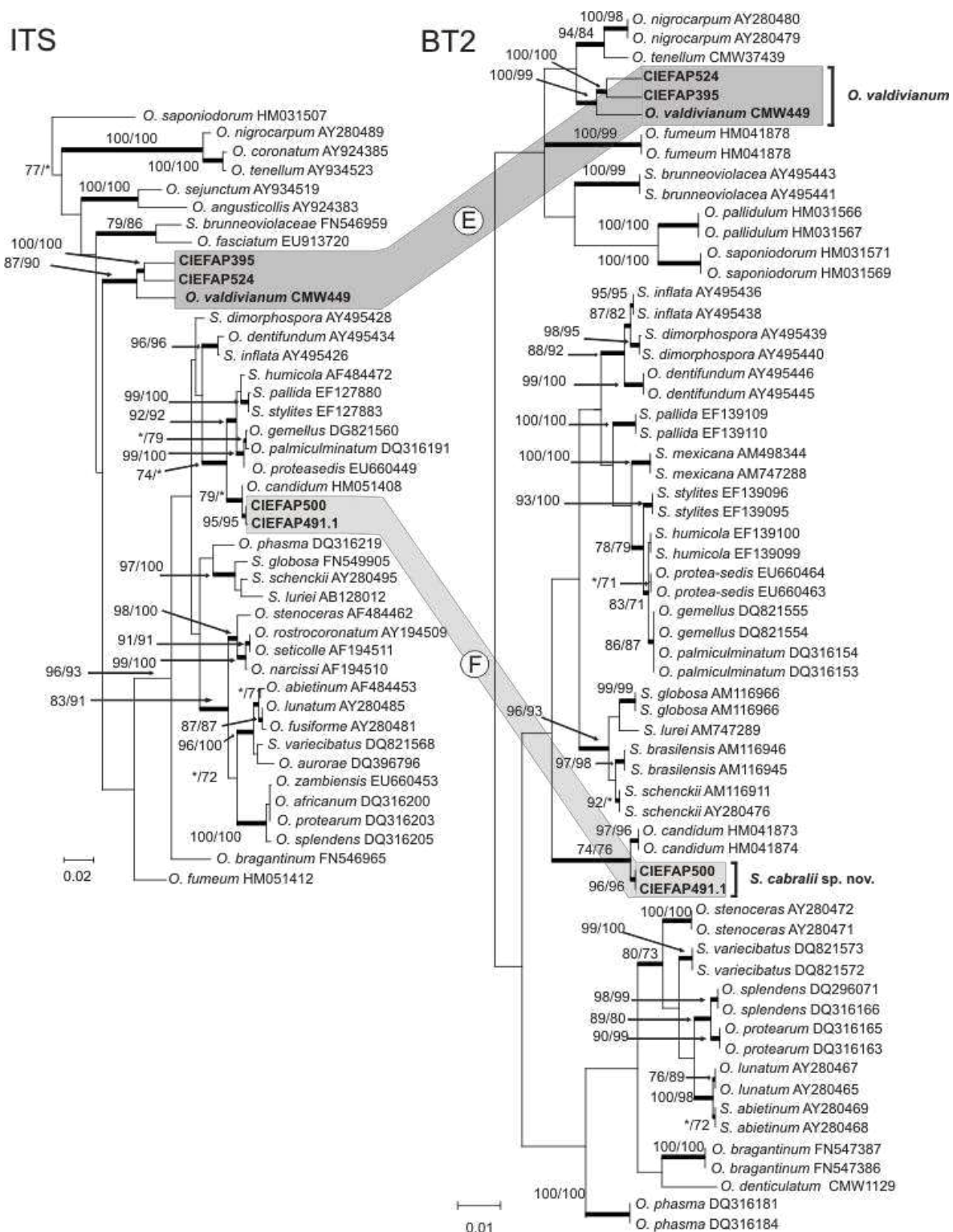


Figura 10. Filogenias de *Sporothrix* basados en la región ITS y BT2. Los soportes estadísticos >70 están indicados en cada nodo (MP/MV). Valores < 70 indicados como *. Las probabilidades a posteriori >90 están indicadas mediante líneas de trazo grueso en cada nodo. Los nombres en negrita indican secuencias obtenidas en este estudio. O.=*Ophiostoma* S.=*Sporothrix*. Barra de referencia = diferencia nucleotídica total entre los taxones.

ITS

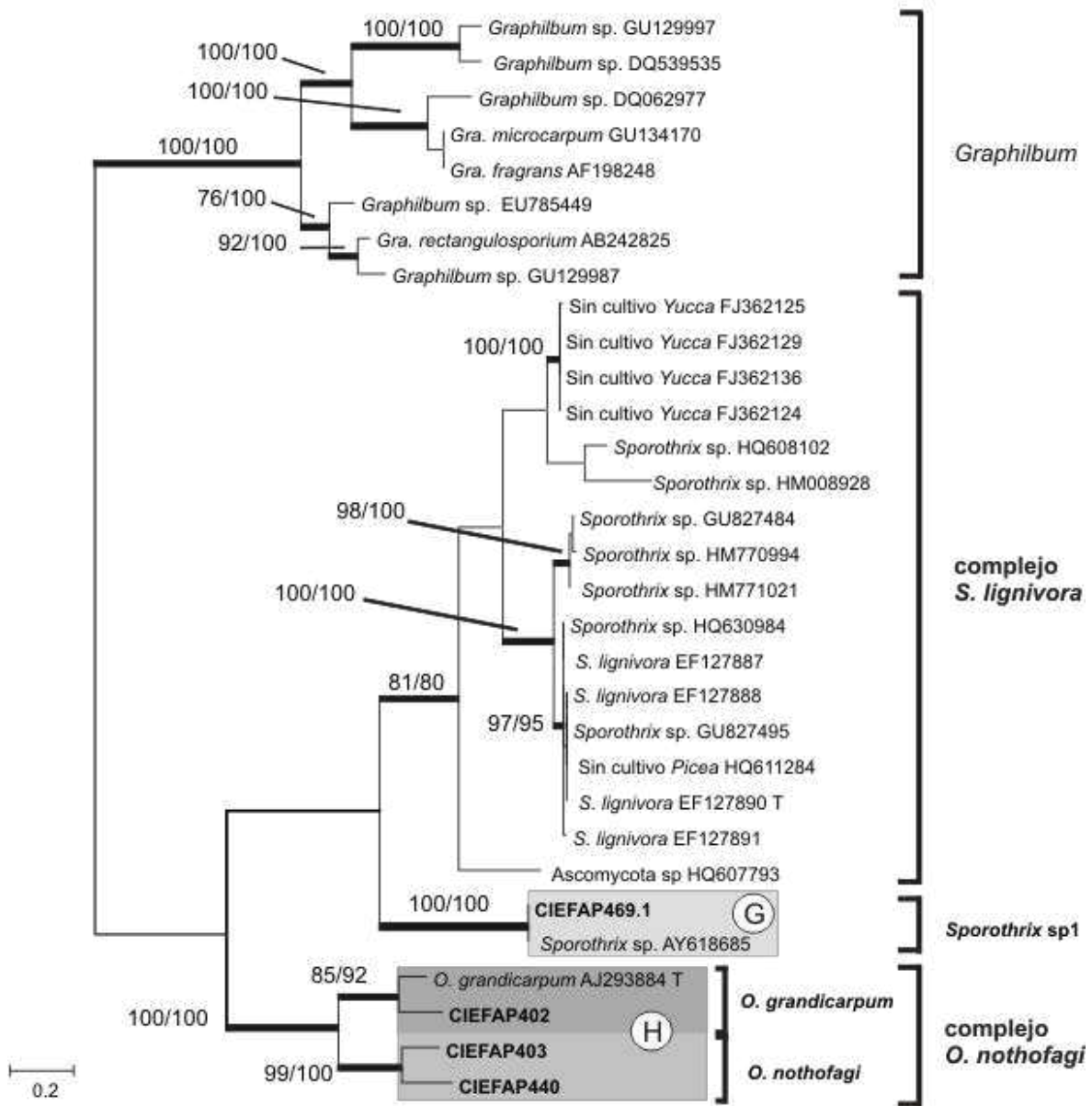


Figura 11. Filogenias basadas en la región ITS (MV) del género *Graphilbum*, el complejo de especies *Sporothrix lignivora* y el complejo *O. nothofagi*. Los soportes estadísticos >70 están indicados en cada nodo (MP/MV). Valores < 70 indicados como *. Las probabilidades a posteriori >90 están indicadas mediante líneas de trazo grueso en cada nodo. Los nombres en negrita indican secuencias obtenidas en este estudio. Gra=*Graphilbum*, O.=*Ophiostoma* S.=*Sporothrix*. Barra de referencia = diferencia nucleotídica total entre los taxones.

ITS2-LSU

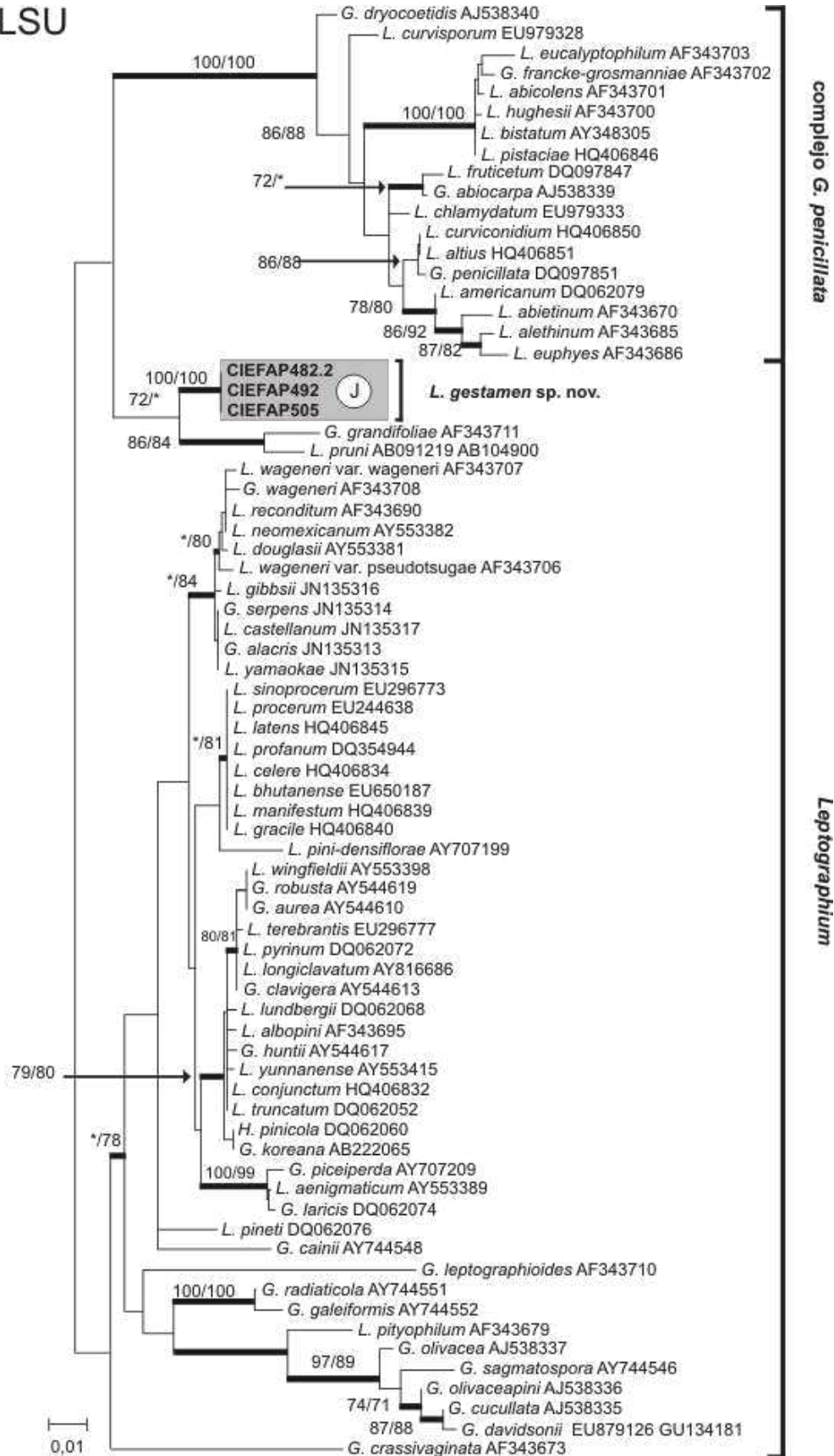


Figura 12. Filogenia de *Leptographium* s.l. basados en la región ITS2-LSU. Los soportes estadísticos >70 están indicados en cada nodo (MP/MV). Valores < 70 indicados como *. Las probabilidades a posteriori >90 están indicadas mediante líneas de trazo grueso en cada nodo. Los nombres en negrita indican secuencias obtenidas en este estudio. G.=*Grosmania*, L.=*Leptographium*. Barra de referencia = diferencia nucleotídica total entre los taxones.

Taxonomía

Ceratocystidaceae

En base a los resultados obtenidos, resultó claro que el conjunto de aislamientos inicialmente identificados como *H. moniliformis* s.l. representan más de un taxón. En la presente sección se detallan las características los taxones identificados, en definitiva, mediante los resultados filogenéticos (Figuras 3 y 4).

Ophiostomataceae

Basados en las genes analizados (Figuras 9-12), los 26 aislamientos de Argentina, fueron asignados a 12 taxones diferentes. Siete son especies de *Ophiostoma* s.l., una es especie de *Leptographium* s.l, otra de *Sporothrix*, una se ubica dentro del complejo de especies *S. lignivora* y las dos últimas (v. gr., *O. grandicarpum* y *O. nothofagi*), no formaron parte de ninguno de los géneros o complejos de especies actualmente aceptados (De Beer & Wingfield, 2013a).

Cinco especies fueron identificadas como *O. grandicarpum* (CIEFAP402), *O. nothofagi* (CIEFAP403/440/490), *O. novae-zelandiae* (CIEFAP49), *O. quercus* (CIEFAP266) y *O. valdivianum* (CIEFAP395/524). Dos aislamientos resultaron idénticos a especies reportadas pero no descritas, una sobre *Thuja* en Canadá (CIEFAP469.1) (Lim et al., 2005) y otra sobre *Betula* en Noruega (CIEFAP464) (Linnakoski, 2009). Los aislamientos CIEFAP260 y CIEFAP426 fueron incluidos en el complejo *O. pluriannulatum*, aunque resultaron diferentes a las especies del grupo conocidas hasta el momento. Estos 4 últimos aislamientos probablemente representan especies nuevas aunque son necesarias más cepas para confirmar su estatus taxonómico y su posición filogenética

dentro de los Ophiostomatales. Por último, 3 especies resultaron ser nuevas para la ciencia, con la suficiente cantidad de aislamientos para ser descritas en el presente trabajo.

Sordariomycetes

Ceratocystidaceae Locq. ex Réblová, W. Gams & Seifert

Huntiella decorticans de Errasti, Z.W. de Beer & Jol. Roux sp. nov.

MB 809115, Holotipo: ARGENTINA, Chubut, P.N. Los Alerces sobre *N. dombeyi*, Nov 2011, A. de Errasti/B. Hurley/J. Roux (CIEFAP474 = BAFC4492cc).

Figuras 13, 14

Etimología: El nombre refiere a la habilidad de este hongo para romper la corteza de su hospedante.

Estado asexual: tipo-thielaviopsis

Descripción: ascoma robusto, superficial. Base del ascoma marrón oscuro a negro, globoso a subgloboso, (260–)283.2–345.1(–410) μm en diám., ornamentado con espinas marrón oscuro, cónicas, de pared gruesa, (–14)19.1–26.4(30–) μm x (5–)6.6–8.9(–10) μm . Cuellos del ascoma marrón oscuro a negro, (490–) 533.4 – 695.2 (–920) μm de largo, (44–) 48.4–52.8 (–56) μm ancho en la base, (16–) 17.7–18.3 (–19) μm ancho en el ápice. En sustrato natural la inserción del cuello en el vientre es central o puede estar desplazada del centro. Hifas ostiolares hialinas, divergentes, (18–)23.5–27.6(–32) μm de long. Ascogonios globosos, evanescentes. Ascosporas acumulándose en gotas pegajosas amarillo pálidas en el ápice del cuello, tornándose ambar en 10-14 días. Ascosporas hialinas, con forma de sombrero en vista lateral, aseptadas, con vaina mucilaginosa, (4–)4.3–5.2(–5.5) x (2.5–)2.7–3.1(–3.5) μm .

Colonias blancas al principio, tornándose grises a negras a los 14 días, con producción de abundante micelio aéreo. Tasa de crecimiento 32 mm de diám. en 7 días. Hifas marrón oscuras, lisas o granuladas, sin constricciones en los septos. Conidióforos solitarios apareciendo directamente del micelio, hialinos a marrón claro, hinchados en la base, truncados hacia la base, (23.2–)45.2–73.8(–92.3) μm largo x (3–) 4.2–7.8 (–8.1) μm ancho en la base, (3–) 3.3–5.3 (–6.8) μm ancho en el ápice. Conidios de dos tipos: conidios primarios hialinos, oblongos, aseptados, producidos en cadenas, (–12) 14.7–17.1 (–19) \times (2.5–)3.4 –4.3 (–5) μm . Conidios secundarios hialinos, doliformes, aseptados, también producidos en cadenas, (4–)7.5– 8.6(–10) x (4)4.2–5.4(–7) μm . Clamidosporas ausentes.

Hospedantes: *Nothofagus pumilio*, *N. dombeyi*.

Distribución: ARGENTINA, región andina, desde Tierra del Fuego a Neuquén.

Habitat: ejemplares coleccionados sobre árbol vivo y también sobre árbol muerto.

Asociados a insectos nitidúlidos y escarabajos ambrosiales (*Gnathotrupes* spp.).

Especímenes adicionales: Tierra del Fuego, Dto. Río Grande, Lago Fagnano sobre *N. pumilio*, Dic 2011, Andrés de Errasti (CIEFAP510=BAFC4493cc). Río Negro, P.N. Nahuel Huapi, Pto Blest sobre *N. dombeyi*, April 2011, A. de Errasti (CIEFAP449 =BAFC4491cc). Neuquén, P.N. Lanín, Lago Correntoso sobre *N. dombeyi*, May 2010, A. de Errasti (CIEFAP293 =BAFC4490cc).

Observaciones: las colecciones fueron obtenidas de árboles con diferentes estados de vitalidad. Los aislamientos BAFC4492cc/BAFC4493cc fueron obtenidos de árboles enfermos con porciones de follaje muerto y ramas secas. Estos árboles presentaron una estructura tipo ‘pressure pad’, galerías de escarabajos ambrosiales y escarabajos nitidúlidos

(Tabla 4, Figura 21). Los ‘pressure pads’ consisten en una gruesa mata de micelio melanizado que se localiza entre el tejido de conducción y la corteza, y que quiebra esta última longitudinalmente al aumentar de tamaño. Por el contrario los aislamientos BAFC4488cc, BAFC4489cc, BAFC4490cc, BAFC4491cc y BAFC4494cc fueron obtenidos de árboles apeados (2) y caídos naturalmente (3). Estos árboles, sin embargo, también presentaron estructuras tipo ‘pressure pad’. Observaciones morfológicas detalladas revelaron que *H. decorticans* presenta ascomas periteciales de base más grande que *H. moniliformopsis* (van Wyk et al., 2004) y espinas de mayor tamaño que *H. inquinans* (Tarigan et al., 2010); estos últimos son, al momento, los taxones con mayores dimensiones de las estructuras mencionadas dentro del género, respectivamente. Exceptuando las bases de los ascomas, el resto de las estructuras morfológicas son muy similares a *H. oblonga*, a no ser por el tamaño de la ascospora, siendo más grande en *C. oblonga* (2-3 x 7-8 μm) que en *H. decorticans* (4.3–5.2 x 2.7-3.1 μm) (Heath et al., 2009). Las características de cultivo de *H. decorticans* fueron similares a *H. oblonga*, *H. moniliformis* y *H. moniliformopsis*, presentando micelio aéreo blanco, el cual se vuelve gris a negro luego de unas semanas, con la presencia de hifas tanto lisas como granuladas. Sin embargo, el crecimiento de *H. decorticans* a 25 °C fue menor que las especies mencionadas (van Wyk et al., 2004; Heath et al., 2009).

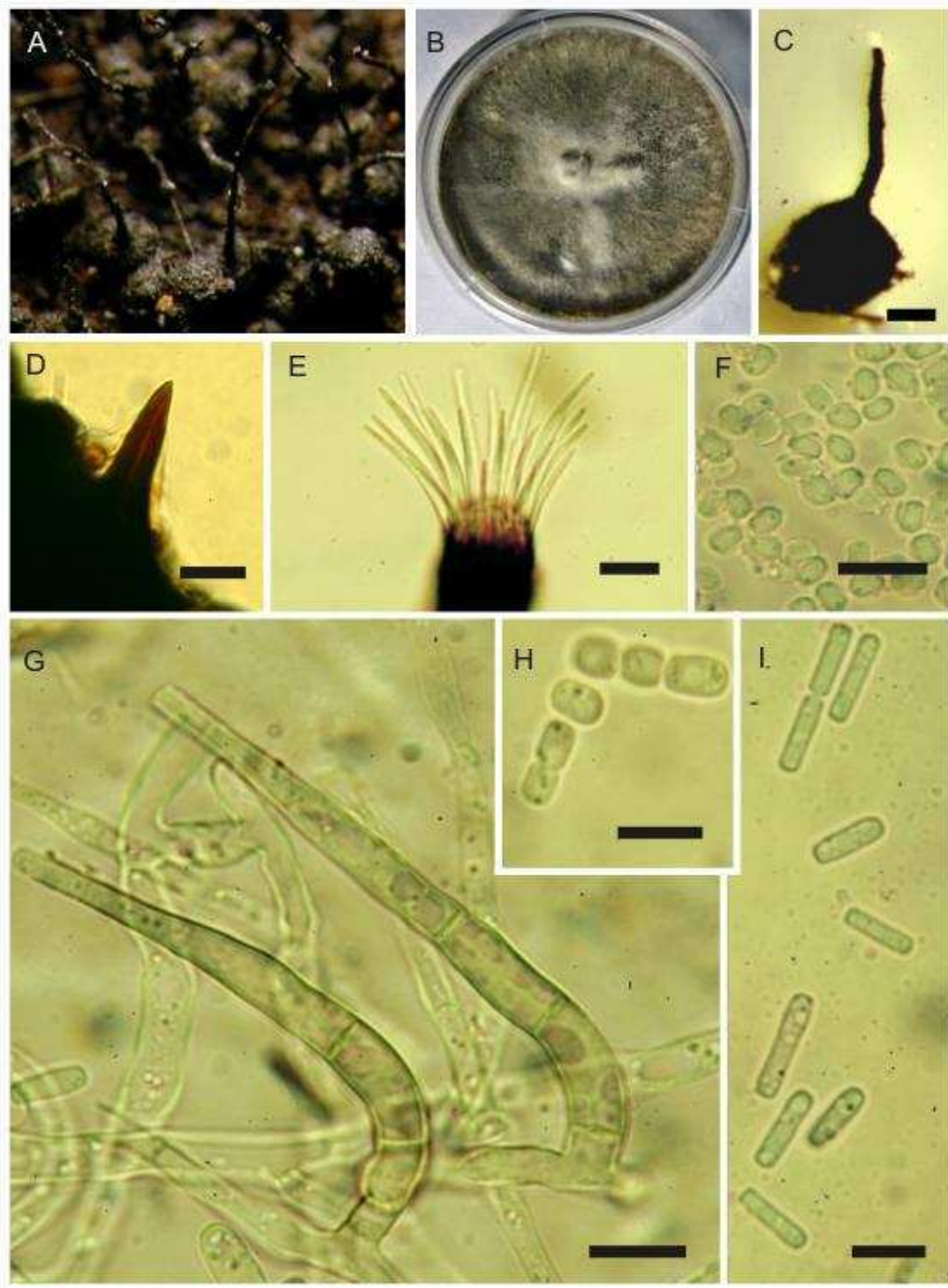


Figura 13. *Huntiella decorticans* sp. nov., características morfológicas del cultivo realizado del Holotipo (CIEFAP474). **A** Ascoma peritecial. **B** Cultivo de 7 días en AM. **C** Cultivo de 14 días en AM. **D** Espinas cónicas. **E** Hifas ostiolares divergentes. **F** Ascosporas. **G** Conidióforo. **H** Conidios doliformes. **I** Conidios cilíndricos. Barras: A = 100 μ m; D, E, F, G, I = 10 μ m; H = 5 μ m.

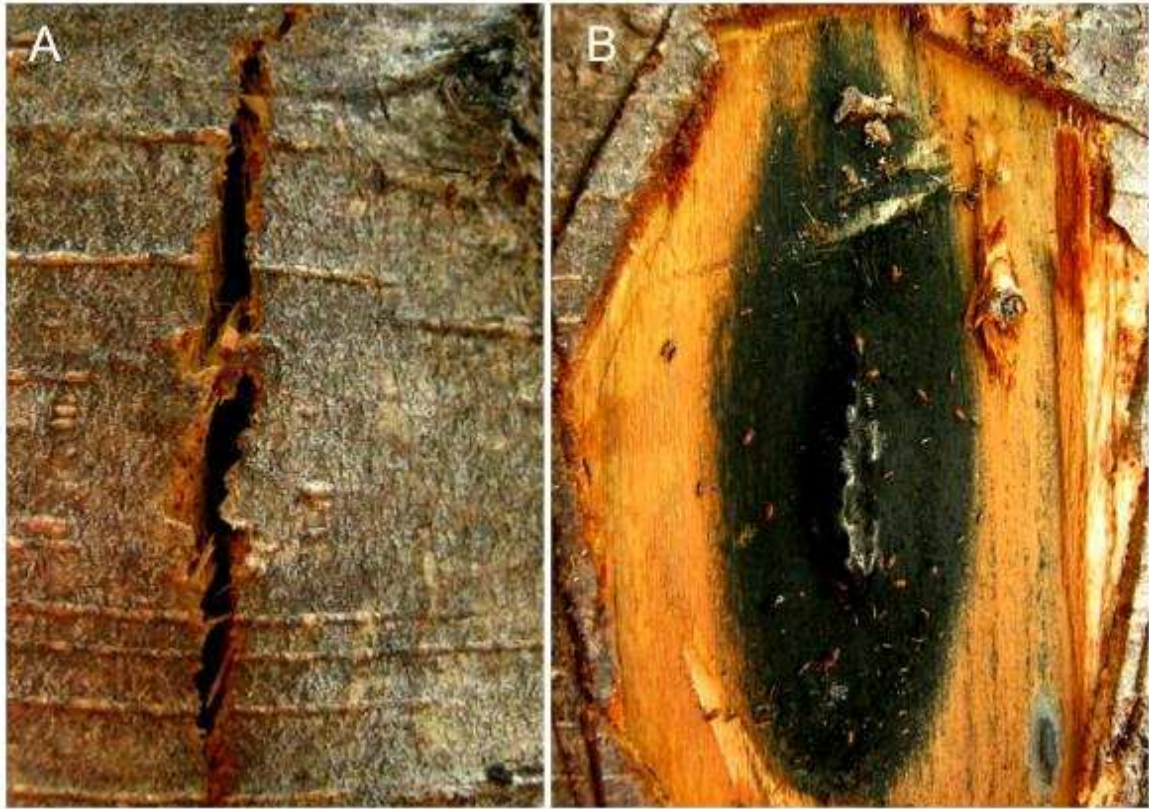


Figura 14. *Huntiella decorticans* sp. nov., Holotipo CIEFAP474, ‘Pressure pad’ sobre *N. dombeyi*. **A** Corteza de árbol enfermo. **B** ‘Pressure pad’ debajo de la corteza infestado con escarabajos nitidúlidos.

***Huntiella* sp1**

Fase asexual: tipo-thielaviopsis

Hospedantes: *Nothofagus pumilio*, *N. dombeyi*, *N. antarctica*.

Distribución: ARGENTINA, región andina de Chubut, Río Negro y Neuquén.

Habitat: esporula por debajo de la corteza y en las caras expuestas de árboles apeados. En algunos casos se encontraron restos de ‘pressure pads’.

Especímenes examinados: ARGENTINA, P.N. Lanín, Lago Lolog, sobre *N. dombeyi*, May 2009, A. de Errasti/M. Rajchenberg (CIEFAP76). Chubut, Dto. Futaleufú,

Cordón Rivadavia, Parcela experimental UNPSJB, sobre *N. pumilio*, May 2009, A. de Errasti (CIEFAP79). Chubut, Dto. Futaleufú, Lago Esperanza, sobre *N. anctartica*, Feb 2010, A. de Errasti (CIEFAP207). Chubut, Dto. Futaleufú, Corcovado, Mallín Grande, sobre *N. pumilio*, Abr 2010, A. de Errasti (CIEFAP217).

Observaciones: Este grupo de aislamientos definidos en base a los resultados de las filogenias moleculares, quedó excluido del clado de *H. decorticans* (Figura 4). No obstante, los cultivos presentaron una morfología que, aunque variable, resultó muy similar a esta especie, prácticamente indistinguible de ella debido al solapamiento de las estructuras. Ello imposibilita la diferenciación morfológica entre ambas.

***Huntiella* sp2**

Estado asexual: tipo-thielaviopsis

Hospedante: *Nothofagus obliqua*.

Distribución: zona cordillerana de la provincia de Neuquén.

Habitat: sobre cara expuesta de un árbol apeado hace más de un año.

Especímenes examinados: ARGENTINA, P.N. Lanín, Lago Lácar, sobre *N. obliqua*, May 2009, A. de Errasti/M. Rajchenberg (CIEFAP40).

Observaciones: Este único aislamiento fue obtenido de *N. obliqua* en Neuquén. Su morfología es idéntica a *Huntiella decorticans* del resto de la Patagonia, pero debido a su segregación en los análisis filogenéticos (Figura 4) es considerada como un taxón diferente.

Ophiostomataceae Nannf.

Leptographium gestamen de Errasti & Z.W. de Beer, sp.nov.

Mycobank MB 814177; Holotipo: ARGENTINA, Chubut, P.N. Los Alerces, sobre *N. dombeyi*, Nov 2011, A. de Errasti/B. Hurley/J. Roux (CIEFAP482.2).

Figura 15

Etimología: del latín ‘gestamen’ cuyo significado es ‘algo llevado sobre el cuerpo’, en referencia a que esta especie es encontrada invariablemente en asociación con escarabajos de ambrosía.

Descripción: conidióforos solitarios, surgiendo directamente del micelio, erectos, macronematosos, (80–)147–203(–235) μm de largo, rizoides basales ausentes. Conidióforo marrón oscuro a pálido, sin constricciones en los septos, cilíndricos, simples, 3-8 septado. Patrón de ramificación tipo A (Jacobs & Wingfield, 2001), con 2 ramificaciones primarias surgiendo del eje principal. Aparato portador de células conidiógenas (28–)33–42(–53) μm de largo, consistente en 3–5 series de ramificaciones. Células conidiógenas discretas 2–3 por rama, cilíndricas, (6.9–)8–11(–13.5) \times (1.5–)1.7–2.1(–3) μm . Conidios aseptados, oblongos con bases truncadas y ápices redondeados, hialinos (2.8–)3.5–4.8(–6) \times (1.2–)1.7–2.6(–3) μm . Micelio superficial y sumergido en el agar. Colonias de crecimiento lento 12 mm de diám. en 7 días a 25 °C en oscuridad. Colonia marrón oliva oscuro 2.5Y 2/0, margen de la colonia efuso. Sin producción de asomas en cultivo. Tampoco observados sobre sustrayo natural.

Hospedantes: *Nothofagus pumilio* y *N. dombeyi*.

Distribución: ARGENTINA, región de los Andes patagónicos, desde Tierra del Fuego a Río Negro.

Habitat: encontrado específicamente en las galerías de escarabajos ambrosiales del género *Gnathotrupes* (Coleoptera: Scolytinae) sobre madera muerta.

Especímenes adicionales: Tierra del Fuego, Dto. Río Grande, Lago Fagnano, sobre *N. pumilio*, Dic 2011, A. de Errasti (CIEFAP492/505). Río Negro, P.N. Nahuel Huapi, Puerto Blest, sobre *N. dombeyi*, May 2010, A. de Errasti/S. Pérez Gorjón (CIEFAP442).

Observaciones: el análisis de la región ITS2-LSU agrupó a *Leptographium gestamen* junto a *L. pruni* y *Grosmannia grandifoliae* (Figura 10). *L. gestamen* se diferencia de *L. pruni* en el patrón de ramificación del conidióforo (Tipo A en *L. gestamen* y Tipo B en *L. pruni*) (Jacobs & Wingfield, 2001), y en pequeñas diferencias en el tamaño del mismo y de los conidios (siendo menores en *L. gestamen*) aunque los rangos de ambas especies se superponen (Masuya et al. 2004). *L. pruni* es particular en tener otra fase asexual tipo-*Sporothrix*, al cual no está presente en la nueva especie. *G. grandifoliae* fue descrita sobre *Fagus* en los EUA (Davidson, 1976) y difiere en la presencia de rizoides en la base del conidióforo y en el patrón de ramificación del mismo (Tipo A en *L. gestamen* y Tipo C en *G. grandifoliae*), aunque los conidios son similares (Jacobs & Wingfield, 2001). Butin & Aquilar (1984) describieron una especie nueva (*O. valdivianum*) la cual producía en cultivo dos estados asexuales diferentes: uno tipo-*Sporothrix* y otro tipo-leptographium (referido como *Verticicladiella* S. Hughes). Este último presenta las mismas características morfológicas que *L. gestamen*. Las secuencias obtenidas del material tipo de *O. valdivianum* no se agrupan con *L. gestamen* y el correspondiente material de herbario de *O. valdivianum* no incluye conidióforos del tipo-leptographium. Por este motivo se considera que ambos materiales corresponden a especies diferentes (ver Discusión).

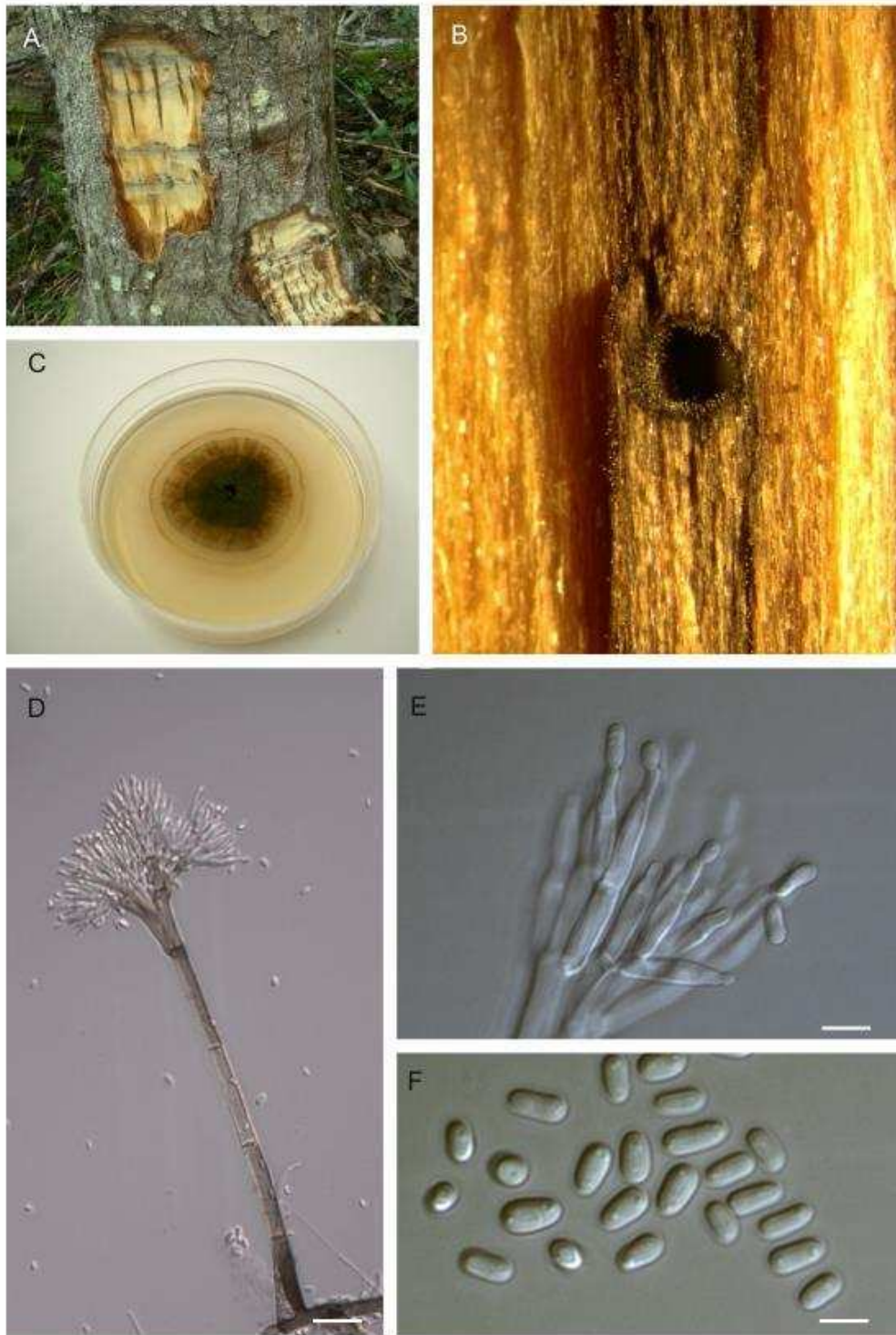


Figura 15. *Leptographium gestamen* sp. nov., características morfológicas (holotipo CIEFAP482.2). **A** Árbol colonizado por *L. gestamen*. **B** Galería de escarabajos de ambrosía producida por *Gnathotrupes* spp. con conidióforos tapizando su interior. **C** Cultivo de 21 días en AM. **D** Conidióforo. **E** Células conidiógenas. **F** Conidios. Barra de referencia, D = 10 μ m; E, F = 5 μ m

Ophiostoma grandicarpum (Kowalski & Butin) Rulamort

Figura 16

Estado asexual: tipo-sporothrix

Descripción: Kowalski T & Butin H (1989) Journal of Phytopathology 124: 243.

Hospedantes: *N. dombeyi*, *Quercus roboris*.

Distribución: ARGENTINA, P.N. Los Alerces. POLONIA, Herby.

Habitat: bajo la corteza de árbol muerto hace 2-3 temporadas, sin presencia de escarabajos.

Especímenes examinados: ARGENTINA, Chubut, P.N. Los Alerces, Lago Rivadavia, sobre *N. dombeyi*, Mar 2011, A. de Errasti/M. Rajchenberg (CIEFAP402).

Observaciones: esta especie se caracteriza por tener ascomas con cuellos que pueden alcanzar hasta 1cm de longitud, los más largos dentro de los Ophiostomatales. Presenta una espora pequeña (3 µm de diám.), con forma de luna en cuarto creciente. Sus colonias son características por presentar poco micelio aéreo, aspecto levaduriforme, melanizándose a los 14/21 días. El crecimiento no supera 1,2 cm en 7 días, sus conidios son alantoides y se observa producción de conidios secundarios. Las únicas especies con ascomas de tales dimensiones son *O. nothofagi* y las del complejo *O. pluriannulatum*. Esta última especie tiene ascosporas en forma de gajo de naranja, conidios obovoides y a menudo presenta engrosamientos a lo largo del cuello. *O. nothofagi* es muy similar a *O. grandicarpum* en cuanto a dimensiones del ascoma, morfología de la ascospora y las características de cultivo, pero es fácilmente diferenciable porque los cuellos del ascoma no atraviesan la corteza.

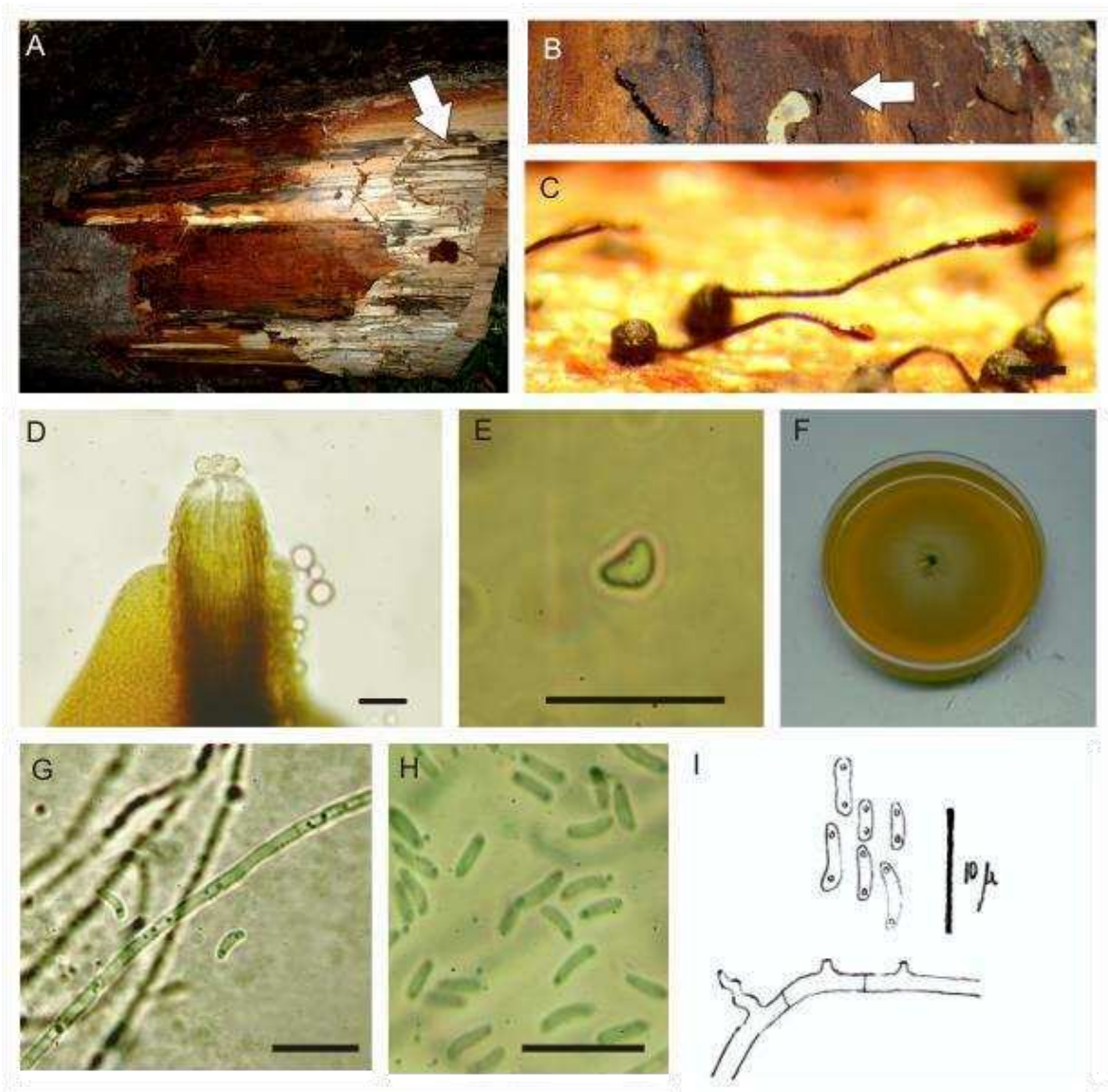


Figura 16. *Ophiostoma grandicarpum*. **A** Árbol con indicios de pudrición blanca incipiente. **B** Galería y larva (flecha) de bupréstido. **C** Ascomas periteciales en sustrato natural. **D**. Apice sin hifas hostiolares. **E** Ascospora. **F** Cultivo 1 mes en AM. **G, H** Conidios alantoides. **I** Esquema de célula conidiógena y conidios. Barra de referencia = 10 µm.

Ophiostoma nothofagi (Butin) Rulamort

Figura 17

Estado asexual: tipo-sporothrix

Descripción: Butin H & Aguilar A (1984) *Phytopathologische Zeitschrift* 109: 84.

Hospedante: *N. dombeyi*, *N. pumilio*.

Habitat: sobre arboles muertos hace más de dos temporadas, pudrición blanca presente, asociado a *Annulohyoxylon bovei*. No asociado a galerías de insectos.

Distribución: ARGENTINA, Tierra del Fuego, Río Negro y Chubut, en las zonas bien húmedas del bosque andino-patagónico; CHILE, X Región, Puyehue, volcán Choshuenco.

Especímenes examinados: ARGENTINA, Chubut, P.N. Los Alerces, Lago Rivadavia, sobre *N. dombeyi*, Mar 2011, A. de Errasti/M. Rajchenberg CIEFAP403. Río Negro, P.N. Nahuel Huapi, Pto. Blest, sobre *N. dombeyi*, Abr 2011 A. de Errasti/S Perez Gorjón (CIEFAP440). Tierra del Fuego, Dto. Río Grande, Lago Fagnano, Reserva Corazón de la Isla, sobre *N. pumilio*, Dic 2011, A. de Errasti (CIEFAP490).

Observaciones: *Ophiostoma nothofagi* es particular en cuanto a sus características en sustrato natural. No hay registros de otros hongos ofiostomatoides que produzcan sus ascomas a través de la corteza, característica que permite la identificación rápida de *O. nothofagi*. Las dimensiones del peritecio solo son igualadas por *O. grandicarpum*. Ambas especies presentan ascosporas pequeñas con forma de luna creciente y conidios alantoides.

Estas dos especies están filogenéticamente emparentadas, y corresponden a un linaje independiente de los 7 grandes grupos dentro del orden. El momento de la sucesión en el

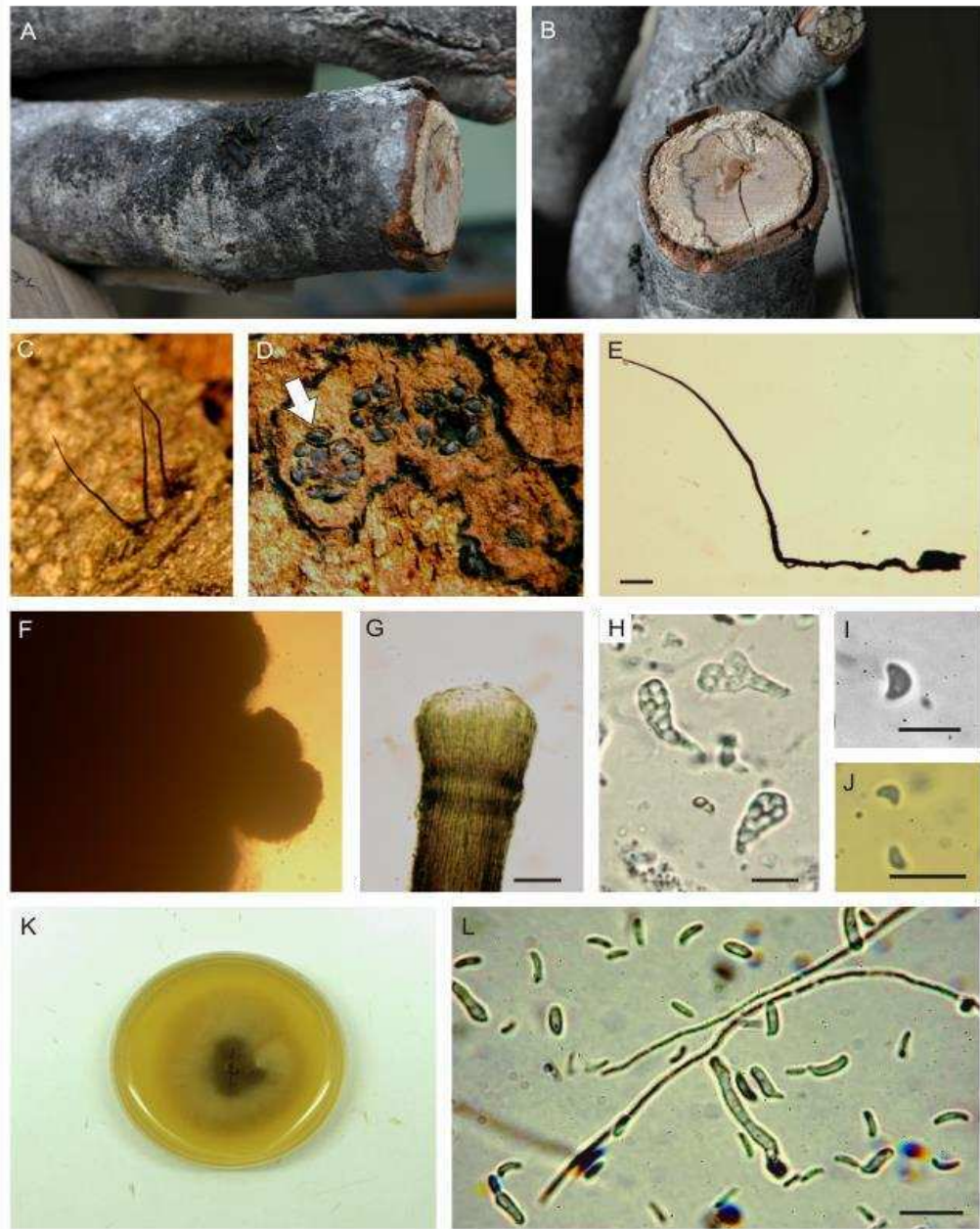


Figura 17. *Ophiostoma nothofagi*. **A** Rama colonizada por *Annulohypoxyton bovei*, *Ameghiniella australis* y *O. nothofagi*. **B** Indicios de pudrición blanca. **C** Cuellos de los ascoma atravesando la corteza mediante aberturas naturales (lenticelas). **D** Disposición de los vientres de los ascoma debajo de la corteza. **E** Ascoma peritecial **F** Protuberancias de la pared del vientre del ascoma. **G** Ápice del ascoma sin hifas ostiolares. **H** Ascoc. **I-J** Ascosporas. **K** Cultivo 1 mes en AM. **L** Células conidiógenas y conidios. Barra de referencia, E = 100 μm ; G, H, I, J, L = 10 μm

cual esporulan y su aparente independencia de los escarabajos de corteza o ambrosía no son características típicas dentro de Ophiostomatales. Estos aspectos quizás justifiquen otorgar a este complejo un rango genérico propio a medida que más especies sean relevadas (ver Discusión).

Ophiostoma novae-zelandiae (Hutchison & J. Reid) Rulamort

Figura 18

Estado asexual: tipo-sporothrix

Descripción: Hutchison LJ & Reid J (1988) Taxonomy of some potential wood-staining fungi from New Zealand 1. Ophiostomataceae. New Zealand Journal of Botany 26:63-81.

Hospedantes: *N. obliqua*, *Podocarpus*.

Distribución: ARGENTINA, área cordillerana de Neuquén; NUEVA ZELANDA, Minginui Urewera National Park.

Habitat: sobre cara expuesta del árbol apeado hace más de un año.

Especímenes examinados: ARGENTINA, Neuquén, P. N. Lanín, Lago Laccar, Nonthue, sobre *N. obliqua*, Mayo 2009, Andrés de Errasti, CIEFAP49.

Observaciones: Esta especie se caracteriza por la producción de engrosamientos en el cuello del ascoma, aspecto que comparte con las especies cercanas a *Ophiostoma pluriannulatum*.

La cepa argentina se ajusta a la definición morfológica de *O. novae-zelandiae*, especie sinonimizada con *O. pluriannulatum* (Thwaites et al. 2005). Los análisis filogenéticos emergentes de este estudio no sustentan la sinonimia y confirman la identificación morfológica de las cepas argentinas como *O. novae-zelandiae*. *O. novae-zelandiae* tiene un arreglo de intrones de BT2 (-/-/5), diferente de *O. pluriannulatum* (3/4/-). La presencia de un estado asexual tipo-pesotum en uno de los cultivos del material tipo

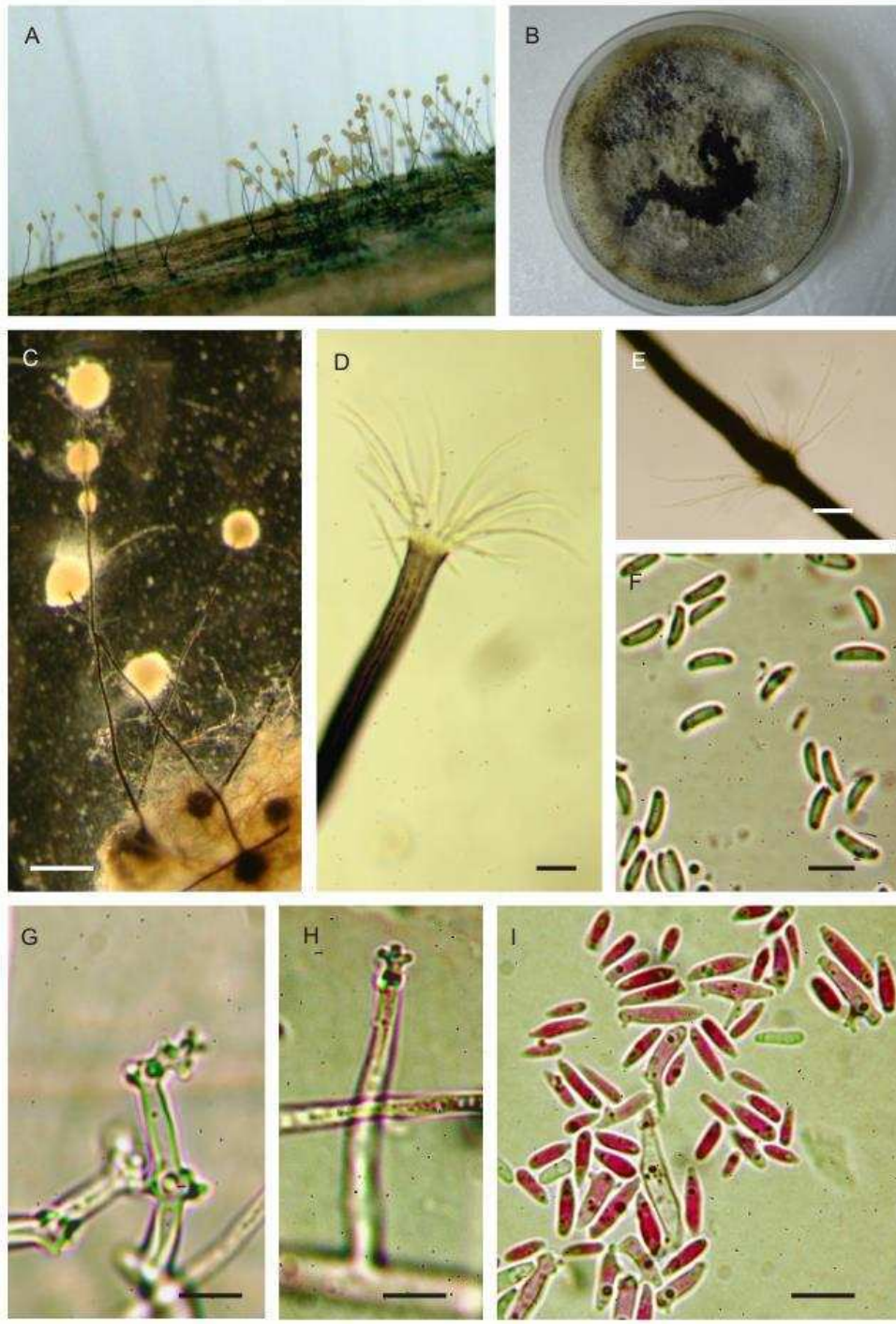


Figura 18. *Ophiostoma novae-zelandiae*. **A** Sobre sustrato natural **B** Cultivo 21 días en AM. **C** Ascomas periteciales con sucesivos engrosamientos a lo largo del cuello. **D** Ápice del ascoma con hifas ostiolares divergentes **E** Engrosamientos a lo largo del cuello del ascoma, también ornamentados. **F** Ascosporas **G, H** Célula conidiógena con denticulos. **I** Conidios. Barra de referencia, C = 100 μm ; D, E, G, H, I = 10 μm ; F = 5 μm .

de *O. noveae-zelandiae* fue interpretado por Thwaites et al. (2005) como una contaminación, y nuestros resultados concuerdan con esa hipótesis. El aislamiento CIEFAP260, identificado como *Ophiostoma* sp3, presentó menor frecuencia de engrosamientos a lo largo del cuello, ascosporas levemente más pequeñas, y en promedio, un cuello de mayor longitud.

Ophiostoma patagonicum de Errasti & Z.W. de Beer, sp. nov.

Mycobank MB 814175; Holotipo: ARGENTINA, Chubut, Dto. Futaleufú, Cordón Rivadavia, parcela experimental Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB), sobre *N. pumilio*, Mayo 2010, Andrés de Errasti (CIEFAP143).

Figura 19

Fases asexuales: tipo-pesotum

Etimología: el epíteto *patagonicum* refiere a la ocurrencia geográfica de esta especie.

Descripción: ascoma desarrollándose luego de 21 días en AM, superficial, parcialmente inmerso en el medio de cultivo. Base oscura, globosa (110–)114–174(–218) μm de diám.; ornamentada con hifas hasta 160 μm de largo. Cuello del ascoma negro (530–)1064–1376(–1655) μm de largo, (23–)30–42(–48) μm de ancho en la base y (8–)10–22(–24) μm de ancho en el ápice. Hifas ostiolares hialinas, divergentes (12–)23–43(–59) μm de largo. Ascosporas no vistos. Ascosporas acumulándose en una masa mucilaginoso blanca en el ápice del ascoma, tornándose amarillo pálido con el tiempo. Ascosporas unicelulares, con forma de gajo de naranja en vista lateral, hialinas (3.3–)4.4–5.2(–5.4) \times (1.3–)1.4–1.8(–2) μm . Estado asexual tipo-pesotum macronematoso, con sinema pigmentado en la base,

(170–)330–480(–595) μm de alto; conidios hialinos, unicelulares, oblongos, (2–)3.1–4.2(–5.5) \times 1–2 μm . Estado asexual tipo-sporothrix también presente. Células conidiógenas formándose directamente de las hifas, o como conidióforo no ramificado, (9–)15.5–27.2(–34) \times 1–1.5 μm ; conidios hialinos, lisos, obovoides (3.5–)3.9–7.1(–11) \times (1.1–)1.4–1.9(–2.1) μm . Conidios secundarios generalmente presentes. Micelio aéreo superficial, y sumergido en el agar. Colonias de crecimiento lento 27mm de diám. en 7 días a 25 °C, blanco 2.5Y 8/0, margen irregular. Zonas tornándose marrón 10YR 4/4 luego de 10 días, coincidiendo con la maduración de los sinemas. Cultivo marrón oscuro (10YR 2/2) luego de 21 días.

Hospedantes: *Nothofagus pumilio*, *N. obliqua*, *N. anctartica*, *N. dombeyi* y *Schinus patagonicus*.

Habitat: hongo oportunista y muy frecuente. Aislado como saprobio sobre árbol muerto, sobre heridas de árbol vivo, y también de coleópteros nitidúlidos.

Distribución: ARGENTINA, región andina desde Tierra del Fuego hasta la provincia de Neuquén.

Especímenes adicionales: Tierra del Fuego, Dto. Río Grande, Lago Fagnano, sobre *N. pumilio*, Dic 2011, Andrés de Errasti (CIEFAP513). Neuquén, P.N. Lanín, Lago Lácar, Nonthué, sobre *N. obliqua*, May 2010, Andrés de Errasti (CIEFAP447). Chubut, P.N. Los Alerces sobre *N. dombeyi*, Nov 2011, A. de Errasti/B. Hurley/J. Roux (CIEFAP482.1).

Observaciones: *Ophiostoma patagonicum* está emparentada a *O. triangulosporum* Butin, y se ubica cercana al complejo *O. ulmi*. *O. triangulosporum* fue aislada en Brasil sobre *Araucaria angustifolia* (Butin 1978), tiene ascosporas con vaina mucilaginosa triangular y una fase asexual tipo-*Raffaelea*. Difiere de *O. patagonicum* y las especies

incluidas en el complejo *O. ulmi* que, en la mayoría de los casos, fueron aisladas de latifoliadas, presentan ascosporas con forma de gajo de naranja carentes de vaina mucilaginosa y sus estados asexuales son tipo-pesotum. Las especies del complejo *O. ulmi* y otras del complejo *O. piceae* (incluyendo a *O. quercus*), son prácticamente indistinguibles en cuanto a su morfología.

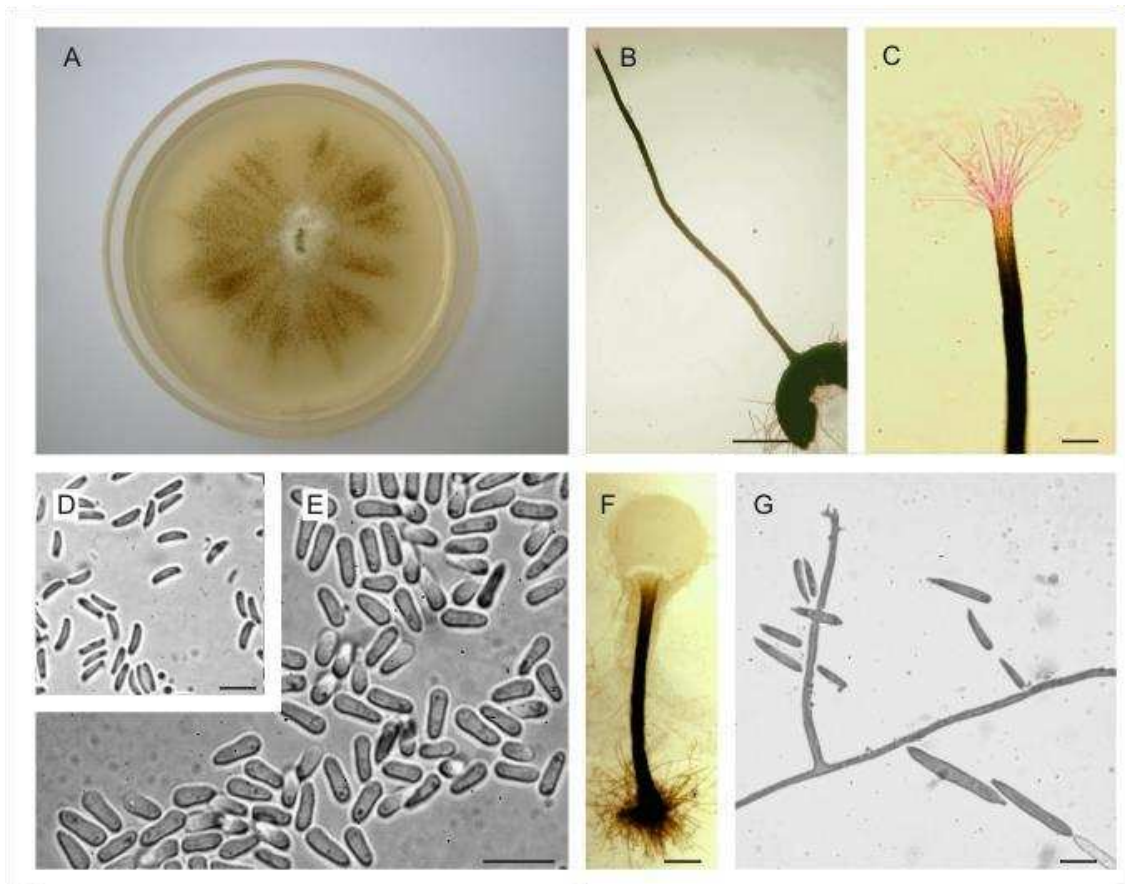


Figura 19. *O. patagonicum* sp. nov., características morfológicas (holotipo CIEFAP143). **A** Cultivo de 14 días en AM. **B** Ascoma peritecial. **C** Hifas ostiolares divergentes. **D** Ascosporas. **E** Conidios. **F** Sinema. **G** Conidióforo tipo-*Sporothrix*. Barra de referencia, B = 100 μ m; D, E, G, I = 5 μ m; C, F = 10 μ m

Ophiostoma quercus (Georgev.) Nannf.

Figura 20

Estados asexuales: tipo-pesotum

Descripción: Harrington TC et al. (2001) Mycologia 93: 111-136.

Hospedantes: *N. dombeyi*, *Fagus*, *Quercus*, *Castanea*, *Eucalyptus*.

Distribución: Cosmopolita.

Habitat: sobre cara expuesta de árbol apeado hace 2 años, aproximadamente.

Especímenes examinados: ARGENTINA, Dto. Bariloche, Río Negro, El Bolsón, Pasarela Río Azul, sobre *N. dombeyi*, Mayo 2010, Andrés de Errasti (CIEFAP266).

Observaciones: esta especie cosmopolita es reportada mayormente sobre latifoliadas. Su morfología incluye ascomas estilizados, de cuello largo, con hifas ostiolares divergentes. Sus ascosporas son en forma de gajo de naranja. Produce estadios asexuales tipo-pesotum y tipo-sporothrix simultáneamente. Estas características lo hacen indistinguible de *O. patagonicum*, cuyas medidas morfológicas se solapan e imposibilitan una correcta identificación. Por tal motivo es indispensable la implementación de análisis moleculares basados en las regiones BT2 o EF para una determinación definitiva.

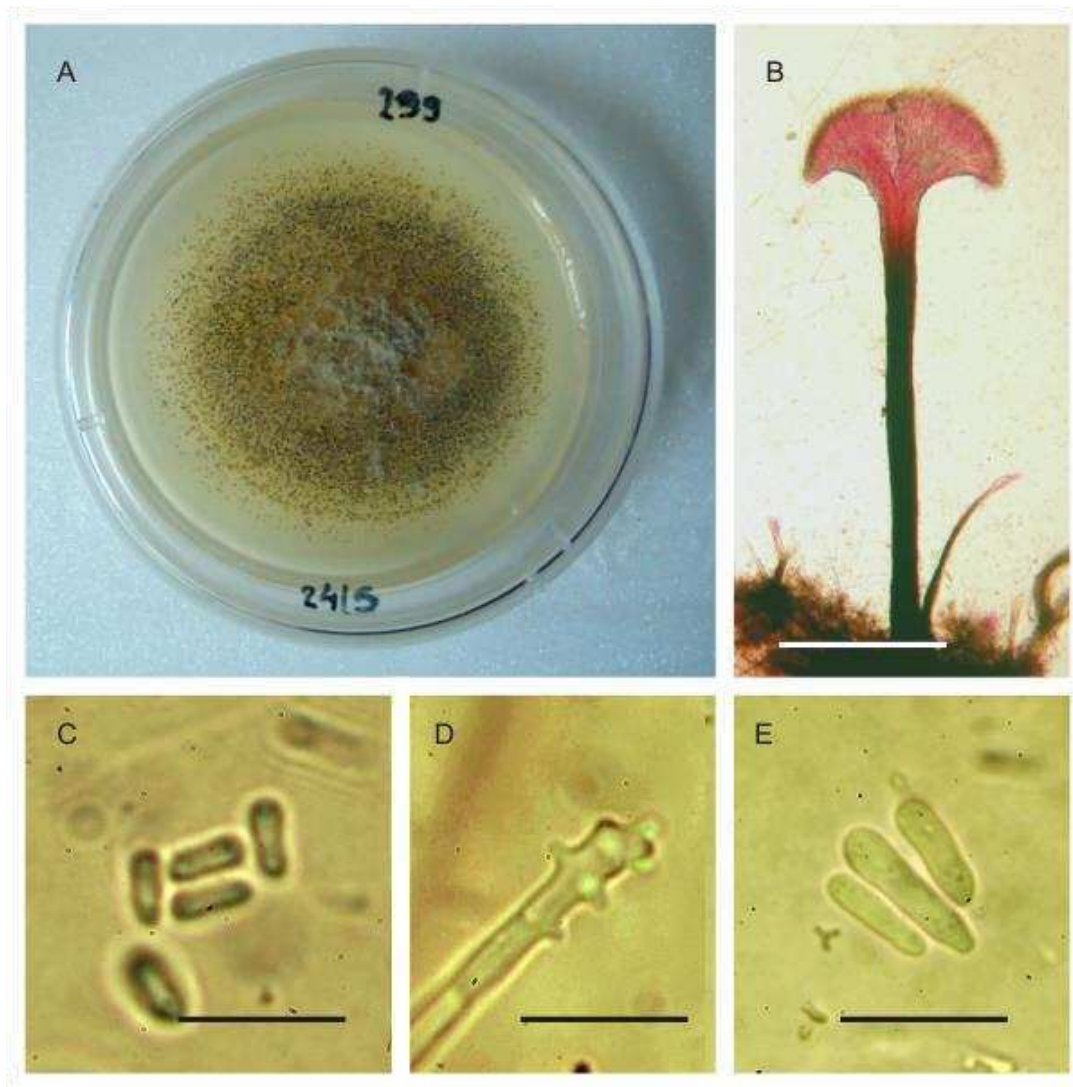


Figura 20. *Ophiostoma quercus* **A** Cultivo de 14 días en AM. **B** Conidioma tipo-pesotum (sinema). **C** Conidios del sinema **D** Células conidiógenas con denticulos (tipo-sporothrix). **E** Conidios tipo-*Sporothrix*. Barra de referencia, B = 100 μ m; C,D,E = 10 μ m.

Ophiostoma valdivianum (Butin) Rulamort

Figura 21

Estado asexual: tipo-sporothrix

Descripción: Butin H & Aguilar A (1984) *Phytopathologische Zeitschrift* 109: 86.

Hospedante: *N. pumilio*.

Habitat: galerías de escarabajos ambrosiales (*Gnathotrupes spp.*) sobre árbol muerto hace una o dos temporadas.

Especímenes examinados: ARGENTINA, Chubut, Dto. Futaleufú, Corcovado, Mallín Grande, sobre *N. pumilio*, Ene 2011, Andrés de Errasti (CIEFAP395). Chubut, Futaleufú, Cordón Rivadavia, parcela experimental Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB), sobre *N. pumilio*, Oct 2012, Andrés de Errasti (CIEFAP524). Réplica (CMW449) del cultivo tipo (CBS454.83).

Observaciones: Los cultivos CIEFAP395 y CIEFAP524 se ajustan a la descripción del estadio anamórfico descrito para esta especie (*Sporothrix*), aunque su identificación se ha realizado en base a resultados filogenéticos basados en la comparación de secuencias de ADN. Estos aislamientos se pueden diferenciar de *Sporothrix* sp1 porque los conidios son cilíndricos a obovoides y no alantoides como los de *Sporothrix* sp1. Por otro lado, la diferencia con *S. cabralii* reside en la longitud y ramificación de los conidióforos, siendo muy largos y simples en *S. cabralii*, mientras que son más cortos y ramificados en los de *O. valdivianum*.

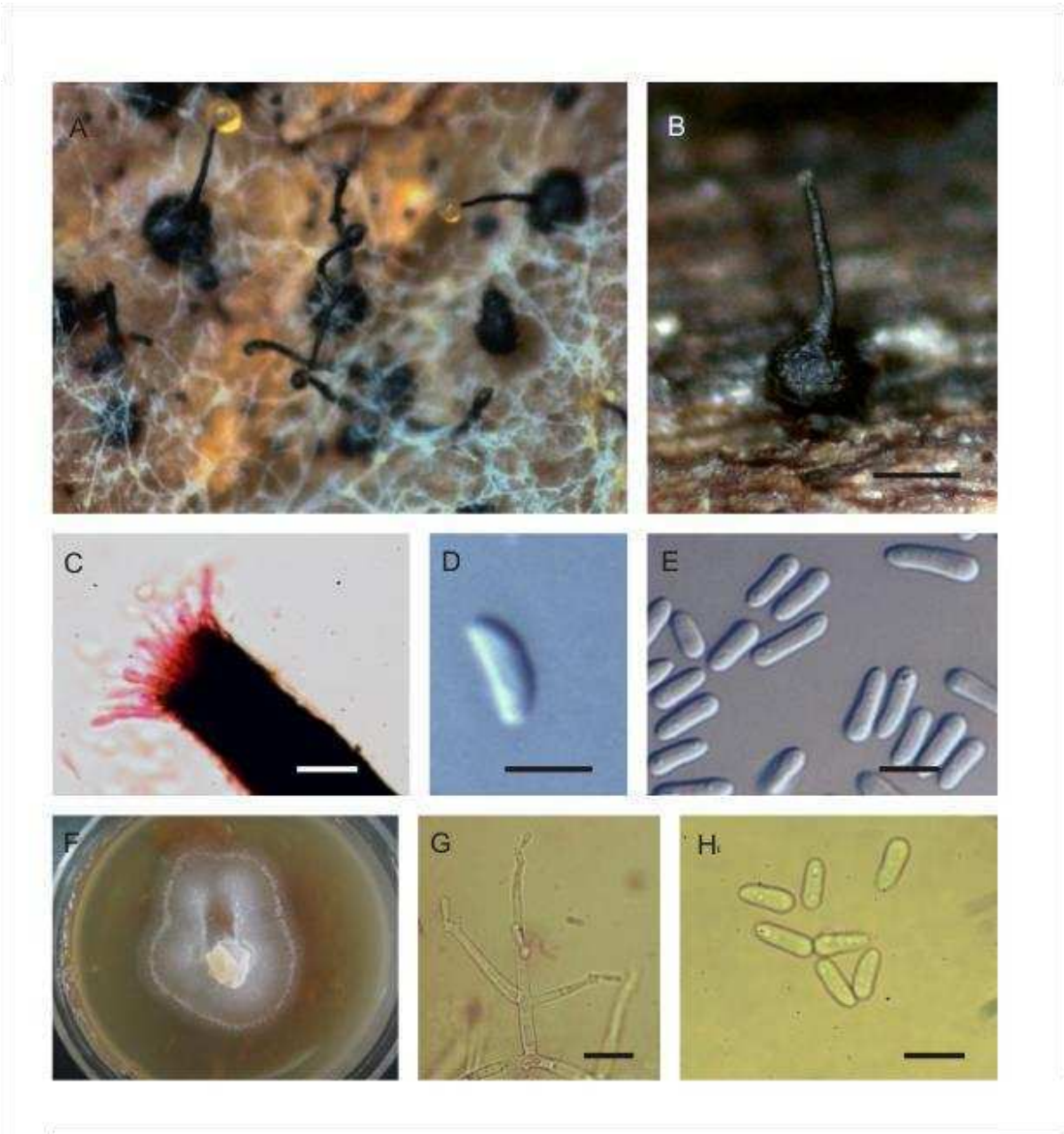


Figura 21. *Ophiostoma valdivianum*: A-E Cultivo ex-tipo (CMW449), F-G Material de la Patagonia (CIEFAP395, CIEFAP524) **A** Cultivo deshidratado con ascomas periteciales **B** Ascoma peritecual **C** Detalle del ápice, con hifas ostiolares. **D** Ascospora. **E** Conidios. **F** Cultivo de 14 días en AM. **G** Conidióforo tipo-sporothrix. **H** Conidios. Barra de referencia, B = 100 μm ; C, D, E, G = 10 μm , H = 5 μm .

***Ophiostoma* sp1**

Figura 11 del Capítulo II, p136.

Hospedante: *N. dombeyi*.

Distribución: Zona Nor-Oeste del Chubut.

Habitat: aislada de galerías de escarabajos de corteza sobre árbol caído esa misma temporada.

Especímenes examinados: ARGENTINA, P.N. Los Alerces, senda arroyo cascada, en galerías de escarabajos de corteza sobre *N. dombeyi*, Nov 2011, A. de Errasti/B. Hurley/J. Roux (CIEFAP464).

Observaciones: el cultivo CIEFAP464 evidenció características de cultivo (morfología y estructuras) muy similares a las de *O. patagonicum* y *O. quercus*, siendo imposibles de diferenciar en la práctica. Esta especie resultó ser la única obtenida de galerías de escarabajos de corteza sobre árboles nativos (*N. dombeyi*) y los resultados moleculares justifican que sea segregada como un taxón diferente. Por otro lado, este aislamiento presentó secuencias idénticas con otro aislamiento obtenido en Noruega, denominado *Ophiostoma* cf. *canum* (CMW29490) (Linnakoski et al., 2008). Sin embargo, este aislamiento y CIEFAP464 produjeron sinemas con conidios obovoides, diferentes a los conidios globosos característicos de *O. canum* (Harrington et al., 2001) y, probablemente, representen una especie nueva (ver Capítulo II, p 94-96 y 106).

***Ophiostoma* sp2**

Estado asexual: tipo-sporothrix

Hospedante: *Tepualia stipularis*

Distribución: Distrito valdiviano del P.N. Nahuel Huapi.

Habitat: sobre cara expuesta de árbol apeado hace 1-2 años.

Especímenes examinados: Argentina, P.N. Nahuel Huapi, Puerto Blest, sobre *T. stipularis*, Abr 2011, A. de Errasti/M. Rajchenberg (CIEFAP426).

Observaciones: esta especie es morfológicamente muy similar a *O. sparsiannulatum*, y no fue posible su distinción en base a dichos caracteres. Su presencia en *Tepualia stipularis* y los resultados filogenéticos permiten diferenciarla, pero se necesitan más especímenes y cultivos para describirla.

***Ophiostoma* sp3**

Estado asexual: tipo-sporothrix

Hospedante: *N. dombeyi*.

Habitat: bajo la corteza de árbol muerto hace 2-3 temporadas, sin presencia de escarabajos.

Especímenes examinados: ARGENTINA, P.N. Los Alerces, Lago Menéndez, senda a Bahía Toro, May 2010, sobre *N. dombeyi*, Andrés de Errasti/M. Rajchenberg, CIEFAP260 (= CIEFAP260).

Observaciones: esta especie se diferencia de *O. noveae-zelandiae* por la ausencia frecuente de engrosamientos a lo largo del cuello, presentando 1-2 engrosamientos de forma esporádica. Por otro lado, sus ascosporas son levemente más pequeñas, y el cuello es de mayor longitud. No se pudieron encontrar diferencias morfológicas entre *Ophiostoma* sp3 y *Ophiostoma* sp2. Por el momento los 3 taxones de Argentina, todas pertenecientes al complejo *O. pluriannulatum*, han sido encontrados en diferentes hospedantes: *O. noveae-*

zelandiae fue coleccionadas de *N. obliqua*, *Ophiostoma* sp3 de *N. dombeyi* y *Ophiostoma* sp2 de *Tepualia stipularis*.

Sporothrix cabralii de Errasti & Z.W. de Beer, sp.nov.

Mycobank MB 814176; Holotipo: ARGENTINA, Tierra del Fuego, Dto. Río Grande, Lago Fagnano, sobre *N. pumilio*, Dic 2011, A. de Errasti (CIEFAP500).

Figura 22

Etimología: la especie es nombrada en memoria del Dr. Daniel Cabral, en reconocimiento a sus contribuciones a la Micología en Argentina.

Descripción: Conidióforos jóvenes cortos $(7.9-16.6-32.5(-42.1) \times (1.3-2.5-3.8(-4.4) \mu\text{m}$, levemente asimétricos, consistentes en una célula basal y una célula conidiógena. Conidióforos a veces ausentes, con conidios surgiendo directamente de hifas indiferenciadas. Conidióforos maduros usualmente de largo considerable $(10-23-65(-170) \mu\text{m}$. Células conidiógenas con dientes prominentes, discretas, cilíndricas, $(4.9-6.2-9.5(-14.7) \times (1.4-2.1-2.9(-3.2) \mu\text{m}$. Conidios oblongos con bases truncadas, hialinos $(3-4.4-7.9(-13.5) \times (1-1.2-1.7(-2.3) \mu\text{m}$. Conidios secundarios producidos regularmente. Micelio superficial, hialino; micelio aéreo abundante, flooso. Colonias de crecimiento lento, 15 mm de diám. en 7 días a 25 °C. Colonias blancas 2.5Y 8/0, con margen irregular. Sin producción de ascomas en cultivo. Tampoco observados sobre sustrato natural.

Hospedante: *Nothofagus pumilio*.

Distribución: ARGENTINA, provincia de Tierra del Fuego.

Habitat: encontrada en las galerías de escarabajos ambrosiales del género *Gnathotrupes*, en madera muerta.

Especímen adicional: Tierra del Fuego, Dto. Río Grande, Lago Fagnano, sobre *N. pumilio*, Dec 2011, A. de Errasti (CIEFAP491).

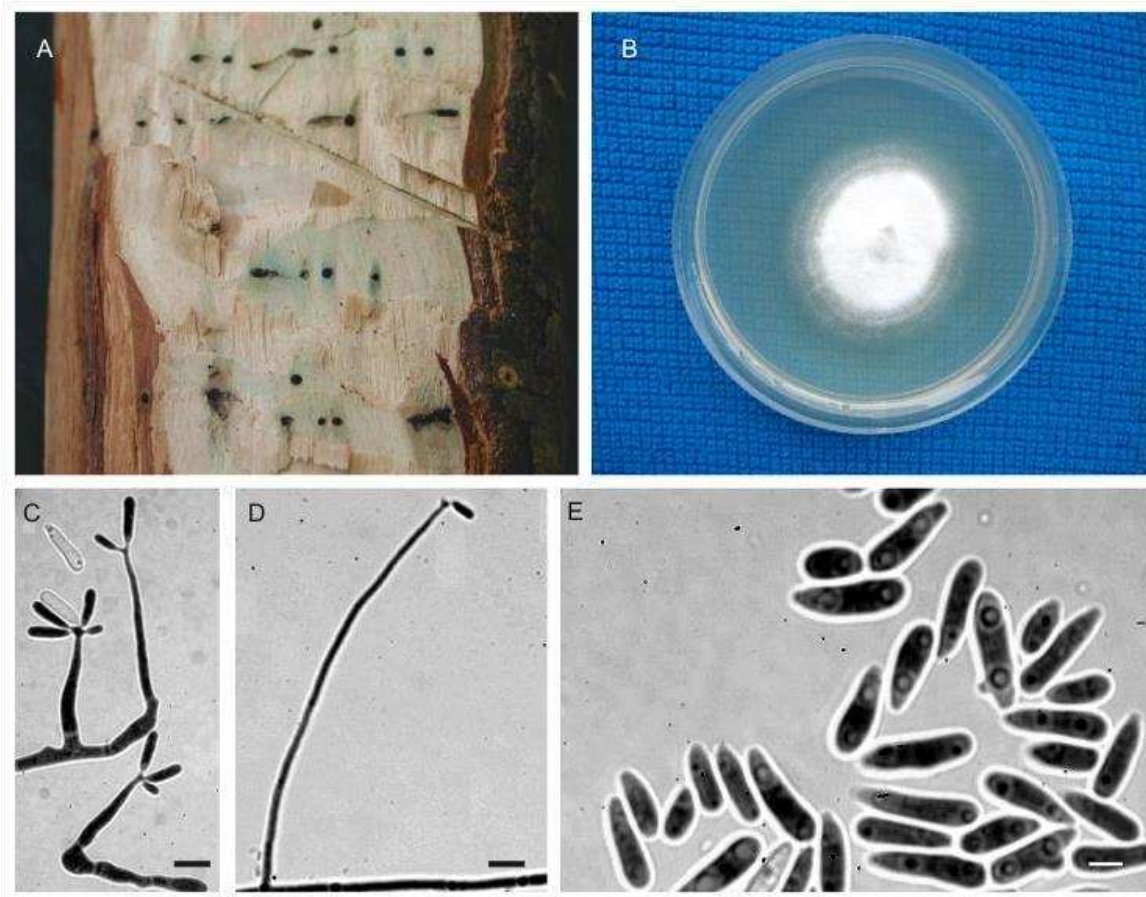


Figura 22. *Sporothrix cabralii* sp. nov., características morfológicas (holotipo CIEFAP491). **A** Árbol con galerías producidas por escarabajos de ambrosía del género *Gnathotrupes*. **B** Cultivo de 14 días en AM. **C**. Conidióforo joven. **D** Conidióforo maduro. **E** Conidios. Barra en C,D = 10 μ m y E = 5 μ m

Observaciones: de acuerdo con la comparación de las secuencias de ADN, *Sporothrix cabralii* está cercanamente emparentada con *O. candidum*, una especie recientemente descrita sobre árboles de eucalipto en la República de Sudáfrica (Kamgan Nkuekam et al., 2012). El estado asexual de esta última produce cultivos blancos similares, con abundante micelio aéreo, conidióforos elongados (12.5–61.0), células conidiógenas con

dientes prominentes y conidios muy pequeños ($1.5-2.5 \times 0.5-1.0 \mu\text{m}$). *Sporothrix cabralii* difiere en la mayor longitud de sus conidióforos y sus conidios de mayor tamaño.

***Sporothrix* sp1**

Hospedante: *N. pumilio*

Habitat: en galería de escarabajo de ambrosía del género *Gnathotrupes*.

Especímenes examinados: ARGENTINA, Chubut, Dto. Futaleufú, Lago Baguillt, sobre *N. pumilio*, Nov 2011, Andrés de Errasti (CIEFAP469.1).

Observaciones: esta especie se diferencia del resto de los estados asexuales tipo-*Sporothrix* debido a que sus células conidiógenas presentan un conidióforo simple, de proliferación simpodial, con dentículos menos prominentes y de menor longitud que *S. cabralii*. Por su parte el estado asexual de *O. valdivianum*, otro habitante común de galerías de escarabajos ambrosiales, tiene un conidióforo ramificado.

Discusión

Este estudio representa la primera evaluación detallada de las familias Ophiostomataceae y Microascaceae en la región andina de la Patagonia argentina. Los muestreos comprendieron 4 provincias patagónicas y los principales hospedantes arbóreos de esa región, realizados durante 3 años consecutivos en otoño y en primavera/verano. En total fueron obtenidos 124 aislamientos de hongos ofiostomatoides. Estos fueron identificados, basados principalmente en la comparación de secuencias de ADN, en 15 taxones: 5 especies conocidas, 2 especies reportadas pero no descriptas formalmente y 8 especies nuevas para la ciencia. De las especies nuevas, 4 incluyeron un número suficiente de colecciones para ser descriptas como nuevas: *Huntia decorticans*, *Leptographium gestamen*, *Ophiostoma patagonicum* y *Sporothrix cabralii*, todas ellas probablemente endémicas de los bosques andino-patagónicos.

La comparación de secuencias de ADN demostró la cercanía entre *Huntia decorticans*, *Huntia* sp1 y *Huntia* sp2 y las demás especies del género *Huntia*, sin embargo, se posicionaron en la periferia, sin estar incluidas en el género mencionado. Teniendo en cuenta la incapacidad de las secuencias ITS para distinguir especies cercanas y la formación de tres subgrupos dentro de los aislamientos argentinos en base a la información de BT1 y EF, es posible que los aislamientos de Argentina representen, en sí mismos, un complejo de especies. La decisión tomada en este estudio es conservadora, definiendo una sola especie de forma restrictiva (*H. decorticans*), con el objetivo de aunar criterios filogenéticos, morfológicos y de patogenicidad (ver Cap. III). Por otro lado, el muestreo del presente trabajo obedece a un criterio de diversidad fúngica, y no a un estudio poblacional dentro de este grupo. La definición de los otros posibles taxones requiere un

muestreo diagramado a tal fin, que abarque más aislamientos de *N. obliqua* y *N. antarctica*, con más representación de Tierra del Fuego y Santa Cruz, empleando técnicas de genética poblacional (RFLP, AFLP o microsatélites), y su posterior correlación con la capacidad patogénica de cada una.

Sánchez (2011) coleccionó *C. moniliformis* s.l. sobre *Nothofagus* en el mismo rodal de donde fue obtenido el holotipo de *H. decorticans*, aunque no pudo aislar el hongo. Es más que probable que esas colecciones representen *H. decorticans*. De forma similar el hongo reportado por Billings sobre *Nothofagus* en Chile (1993) bajo el nombre *C. moniliformis* probablemente represente a *H. decorticans* o alguno de los otros taxones de la Patagonia (*Huntia* sp1 o *Huntia* sp2). Al momento de realizarse el estudio de Billings (1993) la taxonomía de estos hongos se encontraba en pleno debate y la resolución necesaria para clarificar este tema no era posible.

Ophiostoma patagonicum fue aislado de *Nothofagus* y *Schinus*, de madera muerta, de árboles con síntomas de decaimiento, de galerías de hongos ambrosiales y del cuerpo de escarabajos nitidúlidos. Los aislamientos provienen de las provincias de Chubut, Río Negro, Neuquén y Tierra del Fuego. Estas características indican que *O. patagonicum* está ampliamente distribuido y tiene poca especificidad en relación al hospedante y a los insectos vectores. Los reportes previos de *O. piceae* sobre latifoliadas nativas de Chile basados en criterios morfológicos (Butin & Aquilar, 1984; Billings, 1993) pueden representar *O. patagonicum*, debido a que las dos especies son morfológicamente similares y *O. piceae* no está comúnmente asociada a latifoliadas (De Beer et al., 2003b). *Leptographium gestamen* y *Sporothrix cabralii* fueron aisladas exclusivamente de galerías de escarabajos de ambrosía en árboles muertos o enfermos del género *Nothofagus*.

El presente estudio establece la presencia en Argentina de *O. quercus*, *O. noveae-zelandiae*, *O. grandicarpum*, *O. nothofagi* y *O. valdivianum*. La primera especie fue reportada anteriormente en Uruguay (Harrington et al., 2001), Brasil (De Beer et al., 2003b) y es considerada una especie cosmopolita (Grobbelaar et al., 2009). *O. noveae-zelandiae* fue descrita en Nueva Zelanda (Thwaites et al., 2005) y luego sinonimizada con *O. pluriannulatum*. A la luz de los resultados de este estudio dicha sinonimia es puesta en duda, siendo posible que represente una especie en sí misma, asociada a hospedantes nativos en países del hemisferio sur. De las últimas tres especies encontradas en Argentina, la primera fue descrita por Butin y colaboradores en Polonia (Kowalski & Butin, 1989), mientras que las dos últimas fueron descritas por el mismo autor en Chile (Butin & Aquilar, 1984). Ninguna de las cinco especies habían sido citadas previamente para la Argentina y cuatro de ellas no habían sido citadas más que en su país de origen (*O. grandicarpum*, *O. nothofagi*, *O. noveae-zelandiae* y *O. valdivianum*).

Si bien *O. grandicarpum* representa una de las novedades para la Argentina, *O. nothofagi* fue descrita en base a material de la Patagonia chilena, con lo cual es esperable suponer que es autóctona de los bosques andino-patagónicos. El aporte de los primeros datos moleculares de estas 2 especies permite corroborar la coincidencia morfológica y filogenética entre ambas. Ambas forman un clado en sí mismo, sin relación con los demás géneros y complejos de especies en los Ophiostomatales (Figuras 5,10). Ambas habitan en la zona subyacente a la corteza, forman ascosporas pequeñas, en forma de luna en cuarto creciente, desarrollan un estado asexual tipo-*Sporothrix* con conidios curvos y poseen peritecios de dimensiones considerables: las más grandes registradas para el grupo, superando 1 cm el largo del cuello. Asimismo, aparecen en estadios más avanzados de la

sucesión, donde ya se evidencia pudrición blanca incipiente. Es necesario tratar de aquí en más estas especies como un complejo independiente de los linajes conocidos dentro de los Ophiostomatales, siendo posible que a medida que nuevas especies sean descubiertas sea considerado un género independiente.

La última especie identificada satisfactoriamente, *O. valdivianum*, fue descrita originalmente con la singular cualidad de tener simultáneamente estados asexuales tipo-*Sporothrix* y tipo-*Leptographium* (Butin & Aquilar, 1984). Esta especie ha sido puesta en duda en otros trabajos (Jacobs & Wingfield, 2001). Sin bien existen especies con estas características poco frecuentes, por ejemplo *L. pruni*, existen varias razones para suponer que el material en base al cual se describió la especie no fue interpretado correctamente. En primer lugar, la revisión de material tipo y de cultivos deshidratados (CBS454.83=CMW449) no evidenciaron desarrollo alguno del estado asexual tipo-*Leptographium*, solamente el de tipo-*Sporothrix* (Figura 17). En segundo lugar, los cultivos obtenidos en este estudio (CIEFAP524 y CIEFAP395) produjeron secuencias idénticas a las del cultivo tipo, en este caso también están ausentes los conidióforos tipo-*Leptographium*. En tercer lugar, el estado sexual de *O. valdivianum* presenta características morfológicas y afinidades filogenéticas con las especies cercanas a *O. tenellum*, *O. nigrocarpum*, *O. saponiodorum*, *O. fumeum* (dentro de *Ophiostoma* s.l.) y no presenta morfología o afinidad filogenética con las especies dentro de *Leptographium* s.l. En vista de estos resultados es plausible plantear que el estado asexual tipo-*Leptographium* descrito originalmente se trata de una contaminación, probablemente *L. gestamen*, y que resultaría útil redefinir a *O. valdivianum*.

Ophiostoma sp1 (CIEFAP464) fue obtenida en Argentina de galerías de escarabajos de corteza, causando una mancha en un coihue (*N. dombeyi*) caído recientemente. La mancha se desarrollo con considerable rapidez, colonizando ampliamente el tejido del huésped en menos de 7 días. Este aislamiento evidenció una homología perfecta con un aislamiento sin descripción reportado en Noruega como *Ophiostoma* cf. *canum* (CMW29490). La identificación y caracterización molecular de *Ophiostoma* sp2 y *Ophiostoma* sp3 carecen de soporte estadístico y cada una está representada por un solo aislamiento, aunque es seguro que pertenecen al complejo *O. pluriannulatum*. Existen muy escasos datos moleculares de las regiones BT1 o EF de las especies de este complejo. De las que los tienen, existen por lo general solo una única secuencia de cada taxón. Esto impide una resolución adecuada, lo que puede solucionarse en el futuro mediante el análisis de varias secuencias de BT1/EF por cada una de las especies involucradas.

Este estudio comprendió un relevamiento intenso de los hongos ofiostomatoides en hospedantes nativos de la Patagonia Argentina. Esta región previamente inexplorada alberga taxones nuevos y otros previamente desconocidos para esta área. Aún más, estos bosques templados ricos en endemismos (Armesto *et al.*, 1995), han aportado evidencia que contribuye a la emergencia de linajes nuevos dentro de este grupo de hongos. A su vez el estudio permitió esclarecer la taxonomía de especies ya descriptas. Este esquema taxonómico inicial, conforma al mismo tiempo una base para pensar estudios ecológicos y fitopatológicos futuros en la Patagonia, y ofrece información útil para la comprensión del movimiento de estos hongos alrededor del mundo causados por el hombre.

CAPÍTULO II

Taxonomía de los hongos manchadores de albura en plantaciones de coníferas exóticas de la región patagónica

Introducción

La albura de especies forestales puede ser coloreada de tonos grises, negros o azulados debido al crecimiento de hifas fúngicas pigmentadas, lo que se conoce como ‘manchas de albura’ o ‘sap-stain’ (Seifert, 1993). Al crecer radialmente el hongo produce un patrón de colonización profundo (Figura 1) imposible de eliminar mediante tratamientos superficiales. Este problema condiciona la futura utilización de la madera en mueblería, revestimientos, madera estructural a la vista o pulpa de papel. Por ello es considerada de 2^{da} calidad en el mercado y su valor disminuye.

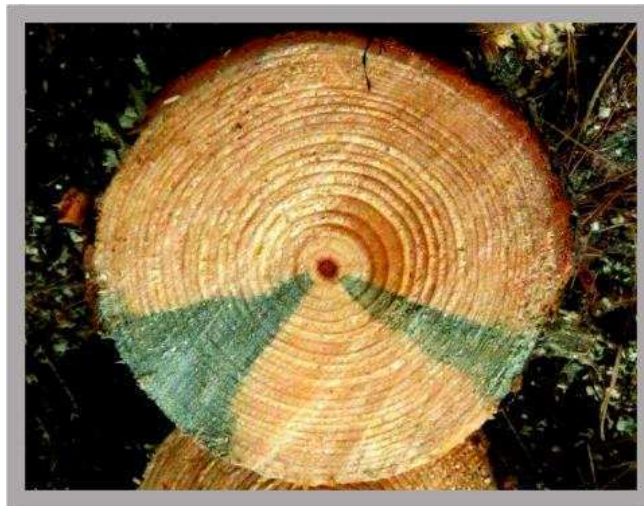


Figura 1. Mancha de albura causada por *Diplodia pinea* creciendo en *Pinus ponderosa* en Las Golondrinas, Chubut (plantaciones de la Dirección General de Bosques y Parques del Chubut).

El daño producido por estos hongos en la madera es solo cosmético, en comparación al daño estructural causado por los hongos degradadores o los causantes de ‘soft-rot’. Los hongos manchadores se alimentan de compuestos celulares libres y diferentes extractivos, pero no atacan la celulosa y la lignina de la pared celular. Por este motivo, no modifican sustancialmente las propiedades estructurales de la madera (Chapman

& Scheffer, 1940; Findlay, 1959), a excepción de su permeabilidad (Lindgren & Scheffer, 1939). La mancha de la albura es una de las causas principales de pérdidas económicas post-cosecha de productos fabricados con madera de coníferas, especialmente con madera del género *Pinus* (Byrne et al., 2005), en todas partes del mundo.

Hongos responsables del 'sap-stain'

Los organismos responsables de esta problemática pertenecen a distintas clases dentro de los Ascomycota, particularmente a las clases Dothideomycetes y Sordariomycetes. Dentro de la primera han sido estudiadas ciertas especies de las familias **Botryosphaeriaceae** Theiss. & Syd., (*Diplodia* Fr., *Fusicoccum* Corda), **Davidiellaceae** Crous & U. Braun (*Cladosporium* Link), **Dothioraceae** Theiss. & Syd. (*Aureobasidium* Viala & G. Boyer, *Hormonema* Lagerb. & Melin, *Sclerophoma* Höhn.), **Herpotrichellaceae** Munk (*Rhinocladiella* Nannf., *Exophiala* J.W. Carmich.), y **Pleosporaceae** Nitschke (*Alternaria* Nees) (Chou & MacKenzie, 1988; Hutchison & Reid, 1988; Thwaites et al., 2005). En cuanto a los Sordariomycetes, la mayoría de los estudios taxonómicos de hongos manchadores se han referido exclusivamente a los hongos 'ofiostomatoides' (Hedgcock, 1906; Mathiesen-Käärik, 1960; Griffin, 1966; Dowding, 1969; Olchowecki & Reid, 1974; Solheim, 1988; Jacobs & Wingfield, 2001) comprendidos en las familias **Ophiostomataceae** Nannf. y **Ceratocystidaceae** Locq. ex Réblová, W. Gams & Seifert, si bien otras especies pueden citarse como manchadoras, por ejemplo, **Coniochaetaceae** (Sacc.) Cooke (Hutchison & Reid, 1988).

Dothideomycetes

Los Dothideomycetes son un grupo importante en relación al manchado de la albura, ya sea por el número de especies involucradas o por la severidad de las manchas producidas. Algunas de estas especies, pueden causar pérdida de la resistencia mecánica de la madera, como por ejemplo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. (Encinas, 1996). En particular, *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx (= *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & Sutton) ha sido estudiada como causante de manchas de albura, muerte apical regresiva, canchrosis y mal de los almácigos en más de 25 países comprendidos entre los 30° y 50° de latitud en ambos hemisferios (Waterman, 1943; Punithalingam & Waterston, 1970; Swart et al., 1985). Los hospedantes incluyen 33 especies del género *Pinus* (Gibson, 1979) y otras especies de pináceas de los géneros *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Thuja* y *Pseudotsuga* (Palmer et al., 1987). Estas sintomatologías han sido más severas en países del hemisferio sur donde las pináceas han sido introducidas, como en Nueva Zelanda (Chou, 1976a; Chou, 1976b; Currie & Toes, 1978) y Sudáfrica (Zwolinski et al., 1990; Swart & Wingfield, 1991), en comparación con Europa y Norteamérica. Distintos estudios demostraron la presencia de 3 morfotipos de *D. pinea* (A, B y C) que difieren en distribución y patogenicidad: *D. pinea* morfotipo A produce conidios lisos, parece estar ampliamente distribuida, con una patogenicidad intermedia (Wang et al., 1985; Palmer et al., 1987). El morfotipo B ha sido descrito como una especie nueva, *D. scrobiculata* J. de Wet, Slippers & M.J. Wingf. (de Wet et al., 2002). Esta especie produce conidios de pared rugosa, es típica de Norteamérica (aunque presente en Uruguay, Carlos Pérez, comm. pers.) y es considerada la de menor patogenicidad (Palmer et al., 1987; de Wet et al., 2002) debido a que requiere heridas para infectar al hospedante. Las esporas del morfotipo C tienen una pared lisa, aunque son más grandes que las del morfotipo A. Este morfotipo es solo conocido en Indonesia y Europa y

es el más patogénico de todos (de Wet et al., 2000; de Wet et al., 2002). Los 3 morfotipos pueden producir infecciones latentes que se acumulan a lo largo de la vida del hospedante, desarrollándose ante eventos de estrés o muerte del hospedante, por lo que son considerados patógenos oportunistas (Slippers & Wingfield 2007). Si bien los morfotipos A y B (*D. scrobiculata*) no suelen causar epidemias severas, la colonización del tejido ante la declinación o muerte del hospedante puede causar manchas en la albura. Por esta razón los diferentes morfotipos en su conjunto (por su patogenicidad o capacidad de manchar la albura) son considerados en diferentes países del hemisferio sur como una de las patologías responsable de las principales pérdidas económicas asociadas con la explotación comercial de *Pinus* spp.

Sordariomycetes

Como se mencionó anteriormente, los hongos ‘ofiostomatoides’ son los más importantes de su clase en relación al manchado. El término ‘ofiostomatoide’ resulta útil para abordar un grupo de especies con similitudes morfológicas y ecológicas, asociadas a los mismos problemas sanitarios. Por otro lado, esta denominación también es útil a nivel taxonómico, dado que bajo este nombre se puede acceder a una historia de larga data y agitada controversia, donde se tratan las especies de ambas familias de manera conjunta, bajo el nombre genérico de mayor aceptación en ese momento *Ceratostomella* Sacc., *Ophiostoma* Syd. & P. Syd. o *Ceratocystis* Ellis & Halst. (De Beer et al., 2013b).

Se considera que las similitudes del grupo son el resultado de la interacción con artrópodos, en especial insectos (Malloch & Blackwell, 1993). Su morfología estilizada y su producción de esporas en masas pegajosas resulta ideal para la dispersión por escarabajos (Coleoptera: Cerambycidae, Buprestidae, Curculionidae) que cumplen parte de su ciclo o se

alimentan en los árboles. Pocos grupos como los insectos son tan efectivos para detectar el estrés, las heridas, o la senescencia de un árbol. Mediante éstos, el hongo logra romper la barrera que representa la corteza, ser diseminado por las galerías, acceder a contenidos celulares frescos y colonizar un ambiente protegido, húmedo, con poca capacidad de defensa. Si bien la diversidad de las interacciones hongo-insecto en este grupo está lejos de comprenderse plenamente, pocos sistemas han sido tan estudiados en el hemisferio norte como la asociación entre hongos ofiostomatoides, escarabajos de corteza (Curculionidae: Scolytinae) y diferentes especies de pináceas (Solheim, 1988; Harrington, 1993; Krokene & Solheim, 1997; Jacobs & Wingfield, 2001; Krokene et al., 2010; Six & Wingfield, 2011; Linnakoski et al., 2012; Zhou et al., 2013).

La mayoría de las especies de hongos que ocasionan manchas de importancia económica sobre pináceas en la Patagonia corresponden a especies de las familias Ophiostomataceae Nannf. (Ophiostomatales) y Ceratocystidaceae Locq. ex Réblová, W. Gams & Seifert (Microascales). El principal objetivo del presente Capítulo, es el relevamiento y caracterización molecular de estas especies. Las primeras están incluidas en *Ophiostoma* Syd. & P. Syd. *Graphilbum* H.P. Upadhyay & W.B. Kendr. y *Grosmannia* Z.W. de Beer, Zipfel & M.J. Wingf., mientras que las segundas están incluidas en *Endoconidiophora* Münch. La correlación entre los caracteres morfológicos y las filogenias moleculares permite la utilización del microscopio para lograr una identificación preliminar certera a nivel de grupo o complejo de especies. La identificación definitiva requiere siempre de la comparación de secuencias de ADN.

Para las especies presentes en la Patagonia, se pueden establecer 4 grupos de especies manchadoras dentro de *Ophiostoma*, de acuerdo a su morfología: (1) las especies con ascoma peritecial de cuello largo, hifas ostiolares divergentes en el ápice, ascosporas en

forma de gajo de naranja (sin vaina), estados asexuales tipo-*Pesotum* y tipo-*Sporothrix* producidos simultáneamente, que son característicos de *O. piceae* (Münch) Syd., *O. ulmi* (Buisman) Nannf. y sus especies más cercanas; (2) aquellas mismas características, pero exceptuando la presencia del sinema tipo-pesotum, corresponden a *O. piliferum* (Fr.) Syd.; (3) las especies con ascomas periteciales de cuello largo a muy largo, con engrosamientos a lo largo del mismo, usualmente con hifas ostiolares presentes en dichos engrosamientos, ascosporas cilíndricas o en forma de gajo de naranja y estadios asexuales tipo-sporothrix, corresponden al complejo de especies *O. pluriannulatum* (Hedgc.) Syd.; (4) los ascomas periteciales sin hifas ostiolares, ascosporas cilíndricas con vainas que le confieren una forma de almohada, y fases asexuales tipo-hyalorhinocladiella corresponden a las especies del complejo *O. ips* (Rumbold) Nannf.

Las especies del género ***Graphilbum*** se caracterizan por sus ascomas periteciales pequeños con cuellos rectos, ascosporas cilíndricas con vainas mucilaginosas y sinemas tipo-*Pesotum*, nunca acompañado por estados asexuales que presenten células conidiógenas con dentículos prominentes (*Sporothrix*), característica que lo diferencia de *Ophiostoma*. Las especies manchadoras del género ***Grosmannia***¹ suelen presentar ascomas robustos, ascosporas en forma de sombrero, con vainas mucilaginosas y fases asexuales tipo-leptographium.

¹ *Grosmannia* fue propuesto por Zipfel et al. (2006) para identificar un grupo de especies previamente incluidas en *Ophiostoma*, cuyos estados asexuales eran clasificados en *Leptographium*. Tras la plena vigencia del nuevo código de nomenclatura, *Leptographium* tiene prioridad sobre *Grosmannia*, sin embargo, De Beer et al (2013) proponen que el género *Grosmannia* solo incluya las especies del complejo *G. penicillata*, y todo el resto sea incluido en *Leptographium*, sin importar si la descripción incluye o no la fase sexual. Proponen, asimismo, utilizar *Leptographium* s.l. para referirse a ambos grupos. Para no generar una catarata de nuevas combinaciones, estos autores han recomendado mantener los nombres actuales de las especies, hasta que se avance en la delineación de los nuevos géneros. En este capítulo consideramos a *Leptographium* sinónimo de *Grosmannia*.

Las especies de Ceratocystidaceae relacionadas al manchado de la albura están incluidas en *Davidsoniella*, *Endoconidiophora* y *Huntiiella*, algunas asociadas a coníferas [*E. coerulescens* Münch y *E. douglasii* (R.W. Davidson) Z.W. de Beer, T.A. Duong & M.J. Wingf.] y otras asociadas a latifoliadas [*D. eucalypti* (Z.Q. Yuan & Kile) Z.W. de Beer, T.A. Duong & M.J. Wingf. y *H. moniliformis* (Hedgc.) Z.W. de Beer, T.A. Duong & M.J. Wingf.]. Estas especies tienen ascomas periteciales medianos, con ascosporas elíptico-cilíndricas o en forma de sombrero, generalmente con vaina mucilaginosa. Su reconocimiento es sencillo debido a la presencia de estados asexuales tipo-thielaviopsis (ex *Chalara* Hughes) caracterizado por fiálides que producen conidios cilíndricos a doliformes mediante una conidiogénesis tipo ‘ring wall building’.

Importancia del estudio y manejo del ‘sap-stain’ en la Patagonia

La Patagonia andina de la Argentina representa una de las regiones del Hemisferio Sur en que se ha decidido plantar pináceas exóticas para su desarrollo forestal. Actualmente las provincias de Chubut, Río Negro y Neuquén suman una superficie forestada que supera las 75.000 ha, en su mayoría con *Pinus ponderosa* (Loguercio & Deccechis, 2006). La incidencia de mancha en los distintos establecimientos, junto a los requerimientos de calidad del mercado, a las restricciones sanitarias y a la competencia con otras regiones forestales (como ser Chile y Mesopotamia) urge a la industria regional, quien debe obtener madera libre de mancha.

El estudio y el manejo del ‘sap-stain’ fueron motivados por la industria maderera del hemisferio norte desde comienzos del siglo pasado. Sin embargo, la investigación actual del manchado de la albura presenta una mayor complejidad. Como se mencionara

anteriormente la introducción de pináceas en el hemisferio sur y el intercambio de hongos manchadores y sus vectores mediante el comercio internacional, ha tenido un impacto significativo en los problemas de ‘sap-stain’ (Wingfield et al., 2013b). Para la Patagonia este escenario indica que el aislamiento histórico del bosque andino-patagónico (con alto grado de endemismos asociado, ver Capítulo I) con respecto a otros bosques templados del planeta comienza a romperse. La caracterización molecular de las especies manchadoras y vectores que han sido introducidos es primordial para estimar su impacto tanto en las plantaciones como en el bosque nativo.

Objetivo

Realizar un relevamiento de la diversidad de hongos manchadores que afectan las plantaciones de uso forestal en la Patagonia, como un primer paso para diagramar estrategias de control.

Materiales y Métodos

Sitios de muestreo

Se visitaron los siguientes aserraderos (n=19) y plantaciones (n=10) sitios en las provincias de Neuquén, Río Negro y Chubut en busca de hongos manchadores durante los años 2009, 2010, 2011 y principios de 2012.

Aserraderos

Chubut, Dto. Futaleufú: Cheveir (Lago Puelo), Graciano (Lago Puelo), González (El Hoyo), Filippi (El Pedregoso), Franco (El Coihue), Campo Experimental INTA EEA Esquel (Aldea Escolar), Carpintería Municipal de Corcovado, Pellech Hnos. (Esquel), Figueroa (Trevelin).

Río Negro, Dto. Nahuel Huapi: Maderera Andina (El Bolsón).

Neuquén, Dto. Los Lagos: Parrilli (San Martín de los Andes), CORFONE S.A. (Junín de los Andes), Ea. San Jorge (Lago Meliquina), Ea. Quechuquina (Lago Lácar). Dto. Las Lajas: CORFONE S.A. (Aluminé).

Plantaciones

Chubut, Dto. Futaleufú: Plantaciones administradas por de la Dirección General de Bosques y Parques (DGBYP, Cerro Radal y Las Golondrinas). Plantaciones de 'Bosques del Epuyén' (Lago Epuyén). Campo Experimental INTA EEA Esquel (Aldea Escolar).

Río Negro, Dto. Nahuel Huapi: Isla Victoria (Lago Nahuel Huapi), Flia. Whewell (Paraje El Foyel).

Neuquén, Dto. Los Lagos: CORFONE S.A (Lago Lolog), Lote 69 (San Martín de los Andes) Ea. San Jorge (Lago Meliquina), Ea. Quechuquina (Lago Laccar). Dto. Las Lajas: CORFONE S.A. (Aluminé).

Método de muestreo

Las muestras coleccionadas consistieron en madera manchada, las cuales fueron llevadas en bolsas plásticas nuevas sin usar y procesadas en el laboratorio. De forma similar a lo realizado en el muestreo en especies nativas (Capítulo I) se realizaron los aislamientos de esporas presentes en los ascomas y/o conidiomas, transfiriendo las gotas de esporas directamente a cajas de Petri conteniendo agar malta estéril (AM, 20g agar, 20g extracto de malta, 1lt H₂O destilada). Si dichas estructuras no estaban formadas se procedió a inducir la esporulación en parte del material o a aislar directamente el hongo del tejido manchado. Al material colectado se le extraía la madera más superficial con formón y gubia previamente flameados en alcohol. Se exponían varios trozos de tejido limpio, algunos depositados en bolsas plásticas nuevas rociadas con agua en su interior e incubados a la temperatura ambiente del laboratorio (20-25 °C). Los trozos de tejido restantes eran sembrados bajo flujo laminar en placas de Petri conteniendo AM. En ocasiones se efectuó una esterilización superficial del tejido mencionado consistente en: 1 min en Lavandina comercial al 5 %, 1 min en EtOH 70%, y sucesivos lavados en H₂O destilada estéril. Un subgrupo representativo de los aislamientos obtenidos en este estudio fue depositado en el cepario del Centro Forestal CIEFAP (Esquel, Chubut).

Morfología

Las características morfológicas fueron evaluadas utilizando estructuras reproductivas presentes en el sustrato original y en cultivo (AM a 25°C, en oscuridad). Las caracterizaciones fueron realizadas siguiendo el mismo esquema utilizado para los hongos ofiostomatoides hallados sobre hospedantes nativos (ver Capítulo I, Materiales y Métodos).

Extracción de ADN, PCR y secuenciación

El ADN fue extraído de micelio fúngico cultivado (100 mg) en 2 % (p/v) extracto de malta (EM; 20g extracto de malta, DIFCO), incubado por 2 semanas a 25 °C, utilizando el KIT de extracción de ADN UltraClean® (MoBio, Carlsbad, CA) y siguiendo el protocolo del fabricante. Dos regiones fueron amplificadas para su secuenciación y posterior análisis filogenético. La secuencia parcial del gen de la subunidad ribosomal pequeña (18S), las secuencias completas del espaciador transcripto interno (ITS1), subunidad ribosomal 5.8S, espaciador transcripto interno (ITS2) y la secuencia parcial de la subunidad ribosomal grande (28S), de aquí en más referido simplemente como ‘ITS’ fue amplificado con los primers ITS1-F e ITS4 (White et al., 1990). Una porción del gen de la β -tubulina (BT2) fue amplificado con los primers Bt2a y Bt2b (O'Donnell & Cigelnik, 1997).

Las reacciones de amplificación se realizaron con un volumen de 25 μ l los cuales consistieron en 2 μ l de Buffer de reacción, 1 μ l $MgCl_2$ (2 mM), 2 μ l dNTPs (0.2 mM), 0.5 μ l de cada primer (0.2 μ M), 0.15 μ l (1 U) Taq Pegasus ADN Polimerasa (Embiotec S.R.L), 2 μ l de una solución conteniendo ADN genómico diluido y 16,85 μ l de agua destilada estéril. Las amplificaciones fueron realizadas con las siguientes condiciones: un paso inicial de desnaturalización a 96 °C durante 2 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C durante

30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 60 s, y una extensión final a 72 °C durante 8 min. La amplificación de los respectivos genes fue confirmada en un gel de agarosa al 2 % suplementado con Gelred™ (Biotium, Hayward, CA). Los productos de reacción fueron enviados para su secuenciación a MACROGEN™ (Seúl, Corea del Sur). Todas las secuencias recibidas fueron revisadas manualmente con ayuda del software MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011).

Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos se realizaron con la misma metodología que se empleó para el Capítulo I. Mediante el software MAFFT 7.0 (Kato, 2013) se realizaron los alineamientos, bajo las estrategias FFT-NS-i y E-INS-i. Se compararon resultados según distintos métodos de reconstrucción filogenética: Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB). Las secuencias de referencia fueron obtenidas del GenBank.

Resultados

Colección de muestras y análisis morfológico

Se obtuvieron 282 muestras de madera manchada de pináceas exóticas. Se realizaron aislamientos de todas las muestras, obteniéndose 242 aislamientos causantes de manchas de albura, los cuales fueron agrupados en 4 categorías: Sordariomycetes (167), Dothideomycetes (58), Leotiomycetes (11) y micelios estériles (9). Dentro de los Sordariomycetes, los hongos ‘ofiostomatoides’ representaron el 95% del total. Los organismos fueron aislados de *Pseudotsuga menziesii* y *Pinus* spp. También se registró la asociación con insectos escolítidos (Coleoptera: Scolytinae) y picudos (Coleoptera: Curculionidae) (Tabla 1). Treinta y siete muestras no resultaron en ningún aislamiento que pudiera asociarse a hongos manchadores, obteniéndose principalmente hongos cuyos estados asexuales son usualmente incluidos en *Penicillium* Link, *Trichoderma* Pers., *Acremonium* Link, *Peecilomyces* Bainier y *Gliocladium* Corda.

Debido a la importancia de los hongos ‘ofiostomatoides’ en cuanto a cantidad de aislamientos, variedad de hospedantes, amplitud geográfica e interacción con insectos vectores, se seleccionó un subgrupo de cultivos representativos de la diversidad encontrada (morfología de cultivo, localización geográfica y hospedante) para su análisis filogenético (Tabla 2).

Tabla 1. Hongos manchadores sobre pináceas exóticas y nativas, identificados durante 3 años de muestreo (2009-2011) en aserraderos y plantaciones de la Patagonia.

Taxón	# aisl.	Hospedante	Insectos asociados
<i>Alternaria</i> sp.	2	<i>Pinus ponderosa</i> , <i>P. radiata</i>	
<i>Cladosporium</i> sp.	2	<i>P. ponderosa</i> , <i>P. sylvestris</i>	
<i>Coniochaeta pulveracea</i> (Ehrh.) Munk	3	<i>P. ponderosa</i> , <i>P. radiata</i>	
<i>Coniochaeta rhopalochaeta</i> A.I. Romero & Carmarán	6	<i>P. ponderosa</i>	
<i>Diplodia pinea</i> (Desm.) J. Kickx f.	25	<i>P. ponderosa</i>	<i>Pissodes castaneus</i>
<i>Dothiorella sarmentorum</i> (Fr.) A.J.L. <i>Phillips, Alves & Luque</i>	1	<i>Austrocedrus Chilensis</i>	
<i>Dyctiosporium</i> sp.	3	<i>P. sylvestris</i>	
<i>Endoconidiophora coerulescens</i> (Münch) <i>Z.W. De Beer, T. Dong, M.J. Wingf.</i>		<i>Pseudotsuga menziesii</i>	
<i>G. huntii</i> (Rob.-Jeffr.) Zipfel, Z.W. de Beer & M.J. Wingf.	3	<i>P. ponderosa</i> , <i>P. sylvestris</i>	<i>Hylastes. ater</i>
<i>G. radiaticola</i> (J.J. Kim, Seifert & G.H. Kim) Zipfel, Z.W. de Beer & M.J. Wingf.	9	<i>P. radiata</i>	<i>Hylurgus ligniperda</i> , <i>H. ater</i>
<i>Graphilbum</i> sp1	23	<i>P. sylvestris</i> , <i>P. ponderosa</i>	<i>H. ligniperda</i> , <i>O. laricis</i> .
<i>Hormonema</i> sp.	5	<i>P. ponderosa</i>	
Micelios estériles	9	<i>Pinus spp.</i>	
<i>O. peregrinum</i> sp. nov.	57	<i>Ps. menziesii</i> , <i>Pinus spp.</i>	<i>H. ligniperda</i> , <i>O. laricis</i>
<i>O. piliferum</i> (Fr.) Syd. & P. Syd.	49	<i>P. ponderosa</i> , <i>P. radiata</i>	<i>H. ligniperda</i> , <i>O. laricis</i> , <i>H. ater</i> , <i>Pi. castaneus</i>
<i>O. subannulatum</i> Livingston & R.W. Davidson	1	<i>Pinus sp.</i>	
<i>Ophiostoma ips</i> (Rumbold) Nannf.	19	<i>P. ponderosa</i> , <i>P. radiata</i>	<i>H. ligniperda</i> , <i>O. laricis</i>
<i>Pilidium concavum</i> (Desm.) Höhn.	11	<i>P. radiata</i> , <i>P. ponderosa</i>	
<i>Sclerophoma pithyophila</i> (Corda) Höhn.	9	<i>Pinus sp.</i>	
<i>Torula</i> sp	1	<i>P. radiata</i>	
<i>Ulocladium</i> sp.	4	<i>P. ponderosa</i> , <i>P. sylvestris</i>	

(G= *Grosmannia*, O= *Ophiostoma*)

Tabla 2. Aislamientos representativos de los hongos ofiostomatoides coleccionados sobre pináceas de la Patagonia, utilizados en los análisis filogenéticos.

Especie	Aislamiento	Hospedante	Provincia
<i>G. radiaticola</i>	CIEFAP164	<i>Pinus radiata</i>	CHB
<i>G. radiaticola</i>	CIEFAP168	<i>P. radiata</i>	CHB
<i>G. huntii</i>	CIEFAP311	<i>P. sylvestris</i>	NQN
<i>G. huntii</i>	CIEFAP585	<i>P. ponderosa</i>	NQN
<i>Graphilbum</i> sp1	CIEFAP586	<i>P. ponderosa</i>	CHB
<i>Graphilbum</i> sp1	CIEFAP190	<i>P. sylvestris</i>	RN
<i>Graphilbum</i> sp1	CIEFAP569	<i>P. ponderosa</i>	CHB
<i>Graphilbum</i> sp1	CIEFAP572	<i>P. sylvestris</i>	RN
<i>O. ips</i>	CIEFAP568	<i>P. ponderosa</i>	NQN
<i>O. ips</i>	CIEFAP160	<i>P. radiata</i>	CHB
<i>O. peregrinum</i> sp. nov.	CIEFAP41	<i>P. ponderosa</i>	NQN
<i>O. peregrinum</i> sp. nov.	CIEFAP104	<i>P. radiata</i>	CHB
<i>O. peregrinum</i> sp. nov.	CIEFAP570	<i>P. ponderosa</i>	NQN
<i>O. peregrinum</i> sp. nov.	CIEFAP574	<i>P. ponderosa</i>	CHB
<i>O. peregrinum</i> sp. nov.	CIEFAP575	<i>P. ponderosa</i>	NQN
<i>O. peregrinum</i> sp. nov.	CIEFAP576	<i>P. ponderosa</i>	NQN
<i>O. peregrinum</i> sp. nov.	CIEFAP577	<i>Ps. menziesii</i>	RN
<i>O. peregrinum</i> sp. nov.	CIEFAP578	<i>P. ponderosa</i>	NQN
<i>O. peregrinum</i> sp. nov.	CIEFAP340	<i>Ps. menziesii</i>	RN
<i>O. piliferum</i>	CIEFAP312	<i>P. ponderosa</i>	NQN
<i>O. piliferum</i>	CIEFAP579	<i>P. ponderosa</i>	NQN
<i>O. piliferum</i>	CIEFAP580	<i>P. ponderosa</i>	NQN
<i>O. piliferum</i>	CIEFAP581	<i>P. ponderosa</i>	NQN
<i>O. piliferum</i>	CIEFAP583	<i>P. ponderosa</i>	CHB

(CHB=Chubut, NQN=Neuquén, RN=Río Negro. G= *Grosmannia*, O= *Ophiostoma*)

Comparación de secuencias de ADN

Las 26 secuencias de la región ITS obtenidas fueron comparadas con 159 secuencias del GenBank, representando los diferentes géneros de la familia Ophiostomataceae. Se utilizó el alineamiento logrado mediante la estrategia FFT-NS-i en el programa MAFFT 7.0 (online). El mismo resultó en una matriz de 813 caracteres incluyendo gaps. Con esta matriz se realizó un análisis preliminar mediante el cual se pudieron asignar todos los aislamientos de la Patagonia a los géneros *Ophiostoma*, *Graphilbum* y *Grosmannia*. Posteriormente se construyeron 3 matrices de la región ITS, una para cada género.

ITS

La matriz del género *Ophiostoma* contó con 76 secuencias, 17 secuencias correspondientes a cultivos de la Patagonia y 59 que representaron la totalidad de especies con secuencias disponibles dentro del género (De Beer & Wingfield, 2013a). El alineamiento produjo una matriz de 780 caracteres incluyendo gaps. Uno de los 23 árboles más parsimoniosos, con 746 pasos, se muestra en la Figura 2. Para este análisis fueron excluidos de la matriz 570 caracteres no-informativos. Los soportes estadísticos están indicados en dicha figura. Las secuencias de cultivos de la Patagonia se distribuyen en 3 grupos bien definidos: el primer grupo de secuencias corresponden al complejo *O. piceae* (CIEFAP41, CIEFAP104, CIEFAP340, CIEFAP570, CIEFAP574, CIEFAP75 al CIEFAP578). El segundo grupo de secuencias quedaron incluidas en *O. piliferum* (CIEFAP579, CIEFAP580, CIEFAP581, CIEFAP583, CIEFAP312) y el tercero en el complejo de especies *O. ips* (CIEFAP160 y CIEFAP568). Exceptuando *O. piliferum*, dentro de los complejos mencionados no se contó con la resolución necesaria para lograr una identificación confiable a nivel específico. Los

análisis de Máxima verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB) resultaron en topologías similares.

La matriz del género *Graphilbum* se construyó con 4 secuencias obtenidas en este estudio y 23 secuencias representativas del género, resultando una matriz de 790 caracteres incluyendo gaps. Para el análisis de MP se excluyeron 608 caracteres. El análisis dio como resultado 22 árboles igualmente parsimoniosos, cada uno con 360 pasos de longitud. Uno de estos árboles, junto a los índices IC e IR y los soportes estadísticos, se muestra en la Figura 3. En la misma se puede apreciar que los aislamientos de la Patagonia residen en un clado junto a *Graphilbum fragrans* (Math.-Käärik) Z.W. de Beer, Seifert & M.J. Wingf., *G. microsporum* (Yamaoka & Masuya) Z.W. de Beer, Masuya & Yamaoka y a otros aislamientos obtenidos en estudios previos que no han sido descritos formalmente.

La matriz del género *Grosmannia* se construyó con 2 secuencias de la Patagonia y 41 secuencias representativas del género. Las secuencias fueron alineadas obteniéndose una matriz de 802 caracteres incluyendo gaps. Para el análisis de MP fueron excluidos 564 caracteres. Uno de los 9 árboles más parsimoniosos, de 725 pasos, se muestra en la Figura 4, junto a los valores de IC, IR y los soportes estadísticos correspondientes. Una de las secuencias de la Patagonia corresponde a *G. huntii*, mientras que la segunda quedó incluida en el grupo de *G. radiaticola*, *G. galeiformis* y especies afines.

BT2

Para confirmar las identificaciones logradas y resolver las restantes, se realizaron filogenias basadas en la región BT2. La matriz que incluyó las secuencias CIEFAP41, CIEFAP104, CIEFAP340, CIEFAP570, CIEFAP574, CIEFAP575, CIEFAP576, CIEFAP577 y

CIEFAP578 evidenció un agrupamiento claro de éstas con las secuencias CIEFAP464 (obtenida en este estudio sobre *Nothofagus dombeyi*, ver Capítulo I) y CMW29495 (obtenida por Linnakoski (2009) sobre *Betula* en Noruega. Este clado corresponde a una nueva especie, *Ophiostoma peregrinum* (ver Taxonomía, más abajo). El análisis basado en la porción del gen BT2 validó la identificación morfológica de *O. piliferum*, en concordancia con los resultados de la región ITS, y evidenció cierta variabilidad entre las cepas argentinas. La topología de los árboles obtenidos mediante los distintos análisis (MP, MV e IB) coincidieron en agrupar las cepas argentinas con las de *O. ips* de diferentes lugares del mundo, con excelentes soportes estadísticos. Los aislamientos del género *Graphilbum* procedentes de la Patagonia fueron incluidos ya sea junto a la especie tipo de *G. fragrans* como a otros aislamientos de Asia y Europa, la mayoría de los cuales no han sido descritos aún (Figura 3).

Por último, Los aislamientos identificados morfológicamente como *G. huntii* formaron un clado bien soportado estadísticamente con otros aislamientos de *G. huntii* de otros países, de forma similar a lo observado para la región ITS. Los otros aislamientos pertenecientes al género *Grosmannia* obtenidos en la Patagonia, quedaron incluidos en un grupo muy bien definido, donde residen distintos aislamientos de *G. radiaticola* coleccionados en varios países. Este grupo presentó una estructura interna con un sustento estadístico razonable, donde las cepas argentinas se vinculan estrechamente a otros aislamientos de Chile y Nueva Zelanda (Figura 4).

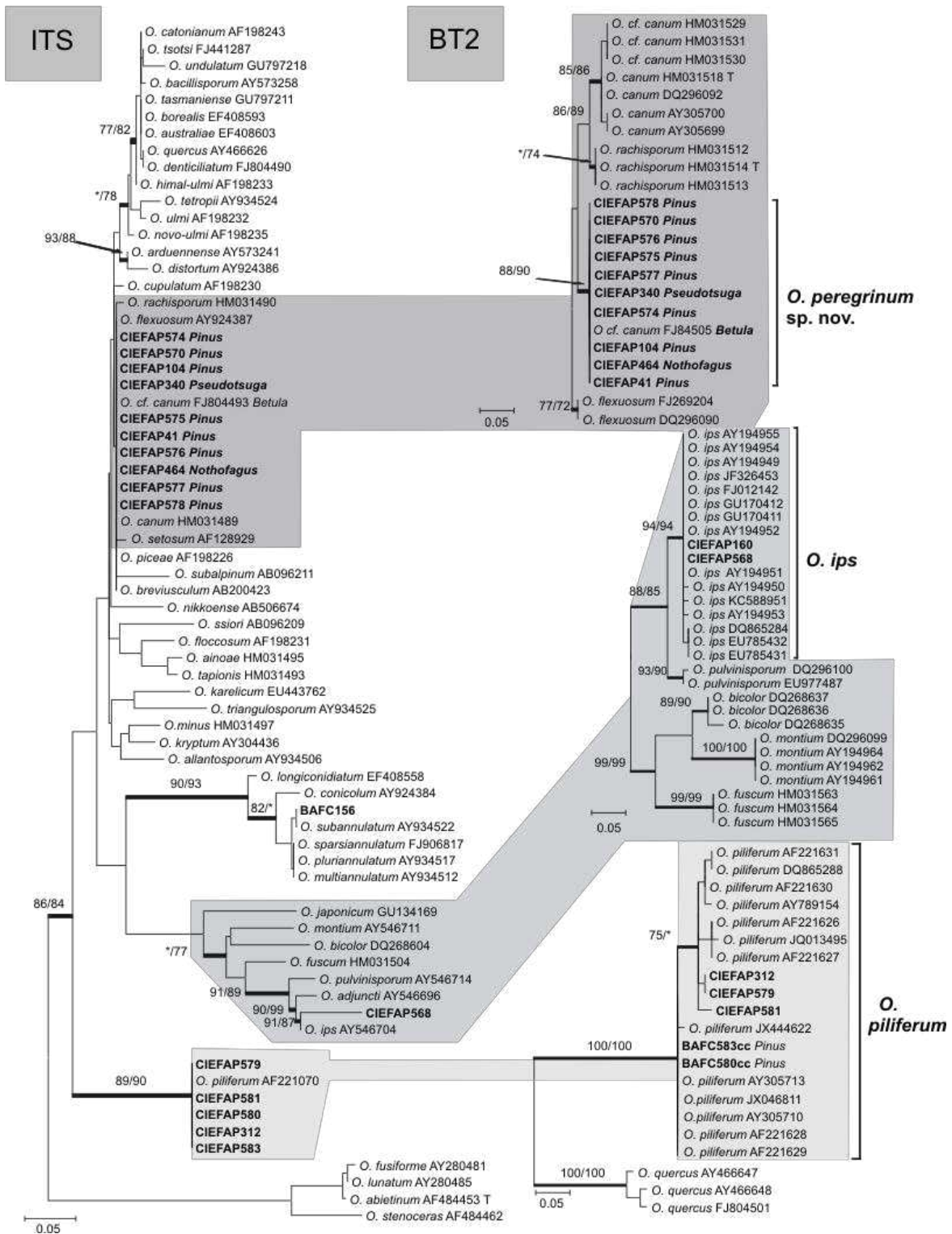


Figura 2. Filogramas (MV) basados en las regiones ITS y BT2 de especies de *Ophiostoma*. Los soportes estadísticos >70 están indicados en cada nodo (MP/MV). Los Valores < 70 están indicados como *. Las probabilidades a posteriori >90 están indicadas mediante líneas de trazo grueso. Los nombres en negrita indican secuencias obtenidas en este estudio. Barra=diferencia nucleotídica total entre taxones. *O.*=*Ophiostoma*.

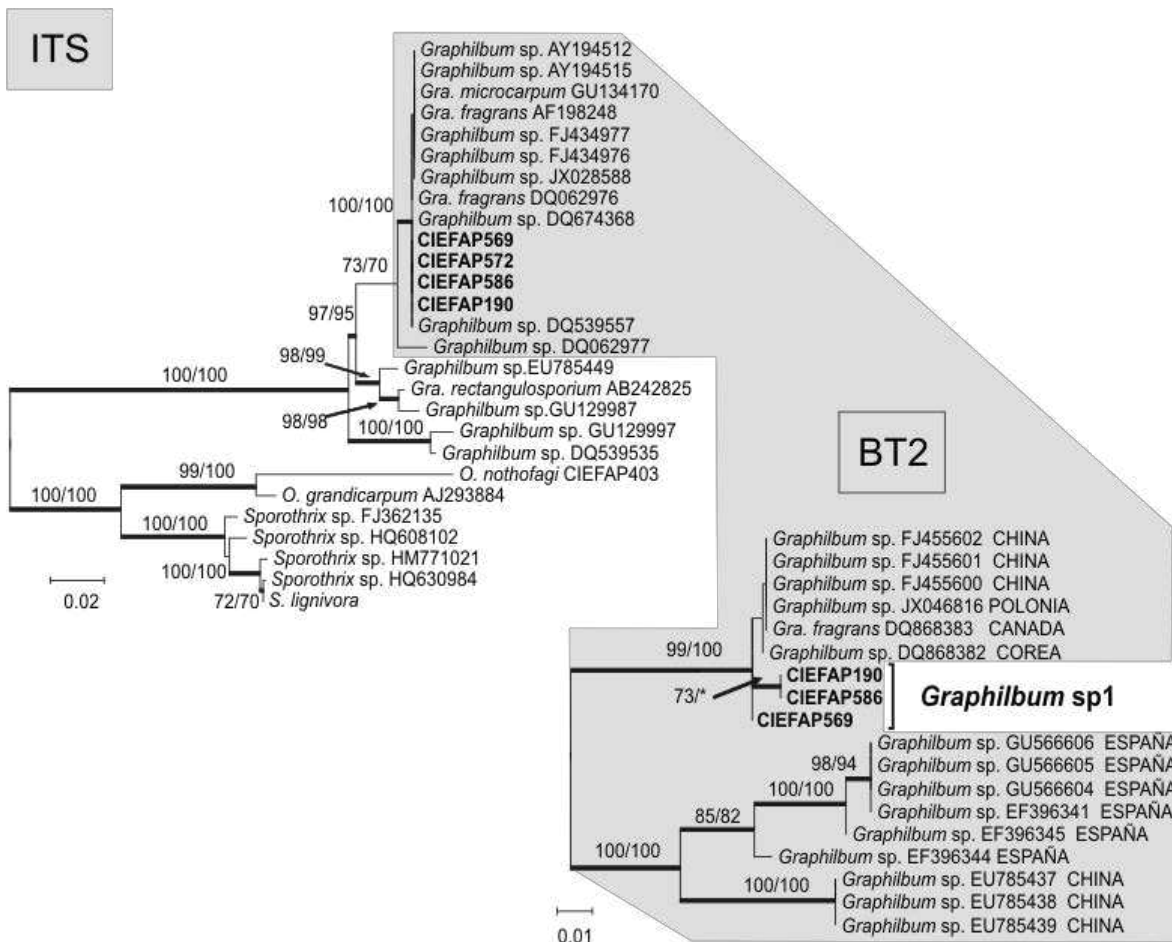


Figura 3. Filogramas (MV) basados en las regiones ITS y BT2 de especies de *Graphilbum*. Los soportes estadísticos >70 están indicados en cada nodo (MP/MV). Los Valores < 70 están indicados como *. Las probabilidades a posteriori >90 están indicadas mediante líneas de trazo grueso. Los nombres en negrita indican secuencias obtenidas en este estudio. Barra=diferencia nucleotídica total entre taxones. *Gra.*=*Graphilbum*.

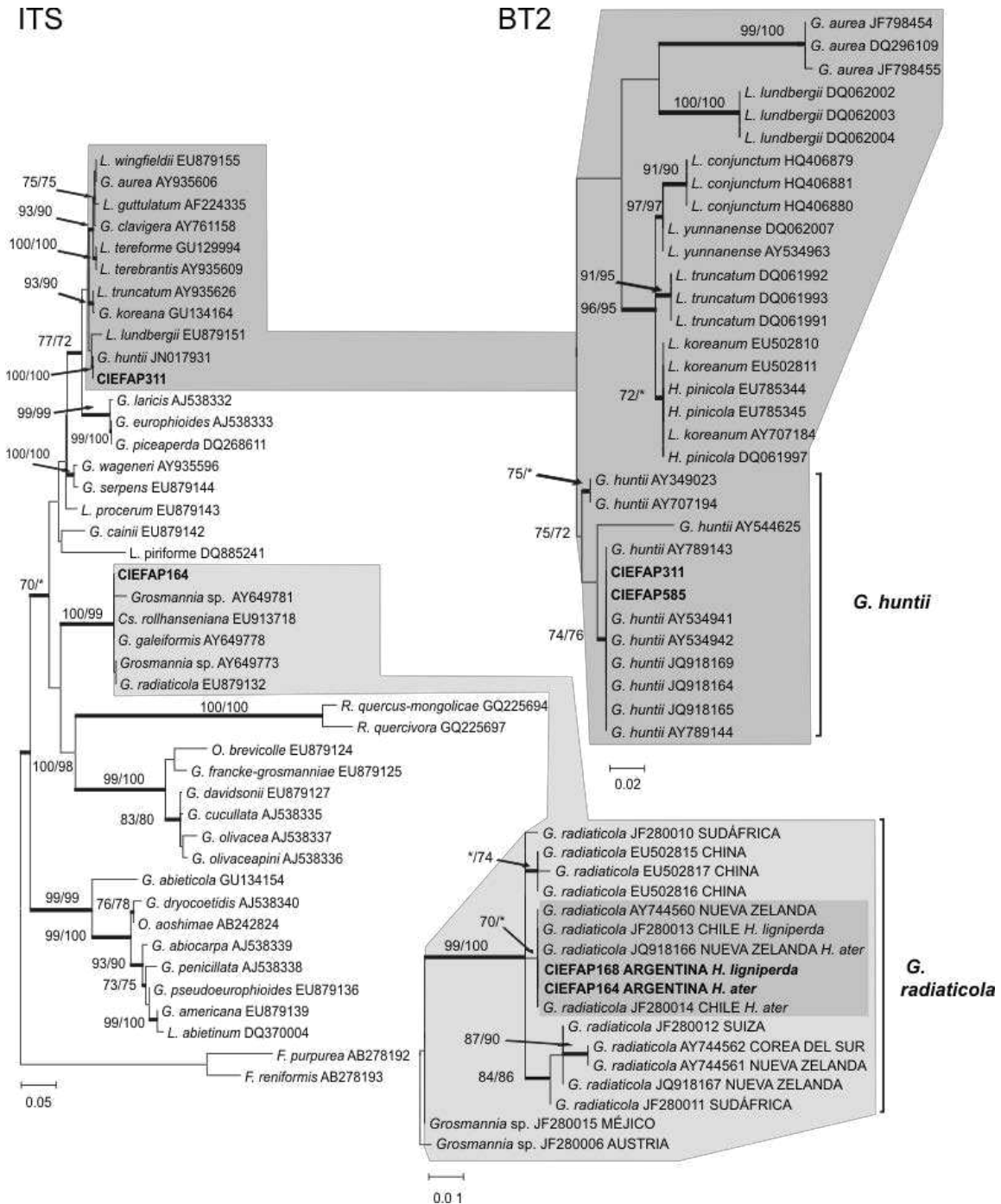


Figura 4. Filogramas (MV) basados en las regiones ITS y BT2 de especies de *Grosmannia*. Los soportes estadísticos >70 están indicados en cada nodo (MP/MV). Los Valores < 70 están indicados como *. Las probabilidades a posteriori >90 están indicadas mediante líneas de trazo grueso. Los nombres en negrita indican secuencias obtenidas en este estudio. Barra=diferencia nucleotídica total entre taxones. *G.*=*Grosmannia*, *O.*=*Ophiostoma*.

Taxonomía

Las especies de hongos responsables de las manchas de albura sobre coníferas obtenidos en el presente estudio, fueron asignados a 20 taxones diferentes, pertenecientes a las clases Sordariomycetes (10), Dothideomycetes (9) y Leotiomycetes (1). Dentro de los Sordariomycetes, 8 taxones fueron identificados a nivel de especie y 2 a nivel de complejo o grupo de especies. Entre los Dothideomycetes 3 taxones fueron identificados a nivel de especie y 6 a nivel genérico. El único taxón perteneciente a la clase Leotiomycetes fue identificado a nivel específico. Las determinaciones morfológicas de la mayoría de las especies de la familia Ophiostomataceae (6) fueron complementadas mediante análisis moleculares. Las identificaciones restantes fueron realizadas mediante técnicas morfológicas y solo aquellas identificadas a nivel específico, se presentan a continuación.

I Dothideomycetes

Botryosphaeriaceae Theiss. & Syd.

***Diplodia pinea* (Desm.) Kickx**

Figura 5

Descripción: Sutton BC (1980) *The Coelomycetes*, p. 231

Hospedantes: *Pinus ponderosa*.

Ecología: presente en trozas recién apeadas

Distribución: NO de la Provincia del Chubut

Especímenes examinados: ARGENTINA, Chubut, Dto. Futaleufú, Las Golondrinas, Destacamento de la Dirección General de Bosques y Parques del Chubut (DGBYP), sobre *P. radiata*, Ago 2011, A. de Errasti (CIEFAP587) y Dic 2011, A. de Errasti (CIEFAP588).

Observaciones: bajo *Diplodia* se han descrito conidiomas de especies de Botryosphaeriaceae. *D. pinea* ya fue citada para Neuquén (como *Sphaeropsis sapinea*) durante una prospección fitosanitaria donde se detectaron ejemplares de pino ponderosa de unos 8 a 10 años con muerte apical. A través de una observación más detallada se determinaron a campo los siguientes síntomas: resinosis en fuste, rama y acículas; clorosis en bandas sobre las acículas; acículas de color castaño claro; microfilia; caída de acículas; manchas oscuras de 1 a 2 mm sobre acículas y ramas; restitución de crecimiento vertical por las yemas laterales, copas con aspecto de candelabro. Se estimó que aproximadamente un 30 % del rodal presentaba síntomas de muerte apical (Mattes Fernández et al., 2010).

Su conidioma produce esporas grandes, oscuras, de pared lisa y sin septos (aunque algunas pueden presentar un septo). Las esporas suelen pigmentarse antes de abandonar el conidioma. Asociada al daño de *Pissodes castaneus*. Los materiales de la Patagonia concuerdan con la descripción de *Diplodia pinea* morfotipo A, tanto en las características de cultivo como en la morfología de los conidios (Wang et al., 1985). Sin embargo la presencia en Uruguay de *D. scrobiculata* (Carlos Pérez UDELAR, com. pers.), muy similar a *D. pinea*, requiere de un análisis molecular para confirmar la identidad del material de la Patagonia.

***Dothiorella sarmentororum* (Fr.) A.J.L. Phillips, Alves & Luque**

Figura 5

Descripción: Booth C (1958) Transactions of the British Mycological Society 41: 335–340.

Hospedantes: *Austrocedrus chilensis*.

Ecología: presente en trozas recién apeadas

Distribución: NO de la Provincia del Chubut

Especímenes examinados: ARGENTINA, Chubut, Dto. Futaleufú, Reserva Provincial El Turbio, Destacamento de la Dirección General de Bosques y Parques del Chubut (DGBYP), sobre *A. chilensis*, Abr 2009, A. de Errasti (CIEFAP14).

Observaciones: Bajo *Dothiorella* se han descripto conidiomas de especies de Botryosphaeriaceae. *D. sarmentororum* fue coleccionada sobre una conífera nativa, lo cual motivaría en sentido estricto su inclusión en el Capítulo I (Taxonomía de hongos manchadores del bosque-andinopatagónico). De todas formas por estar relacionada a una conífera y para poder diferenciarla fácilmente de *D. pinea* es incluida en esta sección. La diferencia principal radica, además del hospedante, en que *Dothiorella sarmentororum* posee conidios mayormente septados, a diferencia de *D. pinea* que son mayormente unicelulares.

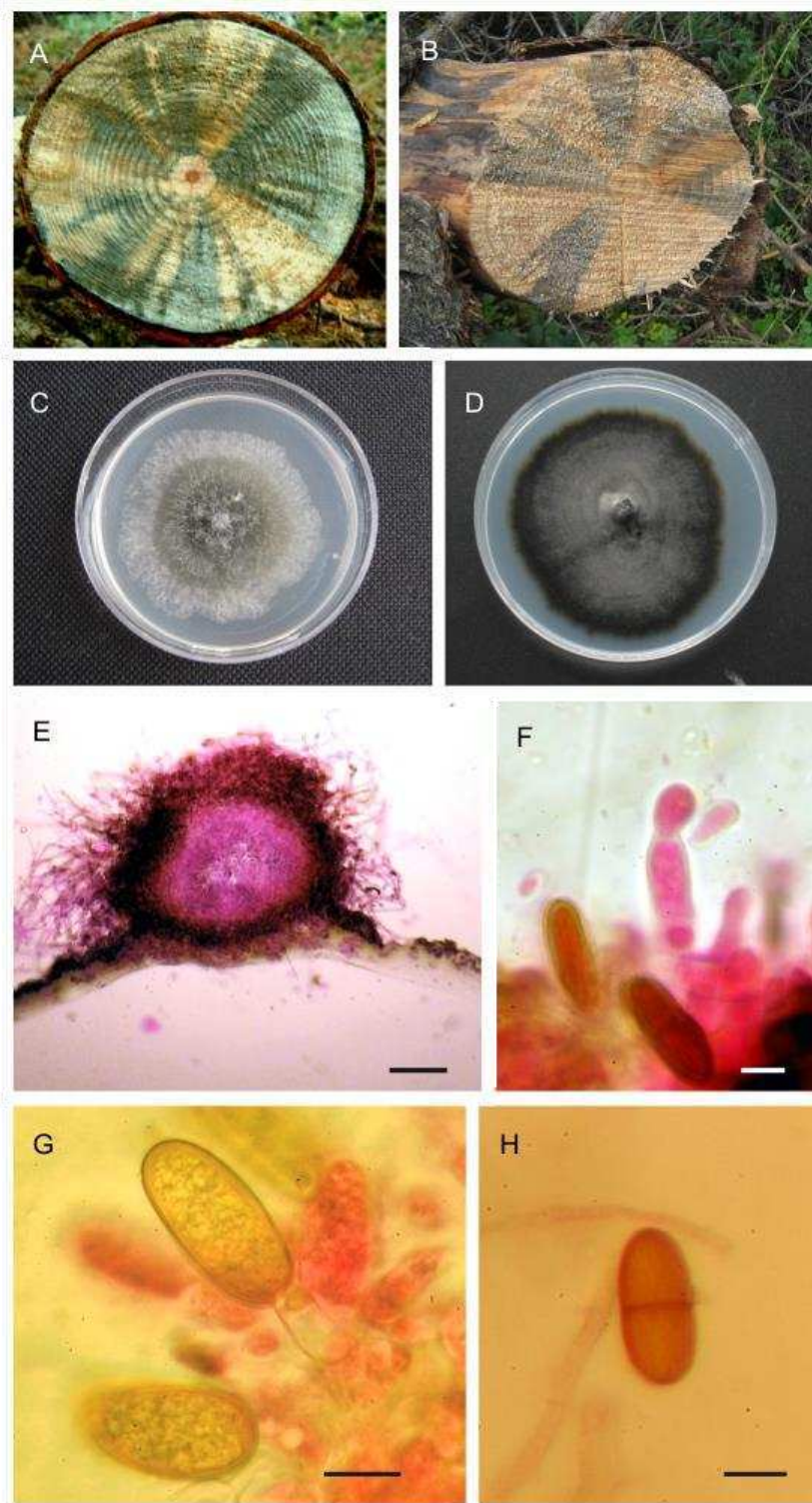


Figura 5. A, C, E, G *Diplodia pinea*. B, D, F, H *Dothiorella sarmentorum* A, B Madera manchada. B, C Cultivo en AM. E Conidioma en cultivo de AM. F,G Células conidiógenas con conidios H Detalle de conidio bicelular. Barra en E = 100 μ m; F, G, H = 10 μ m.

Dothioraceae Theiss. & P. Syd.

***Sclerophoma pithyophila* (Corda) Höhn.**

Figura 6

Descripción: Sutton BC (1980) *The Coelomycetes*, pp 221-222.

Hospedantes: *Pinus* sp.

Ecología: trozas recién apeadas

Distribución: NO de la Provincia del Chubut

Especímenes examinados: ARGENTINA: Chubut, Dto. Futaleufú, EEA INTA Esquel, Campo experimental Aldea Escolar, sobre *Pinus* sp., Sep 2009, A. de Errasti (CIEFAP145). Paraje 'El Coihue', Aserradero Franco, sobre *Pinus* sp., Sep 2009 (CIEFAP161).

Observaciones: Esta especie es la fase asexual de *Sydowia polispora* (Bref. & Tavel) E. Müll. Se puede reconocer por sus conidiomas multiloculares, de forma irregular, sin ostíolo. Por otra parte sus células conidiógenas tienen una gran perurrencia entre la producción de sucesivos conidios, los cuales son cilíndricos y pequeños. Esta especie es considerada un organismo saprobio que coloniza ascículas moribundas (Sinclair & Lyon, 2005) aunque puede comportarse como un patógeno facultativo débil ante árboles bajo estrés (Funk, 1985). Por la decoloración que produce ha sido considerada como hongo manchador en estudios previos (Butin, 1963). Gomez et al. (2011) la citan en la Patagonia como agente defoliador en pinos sometidos a estrés.

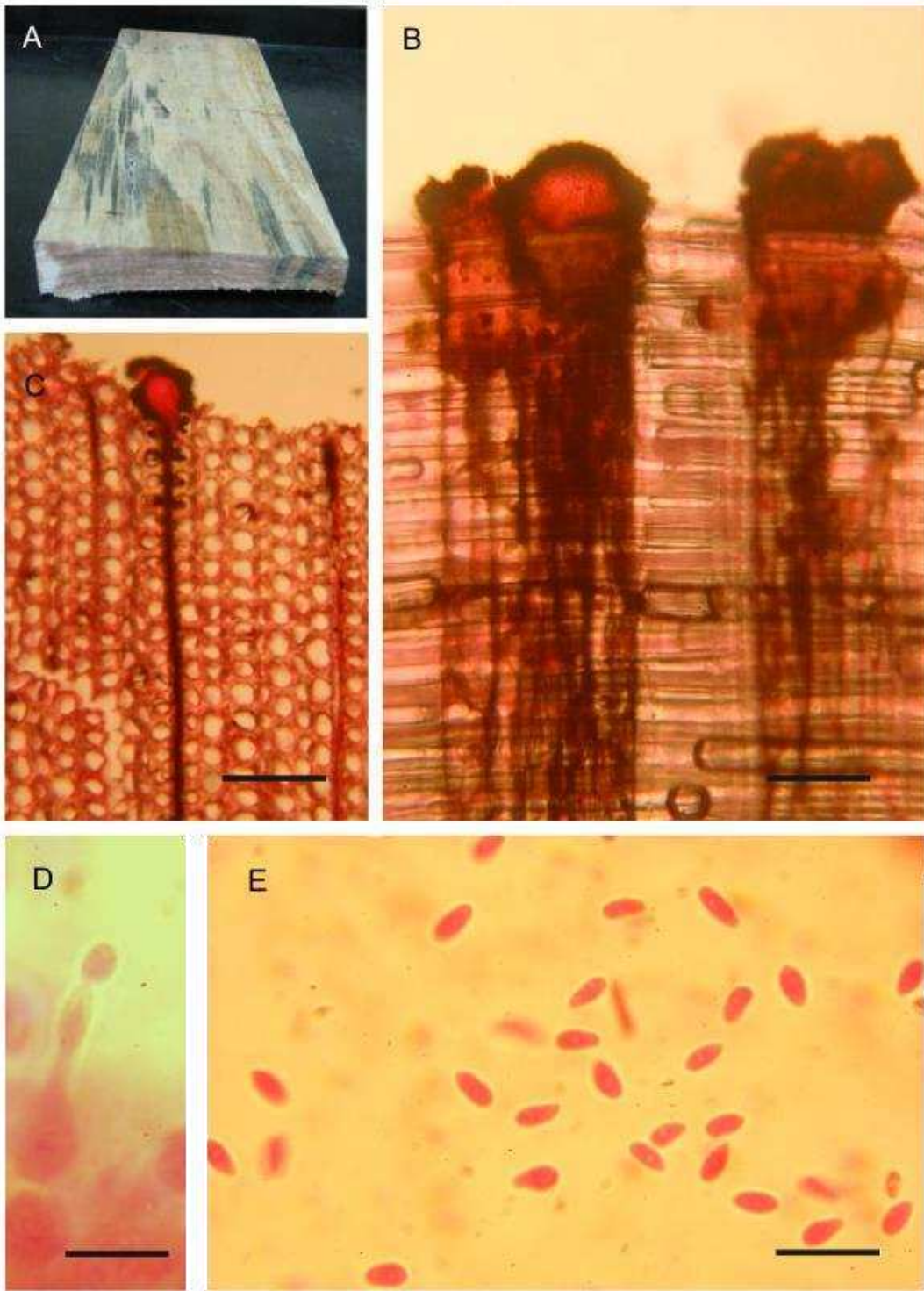


Figura 6. *Sclerophoma phityophila*. **A** Madera manchada. **B, C** Conidioma. **D** Célula conidiógena. **E** Conidios. Barra B = 50µm; C = 100µm; D, E = 10µm.

II Leotiomycetes

Dermateaceae Fr.

***Pilidium concavum* (Desm.) Höhn.**

Figura 7

Descripción: Sutton BC (1980) *The Coelomycetes*. pp 211-212.

Hospedantes: *Pinus radiata*, *P. ponderosa*.

Ecología: madera aserrada y trozas apeadas recientemente.

Distribución: zona andina de las provincias de Chubut y Neuquén

Especímenes coleccionados: ARGENTINA, Neuquén, P.N. Lanín, Ea. Quechuquina, sobre *P. ponderosa*, May 2009, A. de Errasti (CIEFAP32). Chubut, Dto. Futaleufú, Cerro Radal, parcela DGBYP Chubut, sobre *P. radiata*, Jun 2009, A. de Errasti (CIEFAP111).

Observaciones: fase asexual de *Discohainesia oenotherae* (Cooke & Ellis) Nannf. (Dermateaceae, Helotiales). Se caracteriza por la forma alargada de su conidioma y sus conidios falcados. No se encontraron registros ni antecedentes de este organismo como causante de mancha de albura.

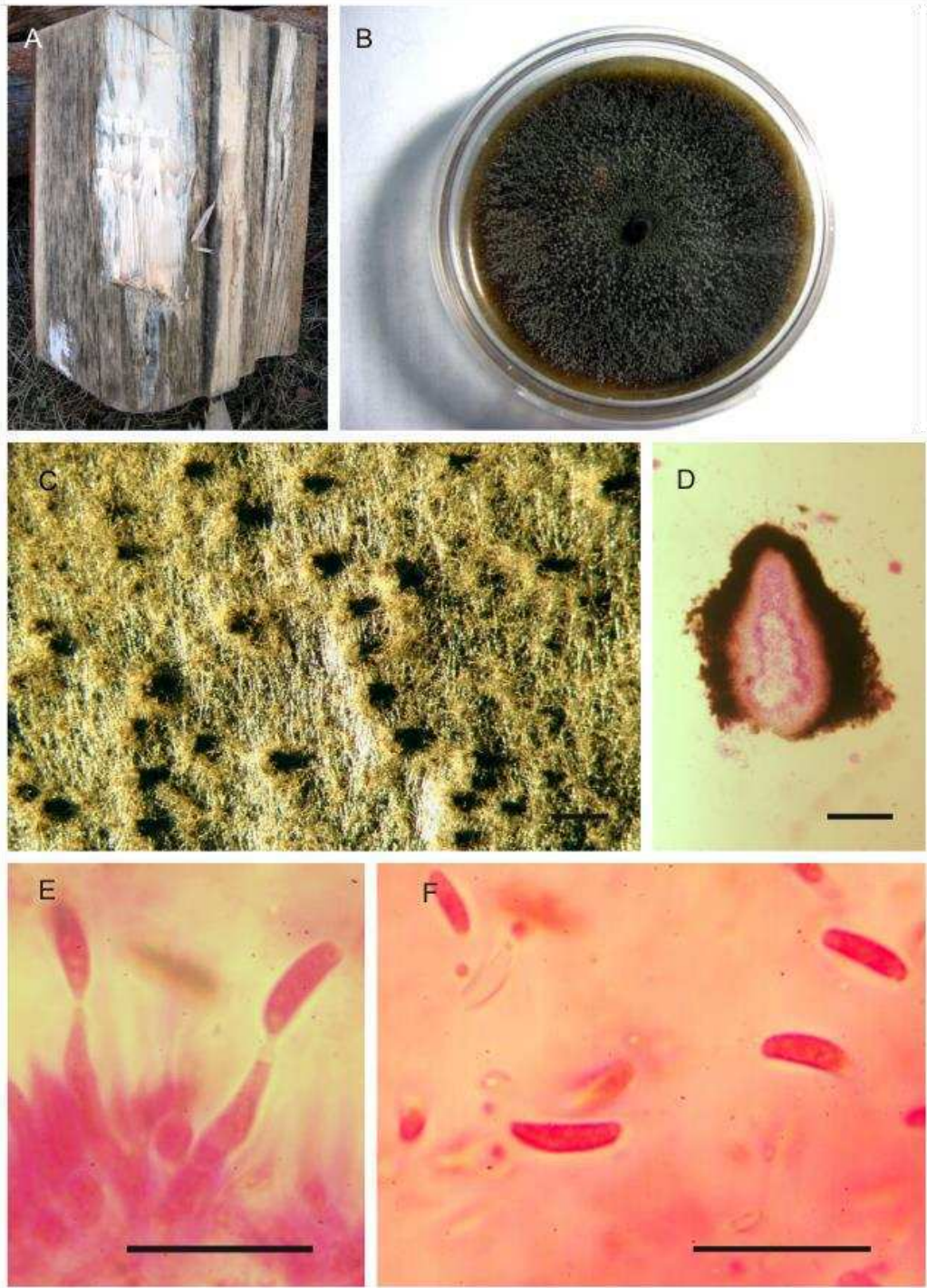


Figura 7. *Pilidium concavum*. **A** Madera manchada. **B** Cultivo en AM. **C, D** Conidioma en cultivo de AM. **E** Célula conidiógena. **F** Conidios. Barra C = 100µm; D = 50µm; E, F = 10µm.

III Sordariomycetes

Coniochaetaceae Malloch & Cain

***Coniochaeta pulveracea* (Ehrh.) Munk**

Figura 8

Estado asexual: tipo-*Phialophora*.

Descripción: Munk A (1908) Dansk Botanisk Arkiv 12(11):9.

Hospedantes: *Pinus radiata*.

Ecología: saprófito sobre tocones y trozas recién apeadas.

Distribución: NO de la provincia del Chubut.

Especimen examinado: ARGENTINA, Chubut, Dto. Futaleufú, Lago Epuyén, Plantaciones a lo largo de la senda Puerto Bonito – Playa Alemán, sobre *P. radiata*, Ene 2010, A. de Errasti (CIEFAP237).

Observaciones: esta especie fue citada para la Argentina sobre *E. viminalis* en la Provincia de Buenos Aires (Romero et al. 1999). Se caracteriza por ascomas periteciales globosos y ornamentados. Sus ascosporas oscuras, con surco germinativo, maduran dentro del asco (aparato apical amiloide). Sus ornamentaciones rectas, con extremos agudos las diferencian de *C. raphalochaeta*.

***Coniochaeta rhopalochaeta* A.I. Romero & Carmarán**

Figura 8

Estado asexual: tipo-*Phialophora*.

Descripción: Romero AI, Carmarán CC, Lorenzo LE (1998) Mycological Research 103(6):689-690.

Hospedantes: *Pinus ponderosa*.

Ecología: sobre troza apeada recientemente

Distribución: NO de la Provincia del Chubut

Especímen examinado: ARGENTINA, Chubut, Dto. Futaleufú, El Pedregoso, Aserradero Filippi, sobre *P. ponderosa*, Abr 2009, A. de Errasti (CIEFAP4) .

Observaciones: esta especie fue descrita por Romero et al. (1999) sobre *Bulnesia retama* en la Provincia de San Juan. Las ornamentaciones del ascoma, cuyo ápice termina en forma de clava, es la característica distintiva de esta especie. Asco con aparato apical amiloide. Ascosporas oscuras de tamaño similar a la especie anterior, con surco germinativo.

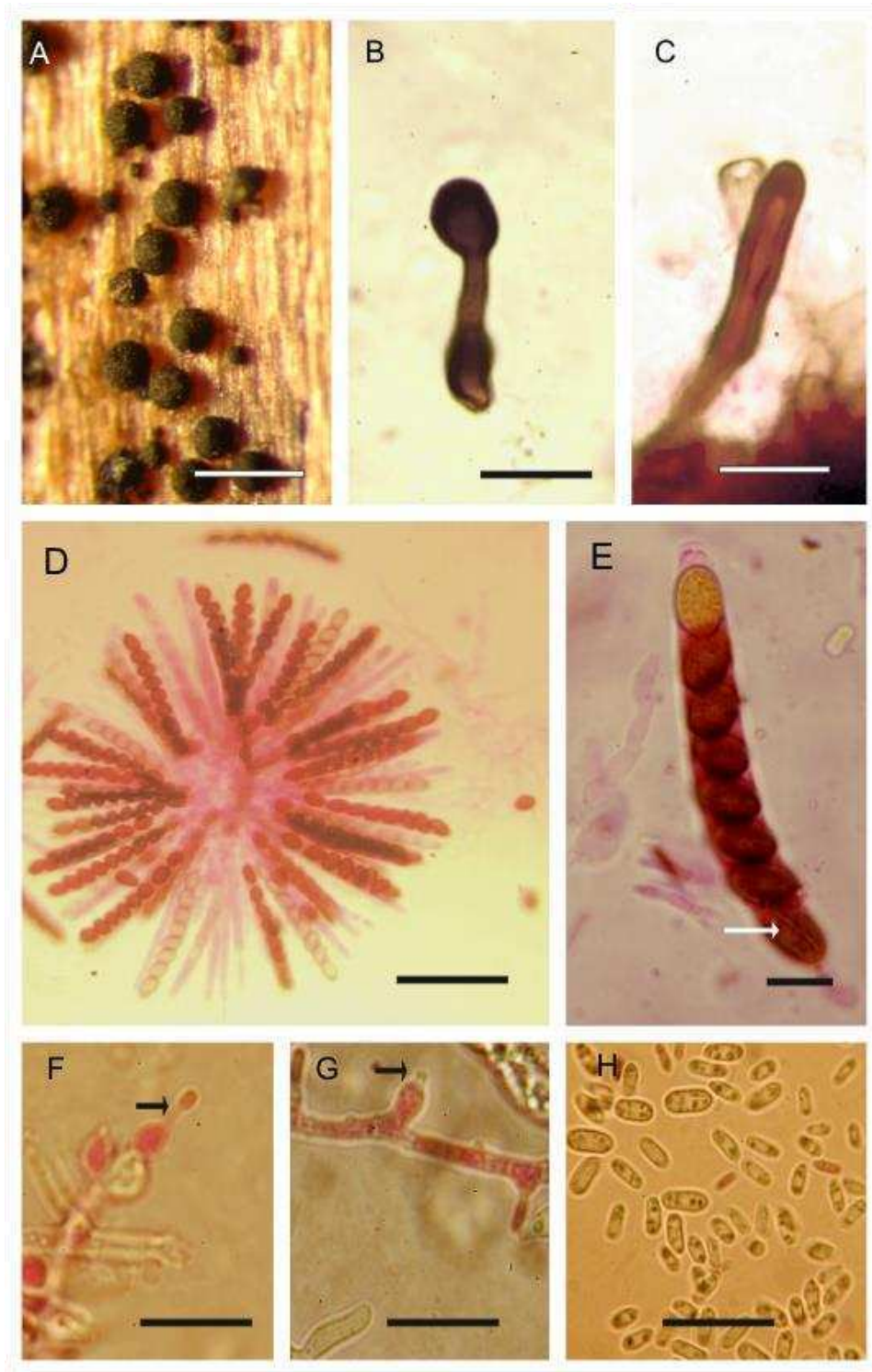


Figura 8. *Coniochaeta rhopalochaeta* A, B, F, H; *Coniochaeta scatigena* C,D,E,G. **A** Ascoma. **B, C** Ornamentaciones del ascoma. **D** Ascogonios. **E** Ascogonio con ascosporas, la flecha indica el surco germinativo de las mismas. **F, G** Células conidiógenas, la flecha indica la perithecia (fiálides). **H** Conidios. Barra A = 100µm; B, C, D, F, G, H = 10µm, E = 5 µm.

Ceratocystidaceae Locq. ex Réblová, W. Gams & Seifert

***Endoconidiophora coerulescens* (Münch) Z.W. De Beer, T. Duong, M.J.**

Wingf.

Figura 9

Estado asexual: tipo-*Thielaviopsis*

Descripción: Davidson RW (1935) Journal of Agricultural Research 50:789-807.

Hospedantes: *Pseudotsuga menziesii*

Distribución: Isla Victoria, Provincia de Río Negro.

Especímen examinado: ARGENTINA, Río Negro, P.N. Nahuel Huapi, Isla Victoria, Aprovechamiento cercano al vivero forestal, sobre *Pseudotsuga menziesii*, May 2010, A. de Errasti (CIEFAP334).

Observaciones: Especímen con la morfología típica del género *Endoconidiophora* Münch. Estas especies, morfológicamente muy difíciles de diferenciar, afectan mayormente coníferas. Se caracterizan por sus ascomas de cuello largo, ornamentados con hifas en el vientre, ascosporas elípticas con vainas y estado asexual tipo-*Thielaviopsis*. Actualmente las especies se identifican mediante filogenias moleculares basadas en las regiones BT y TEF 1- α . La especie encontrada en la Patagonia fue descrita en base a material de herbario del cual no se pudieron obtener aislamientos para su análisis molecular. No existen citas previas para este grupo de especies en el sur de Sudamérica.

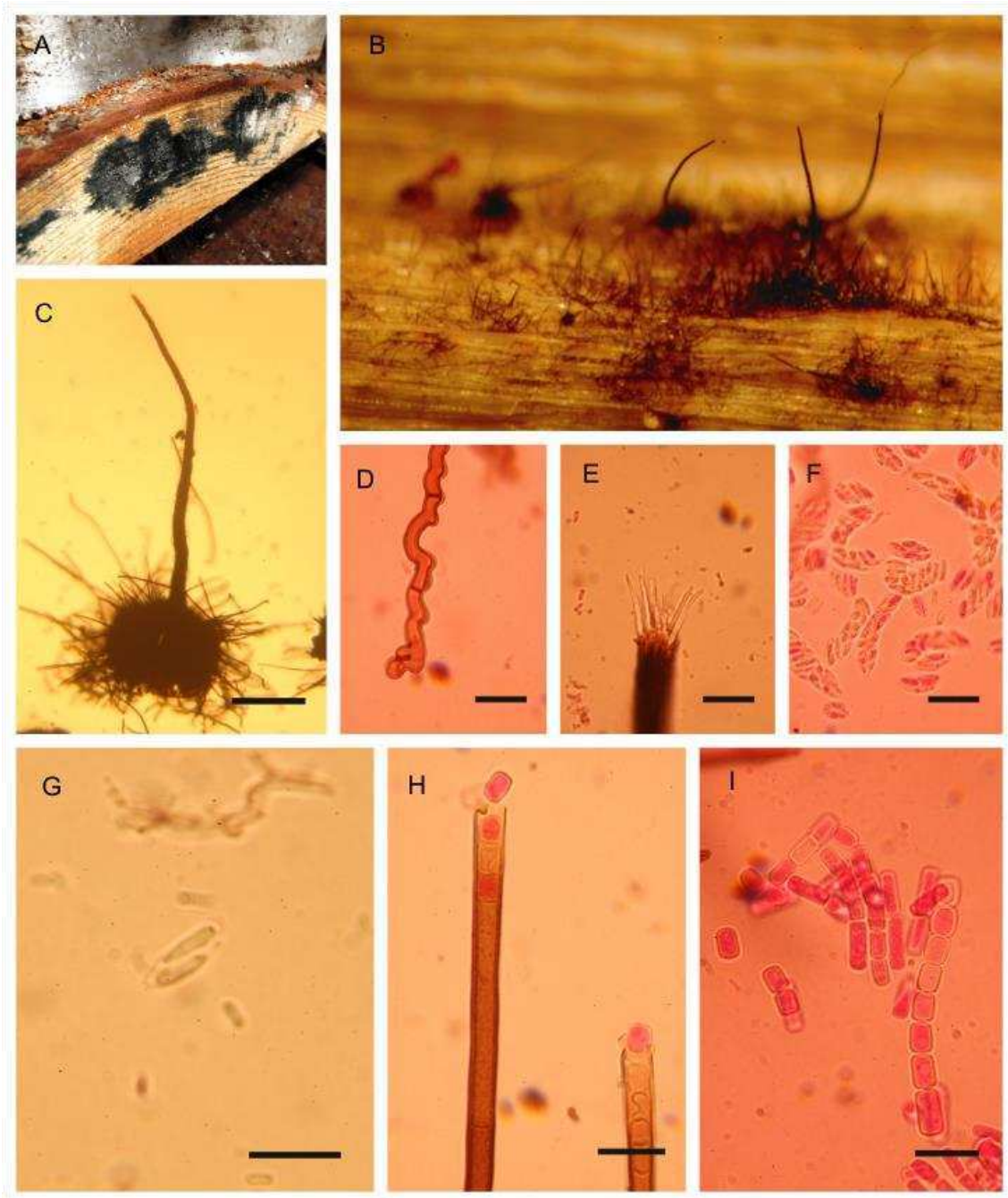


Figura 9. *Endoconidiophora coerulescens* s.l. **A** Madera manchada. **B** Ascomas y conidióforos en sustrato natural. **C** Ascoma peritecial. **D** Hifas de la parte inferior del vientre del ascoma. **E** Cuello del peritecio, con hifas ostiolares. **F** Ascoc. **G** Ascospora. **H** Conidióforo tipo-*Thielaviopsis*. **I** Conidios cilíndricos y doliformes. Barra C = 100 μ m; D, E, F, G, H, I = 10 μ m.

Ophiostomataceae Nannf.

Ophiostoma ips (Rumbold) Nannf.

Figura 10

Estado asexual: tipo-*Hyalorhinocladiella*.

Descripción: Rumbold CT (1936) Journal of Agricultural Research 52: 419-437 (1906).

Hospedantes: *Pinus ponderosa*, *P. radiata*.

Distribución: Zona cordillerana y pre-cordillerana de Chubut y Neuquén.

Ecología: Asociada a *Hylurgus ligniperda* y *Ortothomicus laricis*.

Especímenes examinados: ARGENTINA, Neuquén, Dto. Los Lagos, Lago Meliquina, Ea. San Jorge, sobre *Pinus ponderosa*, Dic 2011, Andrés de Errasti, (CIEFAP586). Chubut, Dto. Futaleufú, Paraje 'El Coihue', Aserradero Franco, sobre *Pinus* sp., Sep 2009, Andrés de Errasti (CIEFAP160).

Observaciones: esta especie y otras especies del complejo producen ascosporas cilíndricas con vainas mucilaginosas que le confieren el aspecto de una 'almohada'. Las ascosporas se agrupan en gotas sobre un cuello sin hifas ostiolares. El estado asexual es descrito como "tipo-*Hyalorhinocladiella*" en la literatura (De Beer et al., 2013a)

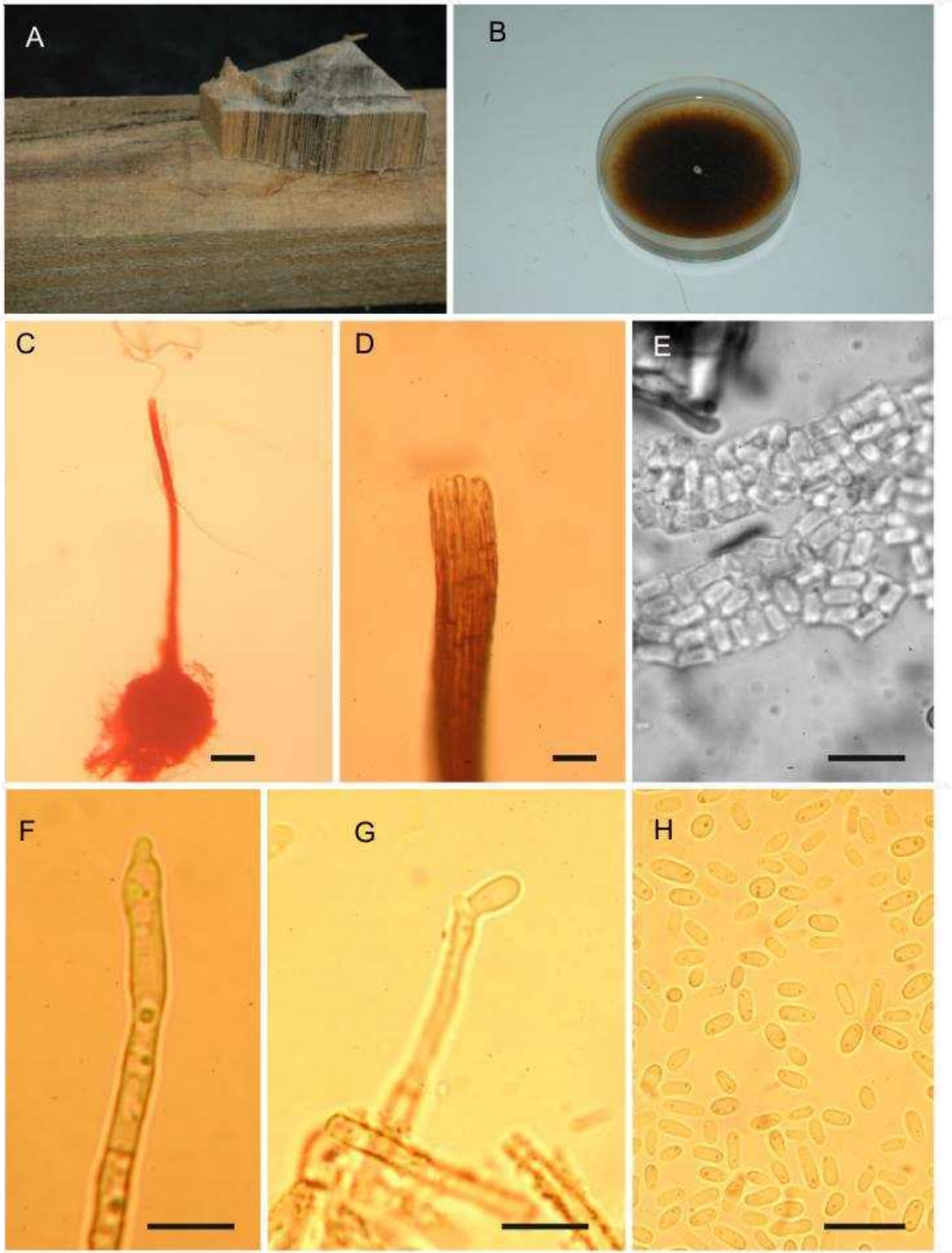


Figura 10. *Ophiostoma ips* **A** Madera manchada. **B** Aspecto del cultivo en AM. **C** Ascoma peritecial. **D** Ápice del cuello, sin hifas ostiolares. **E** Ascosporas. **F** Célula conidiógena tipo-*Hyalorhinocladiella*. **G** Conidiogénesis. **H** Conidios. Barra en C = 100 μ m; en D, E, F, G, H = 10 μ m.

***Ophiostoma peregrinum* sp. nov. de Errasti & Rajchenb.**

Mycobank MBxxxxxx; Holotipo: ARGENTINA, Chubut, Dto. Futaleufú, EEA INTA Esquel, Campo Experimental Aldea Escolar, sobre *Pinus radiata*, May 2009, A. de Errasti (CIEFAP104).

Figura 11

Etimología: el epíteto '*peregrinum*' en su acepción más simple significa 'viajero', una de las características de esta especie capaz de colonizar latifoliadas y coníferas en distintos continentes.

Ascoma ausente en sustrato natural y en cultivo. Sinemas solitarios o en grupos (3-7) consistentes en un pie marrón oscuro (11YR 1/2), sin rizoides basales, (89-)215,5-427,2(-734) μm de longitud, (19-)31,2-43,2(-48,5) ancho en la base, (11-)15,2-27,2(-24,4) ancho en el ápice por debajo del capítulo. Capítulo divergente de conidióforos ramificados en verticilos de 2-3 (-6) ramas. Células conidiógenas hialinas, (9,5-)10,2-17,2(-18,5) \times 1-2 μm , produciendo una masa pegajosa de conidios hialinos, lisos, obovoides, de base truncada (2,5-)3,2-4,2(-6,5) \times (1,1-)1,2-1,6(-2,1) μm . Fase anamórfica tipo-Sporothrix también presente. Conidios producidos en cabezuelas, directamente del micelio a través de denticulos prominentes o en conidióforos diferenciados, (2,5-) 6,2-18,7 (-26,5) \times (1-)1,2-1,4(-1,8) μm , cuya célula conidiógena terminal o intercalar, también presenta denticulos conspicuos. Conidios hialinos, lisos, obovoides, de base truncada (2-)3,6-8,8(-12,5) \times (1-)1,2-1,5(-3,5) μm . Conidios secundarios producidos de forma frecuente. Cultivos en AM alcanzando 19 mm de diám. a los 7 días. Micelio embebido en el medio de cultivo, sin micelio aéreo. Ausencia de pigmentos en la primera semana, tornándose marrón claro (19YR 1/2) durante la segunda semana. Margen del cultivo liso, reverso de la colonia marrón claro (11YR 2/2). Sinemas formando círculos concéntricos de color crema claro (8YR 0/2). Hifas sumergidas en el agar, de pared lisa, sin constricciones en los septos.

Hospedantes: *Pinus ponderosa*, *Pinus radiata*, *Pseudotsuga menziesii*, *Nothofagus dombeyi*, *Betula* sp. (Linnakoski, 2009) .

Distribución: Hobøl, Noruega (Linnakoski, 2009). En la Patagonia es muy frecuente en la precordillera a lo largo de la distribución de las plantaciones de pino (entre los paralelos 44° S y 37° S). También coleccionado más al Oeste (cordillera) asociado a escarabajos de corteza, en ejemplares de *N. dombeyi* dentro del P.N. Los Alerces (ver Capítulo I).

Ecología: En la Patagonia fue coleccionada en trozas recientemente apeadas con galerías de *Hylurgus ligniperda* y *Ortothomicus laricis*.

Especímenes examinados: ARGENTINA, Neuquén, Dto. Los Lagos, Lago Lácar, Ea. Quechuquina, sobre *P. ponderosa*, May 2009, A. de Errasti (CIEFAP41), Lago Lolog, CORFONE S.A., sobre *P. ponderosa*, Dic 2011, A. de Errasti (CIEFAP578). Dto. Las Lajas, Aluminé, Aserradero CORFONE S.A., sobre *P. ponderosa*, May 2010, A. de Errasti (CIEFAP570). Río Negro, P. N. Nahuel Huapi, Isla Victoria, Aprovechamiento cercano al vivero forestal, sobre *Pseudotsuga menziesii*, May 2010, A. de Errasti (CIEFAP340), P. N. Los Alerces, Lago Futalaufquen, sendero arroyo cascada, sobre *N. dombeyi*, Nov 2011, A. de Errasti/B. Hurley/Y. Roux. (CIEFAP464).

Observaciones: como se indicó más arriba, esta especie fue inicialmente aislada en Noruega (CMW29490 y CMW29495) asociada a *Scolytus ratzeburgi* sobre *Betula* sp. No se conocen otras fases del ciclo de vida mas que el estado asexual (Linnakoski et al., 2010) y nunca ha sido aislada en ausencia de escarabajos. Su abundancia y relevancia en la Patagonia requieren que se realice una descripción formal.

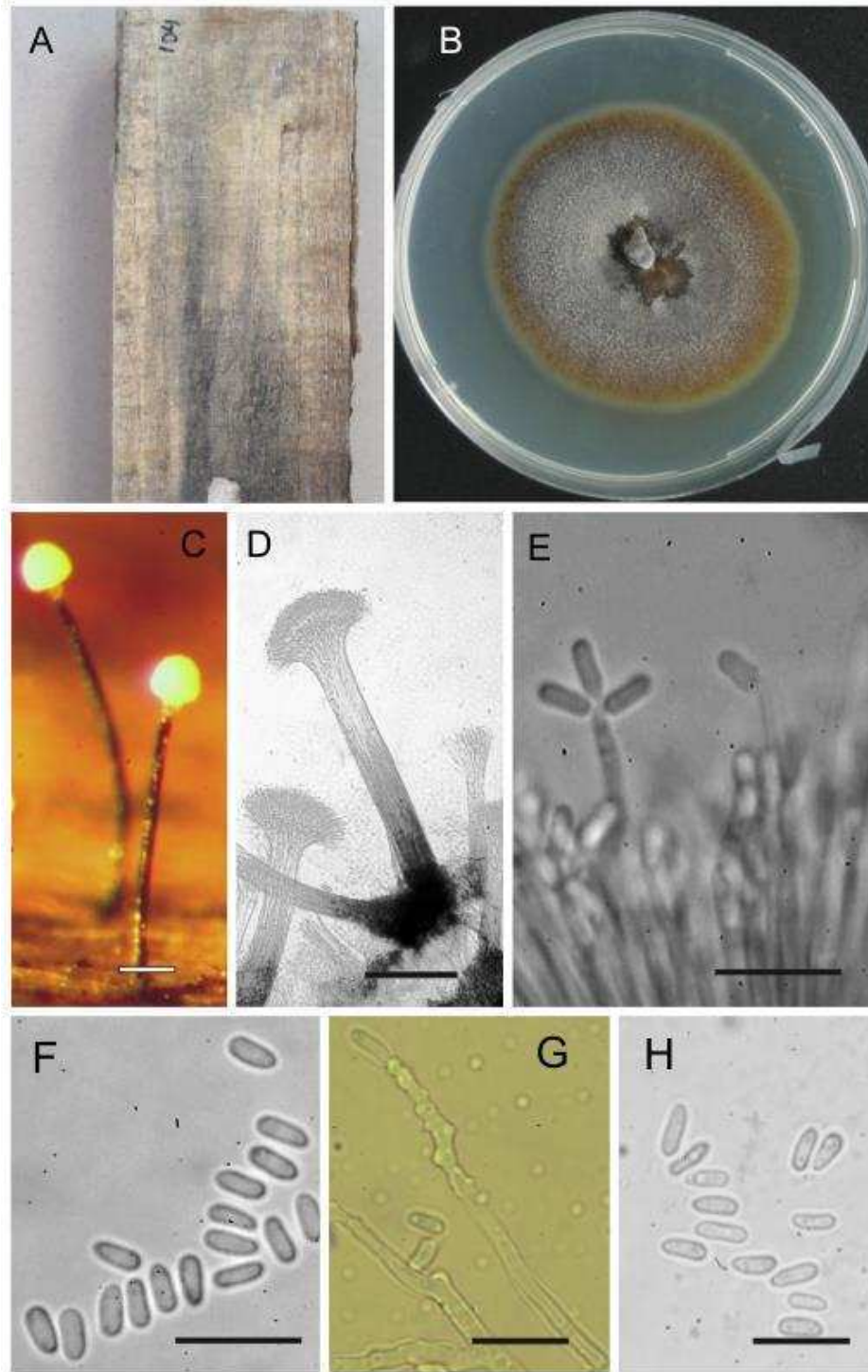


Figura 11. *Ophiostoma peregrinum* sp. nov. **A** Madera manchada **B** Aspecto del cultivo en AM. **C** Sinemas en sustrato natural (tipo-*Pesotum*). **D** Sinemas en cultivo. **E** Célula conidiógena del sinema. **F** conidios del sinema. **G** Célula conidiógena tipo-*Sporothrix* **H** Conidios tipo-*Sporothrix*. Barras en C, D = 100 μm ; en E, F, G y H 10 μm .

***Ophiostoma piliferum* (Fr. : Fr.) Syd.**

Figura 12

Estado asexual: tipo-*Sporothrix*.

Descripción: Von Schrenk (1903) USDA Bureau for Plant Industry Bulletin 36: 1-40.

Hospedantes: *Pinus ponderosa*.

Distribución: *O. piliferum* está presente en todas las plantaciones del género *Pinus* relevadas en Chubut, Río Negro y Neuquén.

Ecología: Presente en trozas apeadas recientemente. Asociada a *Hylastes ater*, *Hylurgus ligniperda*, *Orthothomicus laricis* y *Pissodes castaneus*.

Especímenes examinados: ARGENTINA, Neuquén, Dto. Las Lajas, Aluminé, Aserradero CORFONE S.A., sobre *Pinus ponderosa*, May 2010, A. de Errasti (CIEFAP312); Dto. Los Lagos, Lago Lolog, CORFONE S.A., sobre *P. ponderosa*, Dic 2011, A. de Errasti (CIEFAP580); Lago Meliquina, Ea. San Jorge, sobre *P. ponderosa*, Dic 2011, A. de Errasti (CIEFAP582). Chubut, Dto. Futaleufú, Las Golondrinas, Destacamento de la DGBYP, sobre *P. ponderosa*, Dic 2011, A. de Errasti (CIEFAP583).

Observaciones: *Ophiostoma piliferum* ya ha sido reportada (como *Ceratocystis pilifera*) sobre pino por Fernandez Valiela (1979) en Argentina y por Osorio en Chile (Osorio, 1985). En cultivo presenta micelio aéreo el cual forma cordones hifales oscuros característicos, con conidióforos blancos. Presenta características similares a *O. piceae* y las especies de ese grupo, pero no produce sinemas (*Pesotum*).

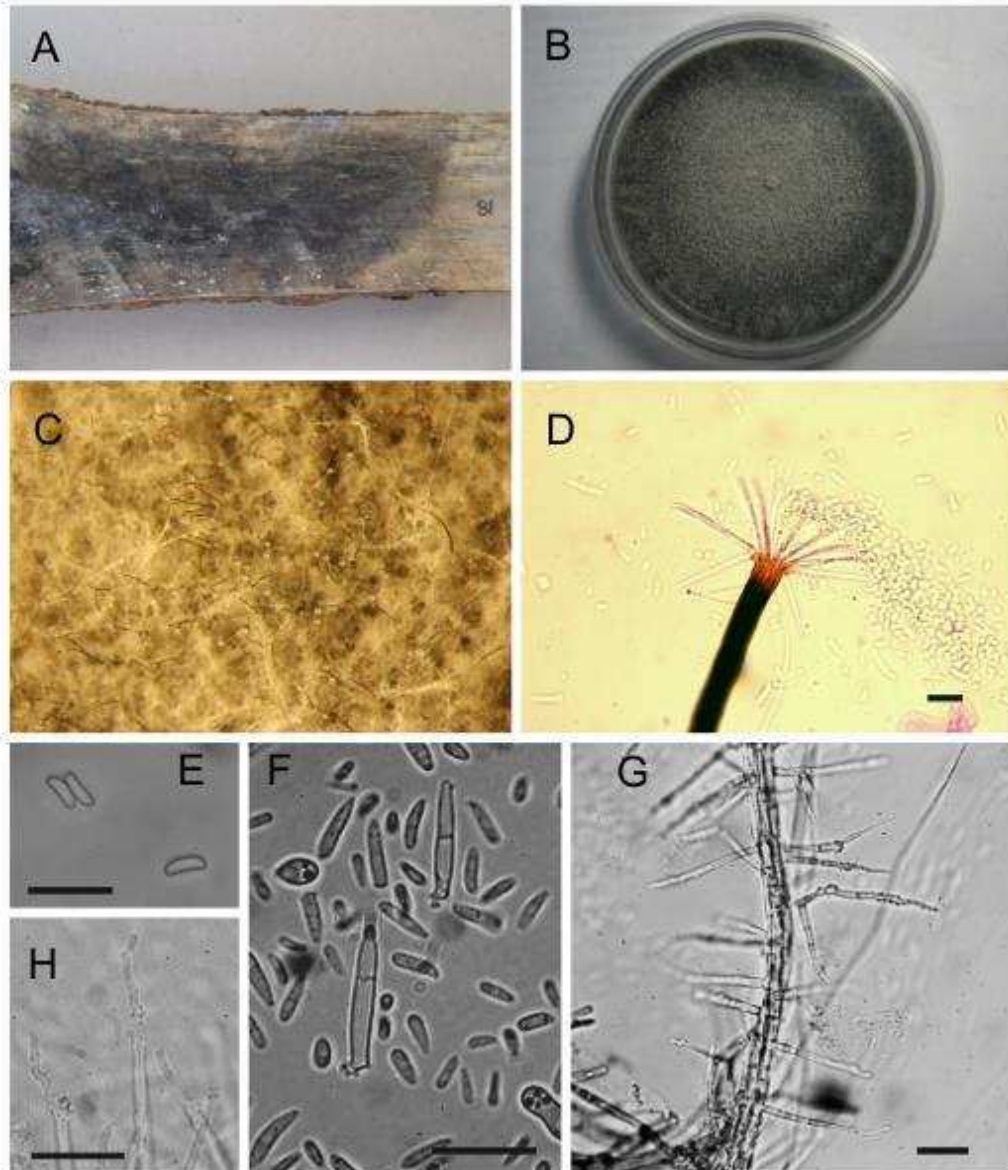


Figura 12. *Ophiostoma piliferum* A Madera manchada. B Aspecto del cultivo en AM, a 25°C en oscuridad. C Ascomas periteciales en cultivo. D Ápice, con hifas ostiolares divergentes. E Ascosporas. F Agrupamientos de hifas y producción de conidióforos. G Célula conidiógena tipo-*Sporothrix*. H Conidios primarios y secundarios. Barra = 10µm.

Ophiostoma subannulatum Livingston & R.W. Davidson

Figura 13

Estado asexual: tipo-*Sporothrix*.

Descripción: Livingston H & Davidson RW (1987) Mycologia 79: 145.

Hospedante: *Pinus sp.*

Distribución: coleccionado solo en la cordillera de la provincia del Chubut.

Ecología: aislado de madera aserrada recientemente, en estiba al aire libre

Especímen examinado: ARGENTINA, Chubut, Dto. Futaleufú, EEA INTA Esquel, Campo experimental Aldea Escolar, sobre *P. radiata*, Sep 2009, A. de Errasti (CIEFAP156).

Observaciones: en esta especie el cuello del ascoma tiene un engrosamiento por debajo del ostiolo, sin hifas ostiolares. Su ascospora es cilíndrica con un vaina de mucilago y su estado asexual, tipo-*Sporothrix*, produce conidios globosos.

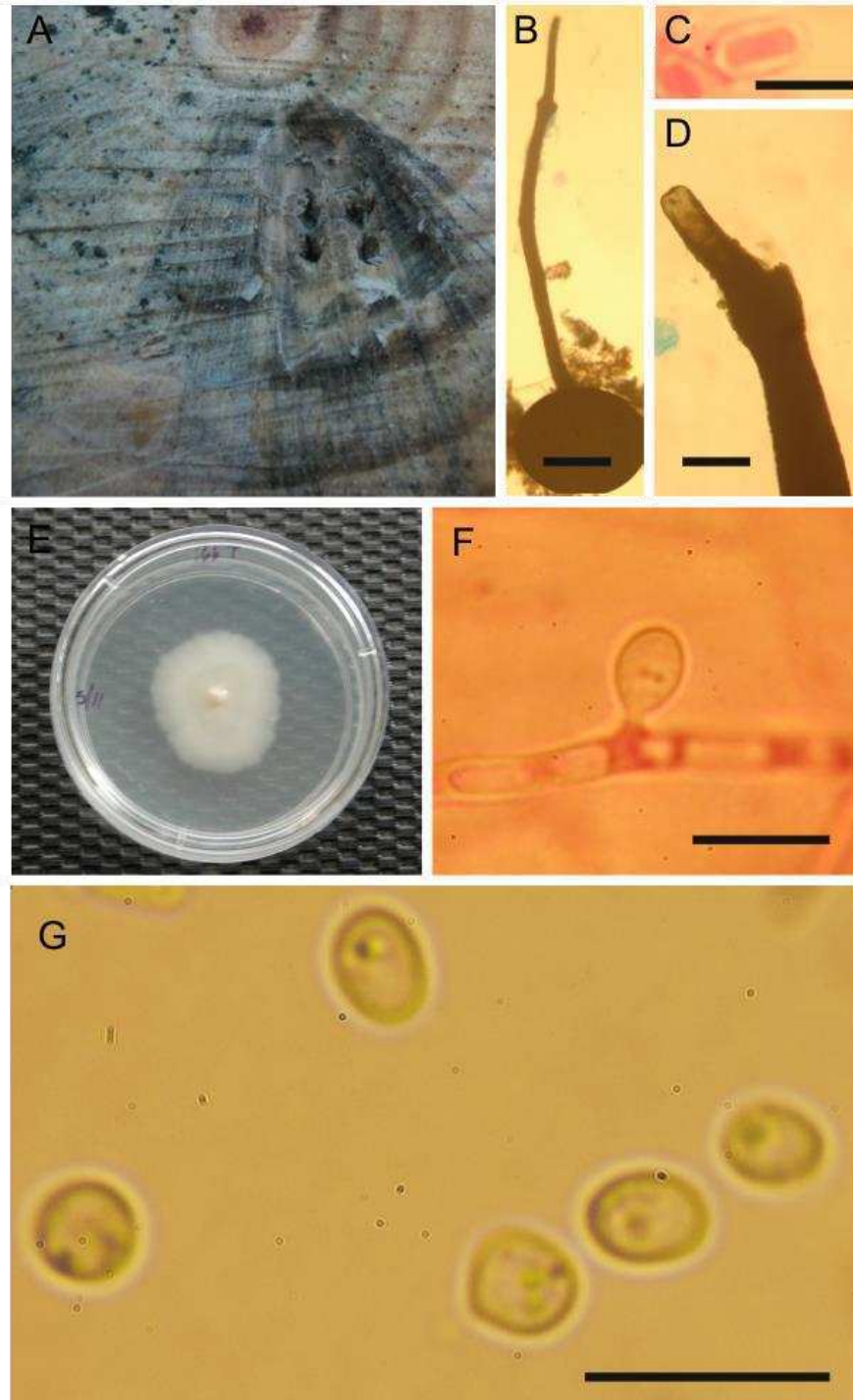


Figura 13. *Ophiostoma subannulatum* **A** Madera manchada. **B** Ascoma peritecial. **C** Ascospora. **D** Engrosamiento del cuello del peritecio por debajo del ostiolo. **E** Aspecto del cultivo en AM, a 25°C. **F**, **G** Conidios. Barra B = 100µm; D, F y G = 10µm; C = 5µm.

Grosmania huntii (R.C. Rob.) Zipfel, Z.W. de Beer & M.J. Wingf.

Figura 14

Estado asexual: tipo-*Leptographium*/*Pesotum*.

Descripción: Robinson-Jeffrey RC & Grinchenko AH (1964) Canadian Journal of Botany 42: 527-532.

Hospedantes: *P. sylvestris*, *Pinus ponderosa*.

Distribución: Area cordillerana en la Provincia de Neuquén.

Ecología: CIEFAP585 estaba claramente asociado a *Hylastes ater*. CIEFAP311 fue encontrado como saprobio, sin evidencias de presencia de escarabajos.

Especímenes examinados: ARGENTINA, Neuquén, Dto. Los Lagos, San Martín de los Andes, Lote 69, sobre *Pinus sylvestris*, May 2010, M. Rajchenberg/C. Barroetaveña (CIEFAP311); Lago Meliquina, Ea. San Jorge, sobre *P. radiata*, Dic 2011, A. de Errasti, (CIEFAP585).

Observaciones: especie es reportada en la Patagonia por Gómez et al. (2011), asociada a un daño a nivel del cuello en plántas jóvenes de *P. ponderosa* ocasionado por *Hylastes ater*. Su ascoma es robusto, sin hifas ostiolares y produce ascosporas con forma de sombrero. El estado asexual tipo-*Leptographium* produce conidióforos solitarios o en grupos. En cultivo se pueden observar hifas sinuosas de color oscuro que son características.

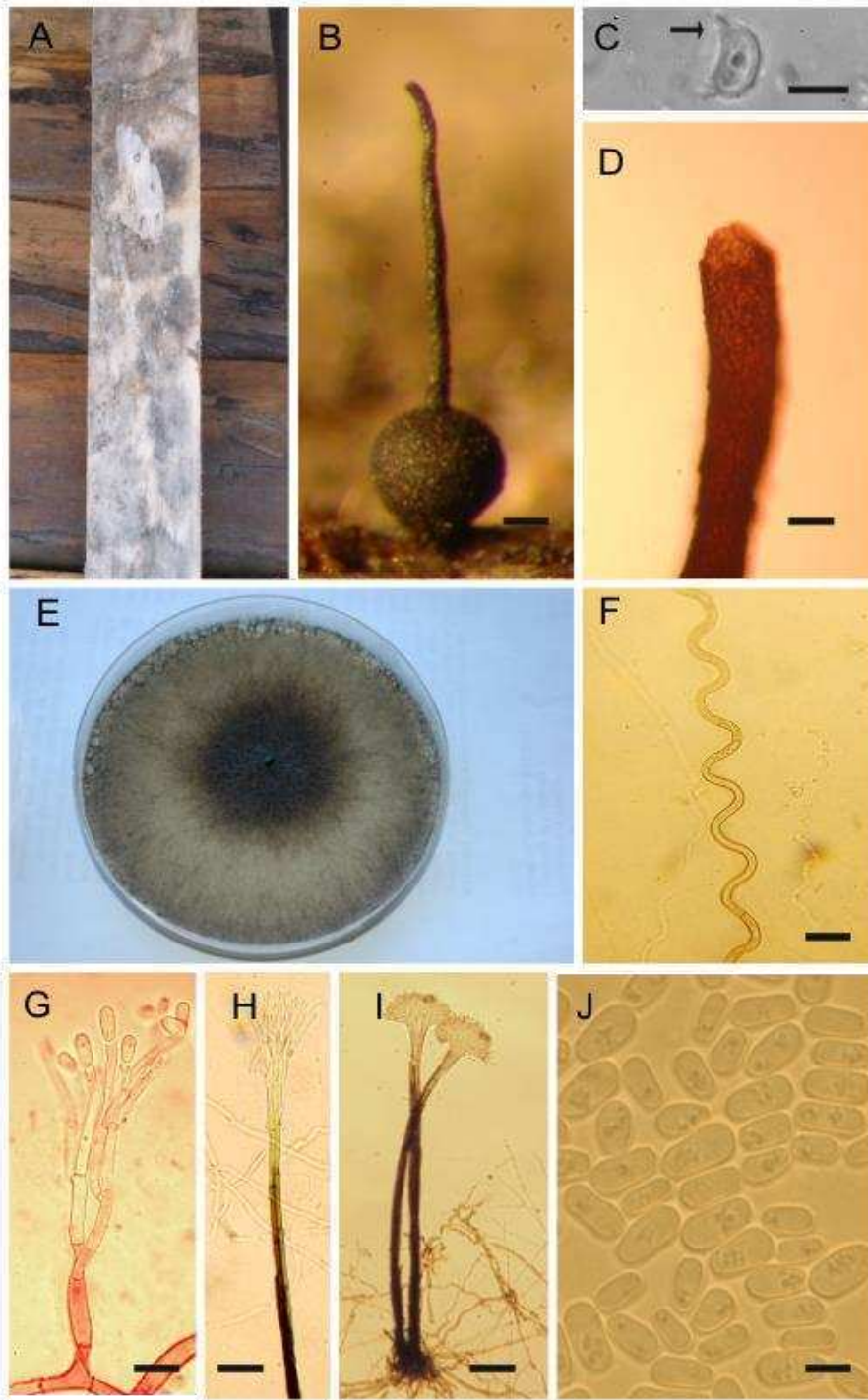


Figura 14. *Grosmannia huntii* A Madera manchada. B Ascoma peritecial. C Ascospora. D Cuello del peritecio, sin hifas ostiolares. E Aspecto del cultivo en AM, a 25°C. F Hifas características. G Conidióforo tipo-*Leptographium*. H Conidióforo melanizado. I Agrupación de conidióforos, aspecto del sinema. J Conidios. Barra B = 100µm; D, F y G, H e I = 10µm; J, C = 2,5 µm.

Grosmannia radiaticola (J.J. Kim, Seifert & G.H. Kim) Z.W. de Beer & M.J. Wingf.

Figura 15

Estado asexual: tipo-*Leptographium/Pesotum*.

Descripción: Mycotaxon 91: 481-496 (2003).

Hospedante: *Pinus radiata*.

Distribución: Provincia del Chubut

Ecología: aislado de madera aserrada recientemente, en estiba al aire libre

Especímenes examinados: ARGENTINA, Chubut, Dto. Futaleufú, El Pedregoso, erradero Filippi, sobre *P. radiata*, Sep 2009. A. de Errasti (CIEFAP164) y (CIEFAP168).

Observaciones: especie citada por Zhou et al. (2004) en Chile bajo el nombre *G. galeiformis*, muy similar en morfología. Linnakoski et al. (2012) identificaron correctamente la especie presente en Chile, bajo el nombre *G. radiaticola*. Esta especie es morfológicamente muy similar a *G. huntii*. Su identificación se realiza mediante el análisis de filogenias moleculares de las regiones ITS, BT2 y EF.

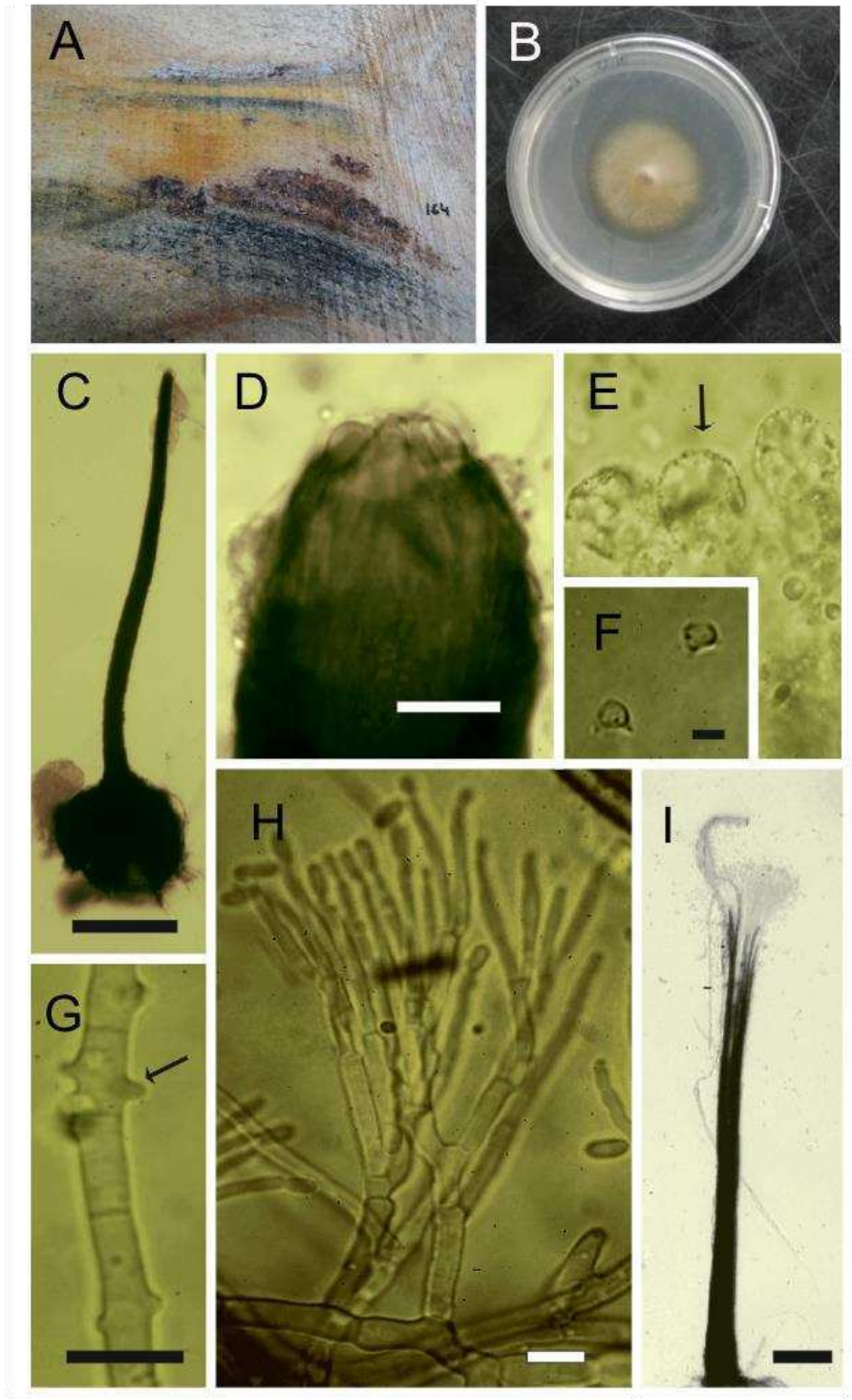


Figura 15. *Grosmannia radiaticola* A Madera manchada. B Aspecto del cultivo en AM, a 25°C. C Ascoma peritecial. D Cuello del peritecio, sin hifas ostiolares. E. Ascos globosos en formación. F Ascospora. Hifas características. G Conidióforo tipo-*Sporothrix*, H Conidióforo tipo-*Leptographium*. I Agrupación de conidióforos, aspecto del sinema. Barra C, I = 100µm; E, G y H = 10µm; D = 5 µm; F, J = 2,5 µm.

***Graphilbum* sp1**

Figura 16

Hospedantes: *Pinus ponderosa*, *Pinus sylvestris*.

Distribución: Areas cordilleranas de las provincias de Chubut y Río Negro

Ecología: asociado a trozas apeadas recientemente, en galerías de *Hylurgus ligniperda* y *O. laricis*.

Especímenes examinados: ARGENTINA, Chubut, Dto. Futaleufú, Las Golondrinas, Destacamento DGBYP, sobre *P. ponderosa*, Dic 2011, A. de Errasti BAFC569 (= BAFC569cc). Río Negro, P. N. Nahuel Huapi, Isla Victoria, Puerto Pampa, sobre *P. sylvestris*, May 2010, A. de Errasti/S. Perez Gorjón BAFC572 (= BAFC572cc).

Observaciones: las especies del género *Graphilbum* producen sinemas que nunca están acompañados por fases asexuales tipo-*Sporothrix*. Esto los diferencia de las especies de *Ophiostoma* s.s. *Graphilbum* sp1 es una especie cercana a *Graphilbum microcarpum* (Yamaoka & Masuya) Z.W. de Beer, Masuya & Yamaoka y *Graphilbum fragrans* (Math.-Käärik) Z.W. de Beer, Seifert & M.J. Wingf. El género ha sido propuesto recientemente (de Beer & Wingfield, 2013b) y muchas de las secuencias disponibles en GenBank no corresponden a especies formalmente descritas. Morfológicamente la especie obtenida en la Patagonia presenta sinemas de pie pigmentado, característica que comparte con *Gra. microcarpum*, pero la morfología, tamaño de los conidios y descripción del cultivo coincide con *Gra. fragrans*. En las bases de datos, los aislamientos con secuencias ITS no tienen por lo general datos de la región BT2, y viceversa. La ausencia de muchas secuencias de la región BT2 para especies de *Graphilbum* ya descritas hace imposible un análisis serio.

Ante esta situación y a la espera de una revisión del género, no podemos asignar con confianza un nombre a este grupo de aislamientos.

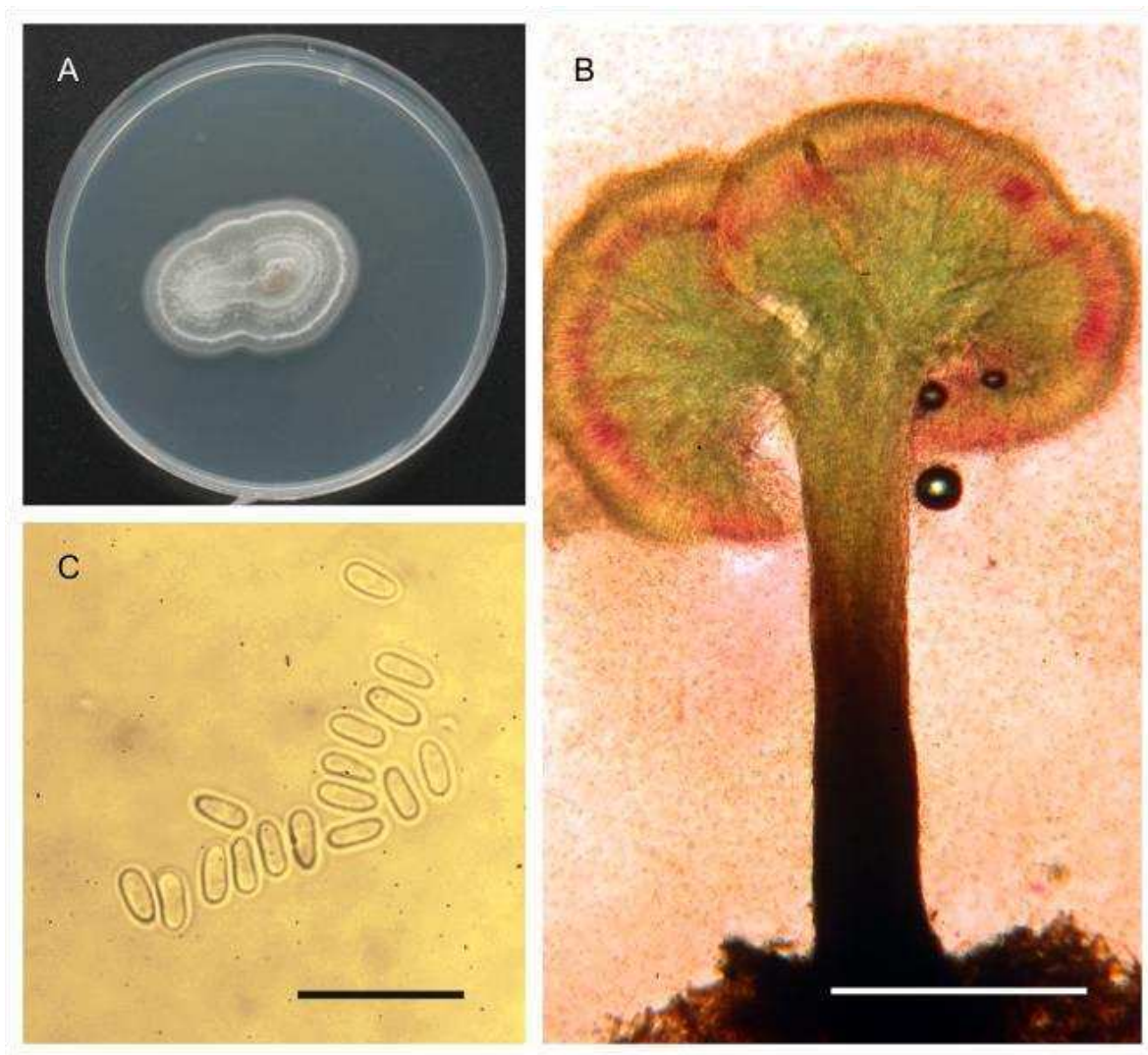


Figura 16. *Graphilbum* sp1. **A** Aspecto del cultivo en AM, a 25°C. **B** Conidióforo tipo-*Pesotum*. **C** Conidios.

Barra B = 100µm; C = 10µm.

Discusión

El presente trabajo constituye el primer relevamiento de hongos manchadores de albura que afectan plantaciones de pináceas en el área cordillerana de la Patagonia argentina. Tres años de muestreo en las provincias de Chubut, Río Negro y Neuquén aportaron más de 250 muestras de madera manchada, de las cuales se lograron identificar las principales especies de hongos responsables (14). Diez especies corresponden a Sordariomycetes de las familias Microascaceae (*Endoconidiophora corulescens* s.l.), Ophiostomataceae (*Grosmannia huntii*, *G. radiaticola*, *Ophiostoma ips*, *O. peregrinum*, *O. piliferum*, *O. subannulatum* y *Graphilbum* sp1) y Coniochaetaceae (*Coniochaeta pulveracea* y *C. raphalochaeta*). Los restantes 4 especies corresponden a las familias Botryosphaeriaceae (*Diplodia pinea*, *Dothiorella sarmentorum*), Dothioraceae (*Sydowia polispora* como ‘*Sclerophoma pityophila*’) y Dermateaceae (*Discohainesia* sp como ‘*Pilidium concavum*’).

Los resultados de este trabajo, con la identificación certera de las especies involucradas mediante métodos moleculares y morfológicos, posibilita confirmar las tendencias señaladas en estudios anteriores (De Beer et al., 2003b; Zhou et al., 2007) sobre los hongos manchadores: éstos se mueven junto al comercio internacional. La diversidad encontrada en la Patagonia se correspondió, en forma general, a la encontrada en otros países y regiones del hemisferio sur donde se cultivan especies de *Pinus* con fines madereros/industriales. La presencia de *Ophiostoma ips*, *Ophiostoma piliferum*, *Ophiostoma quercus*, *Grosmannia huntii* y *Grosmannia radiaticola* no es motivo de sorpresa. Estos típicos organismos manchadores también han sido reportados para Chile (Zhou et al., 2004; Linnakoski et al., 2012), Uruguay (Alonso et al., 2014) y casi todas las regiones del hemisferio sur que han introducido pináceas (de Beer et al., 1995; De Beer et

al., 2003b; Thwaites et al., 2013). Sin embargo, cada uno de los países mencionados también presenta singularidades en cuanto a las especies introducidas. Para Sudamérica, *Ceratocystiopsis minuta* solo fue encontrada en Chile (Zhou et al., 2004), *Ophiostoma abietinum* solo fue encontrado en Uruguay (Alonso et al., 2014) y *Ophiostoma subannulatum* o *Endocidiophora coerulescens* solo han sido reportados en la Patagonia argentina. Este patrón es consistente con la ocurrencia de reiterados eventos de introducción.

Quizás, el resultado más singular pero también más representativo de esta investigación fue el relacionado con *O. peregrinum*: el taxón fue hallado por primera vez por Linnakoski (2009) en Noruega asociado a *Scolytus ratzeburii* sobre *Betula* sp., pero no fue descrito por la falta de colecciones suficientes. Este organismo ahora es reportado y descrito para Argentina sobre *Pinus* spp. Su elevada incidencia en las plantaciones de Patagonia, en diferentes provincias (ver Tabla 2), su asociación con al menos 2 vectores y su colonización veloz de una especie nativa (*N. dombeyi*), son las características de este saprobio de rápido crecimiento, con amplio rango de hospedantes y estado sexual desconocido. Su poca frecuencia en bosques que han sido intensamente investigados, como ser los presentes en Noruega, y su alta frecuencia en la Patagonia es un indicio importante sobre el riesgo del transporte indiscriminado de material biológico; en este caso *O. peregrinum* ha mostrado una alta adaptación a las plantaciones de pino de la región y la capacidad de colonizar una especie de latifoliada nativa.

Como se mencionó previamente *D. pinea* s.l. es un organismo capaz de causar infecciones latentes que se acumulan durante la vida del hospedante y se manifiestan ante eventos de estrés o muerte del mismo (Slippers & Wingfield, 2007). La colonización puede

darse en el árbol vivo ocasionando canchros o muerte regresiva, o bien cuando el hospedante está muerto ocasionando manchas en la albura. En ambos casos representan graves pérdidas económicas al sector forestal, debido a la muerte o al manchado de los ejemplares. Los rodales de Las Golondrinas y Cerro Radal no evidenciaron síntomas de muerte regresiva o canchros. Sin embargo las manchas de la albura producidas por *Diplodia pinea* fueron severas. En ambos casos fue observada una correlación entre el ataque de *Pissodes castaneus* y la presencia de *D. pinea*. Posiblemente la especie ya se halla distribuida a lo largo de las plantaciones de pino en las 3 provincias, presentando una incidencia mayor en sitios sin manejo silvícola, bajo estrés debido al ataque de *Pissodes castaneus*.

CAPÍTULO III

Patogenicidad de hongos ‘ofiostomatoides’ en los bosques andino-patagónicos

Introducción

Bosques templados de la Patagonia

Los bosques templados del sur de Argentina y Chile se distribuyen a lo largo de ambas vertientes de los Andes desde los 38° hasta los 55° de latitud Sur, limitados por el Océano Pacífico al Oeste y la estepa patagónica hacia el Este. Desde una perspectiva fitogeográfica pertenecen a la región Antártica, Dominio sub Antártico (Cabrera, 1971). En estos bosques son comunes las especies del género *Nothofagus* las cuales forman bosques siempreverdes junto a otras especies arbóreas o bosques puros, o casi puros, de especies deciduas. Los primeros son más frecuentes en Chile, con algunas introgresiones del lado argentino, mientras que los bosques con especies deciduas son más frecuentes en la vertiente oriental de los Andes, dominados por *N. antartica* (G.Forst.) Oerst., *N. dombeyi* (Mirb.) Blume, y *N. pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser (Donoso, 1994; Armesto et al., 1995; Veblen et al., 1996).

Hongos ‘ofiostomatoides’

Los hongos ‘ofiostomatoides’ son un grupo diverso de ascomicetes que presentan morfología similar y que son dispersados por artrópodos (Wingfield et al., 1993; Seifert et al., 2013). Este grupo incluye a diferentes géneros dentro de Ceratocystidaceae Locq. ex Réblová, W. Gams & Seifert y Ophiostomataceae Benny & Kimbr. Entre los más relevantes podemos mencionar a *Ceratocystis* Ellis & Halst., *Leptographium* Lagerb. & Melin, *Ophiostoma* Syd. & P. Syd. y *Raffaelea* Arx & Henneb. Estos organismos son mundialmente estudiados por ocasionar manchas de albura en madera recién apeada, más

conocida como mancha azul o mancha de albura (blue-stain o sap-stain) (Seifert, 1993). Otra característica del grupo es la presencia de especies patogénicas que infectan árboles vivos, ocasionando marchitamientos vasculares (Brasier, 1991) y cancrrosis en latifoliadas (Kile, 1993), o pudrición de raíces, típicamente sobre coníferas (Harrington, 1993).

Especies de Ceratocystidaceae que afectan árboles vivos

Algunas especies de Ceratocystidaceae causan marchitamientos vasculares y cancrrosis tanto en latifoliadas cultivadas como en bosque nativo. Tales son los casos de *C. albifundus* M.J. Wingf., de Beer & M.J. Morris (Morris et al., 1993), *C. acaciavora* Tarigan & M. van Wyk (Tarigan et al., 2011), *C. eucalypticola* M. van Wyk & M.J. Wingf. (van Wyk et al., 2012), *C. fagacearum* (Bretz) J. Hunt (Henry et al., 1944), *C. manginecans* M. van Wyk, Al-Adawi & M.J. Wingf. (van Wyk et al., 2007), *C. platani* (Walker) Engelbrecht & Harrington (Panconesi, 1999), *C. populicola* J.A. Johnson & Harrington (Johnson et al., 2005), *Davidsoniella australis* (J. Walker & Kile) Z.W. De Beer, T. Duong & M.J. Wingf. (Kile & Walker, 1987) y *Davidsoniella virescens* (R.W. Davidson) Z.W. De Beer, T. Duong & M.J. Wingf., para citar solo los casos más emblemáticos. Las especies de Ceratocystidaceae necesitan heridas mecánicas para infectar el hospedante, siendo transportadas hasta ellas por insectos que aprovechan los exudados de las heridas como recurso para alimentarse: escarabajos nitidúlidos (Coleoptera: Nitidulidae), moscas (Diptera: Drosophilae), y áfidos (Homoptera: Aphididae). Aunque aparentemente inespecífica, la estrategia de dispersión de estos hongos es altamente efectiva. El micelio suele formar matas hifales con abundantes estructuras reproductivas en la madera expuesta

del hospedante. Estas matas de micelio emiten aromas frutados (Collins & Morgan, 1962; Lanza et al., 1976), asociados a la presencia de los vectores referidos anteriormente.

Otras especies, tales como *Ceratocystis fagacearum* y *Hunttiella decorticans* de Errasti, de Beer & Jol. Roux, han perfeccionado aún más este mecanismo siendo las únicas especies del género que colonizan el hospedante para luego producir una estructura en forma de almohadón rectangular ('pressure pad'), que levanta y quiebra la corteza del hospedante. De esta manera se genera una cavidad entre la corteza y el floema, con una abertura pequeña que impide la desecación excesiva del tronco y que, al mismo tiempo, produce aromas frutados característicos, generando el ambiente propicio para la alimentación de diversos insectos. Existen sin embargo vías de dispersión alternativas a las ya mencionadas, como el contacto y la anastomosis a nivel radicular (Accordi, 1986; Kile, 1993) o la dispersión asociada a el uso de herramientas de poda (Panconesi, 1999; Roux & Wingfield, 2009).

Patógenos forestales de la familia Ophiostomataceae

Dentro de esta familia, se conocen algunos casos bien documentados de patógenos primarios, especialmente de especies incluidas en *Leptographium*, *Ophiostoma* y *Raffaelea*. Estas especies ocasionan marchitamientos vasculares o pudrición en las raíces. *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf., *O. himal-ulmi* Brasier & M.D. Mehrotra y *O. novo-ulmi* Brasier son responsables de la enfermedad vascular del olmo holandés (dutch elm disease), que produjo dos epidemias en Europa y América durante el siglo XX (Brasier, 1991). Estas especies son dispersadas por escarabajos de corteza de los géneros *Hylurgopinus* (Swaine) y *Scolytus* (Geoffroy) los cuales utilizan el floema de árboles sanos como alimento y los

debilitados o muertos para construir galerías donde realizar la oviposición. En estos últimos el hongo crece vigorosamente como saprobio, a la espera de la emergencia de nuevos adultos que los transportarán a los árboles sanos.

Raffaelea lauricola T.C. Harr., Fraedrich & Aghayeva es el agente etiológico del marchitamiento de *Persea borbonia* (L.) Spreng. y de otras especies de la familia Lauraceae en la costa este de Estados Unidos (Harrington et al., 2008), enfermedad conocida como el ‘Marchitamiento del laurel’ (‘Laurel wilt’). *Raffaelea lauricola* es el hongo simbionte de escarabajos ambrosiales de los géneros *Xyleborinus* (Ratzeburg), *Xyleborus* (Eichhoff) y *Ambrosiodmus* (Hopkins). Las galerías son construidas en el interior del xilema pobre en nutrientes lo cual equilibran gracias a los hongos que transportan, sirviendo directamente de alimento o como fuente de enzimas para modificar el entorno. La introducción de *R. lauricola* en los Estados Unidos ha desencadenado esta enfermedad, no registrada en su lugar de origen.

Otros patógenos importantes dentro de los Ophiostomatales son especies del género *Leptographium*: *L. wagneri* (W.B. Kendr.) M.J. Wingf. y *L. callophylli* (Wiehe) J.F. Webber, K. Jacobs & M.J. Wingf. Estas especies atacan la raíz y la zona del cuello, generalmente asociados con escolítidos de los géneros *Dendroctonus* (Erichson), *Hylastes* (Erichson), *Ips* (DeGeer), *Tomicus* (Latreille) e *Hylurgops* (LeConte) (Jacobs & Wingfield, 2001), generando pudriciones en el sistema radicular. *Leptographium wagneri* es frecuente en los bosques de coníferas del Oeste de Norteamérica y *L. callophylli* es originario de la isla de Mauricio (Cobb, 1988). Los episodios epidémicos de *L. wagneri* suelen estar asociados a alteraciones antrópicas como ser la construcción de caminos, los sitios de

cosecha forestal y de raleos, más que a la densidad poblacional del vector (Jacobs & Wingfield, 2001).

Virulencia de los hongos 'ofiostomatoides'

Ceratocystis fagacearum, *Ophiostoma ulmi* y *Leptographium callophylli* constituyen ejemplos de patógenos primarios que atacan árboles vigorosos, colonizan de forma sistémica a través del tejido vascular y producen compuestos activos que, junto al crecimiento de hifas y las reacciones de defensa del hospedante, producen un bloqueo del sistema vascular y la muerte del tejido (Jacobs & Wingfield, 2001). Por otro lado, los hongos ofiostomatoides también cuentan con especies consideradas patógenos débiles u oportunistas (tales como *Grosmannia huntii*, *L. terebrantis*, *L. serpens* y *O. minus*). Estas especies colonizan radialmente el fuste por lo que ocasionan lesiones localizadas generando, además, el manchado de la albura. Suelen estar asociadas a escarabajos de corteza, ambrosía, o picudos (Coleoptera: Curculionidae) que atacan árboles oprimidos o bajo estrés ambiental. También hay especies de hongos 'ofiostomatoides' estrictamente saprobias, que, si bien no afectan árboles vivos, manchan la madera una vez cosechada originando pérdidas de post-cosecha (ver Capítulo 4).

Patógenos de *Nothofagus*

Poco ha sido estudiado en relación a los patógenos de *Nothofagus* en la Patagonia (Butin, 1969; Gamundi & Lederkremer, 1989; Cwielong & Rajchenberg, 1995; Minter et al., 1998; Hansen et al., 2007; Fajardo et al., 2014). En los estudios taxonómicos realizados sobre los hongos 'ofiostomatoides' no existe ninguna mención sobre la posibilidad de que pudieran infectar árboles sanos (Butin & Peredo, 1967; Butin, 1968; Butin & Aquilar, 1984; Osorio,

1985; Butin & Peredo, 1986; Billings, 1993; Zhou et al., 2004; Piontelli et al., 2006; Sánchez, 2011). Esta situación es diferente al caso de Tasmania y Nueva Zelanda donde existen al menos dos registros de hongos ‘ofiostomatoides’ asociados a enfermedades del bosque de *Nothofagus*, cuya patogenicidad ha sido demostrada: *Davidsoniella australis* (Kile & Walker, 1987) y *Sporothrix* sp. (Faulds, 1973; Faulds, 1977).

Hongos ‘ofiostomatoides’ aislados de árboles enfermos en la Patagonia

Como resultado del estudio taxonómico de hongos ‘ofiostomatoides’ en los bosques andino-patagónicos (Capítulo I) se aislaron especies creciendo sobre árboles muertos en pie o enfermos. Diferentes especímenes pertenecientes a los géneros *Huntia* y *Leptographium* (ver Capítulo I) fueron aislados (entre otros sustratos) de ejemplares de *Nothofagus dombeyi* con copas parcialmente muertas, fustes con exudados gomosos, presencia de escarabajos ambrosiales del género *Gnathotrupes* (Figuras 1 y 2) y de *Armillaria novae-zelandiae*. Por otro lado, especímenes de *Ophiostoma patagonicum* sp. nov. fueron aislados (nuevamente, entre otros sustratos) de *Schinus patagonicus* con signos de marchitamiento y cancrrosis. Esta sintomatología de *S. patagonicus* fue observada frecuentemente en zonas de ecotono entre la Cordillera y la estepa en las provincias de Chubut y Río Negro (Figura 3), si bien la etiología e incidencia de la enfermedad no han sido estudiadas.

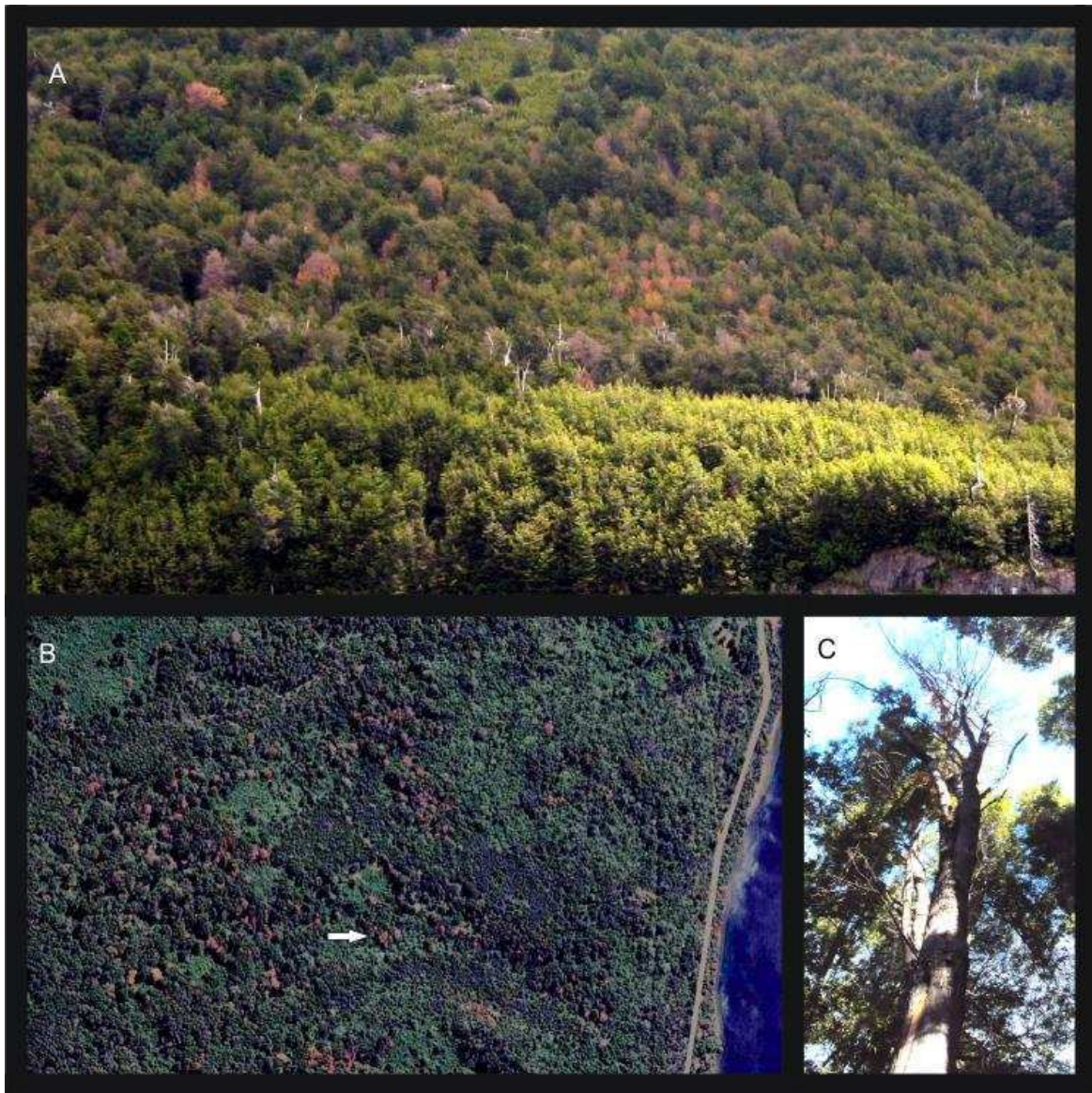


Figura 1. Sintomatología de la copa de *Nothofagus dombeyi* observada en 2011 en el Parque Nacional Los Alerces, Chubut. **A** Rodal con árboles cuya copa está completamente roja. **B** Imagen satelital de zona afectada. **C** Árbol señalado con flecha blanca en B), con pérdida de follaje.



Figura 2. Síntomas y signos del fuste de *Nothofagus dombeyi* observados en 2011 en el Parque Nacional Los Alerces, Chubut. **A** Exudados gomosos **B** Aserrín observado como resultado de la actividad de escarabajos ambrosiales (*Gnathotrupes* spp). **C** Orificio de entrada a la galería. **D** Tejido vascular y albura manchada por *Leptographium gestamen*, en Lago Menéndez (P.N. Los Alerces). **E** Conidióforos de *L. gestamen* tapizando el interior de la galería. **F** Tejido vascular y albura evidenciando crecimiento de *Huntiella decorticans*, en Lago Verde (P.N. Los Alerces). **G, H** “Pressure pad” de *H. decorticans* con la presencia de insectos nitidúlidos (flecha blanca).



Figura 3. Síntomatología de *S. patagonicus*, en Esquel, Chubut (2011). **A** Ejemplar con síntomas de marchitez. **B** Cancros en el fuste. **C** Exudados del fuste. **D** Deposición de goma y resina en el tejido vascular de donde se obtuvieron 2 aislamientos de *O. patagonicum*.

Debido a los antecedentes del grupo expuestos anteriormente y a la presencia de diversos hongos ofiostomatoides en árboles enfermos, se diagramaron ensayos para evaluar su patogenicidad a campo.

Objetivos

- Establecer la capacidad de infección de las especies del género *Huntia* (*H. decorticans* sp. nov., *Huntia* sp1 y *Huntia* sp2) y de *Leptographium gestamen* sobre *Nothofagus pumilio* y *N. dombeyi*.
- Establecer la capacidad de infección de aislamientos representativos de *Ophiostoma patagonicum* sobre *Schinus patagonicus*.

Materiales y Métodos

Los ensayos de patogenicidad a campo sobre especies del género *Nothofagus* presentan como dificultad la escasez de rodales accesibles con bajo impacto antrópico, v.gr. incendios, aprovechamiento maderero, pastoreo. La mayoría de los bosques bien conservados se encuentran protegidos dentro de los Parques Nacionales y las Reservas Provinciales. Se realizó un análisis de posibles sitios y metodologías para minimizar los disturbios en las parcelas elegidas, y se redactó una propuesta de trabajo presentada formalmente a Parques Nacionales y a la Dirección General de Bosques y Parques del Chubut, DGBYP (ver Anexo II). Ante la respuesta positiva de la DGBYP se acordó la cantidad de árboles afectados al ensayo. Se pudo disponer un máximo de 60 ejemplares de *N. pumilio*, 60 de *N. dombeyi* y 10 de *Schinus patagonicus*.

En la provincia del Chubut, el 30 de Octubre 2012, se realizó un ensayo de patogenicidad en la parcela experimental de la UNPSJB (42° 12', 45'' S; 72° 32', 44'' W, 1006 msnm, 1050 mm/año precipitación media) en un rodal uniforme de *N. pumilio* (Diámetro a la Altura del Pecho (DAP)= 13.5 ± 4.6; 30-40 años). Esta zona fue

aprovechada hace más de 30 años, con relativa exclusión del ganado posteriormente. Estos ensayos fueron replicados el 31 del mismo mes en la Reserva Provincial ex-concesión Vicente Robles (42°, 12', 45'' S; 72°, 32', 44'' W, 693 msnm, 1430 mm/ mm/año precipitación media) dentro de un rodal mixto de *N. dombeyi* (DAP = 12,3 ± 6.9; disetáneo) y *Austrocedrus chilensis*. Esta reserva también constituye un área con relativa exclusión de ganado. En cada sitio se utilizaron dos aislamientos de *Huntia decorticans*, uno de *Huntia* sp1, uno de *Huntia* sp2 y uno de *Leptographium gestamen* (Tabla 1). Se inocularon 10 ejemplares de *N. pumilio* con cada cepa (50 árboles en total) más 10 controles (ver método de inoculación más abajo). El mismo esquema se utilizó para la inoculación de *N. dombeyi*.

Los ensayos sobre *Schinus patagonicus* fueron realizados en un área de interfase entre bosque y estepa en las inmediaciones de Trevelin, Chubut (42°, 12', 76'' S; 72°, 31', 64'' W, 432 msnm, 932 mm/año precipitación media). El área presenta un fuerte efecto de ramoneo y daño mecánico sobre los ápices de leñosas como *S. patagonicus*, *Berberis* spp., *Maytenus boaria* y *Chacaya* sp. causados por la liebre europea y por el ganado vacuno. Se tomaron 10 árboles, en cada uno se seleccionaron 3 ramas sobre las cuales se inocularon los 2 aislamientos de *Ophiostoma patagonicum* obtenidos de *S. patagonicus* y un control (totalizando 30 inoculaciones).

Las inoculaciones fueron realizadas en ramas o troncos, en zonas previamente esterilizadas superficialmente con alcohol 70%. Se procedió a la extracción de la corteza con un saca-bocados de 6-mm debidamente esterilizado mediante flameado. De esta forma, el floema resultó expuesto y se le insertó el inóculo (ver mas abajo) en la herida realizada,

con el micelio enfrentado al floema. La corteza fue introducida en su posición original y el área inoculada fue cubierta con gasa húmeda estéril, papel aluminio y cinta (Figura 4).

Tabla 1. Especies y cepas utilizadas en los ensayos de patogenicidad, su denominación, hospedante, procedencia y observaciones.

Especie	Aislamiento	Hospedante	Provincia	Observaciones
<i>Huntia</i> sp1	CIEFAP79	<i>N. pumilio</i>	Chubut	Árbol muerto caído
<i>Huntia</i> sp2	CIEFAP40	<i>N. obliqua</i>	Neuquén	Árbol muerto caído
<i>H. decorticans</i>	BAFC4492	<i>N. dombeyi</i>	Chubut	Arbol enfermo, pressure pad
<i>H. decorticans</i>	BAFC4493	<i>N. pumilio</i>	T. del Fuego	Arbol muerto, pressure pad
<i>L. gestamen</i>	CIEFAP482.2	<i>N. dombeyi</i>	Chubut	Arbol enfermo
<i>O. patagonicum</i>	CIEFAP514.3	<i>S. patagonicus</i>	Chubut	Arbol enfermo
<i>O. patagonicum</i>	CIEFAP514.2	<i>S. patagonicus</i>	Chubut	Arbol enfermo

(H=*Huntia* L=*Leptographium* O=*Ophiostoma* N=*Nothofagus* S=*Schinus*)

El inóculo consistió en el hongo a ser testado crecido en 2% Agar Malta (AM) y para los controles AM estéril (sin el hongo). Aproximadamente diez semanas luego de la inoculación (4/5 Febrero, 2013) la corteza fue removida y la extensión total de la necrosis sobre la zona del cambium y de la albura externa fue medida para estimar el éxito de la colonización fúngica. Porciones del tejido sintomático de un subgrupo representativo de 5 muestras por cepa, fueron llevadas al laboratorio y acondicionadas en cámaras húmedas para inducir la formación de estructuras reproductivas y confirmar que la lesión estuviera asociada al hongo inoculado previamente. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando SPSS 17.0 (IBM Software).



Figura 4. Ensayos de inoculación. **A** Esterilización superficial. **B** Descortezado. **C** Inoculación. **D** Re-introducción de la corteza. **E** Aplicación de gasa húmeda y papel aluminio estériles. **F** Protección con cinta.

Resultados

Ensayos de inoculación con especies del género *Huntia*

Todas las cepas produjeron lesiones evidentes en el cambium y en la albura externa de los árboles inoculados. Los aislamientos CIEFAP79, BAFC4492 y BAFC4493 produjeron lesiones estadísticamente significativas ($p=0.05$; ANOVA no paramétrico) comparadas a la cepa CIEFAP40 y los controles (Figura 5).

Los controles no presentaron lesiones en la corteza externa, ni en el cambium y/o la albura, y todos formaron un callo alrededor de la herida, evidenciado la capacidad de cicatrización por parte del tejido. Las porciones de tejido sintomático dispuestas en cámara húmeda produjeron consistentemente fructificaciones del hongo respectivo inoculado. El mismo patrón fue observado en *N. pumilio* y *N. dombeyi*. Aunque las diferencias no fueron significativas, todas las cepas presentaron un nivel de colonización promedio mayor en *N. dombeyi* comparado con las realizadas en *N. pumilio* (Figura 5).

Los aislamientos BAFC4492 y BAFC4493 presentaron patrones de colonización típicos del género *Huntia*. Estas colonizaciones resultaron de considerable extensión y se correlacionaron con una depresión en el área afectada, *v. gr.* un cancro, formado como resultado de la ausencia de crecimiento (Figura 6).

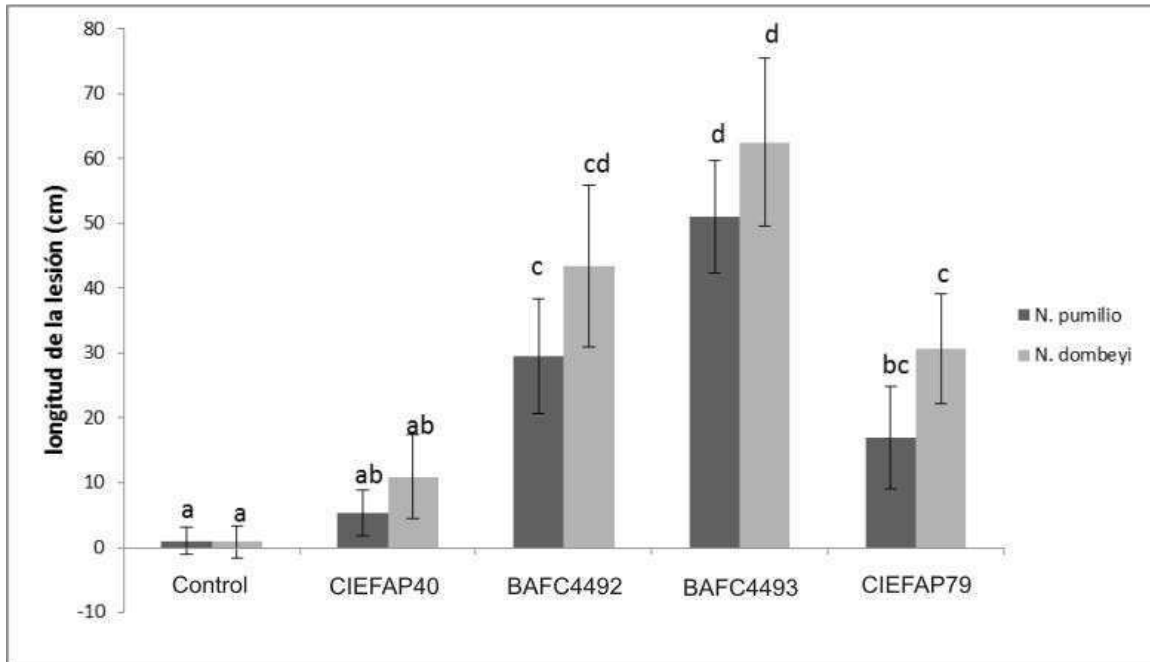


Figura 5. Resultados de las inoculaciones a campo (N=100) sobre *Nothofagus pumilio* (parcela experimental de la UNPSJB) y *N. dombeyi* (Reserva Provincial ex-Concesión Vicente Robles), ambos en Chubut. Se inocularon, en cada sitio, 4 cepas y un control: *Huntia decorticans* sp. nov. (BAFC4492, BAFC4493), *Huntia* sp1 (CIEFAP79) y *Huntia* sp2 (CIEFAP40). Las letras diferentes por encima de las barras indican diferencias estadísticas entre los aislamientos ($P < 0.05$).

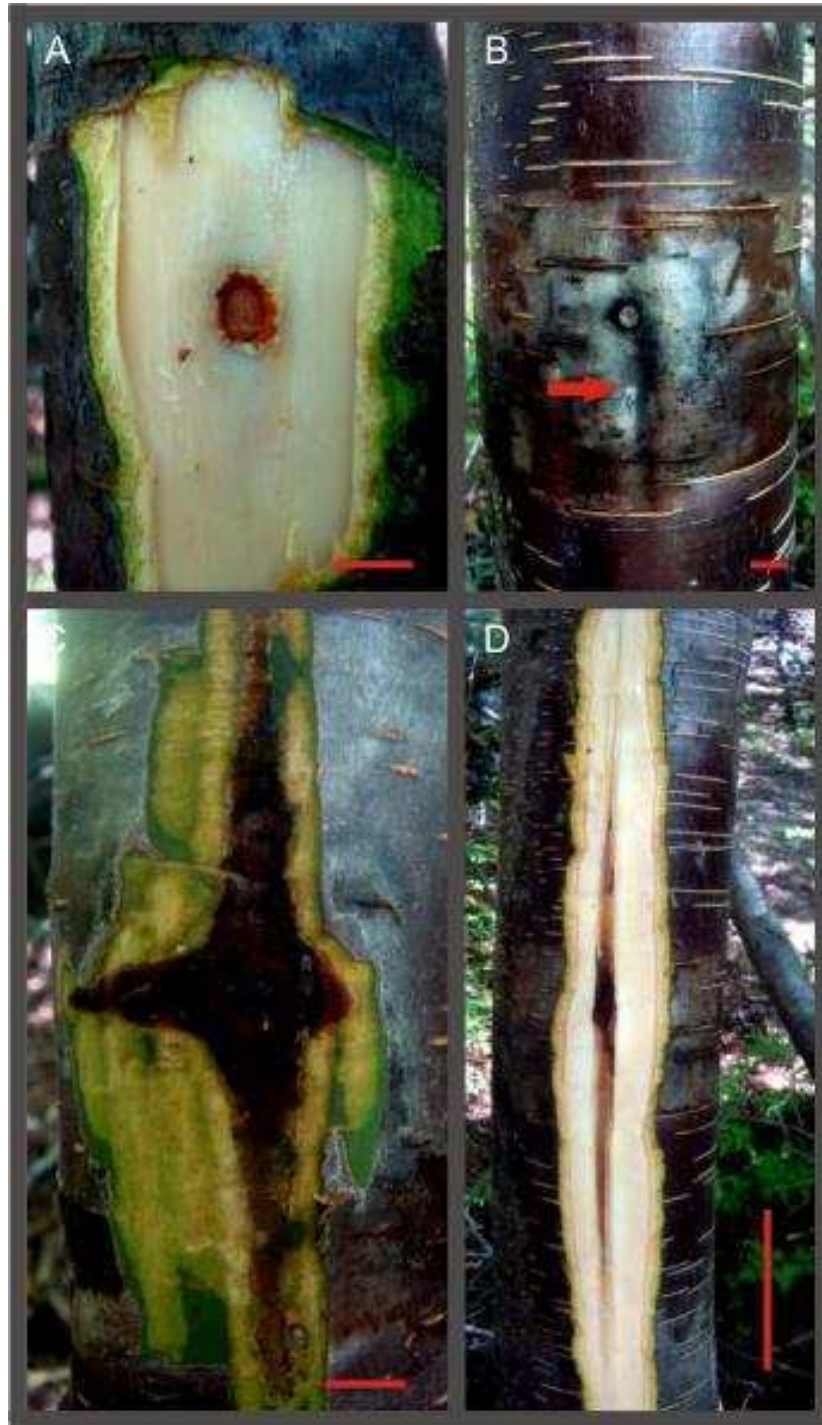


Figura 6. Lesiones sobre *Nothofagus pumilio* como resultado de los ensayos de patogenicidad con *H. decorticans* (BAFC4492, BAFC4493). **A** Control. **B** Árbol con una zona deprimida o cancro (nótese que el centro coincide con el punto de inoculación), formado después de 10 semanas como resultado de la falta de crecimiento tras la inoculación. **C** Lesión en la zona del cambium. **D** Lesión en la albura externa. Barras de A - C = 1 cm, en D = 10 cm.

Ensayos de inoculación con *Leptographium gestamen*

Estadísticamente, las lesiones producidas en *N. pumilio* y *N. dombeyi* fueron similares, sin diferencias significativas entre sí, y también entre éstas y el control (Figura 7). Una pequeña decoloración de la corteza fue observada tanto en los árboles inoculados con el hongo como en el control. La cepa CIEFAP482.2 no fue capaz de generar una colonización apreciable del cambium y la albura de los hospedantes (Figura 8). Asimismo la formación de un callo alrededor de la herida como síntoma de cicatrización fue observado en los 3 casos.

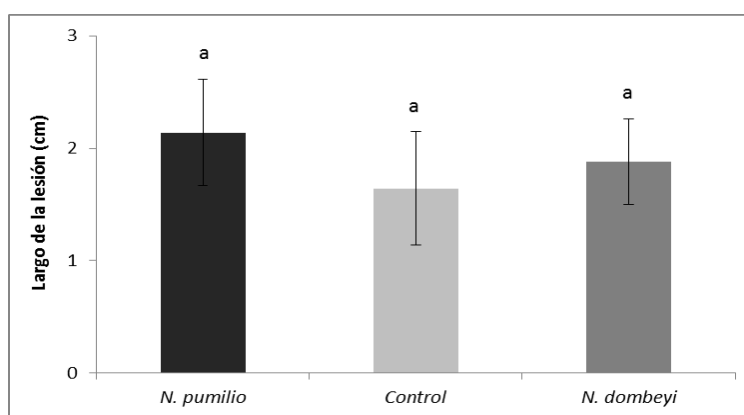


Figura 7. Resultados de las inoculaciones a campo (N=30) con *Leptographium gestamen* sp. nov. (CIEFAP482.2) y un control sobre *Nothofagus pumilio* (parcela experimental de la UNPSJB) y sobre *N. dombeyi* (Reserva Provincial ex-Concesión Vicente Robles). Letras diferentes por encima de las barras indican diferencias estadísticas entre los aislamientos ($P < 0.05$).

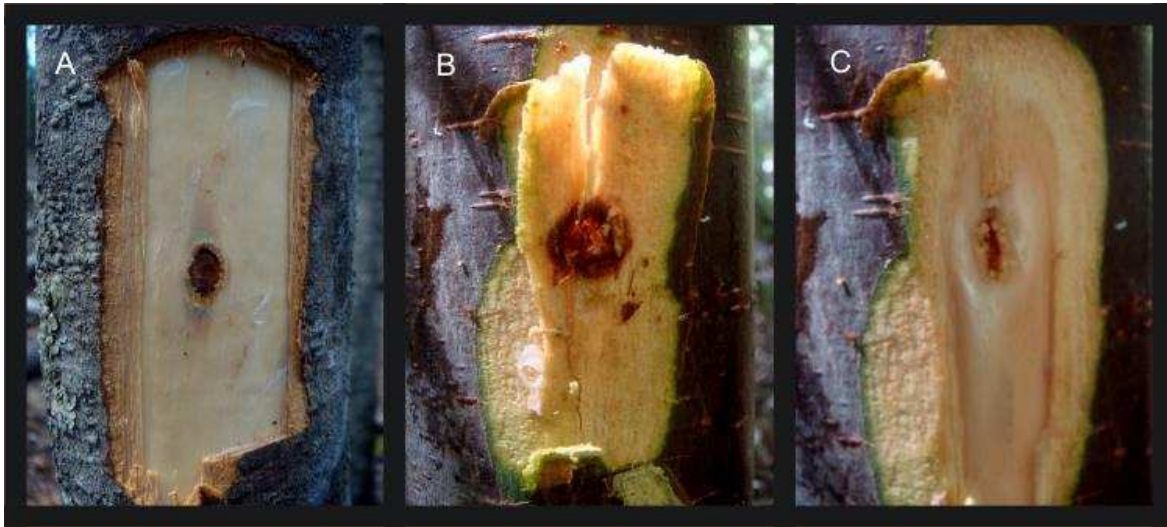


Figura 8. Lesiones sobre *Nothofagus* como resultado de los ensayos de patogenicidad con *L. gestamen* (BAFC482.2). **A** Control. **B** Lesión en la zona del cambium alrededor del punto de inoculación. **C** Cicatrización y ausencia de lesión en la albura externa y en el tejido de cicatrización alrededor de la herida.

Ensayos de inoculación con *Ophiostoma patagonicum*

La colonización del tejido de las cepas BAFC514.3 y BAFC514.2 fue similar en las cepas testeadas y en el control, sin existir diferencias significativas entre los 3 tratamientos (Figura 9). No se observaron lesiones, aunque la cicatrización de la herida no fue evidente en ninguno de los 3 casos (Figura 10).

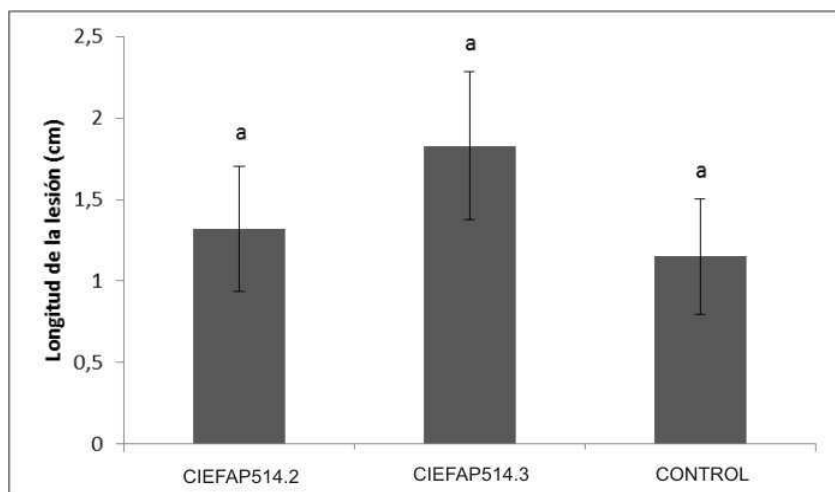


Figura 9. Resultados de las inoculaciones a campo (N=30) con *O. patagonicum* sp. nov. (CIEFAP513.2, CIEFAP513.3) y un control sobre *Schinus patagonicus* (inmediaciones de Trevelin, Chubut). Letras diferentes por encima de las barras indican diferencias estadísticas entre los aislamientos ($P < 0.05$).



Figura 10. Lesiones sobre *Schinus patagonicus* como resultado de los ensayos de patogenicidad con *O. patagonicum* (CIEFAP514.2, CIEFAP514.3). **A,D** Control. **B,E** Lesión ocasionada por el aislamiento CIEFAP514.2, similar al control. **C, F** Lesión ocasionada por el aislamiento CIEFAP514.3, también similar al control.

Discusión

Los ensayos de patogenicidad indicaron que *Huntia decorticans* y en menor medida *Huntia* sp1, tienen la capacidad de colonizar tejido de un árbol sano, mientras que *Huntia* sp2, *L. gestamen* y *O. patagonicum* no demostraron esta capacidad. Los resultados y su posible relación con los árboles muertos observados en el Parque Nacional Los Alerces se discute a continuación.

Complejo de especies '*Huntia decorticans*'

Los dos aislamientos de *H. decorticans* (BAFC4492 y BAFC4493) produjeron lesiones en el cambium y en la albura externa. Ambos fueron capaces de generar frentes de avance de hasta 50 cm desde el punto de inoculación, con longitudes totales que llegaron a los 100 cm. Los árboles inoculados con estos aislamientos evidenciaron la formación de un cancro, que fue resultado de la ausencia de crecimiento durante el ensayo. El tejido vascular, así como la albura externa se vio claramente colonizada por el hongo.

Los valores medios de colonización de BAFC4492 (32.1 cm \pm 5.4 y 51.1 cm \pm 17.3) y BAFC4493 (43.1 cm \pm 14.9 y 62.5 cm \pm 25.9) sobre *Nothofagus pumilio* fueron comparables a ensayos similares en climas cálidos (Rodas et al., 2008; Tarigan et al., 2011). Fueron también comparables a las tasas de colonización del patógeno *Davidsoniella australis*, una especie reportada sobre distintas especies de *Nothofagus* en Tasmania con un clima templado frío (Kile & Walker, 1987).

En el árbol vivo *Huntia decorticans* produjo estructuras similares a las producidas por el marchitamiento del roble ('pressure pads'), ocasionado por *Ceratocystis fagacearum*.

Los árboles inoculados con *H. decorticans* no demostraron, sin embargo, la sintomatología de un verdadero marchitamiento. Por el momento los indicios indican que *H. decorticans* es responsable de ocasionar cancrrosis localizadas, pero no infecciones sistémicas restringidas al tejido vascular.

Las cepas de *Huntia decorticans* ensayadas fueron coleccionadas sobre *N. pumilio* (Tierra del Fuego, BAFC4492) y *N. dombeyi* (Chubut, BAFC4493), a 1359 km de distancia, lo cual indica que su presencia a lo largo de toda la Patagonia no es improbable. Los árboles inoculados con *Huntia* sp1 (CIEFAP79) y *Huntia* sp2 (CIEFAP40) causaron lesiones con diferencias significativas y no significativas con respecto al control, respectivamente. Estos 3 grados de virulencia (alto para *H. decorticans*, medio para *Huntia* sp1 y bajo *Huntia* sp2) concuerdan con los 3 grupos filogenéticos observados.

Los escarabajos nitidúlidos son vectores bien documentados de especies de *Ceratocystidaceae* (Gibbs & French, 1980; Appel et al., 1990; Juzwik et al., 1998; Cease & Juzwik, 2001; Tarigan et al., 2011). En el presente trabajo se constató la asociación entre *H. decorticans* e insectos nitidúlidos (Figura 11). Estos últimos son conocidos como “escarabajos de savia fresca” o “sap-feeding beetles”, e implican la posibilidad de dispersión a árboles vivos no estresados.

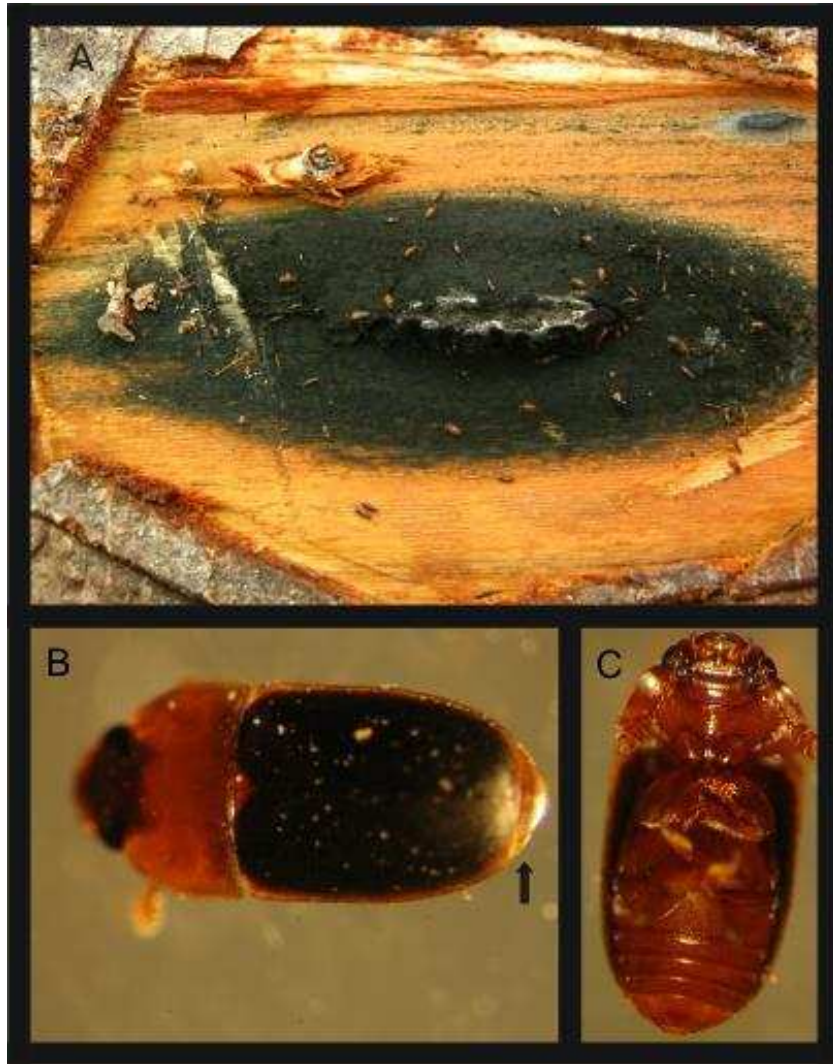


Figura 11. *Huntiella decorticans* sp. nov. **A** ‘Pressure pad’ sobre *N. dombeyi* (BAFC4492) infestado de escarabajos nitidúlidos (Coleoptera: Nitidulidae). **B** Detalle de la vista dorsal de una de las especies, nótese que los élitros no cubren todos los segmentos abdominales (flecha), una de las características que distinguen este grupo de los escarabajos ambrosiales. **C** Detalle de la vista ventral.

Especies de Ophiostoma y Leptographium

Tanto *Ophiostoma patagonicum* como *Leptographium gestamen* no presentaron lesiones significativamente diferentes a los controles. Para el caso de *O. patagonicum* este resultado concordó con el número elevado de aislamientos obtenidos, de diferentes hospedantes y

aislado de diversos vectores, características de un saprobio frecuente y oportunista. *L. gestamen* no pudo colonizar árboles sanos y siempre se lo encontró asociado a las especies de *Gnathotrupes*.

Implicancias de los resultados obtenidos

- *Schinus*

Los bosques de *Schinus* presentes en la transición entre el bosque de *Nothofagus* y la estepa patagónica de las provincias de Chubut y Río Negro están sujetos a una fuerte presión antrópica. La incidencia de este componente es difícil de separar al momento de analizar el estado sanitario del árbol. Más allá del estrés o daño mecánico que sufran los ejemplares existe uno o varios agentes bióticos que ocasionan la resinación excesiva, los canchales y posterior marchitez observados. A la luz de los resultados de los ensayos *O. patagonicum* difícilmente sea el agente causal de la sintomatología. Asimismo, su crecimiento radial veloz indicaría poca especificidad por el tejido vascular, lo cual sería esperable de un patógeno primario de este grupo (complejo de especies cercanas a *O. ulmi*). En consecuencia, el o los organismos involucrados en esta patología siguen sin conocerse. Durante los viajes de campo de la temporada 2009-2011, la sintomatología ha sido observada desde Bariloche (Provincia del Río Negro) hasta Corcovado (Provincia del Chubut).

- *Nothofagus*

La muerte de árboles de *Nothofagus* en pie como consecuencia de sequía extrema ha sido bien documentada, por ejemplo, durante la temporada 1998-1999 (Suarez et al., 2004). En

el contexto de cambio climático, se considera que el déficit hídrico y las altas temperaturas que se registran en la Patagonia en los últimos años (Villalba et al., 2003) modulan otros disturbios como los incendios (Kitzberger et al., 1997) o el ataque de plagas (Paritsis & Veblen, 2011). Estas últimas, suelen atacar árboles bajo estrés contribuyendo al proceso de muerte del mismo. En esta categoría podemos incluir principalmente especies de escolítidos, cerambícidos, bupréstidos y lepidópteros que atacan follaje y fuste.

Los escarabajos del género *Gnathotrupes* se clasifican en unas 20 especies, las cuales se distribuyen en diferentes gremios (Schedl, 1975; Naumann-Etienne, 1978; Guajardo Becchi, 2006). De especial interés es el gremio constituido por especies que atacan el fuste o ramas gruesas de árboles vivos, el cual incluye a *G. fimbriatus*, *G. vafer*, *G. barbifer* y *G. velatus*, entre otros (Aguayo Silva et al., 2008). La correlación entre la presencia de galerías de estos insectos y árboles enfermos ha sido reportada en estudios sobre el estado sanitario de *N. pumilio* (Guajardo Becchi, 2006) y *N. antarctica* (Alvarado Ojeda, 2006).

En el P.N. Los Alerces, la presencia de galerías de *Gnathotrupes* spp. fue constatada en los árboles que resultaron muertos durante el año 2010/2011. Sumado al posible efecto del escarabajo en sí estos insectos transportan una comunidad de microorganismos que pueden afectar al árbol. Dentro de las galerías de estos escarabajos se aislaron, además de *Leptographium gestamen*, otros hongos considerados saprobios o simbioses como *Sporothrix cabralii* y *O. valdivianum*. Sólo el primero fue sometido a ensayos de patogenicidad, sin poder colonizar el hospedante sano. Por otro lado, se observaron ascomas de *Huntia decorticans* dentro de las galerías de los escarabajos de ambrosía. *Huntia decorticans* podría tener una estrategia de dispersión inespecífica a través de

estos escarabajos y otra más específica mediante los escarabajos nitidúlidos, como ya ha sido demostrado en otros casos (Juzwik et al., 2011). Además de la presencia de escarabajos ambrosiales, sus hongos asociados y *H. decorticans*, también se observó la presencia de *Armillaria novae-zelandiae* (G. Stev.) Boesew (de Errasti et al., 2013). La presencia de cerambícidos y lepidópteros fue siempre posterior al ataque de las plagas y patógenos antes mencionados.

La mortalidad observada en *Nothofagus* dentro del PNLA durante la temporada 2010-2011 no parecería obedecer a una única causa. El estrés ambiental de las últimas décadas podría ser un factor desencadenante del fenómeno de mortalidad, al que contribuyen los escolítidos, *Huntella*, *Armillaria* y otros oportunistas. Los microorganismos asociados a los escarabajos están lejos de conocerse y es de esperar que surga información interesante de su estudio.

CAPÍTULO IV

Cronogramas de cosecha para lograr trozas de pino libres de manchas de albura

Introducción

La plantación de pináceas en la Patagonia comenzó a realizarse a mediados del siglo pasado, con el objetivo de aumentar la productividad del sector forestal. A través de mecanismos de promoción nacionales y provinciales se forestaron 23.000 ha durante el período 1985-1995 y 43.000 ha en la década siguiente. Actualmente unas 75.000 ha han sido plantadas, la mayoría con pino ponderosa (*Pinus ponderosa* Dougl.) y, en menor medida, pino oregón [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco], pino contorta (*Pinus contorta* Dougl.) y pino radiata (*Pinus radiata* D. Don.) (Loguercio & Deccechis 2006). Históricamente el pino se forestaba como reemplazo del bosque nativo, en zonas con una precipitación anual entre 800 y 1500 mm. A partir de la década 1990-2000 la tendencia ha sido forestar en zonas con precipitaciones anuales menores a 800 mm, entre el bosque nativo y la estepa. La distribución de las plantaciones abarca las provincias de Chubut, Rio Negro y Neuquén, entre el paralelo 37° S y el 44 °S (Figura 1). Las rotaciones entre cortas sucesivas se calculan entre 35 - 40 años.

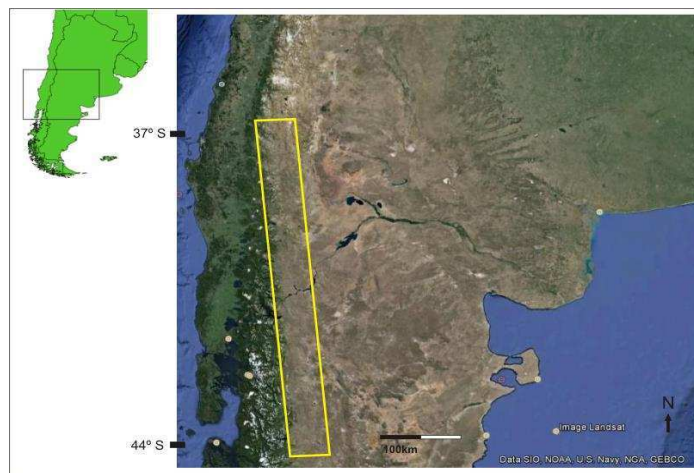


Figura 1. Área potencial para plantaciones de pináceas exóticas (recuadro amarillo) en la Patagonia, que incluye las 75.000 ha forestadas actualmente.

En la región patagónica se registra una incidencia elevada de manchas de origen biológico en la madera, comúnmente llamada ‘mancha de albura’ (‘sap-stain’ en inglés). Estos tipos de manchas no son superficiales, sino que manchan la madera en sentido radial, siendo imposibles de eliminar. Esto ocasiona una pérdida en la calidad de la madera y una merma de su valor comercial, en especial en productos con valor agregado producidos en la región: troncos cabañeros, muebles y revestimientos. Esta situación pone en desventaja a la industria local frente a los productos importados de Chile y a los provenientes de la Mesopotamia argentina. Por otro lado, el empleo de madera manchada en la construcción de embalajes para exportación (pallets) aumenta las posibilidades de que sean rechazados debido a restricciones cuarentenarias.

El manchado de la albura se origina y desarrolla por el crecimiento de hongos (reino Fungi, phylum Ascomycota) que infectan la madera recién apeada y/o elaborada que no recibe un tratamiento adecuado, originando una de las pérdidas económicas de post-cosecha más importantes a nivel mundial (Wingfield et al., 1993). Los hongos manchadores se alimentan de compuestos celulares simples; no degradan compuestos complejos como la celulosa y la lignina, de tal manera que no ocasionan problemas físico-estructurales a la madera (Chapman & Scheffer, 1940; Findlay, 1959). Pero al crecer en el tejido de la planta, sus paredes celulares oscuras (marrones a negras) manchan la albura ocasionando un problema estético importante.

Existen dos grupos principales de hongos manchadores, diferenciados por el grupo taxonómico al que pertenecen y por la estrategia de colonización empleada:

A) Algunas especies de la familia Botryosphaeriaceae Theiss. & Syd. (*Diplodia pinea* (Desm.) J. Kickx f., *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.) constituyen

un serio riesgo en relación al manchado (Swart & Wingfield, 1991). Estos hongos están presentes en conos, acículas, corteza y pinocha (Peterson, 1977). Sus esporas son dispersadas por la acción conjunta del viento y la lluvia. La infección de los árboles está típicamente asociada a heridas mecánicas causadas por las tareas de poda (Chou & MacKenzie, 1988), heladas (Zwolinski et al., 1990) o daño por insectos (Haddow & Newman, 1942). Sin embargo, también se han documentado casos de infección en tejidos jóvenes mediante los estomas (Waterman, 1943; Chou, 1978). La susceptibilidad de las plantas aumenta bajo condiciones de estrés (Zwolinski et al., 1990) y disminuye con un sitio de mayor aptitud forestal (Laughton, 1937). Las temperaturas entre 24 y 30 °C junto a un 90 % de humedad relativa ambiente, son consideradas las condiciones óptimas para la infección (Brookhouser & Peterson, 1971; Chou, 1982). En la región cordillerana de la Patagonia estas condiciones suelen darse en la primavera y el otoño, durante los días posteriores a una lluvia. Estas infecciones no siempre manchan la madera de inmediato. Se acumulan y perduran como infecciones latentes durante la vida del hospedante, colonizando la madera cuando ocurren episodios de estrés severo, la muerte o la cosecha del ejemplar. Durante esta colonización la troza resulta severamente manchada (Peterson, 1977; Encinas, 1996).

B) Otro grupo de ascomicetes de gran importancia a nivel mundial en relación al manchado de la madera son los llamados ‘hongos ofiostomatoides’. Estas especies están adaptadas a la dispersión por insectos, especialmente a los escarabajos de corteza (Coleoptera: Scolytinae). Se caracterizan por formar estructuras reproductivas que exudan gotas de esporas pegajosas, producidas en sincronía con la maduración de los insectos adultos. Al emprender el vuelo y colonizar nuevos fustes, estos transportan esporas en su

cuerpo. Una vez introducido por los insectos en el tejido fresco del hospedante, el hongo se desarrolla. El crecimiento óptimo se registra cuando la madera tiene entre 100–120% de humedad relativa (en relación al peso seco) y la temperatura está en el rango de 22–30 °C. La severidad de la mancha suele estar directamente relacionada con los niveles poblacionales de los escarabajos vectores presentes. En la Patagonia han sido reportadas 3 especies de escolítidos: *Orthotomicus laricis* (Fabricius), *Hylastes ater* (Paykull) e *Hylurgus ligniperda* (Fabricius) (Tiranti, 2010). En Chile estas especies suelen presentar uno o dos picos de vuelo entre Octubre a Febrero, dependiendo de la zona, y casi no registran eventos de vuelo en invierno (Lanfranco et al., 2002; Ruiz & Lanfranco, 2008). *H. ligniperda* produce 3-4 generaciones al año, mientras que *H. ater* solo una (Parra, 1996; Mausel et al., 2007). El régimen de tareas silviculturales y la correspondiente disposición de residuos son, entonces, aspectos claves para el manejo de la densidad poblacional de los escarabajos y, por consiguiente, de la mancha de albura (Ruiz & Lanfranco, 2008).

En un esquema productivo, el manchado de la madera puede manifestarse en diferentes etapas. La troza apeada sin procesar que permanece en el sitio de cosecha, suele perder humedad lentamente y el manchado ocurre progresivamente si las temperaturas posibilitan el crecimiento fúngico. Lo mismo sucede en las playas de acopio de los aserraderos. Si se cosecha, se transporta y se procesa la materia prima en poco tiempo, pero la madera no se seca a una tasa adecuada, puede ser colonizada por organismos manchadores aún después de ser aserrada.

Como métodos de manejo y control se buscan generar condiciones o utilizar compuestos que resulten desfavorables para el crecimiento fúngico durante el proceso productivo. En combinación, la cosecha, el transporte y el aserrado casi inmediatos, junto al

secado artificial posterior, constituyen las herramientas usuales para evitar el desarrollo de las manchas en la albura. Los compuestos químicos utilizados, tales como los fenoles halogenados (pentaclorofenol, tribromofenol), están en desuso creciente. Diversas investigaciones han ensayado métodos de mitigación alternativos, basados en organismos biocontroladores y en productos químicos de origen vegetal o fúngico (Vanneste et al., 2002). En este sentido las líneas de aserrío de mayor importancia situadas en las provincias del Neuquén, utilizan cronogramas de cosecha y transporte, organización por lotes en playa de estibado, baño antimancha (con tribromofenol) posterior al aserrado y secado artificial. Sin embargo, dentro del marco socio-económico de la región andino-patagónica, la automatización de las tareas de cosecha, de transporte y la implementación de un secadero artificial no se presentan como soluciones factibles en todas las situaciones, por lo tanto se requiere plantear otras estrategias desde lo productivo y tecnológico.

Objetivos

- Caracterizar la colonización por parte de los hongos manchadores a lo largo del tiempo, en rollizos cosechados en diferentes estaciones.
- Generar información que permita discernir las épocas de mayor riesgo en relación al manchado y estimar el tiempo del que dispone el productor antes de que se manifieste el problema una vez cosechados/apeados los árboles.

Materiales y Métodos

Sitios de estudio

Se trabajó en 5 sitios, en parcelas de cosecha de plantaciones ubicadas 2 en la provincia de Chubut y 3 en la provincia de Neuquén. En la provincia del Chubut los sitios representan plantaciones bajo administración pública, en el noroeste de la provincia. Ambas abastecen parte de la demanda de madera comercializada en la región para su empleo en construcción. Las áreas estudiadas en la provincia del Neuquén incluyen plantaciones públicas y privadas que destinan su producción para construcción de cabañas de troncos, tirantería y pallets.

- **Sitio 1:** Chubut, Dto. Futaleufú, Las Golondrinas, Destacamento Dirección General de Bosques y Parques (DGByP).
- **Sitio 2:** Chubut, Dto. Futaleufú, Aldea Escolar, Campo Experimental EEA INTA Esquel.
- **Sitio 3:** Neuquén, Dto. Los Lagos, Lago Meliquina, Estancia San Jorge.
- **Sitio 4:** Neuquén, Dto. Los Lagos, Lago Lolog, CORFONE S.A.
- **Sitio 5:** Neuquén, Lago Lácar, Estancia Quechuquina.

Caracterización de los sitios

En cada lugar se estableció una parcela circular de 10m de radio, en donde se instaló el ensayo. Previamente se realizó una caracterización de la misma, registrándose:

- Ubicación geográfica
- Especie forestal
- Edad del rodal
- Área basal
- Altura de los árboles dominantes
- Cobertura del dosel
- Pendiente
- Exposición
- Aptitud forestal
- Inóculo fúngico
- Insectos presentes
- Temperatura media anual
- Precipitación media anual
- Observaciones particulares

A su vez se solicitaron registros de temperatura y precipitación de las estaciones meteorológicas más cercanas a cada uno de los sitios. En todos los casos las estaciones se encontraban fuera de la parcela, a distancias variables (desde 100 m, hasta 17 km).

Cosecha

En cada sitio se cortaron un total de 30 trozas de *Pinus ponderosa* (150 trozas en total) según el siguiente cronograma: 8 trozas en VERANO, 8 en OTOÑO, 8 en INVIERNO y 6 en PRIMAVERA. Las trozas fueron desramadas, cortadas en secciones comerciales de 2,5 m y colocadas en contacto con el suelo, con el eje longitudinal de la troza en dirección Norte/Sur. A medida que se fueron realizando los apeos, se asignaron letras al azar para individualizar cada troza, las cuales se marcaron con aerosol sobre la corteza.

Contenido de humedad inicial de las trozas

Mediante una balanza de campo (precisión de un 0.1 g) se pesó una porción de tejido fresco (corte transversal del fuste o rodaja) que no excediera los 2 kg para determinar peso fresco (Pf). Las porciones de tejido fueron trasladadas al laboratorio y secadas a 105 °C hasta alcanzar peso constante, determinándose el peso seco (Ps). Mediante la diferencia de pesos se estimó el porcentaje de humedad inicial, en relación al peso seco (Ho).

$$Ho (\%) = (Pf - Ps) * 100 / Ps.$$

Procesamiento de las trozas

Las 8 trozas cosechadas en una misma estación fueron procesadas de a pares y de forma aleatoria a los 3, 6, 9 y 12 meses. Se evaluó el porcentaje manchado en relación al volumen total de la troza. Asimismo, se realizó el aislamiento y recolección de agentes manchadores e insectos asociados.

Volumen de la troza (Vt): se registraron los diámetros de ambos extremos y el largo total.

(Dm = diámetro promedio entre ambas caras, L = largo de la troza)

$$Vt = (Dm/2)^2 \pi L$$

Volumen de la troza manchado (Vm): se realizaron cortes seriados de la troza cada 10 cm (0.1 m) y se estimó visualmente sobre una de las caras el porcentaje de la superficie manchada (Sm, entre 1 y 0). Luego se sumaron los resultados para las 25 secciones obtenidas, evaluando de esta forma los 2,5 metros del largo total de la troza.

$$Vm = \sum (Dm/2)^2 \pi Sm 0.1 m$$

Porcentaje de mancha (Pm): porcentaje del volumen total del palo afectado por la mancha

$$Pm = (Vm 100)/Vt$$

Aislamientos fúngicos y recolección de insectos: se realizaron aislamientos a campo de estructuras reproductivas de hongos manchadores. Si estas estaban ausentes se transportó el tejido afectado al laboratorio. El procesamiento en el laboratorio e identificación de los hongos manchadores está descrito en el Capítulo II de esta Tesis. Los cultivos de hongos obtenidos directamente de los insectos, se realizaron simplemente mediante la siembra de insectos vivos en placas estériles conteniendo AM 2%. Se utilizaron pinzas esterilizadas con alcohol 70% para su manipulación. Se realizaron, a su vez, las recolecciones de los insectos vectores, los cuales fueron identificados siguiendo a López Romero et al. (2007) y luego fueron confirmadas por el Dr. Sergio Tiranti (Lab. Entomología, Asentamiento Universitario San Martín de los Andes – Universidad Nacional del Comahue, San Martín de Los Andes).

Utilizando la metodología de cosecha y procesamiento descritos (Tabla 1) el ensayo estimó el porcentaje de mancha en relación a dos variables:

Tiempo de permanencia: 3, 6, 9 y 12 meses.

Época de cosecha: PRIMAVERA, VERANO, OTOÑO, INVIERNO

A lo largo del período 2010-2012 se realizaron 8 viajes a cada uno de los 5 sitios, cada 3 meses. Las actividades realizadas en cada viaje se detallan en la Tabla 2.

Tabla 1. Esquema del diseño experimental empleado para evaluar la colonización de las trozas, en relación a su época de cosecha y al tiempo de permanencia en el campo.

Época de cosecha	Tiempo de permanencia			
	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Primavera (P)	(3P)	(6P)	(9P)	(12P)
Verano (V)	(3V)	(6V)	(9V)	(12V)
Otoño (O)	(3O)	(6O)	(9O)	(12O)
Invierno (I)	(3I)	(6I)	(9I)	(12I)

(N = 30. Por cada una de las 16 combinaciones, se procesaron 2 trozas)

Tabla 2. Cronograma del ensayo. Fecha y tareas realizadas en cada sitio

Tarea	S1	S2	S3	S4	S5
Cosecha de Primavera Caracterización del rodal	4/11/10	9/11/10	10/11/10	12/11/10	16/11/10
Cosecha de Verano Procesamiento 3P	8/2/11	9/2/11	10/2/11	11/2/11	15/2/11
Cosecha de Otoño Procesamiento 6P, 3V	8/5/11	8/5/11	9/5/11	10/5/11	13/5/11
Cosecha de Invierno Procesamiento 9P, 6V, 3O	30/9/11	17/9/11	18/9/11	19/9/11	23/9/11
Procesamiento 12P, 9V, 6O, 3I	26/12/11	27/12/11	28/12/11	29/12/11	23/12/11
Procesamiento 12V, 9O, 6I	5/3/12	28/2/12	29/2/12	29/2/12	2/3/12
Procesamiento 12O, 9I	15/4/12	16/4/12	16/4/12	17/4/12	19/4/12

En negrita se indica el muestreo afectado por las cenizas del volcán Puyehue, motivo por el cual se retrasó el viaje de invierno del año 2011. S = sitio; 3, 6, 9, 12 = meses de permanencia de la troza en el sitio; V = verano, O = otoño, I = invierno y P = primavera. El último viaje de procesamiento, (trozas 12I), se consideró demasiado costoso para la obtención de un solo dato. Por este motivo no se realizó.

Resultados

Sitio 1 (DGByP) Las Golondrinas

Durante la caracterización de la parcela se obtuvieron los siguientes datos

- Ubicación geográfica: 42° 02' 26'' S, 71° 32' 35'' O
- Especie: *Pinus ponderosa*
- Edad del rodal: 35 años
- Área basal (m²/ha): 88 ± 1
- Altura de los árboles dominantes: 24-27 m
- Cobertura: 62% ± 5
- Pendiente: 2 ° ± 1
- Exposición: Sur
- Aptitud forestal: Clase 1
- Inóculo fúngico: trozas tiradas de aprovechamientos previos, más de 2 años, con mucha mancha. Se aislaron *O. peregrinum*, *O. piliferum* y *Graphilbum* sp
- Insectos: escarabajos de corteza (*Hylurgus ligniperda*, *Orthotomicus laricis*), picudos (*Pissodes castaneus*) y sirícidos (*Sirex noctilio*)
- Temperatura media anual: 9° C
- Precipitación media anual: 962 mm

— Observaciones: parcela sin poda ni raleo. Sotobosque ocupando un 15% de la superficie de la parcela: *Aristotelia chilensis*, *Rubus sp.*, *Rosa rubiginosa*, gramíneas, regeneración de pino. Restos del aprovechamiento (ramas, despuntes, trozas abandonadas) agrupados en pilas. En áreas aledañas la cosecha se realiza con motosierristas y posterior arrastre con bueyes. Para el transporte se construyen cargaderos y playas de acanchado en claros. Accesibilidad dependiente de la estación del año. La humedad inicial de las trozas fue mayor durante el período de crecimiento del árbol (Figura 2).

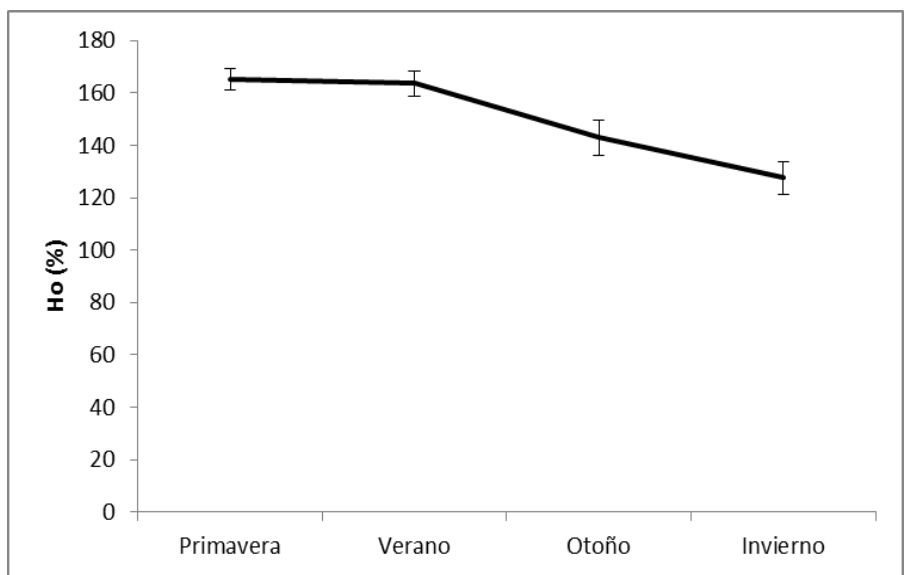


Figura 2. Humedad inicial de las trozas cosechadas en diferentes épocas del año para el Sitio 1, DGBYP Las Golondrinas, Chubut (N = 30). $H_o (\%) = (Pf - P_s) / P_s * 100$.

Con respecto al manchado, el otoño fue la época más adecuada para el apeo y el verano la época más crítica (Figura 3).

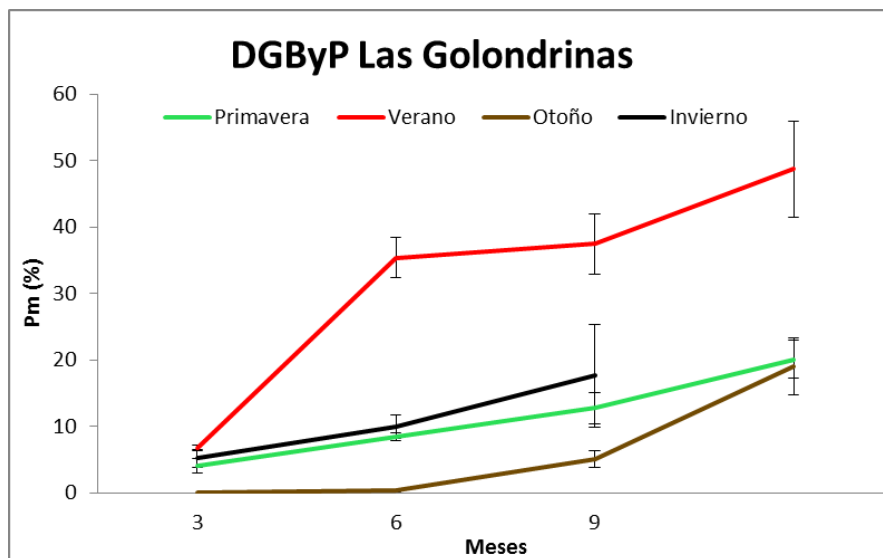


Figura 3. Porcentaje de mancha (Pm) a lo largo del tiempo (3, 6, 9 y 12 meses), para trozas cosechadas en diferentes épocas del año (curvas roja, negra, verde y marrón). $Pm (\%) = \text{Vol manchado} / \text{Vol total} * 100$. Sitio 1, DGBYP Las Golondrinas, Chubut.

Como primeros colonizadores se identificaron a *Diplodia pinea* en primavera-verano y a *O. peregrinum* en invierno (Tabla 3). *Diplodia pinea* fue aislada con mayor frecuencia, presentando la mayor severidad, si bien los hongos ofiostomatoides también estuvieron presentes (*Ophiostoma piliferum*, *O. peregrinum*, *O. ips*, *Graphilbum*), asociados a *H. ligniperda* y *O. laricis*.

Tabla 3. Especies fúngicas responsables del manchado de la albura en las diferentes trozas del Sitio 1 DGBYP, Las Golondrinas, Chubut.

Época de cosecha	Tiempo de permanencia			
	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Primavera	<i>D. pinea</i>	<i>D. pinea</i> <i>O. peregrinum</i>	<i>D. pinea</i> <i>Co. pulveracea</i> <i>Graphilbum</i> sp1	<i>D. pinea</i> <i>Graphilbum</i> sp1

Verano	<i>D. pinea</i>	<i>D. pinea</i>	<i>D. pinea</i> <i>O. piliferum</i>	<i>D. pinea</i>
Otoño		<i>D. pinea</i> <i>Co. Raphalochaeta</i>	<i>D. pinea</i>	<i>D. pinea</i> <i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>
Invierno	<i>O. peregrinum</i>	<i>D. pinea</i>	<i>D. pinea</i> <i>O. ips</i>	<i>D. pinea</i> <i>O. peregrinum</i>

(D= *Diplodia*; O= *Ophiostoma*; Co=*Coniochaeta*)

Este sitio ha sido catalogado como de aptitud forestal muy buena (Clase 1), sin embargo, no se han realizado las tareas silviculturales debidas. Esto se vio reflejado en el mal estado sanitario de la parcela, debido a la presencia de plagas [*Pissodes castaneus* (De Geer) y *Sirex noctilio* (Fabricius)], una abundante cobertura del dosel y un escaso sotobosque.

Sitio 2 EEA INTA Esquel

La parcela experimental dentro del predio del INTA fue caracterizada del siguiente modo

– Ubicación geográfica: 43° 07' 15'' S, 71° 33' 08'' O

– Especie: *Pinus ponderosa*

– Edad del rodal: 22 años

– Área basal (m²/ha): 51 ± 1

– Altura de los árboles dominantes: 22 – 24 m

– Cobertura: 60% ± 7

- Pendiente: $5^{\circ} \pm 1$
- Exposición: Sur
- Aptitud forestal: Clase 1
- Inóculo fúngico: trozas manchadas con *O. piliferum*
- Insectos: Indicios de escarabajos de corteza (*Hylurgus ligniperda*, *Orthotomicus laricis*), picudos (*Pissodes castaneus*) y sirícidos (*Sirex noctilio*)
- Temperatura media anual: 8°C
- Precipitación media anual: 840 mm
- Observaciones: Sotobosque poco abundante (20% de la superficie de la parcela), se observó *Aristotelia chilensis*, *Rubus sp.*, *Rosa rubiginosa*, *Buddleja globosa*, regeneración de pino y algunas herbáceas. Residuos de podas y raleos previos dispuestos en pilas y rumas abandonadas. Dentro del predio se realizan apeos con motosierra, frecuentemente mediante talas rasas. Las trozas se disponen en playas de estibado con poca vegetación, rumas en contacto con el suelo, carga mecanizada.

En este sitio la humedad inicial de las trozas también fue mayor durante el período de crecimiento, siendo el verano donde se registraron los valores más elevados (Figura 4).

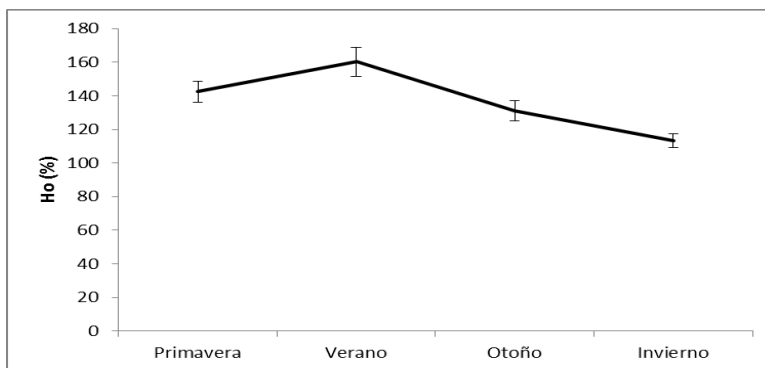


Figura 4. Porcentaje de Humedad relativa inicial (Ho) de las trozas cosechadas en diferentes épocas del año para el Sitio 2, EEA INTA Esquel, Chubut (N = 30). $Ho (\%) = (Pf - Ps) / Ps * 100$.

En relación a la colonización de hongos manchadores, a los 3 meses no existieron diferencias significativas entre las distintas épocas de apeo, las trozas se encontraban libres de mancha. A los 6 meses las diferencias fueron escasas si bien se pudo detectar hasta un 8 % del volumen manchado. Las diferencias ocurrieron a partir de los 9 meses de permanencia en el sitio, siendo las más afectadas las trozas apeadas en otoño (Figura 5).

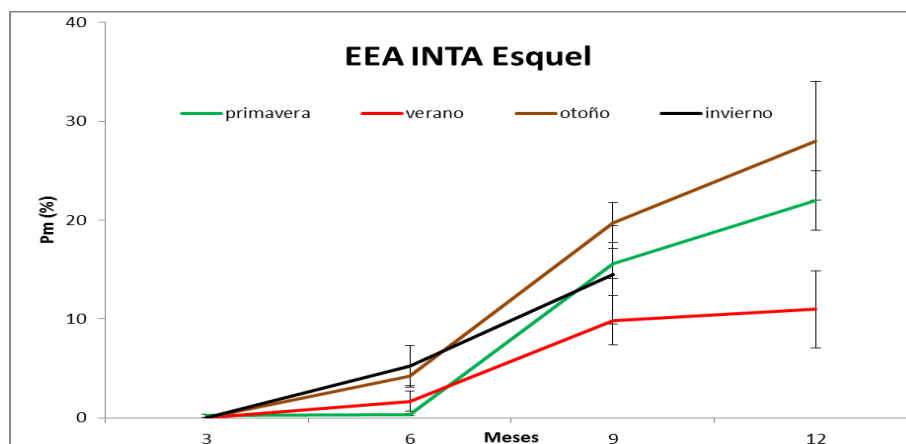


Figura 5. Porcentaje de mancha (Pm) a lo largo del tiempo (3, 6, 9 y 12 meses), para trozas cosechadas en diferentes épocas del año (curvas roja, negra, verde y marrón). $Pm (\%) = Vol\ manchado / Vol\ total * 100$. Sitio 2, EEA INTA Esquel, Chubut

Como primeros colonizadores se pudo identificar la presencia de *O. piliferum* en primavera-otoño y *Sclerophoma phityophila* en invierno (Tabla 4). *Ophiostoma piliferum* y *O. peregrinum* fueron los hongos manchadores más frecuentes, asociados a *Hylurgus ligniperda* y *Orthotomicus laricis*.

Tabla 4. Especies fúngicas responsables del manchado de la albura en las diferentes trozas del Sitio 2, EEA INTA Esquel, Chubut.

Época de cosecha	Tiempo de permanencia			
	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Primavera		<i>O.piliferum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>	<i>O. piliferum</i>
Verano			<i>O. piliferum</i> <i>S. phytiophyla</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>
Otoño		<i>O.piliferum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i> <i>S. phytiophyla</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>
Invierno		<i>S. phitiophyla</i>	<i>O. peregrinum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>

(O= *Ophiostoma*; S= *Sclerophoma*)

Sitio 3: Ea. San Jorge

Durante la caracterización de la parcela se obtuvieron los siguientes datos:

- Ubicación geográfica: 40° 24' 58'' S, 71° 14' 24'' O
- Especie: *Pinus ponderosa*
- Edad del rodal: 20 años
- Área basal (m²/ha): 39 ± 1
- Altura de los árboles dominantes: 16-19 m
- Cobertura: 53% ± 7
- Pendiente: 3 ° ± 1
- Exposición: Oeste
- Aptitud forestal: Clase 2
- Inóculo fúngico: *O. piliferum* y *O. peregrinum*
- Insectos: numerosas galerías de escarabajos de corteza (*Hylurgus ligniperda*, *Orthotomicus laricis*, *Hylastes ater*) y sirícidos (*Sirex noctilio*)
- Temperatura media anual: 11° C
- Precipitación media anual: 417 mm
- Observaciones: sitio originalmente plantado a una distancia de 3m entre árboles. Se efectuó un primer raleo no comercial línea por medio. Las ramas y desechos de la tarea fueron apiladas en rumas. Sotobosque escaso, algunas orquídeas (*Chloris* sp.) y herbáceas.

La humedad inicial de las trozas también fue mayor durante el período de crecimiento y tampoco pareció evidenciar una relación con la severidad de la mancha, al igual que en los sitios anteriores (Figura 6).

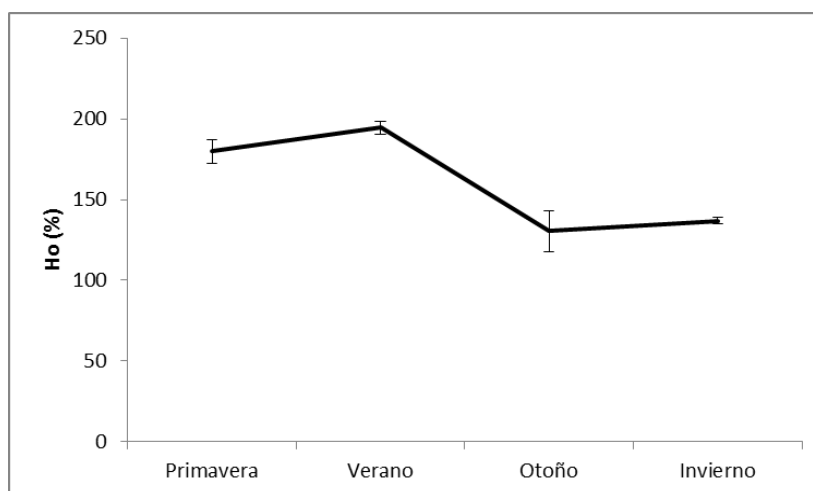


Figura 6. Porcentaje de Humedad relativa inicial (Ho) de las trozas cosechadas en diferentes épocas del año para el Sitio 3, Ea. San Jorge, Neuquén (N = 30). $Ho (\%) = (Pf - Ps) / Ps * 100$.

Hasta los 3 meses no se registró un porcentaje de mancha apreciable, independientemente de la época del año en la cual se realizó el apeo (Figura 7). A partir de los 6 meses fue evidente que las trozas apeadas en primavera se mancharon significativamente más que el resto.

Con respecto a los organismos responsables de las manchas de albura, *O. piliferum* y *O. peregrinum* resultaron los principales agentes del manchado, asociados a *Hylurgus ligniperda* y a *Orthotomicus laricis*. (Tabla 5). Se detectó la presencia de *Grosmannia huntii* asociado a *Hylastes ater*

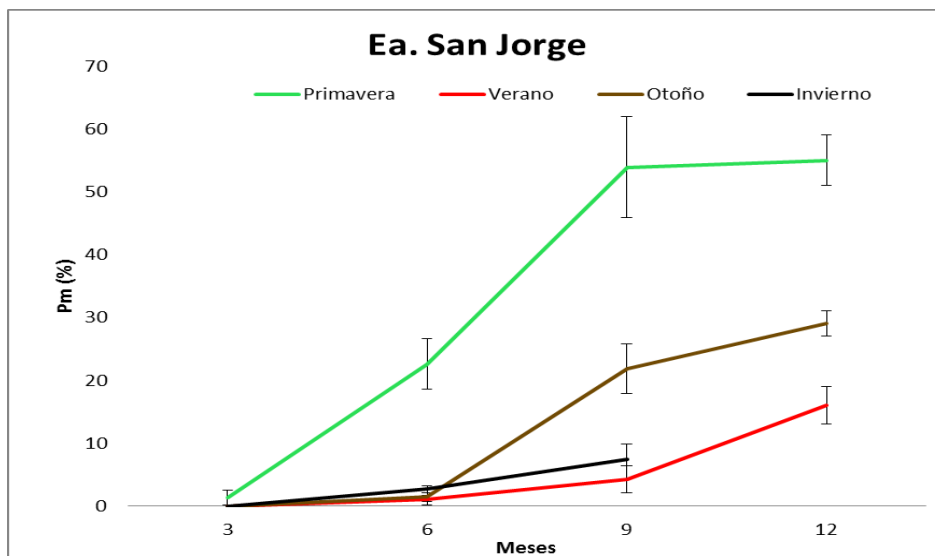


Figura 7. Porcentaje de mancha (Pm) a lo largo del tiempo (3, 6, 9 y 12 meses), para trozas cosechadas en diferentes épocas del año (curvas roja, negra, verde y marrón). Pm (%) = Vol manchado/Vol total *100. Sitio 3, Ea. San Jorge, Neuquén.

Tabla 5. Especies fúngicas responsables del manchado de la albura en las diferentes trozas del Sitio 3, Ea. San Jorge, Neuquén.

Época de cosecha	Tiempo de permanencia			
	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Primavera	<i>O. piliferum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i> <i>G. huntii</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>
Verano			<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i> <i>O. ips</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>
Otoño		<i>O. piliferum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>Co. pulveracea</i> <i>O. ips</i>	<i>O. peregrinum</i>
Invierno		<i>O. peregrinum</i>	<i>O. peregrinum</i>	<i>O. piliferum</i>

(O= *Ophiostoma*; G= *Grosmannia*)

Sitio 4: CORFONE S.A.

El resultado de la caracterización de la parcela se presenta a continuación

- Ubicación geográfica: 40° 04' 11'' S, 71° 20' 42'' O
- Especie: *Pinus ponderosa*
- Edad del rodal: 20-22 años
- Área basal (m²/ha): 36 ± 3
- Altura de los árboles dominantes: 16-19 m
- Cobertura: 66% ± 7
- Pendiente: 4 ° ± 1
- Exposición: Este
- Aptitud Forestal: Clase 1
- Inóculo fúngico: una troza y algunas ramas manchadas con *O. piliferum*
- Insectos: galerías de escarabajos de corteza (*Hylurgus ligniperda*)
- Temperatura media anual: 10° C
- Precipitación media anual: 1220 mm
- Observaciones: Sotobosque abundante, con presencia de *Aritsotelia chilensis*, *Rosa rubiginosa*, renovales de *Nothofagus antarctica*, *Schinus patagonicus* y *Lomatia hirsuta*. Herbáceas, orquídeas (*Chloris* sp.) y caña (*Chusquea coleou*). La cosecha en zonas aledañas se realiza actualmente mediante motosierristas, durante fines de primavera a comienzos de otoño. Se construyen playas de estibado bien amplias, cronogramas de

transporte y carga mecanizada. Residuos dispuestos en pilas, posteriormente incorporados al suelo mediante chipeado o incinerado.

La humedad inicial de las trozas varía según lo esperado, siendo mayor durante la etapa de crecimiento (Figura 8).

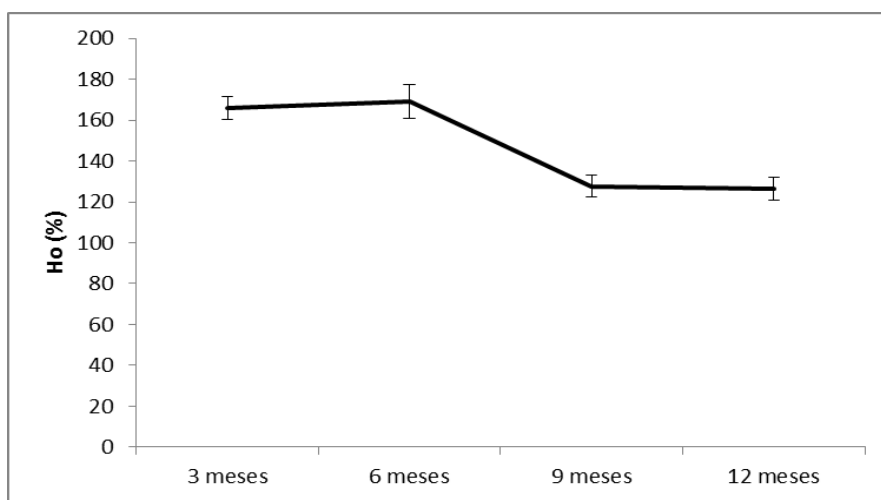


Figura 8. Porcentaje de Humedad relativa inicial (Ho) de las trozas cosechadas en diferentes épocas del año para el Sitio 4, CORFONE S.A., Neuquén (N = 30). $Ho (\%) = (Pf - Ps) / Ps * 100$.

Durante la colonización de las trozas no se observó ninguna diferencia significativa entre las distintas épocas de apeo, dentro de los 6 meses de realizada la cosecha. A los 9 meses, las trozas apeadas en otoño fueron las más afectadas por la mancha (Figura 9).

Los organismos manchadores, responsables de la colonización de las trozas, resultaron ser solo especies de hongos ofiostomatoides: *Ophiostoma piliferum*, *O. peregrinum* y *O. ips* (Tabla 6).

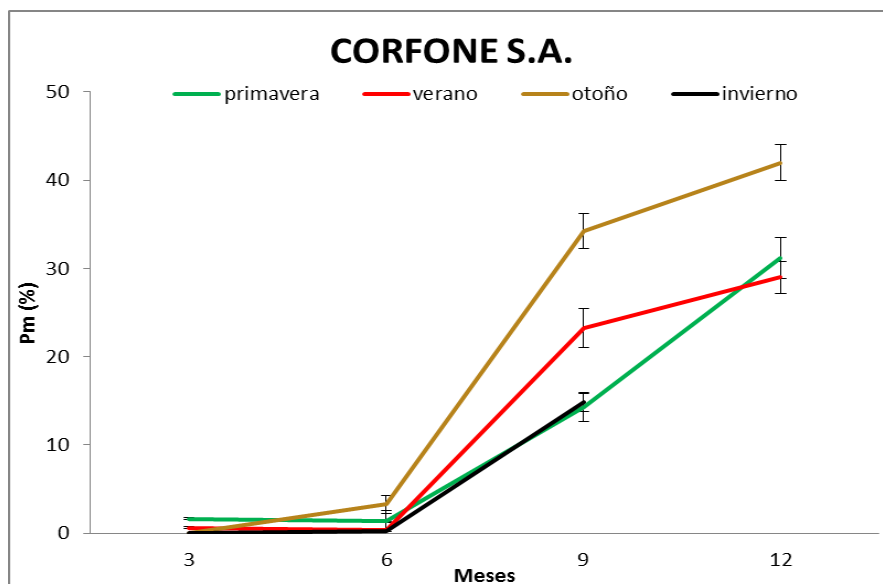


Figura 9. Porcentaje de mancha (Pm) a lo largo del tiempo (3, 6, 9 y 12 meses), para trozas cosechadas en diferentes épocas del año (curvas roja, negra, verde y marrón). Pm (%) = Vol manchado/Vol total *100. Sitio 4, CORFONE S.A., Neuquén.

Tabla 6. Especies fúngicas responsables del manchado de la albura en las diferentes trozas del Sitio 4, CORFONE S.A., Neuquén.

Época de cosecha	Tiempo de permanencia			
	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Primavera	<i>O. peregrinum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i> <i>O. ips</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i> <i>O. ips</i>	<i>O. piliferum</i>
Verano		<i>O. peregrinum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>
Otoño		<i>O. piliferum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>
Invierno		<i>O. peregrinum</i>	<i>O. peregrinum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>

(O= *Ophiostoma*)

Sitio 5 Ea. Quechuquina

Durante la caracterización de la parcela se obtuvieron los siguientes datos

- Ubicación geográfica: 40° 09' 23'' S, 71° 33' 27'' O
- Especie: *Pinus ponderosa*
- Edad del rodal: 26 años
- Área basal: 56 ± 5
- Altura de los árboles dominantes: 26-29 m
- Cobertura: 64% ± 7
- Pendiente: 2 ° ± 1
- Exposición: Este
- Aptitud forestal: Clase 1
- Inóculo fúngico: trozas manchadas con *Ophiostoma piliferum* y *O. peregrinum*
- Insectos: galerías de escarabajos de corteza (*Orthotomicus laricis*)
- Temperatura media anual: 10° C
- Precipitación media anual: 1220 mm
- Observaciones: residuos dispuestos en pilas, sin tratamiento posterior. Trozas abandonadas. Sotobosque abundante, con *Aritsotelia chilensis*, *Rosa rubiginosa*, *Rubus* sp., renovales de pino, *Buddleja globosa* y herbáceas. Aprovechamiento: apeo por

motosierrista, playas de estibado con mucha vegetación, rumas en contacto con el suelo.

La humedad inicial de las trozas fue mayor durante la etapa de crecimiento (Figura 10).

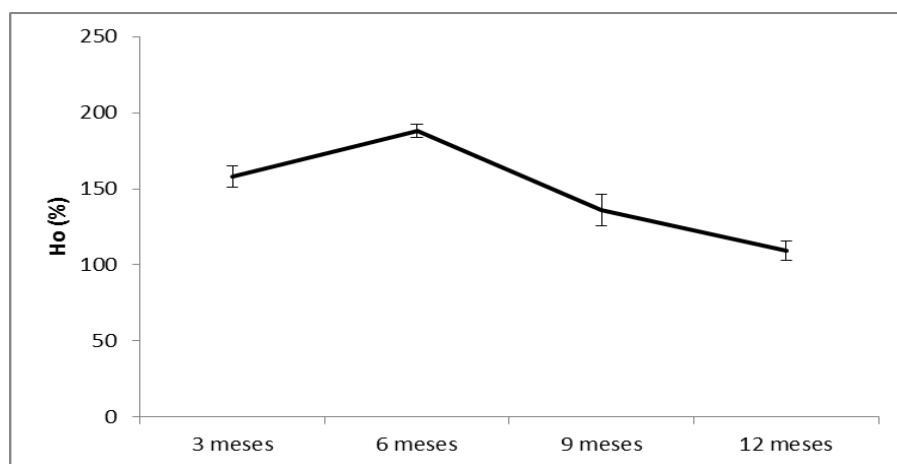


Figura 10. Porcentaje de Humedad relativa inicial (Ho) de las trozas cosechadas en diferentes épocas del año para el Sitio 5, Ea. Quechuquina, Neuquén (N = 30). $Ho (\%) = (Pf-Ps)/Ps * 100$.

Dentro de los 3 meses de realizado el apeo las trozas no evidenciaron manchas. A los 6 meses, las trozas apeadas en otoño fueron las más afectadas por la mancha, si bien el volumen manchado no superó el 10% (Figura 11).

De la madera manchada se realizaron diferentes aislamientos de los cuales se pudieron identificar diferentes organismos, todos ellos especies de hongos ofiostomatoides: *Ophiostoma piliferum*, *O. peregrinum* y *O. ips* (Tabla 7).

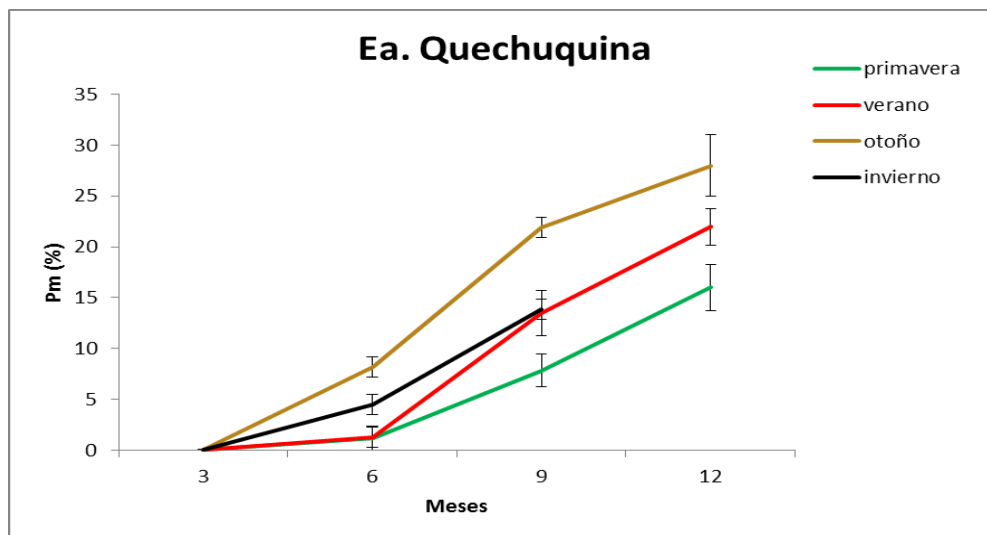


Figura 11. Porcentaje de mancha (Pm) a lo largo del tiempo (3, 6, 9 y 12 meses), para trozas cosechadas en diferentes épocas del año (curvas roja, negra, verde y marrón). $Pm (\%) = \text{Vol manchado} / \text{Vol total} * 100$. Sitio 5, Ea. Quechuquina., Neuquén.

Tabla 7. Especies fúngicas responsables del manchado de la albura en las diferentes trozas del Sitio 5, Ea Quechuquina, Neuquén.

Época de cosecha	Tiempo de permanencia			
	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Primavera	<i>O. piliferum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i> <i>O. ips</i>	<i>O. peregrinum</i>
Verano		<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>
Otoño		<i>O. piliferum</i> <i>O. ips</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>
Invierno		<i>O. piliferum</i>	<i>O. peregrinum</i>	<i>O. piliferum</i> <i>O. peregrinum</i>

(O= *Ophiostoma*)

Al considerar los datos de todos los sitios en conjunto, cabe señalar que *Ophiostoma piliferum*, *O. peregrinum*, *Diplodia pinea* y *Ophiostoma ips* resultaron los organismos más aislados (Figura 11).

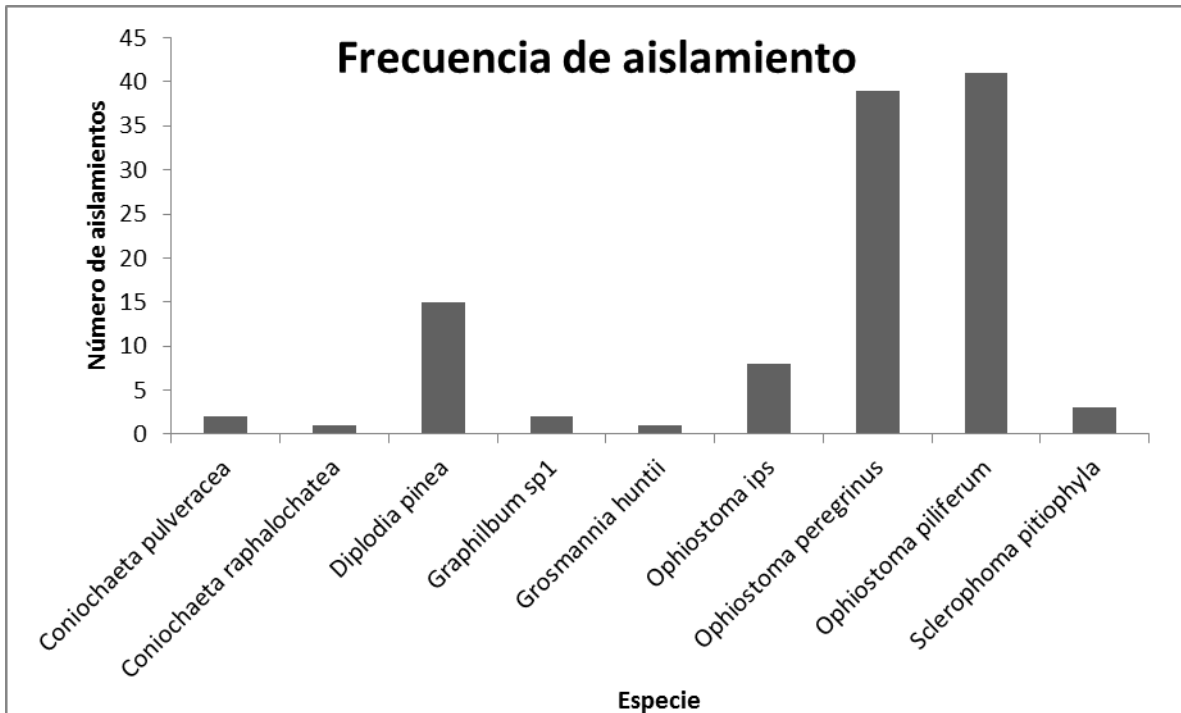


Figura 12. Frecuencia de aislamientos por especie, en los 5 sitios, sobre el total de las trozas relevadas (N=150).

En cuanto a la asociación entre estos hongos y sus insectos vectores, tanto *Orthotomicus laricis* como *Hylurgus ligniperda* parecieran estar asociados a diferentes hongos sin una especificidad aparente, lo cual ha sido corroborado por diferentes autores (Six & Wingfield, 2011). Distinto es el caso de la asociación entre *Hylastes ater* y *Grosmannia* (Tabla 8) la cual sí pareciera ser más específica, hecho ya documentado en otros estudios (Jacobs & Wingfield, 2001).

Tabla 8. Número de aislamientos fúngicos obtenidos directamente del exoesqueleto de escarabajos vectores (Coleoptera: Scolytinae) (N = 49). Resultados de los 5 Sitios muestreados.

Hongos manchadores	Insectos		
	<i>H. ligniperda</i>	<i>H. ater</i>	<i>O. laricis</i>
<i>Graphilbum</i> sp1	7	1	4
<i>Grosmannia huntii</i>	0	2	0
<i>G. radiaticola</i>	1	1	0
<i>Ophiostoma ips</i>	2	0	1
<i>O. peregrinum</i>	6	0	12
<i>O. piliferum</i>	9	0	3
	25	4	20

Discusión

En este trabajo se planteó caracterizar la colonización de hongos manchadores de la madera en distintos sitios de aprovechamiento en la Patagonia Andina. Uno de los objetivos específicos del presente Capítulo fue identificar el tiempo de permanencia de las trozas en el campo antes de que comiencen a ser manchadas. Los sitios EEA INTA Esquel, CORFONE S.A. y Ea. Quechuquina (Sitios 2, 4 y 5) disponen de una ventana de 3 meses sin mancha y de 6 meses con menos del 10 % de mancha, independientemente de la época de cosecha de las trozas. En el caso de la Ea. San Jorge y DGBYP Las Golondrinas (Sitios 3 y 1), puede observarse que hasta los 3 meses no se producen manchas que superen el 10% del volumen total de la troza, independientemente de la época de cosecha. De esta forma, es posible afirmar que en los 5 sitios visitados existe una ventana de 3 meses en la cual la troza puede permanecer a campo con un porcentaje de mancha despreciable. Es importante mencionar que si bien el volumen manchado es escaso el inóculo ya está presente y una vez transportado debe ser procesado y secado sin demoras.

El otro objetivo específico del trabajo fue establecer la época del año más crítica para efectuar el aprovechamiento, desde la perspectiva de la aparición y desarrollo del manchado de la albura. En relación a este objetivo pudieron identificarse 3 patrones diferentes.

El primero incluye los sitios EEA INTA Esquel, CORFONE S.A. y Ea. Quechuquina (Sitios 2, 4 y 5). En estas parcelas la colonización de la madera fue escasa dentro de los 6 meses y no presentó diferencias entre las trozas apeadas en diferentes estaciones. A los 9 meses ya existen diferencias en el manchado en función de la época de apeo y **las trozas apeadas en otoño** representan el sustrato más vulnerable. Este resultado

ejemplifica la cosecha de otoño cuyas trozas no son transportadas, pasan el invierno en el sitio de cosecha, y cuyo floema se encuentra aún húmedo en la primavera siguiente. Concuerdando con estos resultados el hecho que los principales organismos causales sean especies de hongos ophiostomatoides, asociadas a los escarabajos de corteza *Hylurgus ligniperda*, *Orthotomicus laricis* e *Hylastes ater*.

El segundo patrón se ejemplifica mediante los resultados de la Ea. San Jorge (Valle de Meliquina, Neuquén) (Sitio 3). En este sitio la época más crítica fue la **primavera**. Este patrón es probablemente debido al aumento poblacional y época de vuelo de los escarabajos de corteza durante este período. A pesar de que esta plantación se encuentra en un sitio de estepa, con poca precipitación y baja humedad relativa ambiente, las características del sitio resultan favorables para estos insectos: el área ha sido intervenida en los últimos años mediante podas y raleos no comerciales, y los residuos permanecen apilados en rumas abandonadas. Estos residuos representan un recurso abundante a partir del cual se observa un aumento poblacional de los escarabajos de corteza. Este aumento trae aparejado una mayor incidencia de los hongos manchadores. Si bien no se evaluó específicamente el tamaño poblacional de los escarabajos, a lo largo de los sucesivos viajes resultó evidente la cantidad de insectos presentes, en relación a los demás sitios del ensayo.

El último caso (DGBYP Las Golondrinas) (Sitio 1) representa una situación diferente. Las **trozas apeadas en verano** (la estación más seca y de mayor temperatura) **presentaron un mayor volumen de colonización**. Este patrón es debido a la presencia de *Diplodia pinea*. Como se mencionara en la Introducción, este hongo infecta al ejemplar mientras está vivo, manteniéndose en un estado latente, para luego colonizar el tejido ante la muerte, cosecha o estrés severo del hospedante. Al apearse el árbol, el inóculo ya está

presente, y solo necesita condiciones favorables para su desarrollo. En este sitio, está claro que las condiciones más favorables para la colonización se dan en verano, posiblemente debido a las altas temperaturas. Por otro lado, la falta de podas y raleos permite condiciones de humedad relativamente altas en comparación a sitios con manejo silvícola, aumentando la presencia de inóculo y asegurando la humedad necesaria para la infección. A su vez, la falta de raleos genera un crecimiento sub-óptimo del rodal, que podría ocasionar árboles débiles u oprimidos, ideales para la infección por parte del hongo.

Estos resultados indican que debe conocerse la identidad de organismos manchadores presentes en un determinado sitio, debido a que las estrategias de manejo y control pueden variar. De todas maneras, existen recomendaciones que pueden disminuir la incidencia del problema, sea cual fuere el organismo causal, por debajo del umbral deseado. Como estrategias preventivas el énfasis debe ponerse en las tareas silviculturales del rodal. Es sabido que una plantación sin intervención es indeseable ya que se asocia con una menor productividad, un mal estado sanitario y un mayor riesgo de incendios; pero aún realizadas las tareas de poda y raleo, existen aspectos que, de no ser tenidos en cuenta, pueden aumentar la incidencia de la mancha. En primera instancia las podas y raleos deben efectuarse en la temporada correcta (con bajas temperaturas durante el invierno) para evitar la superposición de heridas mecánicas y condiciones aptas para la germinación de *D. pinea*, lo cual resulta en múltiples infecciones del hospedante. En segunda instancia la correcta disposición del material de podas y raleos constituye una práctica fundamental para evitar aumentos poblacionales de los insectos vectores de hongos ofiostomatoides. En relación a la problemática de disposición de residuos de poda y raleos no comerciales, algunas propuestas incluyen el chipeado del material para generación de energía, la construcción de

tableros de partículas o su empleo como material estructurante de pilas de compostaje de residuos orgánicos. Si los desechos no pueden procesarse, es importante evitar las pilas, ya que en estas el material permanece apto para la proliferación de insectos durante más tiempo.

Más allá de las tareas preventivas, este estudio permitió generar las siguientes recomendaciones:

1) La mejor alternativa es cosechar, transportar, aserrar y secar de forma tal que el proceso completo no supere los 3 meses.

2) La mejor estación para efectuar el apeo es el invierno. Esta información se considera compatible con las propuestas que otros autores han realizado sobre la factibilidad de secado natural de madera en la Patagonia (Jovanovski, 1993).

3) Si la cosecha se realiza a gran escala y las trozas deben permanecer acopiadas por un período que superen los 3 meses, una de las opciones más factibles la representa el descortezado mecánico, aumentando la tasa de secado e impidiendo la presencia de escolítidos. Por otro lado la corteza de pino es un sub-producto que puede tener futuras utilidades en parqueizaciones o como sustrato para viveros con fertirriego. El riego por aspersión de las trozas cosechadas puede ser una solución debido a que la baja presión parcial de oxígeno, en trozas saturadas de agua, impide el crecimiento fúngico. De todas formas las playas de acopio deben proveer la recolección y reutilización de efluentes para evitar daños ambientales considerables.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES GENERALES

Taxonomía

Este estudio representa la primera evaluación detallada de las especies de hongos manchadores en la región andino-patagónica de Argentina, en especial de las familias Ophiostomataceae y Microascaceae, sobre bases morfológicas y filogenéticas. Fueron colectadas 588 muestras de los cuales se obtuvieron más de 350 aislamientos. Estos fueron identificados en 28 taxones, 13 fueron coleccionados sobre coníferas exóticas, 14 sobre hospedantes nativos y una especie sobre ambos tipos de hospedante. De los 28 taxones, 18 son conocidos y los 10 restantes constituyen especies nuevas para la ciencia (Tabla 1). De las especies nuevas, 5 incluyeron un número suficiente de colecciones para ser descriptas como nuevas: *Ceratocystis decorticans*, *Leptographium gestamen*, *Ophiostoma patagonicum*, *Ophiostoma peregrinum* y *Sporothrix cabralii*.

Tabla 1. Hongos manchadores presentes en bosques y plantaciones de la Patagonia, Argentina.

Especies	Hospedante	Distribución
<i>Coniochaeta pulveraceae</i>	<i>P. ponderosa</i> , <i>P. radiata</i>	Cosmopolita
<i>Coniochaeta rophalochaeta</i>	<i>P. ponderosa</i>	Cosmopolita
<i>Diplodia pinea</i>	<i>Pinus ponderosa</i>	Cosmopolita
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	<i>Austrocedrus chilensis</i>	Cosmopolita
<i>Endoconidiophora coeruleascens</i> s.l.	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Cosmopolita
<i>Grosmannia. huntii</i>	<i>Pinus ponderosa</i> , <i>P. sylvestris</i>	Cosmopolita
<i>Grosmannia radiaticola</i>	<i>Pinus radiata</i>	Cosmopolita
<i>Huntia decorticans</i> sp. nov.*	<i>Nothofagus</i>	Bosque andino patagónico

<i>Leptographium gestamen</i> sp. nov.*	<i>Nothofagus</i>	Bosque andino patagónico
<i>Ophiostoma grandicarpum</i>	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Argentina, Alemania
<i>Ophiostoma ips</i>	<i>Pinus ponderosa</i> , <i>P. radiata</i>	Cosmopolita
<i>Ophiostoma nothofagi</i>	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Bosque andino patagónico
<i>Ophiostoma novae-zelandiae</i>	<i>Podocarpus</i> , <i>N. dombeyi</i>	Argentina, Nueva Zelanda
<i>Ophiostoma patagonicum</i> sp. nov.*	<i>Nothofagus obliqua</i>	Bosque andino patagónico
<i>Ophiostoma peregrinum</i> sp. nov.	<i>Ps. menziesii</i> , <i>Pinus</i> , <i>Betula</i> , <i>N. dombeyi</i>	Argentina, Noruega
<i>Ophiostoma piliferum</i>	<i>Pinus ponderosa</i> , <i>P. radiata</i>	Cosmopolita
<i>Ophiostoma quercus</i>	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Cosmopolita
<i>Ophiostoma subannulatum</i>	<i>Pinus</i> sp.	Cosmopolita
<i>Ophiostoma valdivianum</i>	<i>Nothofagus pumilio</i>	Bosque andino patagónico
<i>Pilidium concavum</i>	<i>Pinus ponderosa</i> , <i>P. radiata</i>	Cosmopolita
<i>Sclerophoma pityophila</i>	<i>Pinus</i> sp.	Cosmopolita
<i>Sporothrix cabralii</i> sp. nov.	<i>Nothofagus pumilio</i>	Bosque andino patagónico
<i>Graphilbum</i> sp1	<i>Pinus sylvestris</i> , <i>Pinus ponderosa</i>	Plantaciones en Patagonia
<i>Huntiaella</i> sp1	<i>Nothofagus</i>	Bosque andino patagónico
<i>Huntiaella</i> sp2	<i>Nothofagus obliqua</i>	Bosque andino patagónico
<i>Ophiostoma</i> sp2	<i>Tepualia stipularis</i>	Bosque andino patagónico
<i>Ophiostoma</i> sp3	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Bosque andino patagónico
<i>Sporothrix</i> sp1	<i>Nothofagus pumilio</i>	Bosque andino patagónico

(*P.*=*Pinus*, *Ps.*=*Pseudotsuga*. En **negrita** se indican las especies descritas en este estudio. * Especies aisladas, entre otros sustratos, de árboles enfermos.)

Diversidad

Como era previsible, la diversidad no estudiada en la Patagonia es aún considerable. Casi el 40% de los taxones identificados (incluyendo los obtenidos de bosque nativo y plantaciones) produjeron secuencias desconocidas en las bases de datos (GenBank), a pesar que, recordamos, estos hongos son ampliamente estudiados en todo el mundo. Si solo consideramos el bosque nativo, de los 15 taxones colecciones solo 3 han sido reportados fuera del mismo, evidenciando un estimado del 80% de especies propias o endémicas. Las 5 especies descritas residen en 4 géneros diferentes: *Leptographium*, *Ophiostoma*, *Sporothrix* y *Huntiaella*. Dentro de este último, es probable que *Huntiaella decorticans* represente un complejo de especies crípticas asociadas a diferentes especies de *Nothofagus* con diferentes niveles de patogenicidad.

Este trabajo aportó los primeros datos moleculares de *Ophiostoma nothofagi*. Las relaciones filogenéticas de esta especie indican que corresponde a un linaje independiente dentro de la familia Ophiostomataceae junto a *O. grandicarpum*. Ambas presentan una morfología particular y presentan características ecológicas poco usuales dentro del grupo: colonizadores más tardíos, y capacidad de atravesar la corteza del hospedante, lo que refuerza la idea de erigir un género independiente en el futuro.

Patogenicidad de hongos manchadores en el bosque nativo

Las especies de hongos ‘ofiomatoides’ con posible comportamiento patogénico fueron caracterizadas. Las mismas fueron aisladas, entre otros sustratos, de árboles que presentaban síntomas de decaimiento o marchitez. *Huntiaella decorticans* demostró la

capacidad de colonizar árboles sanos. Sus insectos vectores asociados se alimentan de la savia fresca en heridas expuestas recientemente. Esta característica junto a la presencia de un ‘pressure pad’ indicarían que el hongo está adaptado para colonizar árboles vivos, presumiblemente con algún grado de patogenicidad. Las lesiones producidas (cancros) fueron localizadas y no sistémicas como en un marchitamiento vascular típico. La presencia de *H. decorticans* en rodales enfermos, infestados de escarabajos de ambrosía, sumado a la presencia del hongo dentro de sus galerías, plantea la posibilidad de que exista un transporte inespecífico por parte de estos insectos. Esta interacción entre insectos y *H. decorticans*, junto a la de otros organismos oportunistas, pueden contribuir a la mortalidad de ejemplares de *Nothofagus*. Por el contrario, *L. gestamen* y *O. patagonicum* no pudieron colonizar sus respectivos hospedantes (*Nothofagus* spp. y *Schinus patagonicus*), siendo probable que ambas especies sean saprobios oportunistas dispersados por escarabajos de ambrosía.

Ciclo del manchado en las plantaciones de coníferas

Las especies de hongos manchadores de mayor impacto sobre la industria foresto-maderera de la región Norte de la Patagonia, no solo incluyen hongos ‘ofiostomatoides’. En especial, dos especies de la familia Botryosphaeriaceae (*Diplodia pinea* y *Dothiorella sarmentorum*) demostraron la mayor tasa de colonización, si bien su incidencia fue notablemente menor que la correspondiente a los hongos ‘ofiostomatoides’. En relación a estos últimos, *O. peregrinum* y *O. piliferum* resultaron ser los organismos manchadores de mayor frecuencia, siempre asociados a los escarabajos de corteza exóticos presentes en la región (*Hylurgus ligniperda*, y *Orthotomicus laricis*). Los ensayos a campo situados en el área cordillerana de Chubut y Neuquén, permiten establecer ciertas recomendaciones para disminuir la

presencia de la mancha. Como medidas preventivas es necesario realizar podas y raleos dentro del período otoño tardío–primavera temprana. Esto evita la superposición de heridas mecánicas y condiciones de temperatura propicias para que *D. pinea* las infecte. Por otro lado, los residuos de las tareas silviculturales deben disponerse de forma adecuada o reutilizarse para no favorecer la proliferación de escarabajos de corteza. El invierno es la temporada más favorable para realizar la cosecha. Las trozas no registraron manchas de albura antes de los 3 meses, independientemente de la época en la que fueron apeadas. Los árboles cosechados en primavera y en menor medida en otoño, son altamente susceptibles al ataque de hongos ‘ofiostomatoides’, probablemente porque en esta época se produce el vuelo de los adultos. Las cosechas de verano son críticas si el rodal está afectado por *Diplodia*, dado que las altas temperaturas favorecen su crecimiento.

Ophiostoma peregrinum, especie que inicialmente fue reportada en el hemisferio Norte sobre *Betula* sp., mostró en la Patagonia una amplia distribución y frecuencia (inclusive colonizando hospedantes nativos). Si bien no es considerada una especie patogénica, esta especie se comporta como un saprobio agresivo, que junto a su capacidad de asociación poco específica con escarabajos de corteza le confieren un gran potencial de dispersión. Estas características implican que la especie puede tener efecto sobre el ecosistema nativo, desplazando especies que compiten por ese nicho. Estas consideraciones, una vez más, confirman el riesgo involucrado en el transporte de inóculo entre regiones distantes.

REFERENCIAS

- Accordi, S.M., 1986. Diffusione de *Ceratocystis fimbriata* f. *platani* attraverso le anastomosi radicali. *Inftore. Fitopatol.*, 36: 53-58.
- Aghayeva, D.N., Wingfield, M.J., Kirisits, T. y Wingfield, B.D., 2005. *Ophiostoma dentifundum* sp. nov. from oak in Europe, characterized using molecular phylogenetic data and morphology. *Mycological Research*, 109(10): 1127-1136.
- Aguayo Silva, J., Ojeda Alvarado, A., Baldini Urrutia, A., Cerda Martinez, L., Emanuelli Avilés, P., Kirkendall, L.R. y Sartori Ruilova, A., 2008. Manual de plagas y enfermedades del bosque nativo en Chile Manual de Cooperación Técnica. FAO, Santiago de Chile, 228 pp.
- Alfaro, R.I., Leland, M.H., Gonzalez, P., Villaverde, R. y Allegro, G., 2007. The threat of the ambrosia beetle *Megaplatypus mutatus* (Chapuis) (= *Platypus mutatus* Chapuis) to world poplar resources. *Forestry*, 80(4): 471-479.
- Alonso, R., de Errasti, A., Gómez, D., Pérez, C., Pildain, M.B., Bettucci, L. y Rajchenberg, M., 2014. Ophiostomatales asociados a escolítidos en plantaciones de pino en Uruguay, VIII Congreso Latinoamericano de Micología, Cartagena, Colombia.
- Alvarado Ojeda, A.J., 2006. Determinación del estado sanitario de los bosques de Ñirre en la XI región Pontificia Universidad Católica de Chile Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal Departamento de Ciencias Forestales.
- Álvarez, E., Llano, G., Loke, J.B. y Chacon, M.I., 2012. Characterization of *Thielaviopsis paradoxa* isolates from oil palm in Colombia, Ecuador and Brazil. *Journal of Phytopathology*, 160(11-12): 690-700.
- Alves, M.L.B. y Lourd, M., 1985. Podridão negra de frutos de coco causada por *Ceratocystis paradoxa* em Manaus AM. *Fitopatologia Brasileira*, 10: 233.
- Andrieu, S., Biguet, F. y Mauamba, S., 1971. Etude immunologique comparée de *Sporothrix schenckii* et des souches saprophytes voisins. *Sabouraudia* 9: 206-209.
- Appel, D.N., Kurdyla, T. y Lewis Jr., R., 1990. Nitidulids as vectors of the oak wilt fungus and other *Ceratocystis* spp. in Texas. *Forest Pathology*, 20: 412-417.
- Armesto, J., León, P. y Arroyo, M.K., 1995. Los bosques templados del sur de Chile y Argentina: una isla biogeográfica. En: J. Armesto, C. Villagrán and M.K. Arroyo (Editors), *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Universitaria, Santiago, pp. 23-28.
- Bakshi, B.K., 1951. Studies on four species of *Ceratocystis*, with a discussion on fungi causing saprotin in Britain. *Mycological Papers*, 35: 1-16.
- Barbour, M.G., Burk, J.H. y Pitts, W.D., 1980. *Terrestrial Plant Ecology*. Benjamin Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA. .
- Barnes, I., Roux, J., Wingfield, B.D., O'Neill, M. y Wingfield, M.J., 2003. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay. *Australasian Plant Pathology*, 32: 361-366.
- Barron, E.J., Harrison, C.G.A., Sloan, J.L. y Hay, W.W., 1981. Paleogeography, 180 million years ago to the present. *Eclogae Geologicae Helvetiae*, 74: 443-470.
- Beer-Romero, P., Rodríguez-Ochoa, G., Angulo, R., Cabrera, S. y Yarzabal, L., 1989. Sporotrichosis in the Orinoco river basin of Venezuela and Colombia. *Mycopathologia*, 105(1): 19-23.
- Berbee, M.L. y Taylor, J.W., 1992. 18s Ribosomal RNA gene sequence characters place the pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus *Ophiostoma*. *Experimental Mycology*, 16: 87-91.
- Billings, R.F., 1993. Pest risk assesment of the importation of *Pinus radiata*, *Nothofagus dombeyi*, and *Laurellia philippiana* logs from Chile. USDA Forest Service Miscellaneous Publication No. 1517.

- Brasier, C.M., 1991. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics. *Mycopathologia*, 115: 151-161.
- Brookhouser, L.W. y Peterson, G.W., 1971. Infection of Austrian, Scots and Ponderosa pines by *Diplodia pinea*. *Phytopathology*, 6: 439-444.
- Burgess, T., Wingfield, M.J. y Wingfield, B.D., 2001. Simple sequence repeat markers distinguish among morphotypes of *Sphaeropsis sapinea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1): 354-362.
- Butin, H., 1963. Über *Sclerophoma pithyophila* (Corda) v Höhn als Bläuepilz an verarbeitetem Holz. *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology*, 48: 298-305.
- Butin, H., 1968. A new species of *Ceratocystis* causing blue-stain in *Araucaria araucana*. *Canadian Journal of Botany*, 46: 61-63.
- Butin, H., 1969. Studien zur morphologie und biologie von *Mikronegeria fagi*. *Diet. & Neg.* . *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology*, 64: 242-57.
- Butin, H., 1978. A new species of *Ophiostoma* causing blue-stain in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze. *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology*, 91: 230-234.
- Butin, H. y Aquilar, A.M., 1984. Blue-stain fungi on *Nothofagus* from Chile - including two new species of *Ceratocystis* Ellis & Halst. *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology*, 109: 80-89.
- Butin, H. y Peredo, H., 1967. Mancha en madera de especies nativas y sus agentes causales, 'Terceras Jornadas Forestales'. Instituto Forestal Santiago, Santiago, Chile, pp. 77-79.
- Butin, H. y Peredo, H., 1986. Hongos parásitos en coníferas de América del Sur con especial referencia a Chile. *Bibliotheca Mycologica*, 101: 1-100.
- Byrne, T., Woo, K.L., Uzonovic, A. y Watson, P., 2005. An annotated bibliography on the effect of bluestain on wood utilization with emphasis on mountain pine beetle-vectored bluestain. Government of Canada publications.
- Cabrera, A.L., 1971. Fitogeografía de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 14: 1-42.
- Cease, K.R. y Juzwik, J., 2001. Predominant nitidulid species (Coleoptera: Nitidulidae) associated with spring oak wilt mats in Minnesota. *Canadian journal of Forest Research*, 31: 635-43.
- Cobb, F.W., 1988. *Leptographium wagneri*, cause of black-stain root disease: a review of its discovery, occurrence and biology on pynion and ponderosa pine. En: T.C. Harrington and F.W. Cobb (Editors), *Leptographium* root diseases on conifers. APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 149.
- Collins, R. y Morgan, M.E., 1962. Identity of fruit-like aroma substances synthesized by endoconidial-forming fungi. *Phytopathology*, 52: 407-409.
- Conti Díaz, I.A., 1989. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia*, 108(2): 113-6.
- Currie, D. y Toes, E., 1978. Stem volume loss due to severe *Diplodia* infection in a young *Pinus radiata* stand. *New Zealand Journal of Forestry*, 23: 143-148.
- Cwielong, P.P. y Rajchenberg, M., 1995. Wood rotting Fungi on *Nothofagus pumilio* in Patagonia, Argentina. *European Journal of Forest Pathology* 25: 47-60.
- Chapman, A.D. y Scheffer, T.C., 1940. Effect of blue-stain on specific gravity and strength of southern pine. *Journal of Agricultural Research*, 61: 125-133.
- Chou, C.K.S., 1976a. A shoot dieback in *Pinus radiata* caused by *Diplodia pinea*. 1. Syntoms, disease development, and isolation of pathogen. *New Zealand Journal of Forestry Science* (6): 72-79.
- Chou, C.K.S., 1976b. A shoot dieback in *Pinus radiata* caused by *Diplodia pinea*. II. Inoculation studies. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 6: 409-420.

- Chou, C.K.S., 1978. Penetration of young stems of *Pinus radiata* by *Diplodia pinea*. *Physiological Plant Pathology*, 13: 189-192.
- Chou, C.K.S., 1982. *Diplodia pinea* infection of *Pinus radiata* seedlings: effect of temperature and shoot wetness duration. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 12: 425-437.
- Chou, C.K.S. y MacKenzie, M., 1988. Effect of pruning intensity and season on *Diplodia pinea* infection of *Pinus radiata* stem through pruning wounds. *European Journal of Forest Pathology*, 18: 437-444.
- Dalbosco, M., El Tassa, S.O.M. y Duarte, V., 2003. Ocorrência de podridão negra, causada por *Chalara elegans*, em raízes de cenoura no Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira*, 29(3): 336.
- Davidson, R.W., 1976. Sapwood staining fungi from two tree species. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 28(1): 45-49.
- De Beer, W.Z. y Wingfield, M.J., 2013a. Emerging lineages in the Ophiostomatales. En: K.A. Seifert, Z.W. De Beer and M.J. Wingfield (Editors), *The Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, pp. 21-46.
- de Beer, W.Z., Wingfield, M.J. y Kemp, G.H.J., 1995. First report of *Ophiostoma querci* in South Africa. *South African Journal of Science* 91: vi.
- de Beer, Z.W., duong, T.A., Barnes, I., Wingfield, B.D. y Wingfield, M.J., 2014. Redefining *Ceratocystis* and allied genera. *Studies in Mycology*: 1-33.
- De Beer, Z.W., Harrington, T.C., Vismer, H.F., Wingfield, B.D. y Wingfield, M.J., 2003a. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia*, 95(3): 434-441.
- De Beer, Z.W., Seifert, K.A. y Wingfield, M.J., 2013a. A nomenclator for ophiostomatoid genera and species in the Ophiostomatales and Microascales. En: K.A. Seifert, Z.W. De Beer and M.J. Wingfield (Editors), *The Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, pp. 245-322.
- De Beer, Z.W., Seifert, K.A. y Wingfield, M.J., 2013b. The ophiostomatoid fungi: their dual position in the Sordariomycetes. En: K.A. Seifert, W.Z. De Beer and M.J. Wingfield (Editors), *The Ophiostomatoid fungi: Expanding Frontiers*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, pp. 1-19.
- De Beer, Z.W., Wingfield, B.D. y Wingfield, M.J., 2003b. The *Ophiostoma piceae* complex in the Southern Hemisphere: a phylogenetic study. *Mycological Research*, 107(4): 469-476.
- de Beer, Z.W. y Wingfield, M.J., 2013b. Emerging lineages in the Ophiostomatales. En: K.A. Seifert and M.J. Wingfield (Editors), *The Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers*. CBS, Utrech, The Netherlands, pp. In press.
- de Errasti, A., Pildain, M.B. y Rajchenberg, M., 2013. Estudios preliminares de patógenos forestales asociados al problema sanitario southern beech decline en Patagonia, Argentina, XXXII Jornadas Argentinas de Botánica SAB, pp. 117.
- de Hoog, G.S., 1974. The genera *Blastobotrys*, *Sporothrix*, *Calcarisporium* and *Calcarisporiella* gen. nov. *Studies in Mycology*, 7: 1-84.
- De Hoog, G.S. y Scheffer, R.J., 1984. *Ceratocystis* versus *Ophiostoma*: a reappraisal. *Mycologia*, 76(2): 292-299.
- de Meyer, E.M. y De Beer, Z.W., 2008. Taxonomy and phylogeny of new wood-and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia*, 100(4): 647-61.
- de Oliveira, M.M., de Almeida-Paes, R., de Medeiros Muniz, M., de Lima Barros, M.B., Galhardo, M.C. y Zancope-Oliveira, R.M., 2010. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio De Janeiro, Brazil: case report. *Mycopathologia*, 169(5): 359-63.

- de Wet, J., Wingfield, M.J. y Coutinho, T.A., 2000. Characterization of *Sphaeropsis sapinea* isolates from South Africa, Mexico, and Indonesia. *Plant Disease*, 84: 151-156.
- de Wet, J., Wingfield, M.J., Coutinho, T.A. y Wingfield, B.D., 2002. Characterization of the 'C' morphotype of the pine pathogen *Sphaeropsis sapinea*. *Forest Ecology and Management*, 161: 181-188.
- Donoso, C., 1994. Bosques templados de Chile y Argentina. Variación, estructura y dinámica. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Dowding, P., 1969. The dispersal and survival of spores of fungi causing blue stain in pine. *Transactions of the British Mycological Society*, 52: 125-137.
- Encinas, O., 1996. Development and significance of the attack by *Lasiodiplodia theobromae*(Pat.) Griff. & Maub. in Caribbean pine wood and ther wood species. , Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Engelbrecht, C.J. y Harrington, T.C., 2005. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. *Mycologia*, 97(1): 57-69.
- Fajardo, S.N., Figueredo, A., Valenzuela, S. y Sanfuentes, E., 2014. *Phytophthora pseudosyringae* associated to the mortality of *Nothofagus* forests of central-southern Chile, 7th Meeting of IUFRO working party 7.02.09. *Phytophthora in forests and natural ecosystems*, Esquel, Argentina.
- Faulds, W., 1973. Discolouration associated with *Platypus* wounds in living *Nothofagus fusca*. *New Zealand Journal of Forest Science*, 3(3): 331-41.
- Faulds, W., 1977. A pathogenic fungus associated with *Platypus* attack on New Zealand *Nothofagus* species. *New Zealand Journal of Forest Science*, 7(3): 384-396.
- Fernandez Valiela, M., 1979. Introducción a la fitopatología. , 4 Hongos y Mycoplasmas. Colección científica INTA, Argentina.
- Ferreira, E.M., Harrington, T.C., Thorpe, D.J. y Alfenas, A.C., 2010. Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. *Plant Pathology*, 59: 721-735.
- Findlay, W.P.K., 1959. Sapstain of timber. *Forestry*, 20(1 & 2): 1-14.
- Fleet, C., Breuil, C. y Uzonovic, A., 2001. Nutrient consumption and pigmentation of deep and surface colonizing sapstaining fungi in *Pinus contorta*. *Holzforschung*, 55: 340-345.
- Funk, A., 1985. Foliar fungi of western trees. *Canadian Forest Service Victoria*: 159.
- Gamundi de Amos, I., 1975. Fungi, Ascomycetes, Pezizales. *Flora Criptogámica de Tierra del Fuego Tomo X Fasc. 3*. FECIC, Buenos Aires.
- Gamundi de Amos, I., 1986. Fungi, Ascomycetes, Cyttariales, Helotiales in part. . *Flora Criptogámica de Tierra del Fuego Tomo X Fasc. 4*. CONICET, Buenos Aires.
- Gamundi de Amos, I. y Romero, A.I., 1998. Fungi, Ascomycetes, Helotiales: Helotiaceae. *Flora Criptogámica de Tierra del Fuego, Tomo X, Fasc. 5*. CONICET, Buenos Aires, 131 pp.
- Gamundi, I.J. y Amos, V., 2007. Exploraciones micológicas en Tierra del Fuego. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 42(1-2): 131-148.
- Gamundi, I.J. y Lederkremer, R.M., 1989. Los hongos andinopatagónicos del género *Cyttaria*. Sus hidratos de carbono. *Ciencia e Investigación*, 43: 4-13.
- Geldres, J.J., Miranda, H., García, J. y Tincopa, L., 1973. Sporotrichosis: determination of an endemic area in Northern Peru (Otuzco-La Libertad). *Mycopathologia et mycologia applicata*, 51(1): 33-51.
- Gibbs, J.N. y French, D.W., 1980. The transmission of oak wilt. *Research Papers - USDA Forest Service, NC-185* 17.

- Gibson, I.A.S., 1979. Diseases of forest trees widely planted as exotics in the tropics and southern hemisphere. Part II. The genus *Pinus*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 135 pp.
- Giménez, R., 2009. *Megaplatypus mutatus*: Bases para su manejo integrado. Manejo Integrado de Plagas Forestales. INTA, Bariloche, Argentina.
- Glass, N.L. y Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology, 61: 1323-1330.
- Gomez, C., Greslebin, A. y Rajchenberg, M., 2011. Plagas y enfermedades de *Pinus* sp. de la región Andino Patagónica de Argentina. Manual de campo. . Ed. Universidad Nacional de la Patagonia S.J. Bosco, Comodoro Rivadavia, 88 pp.
- Greslebin, A., 2002. Fungi, Basidiomycota, Aphyllophorales: Coniophoraceae, Corticiaceae, Gomphaceae, Hymenochaetaceae, Lachnocladiaceae, Stereaceae, Thelephoraceae. Tulasnellales: Tulasnellaceae. Flora Criptogámica de Tierra del Fuego, Tomo XI, Fasc. 4. CONICET, Buenos Aires.
- Griffin, H.D., 1966. The genus *Ceratocystis* in Ontario. Canadian Journal of Botany(46): 689-718.
- Grobbelaar, J.W., Aghayeva, D.N., De Beer, Z.W., Bloomer, P., Wingfield, M.J. y Wingfield, B.D., 2009. Delimitation of *Ophiostoma quercus* and its synonyms using multiple gene phylogenies. Mycological Progress, 8: 221-236.
- Grobbelaar, J.W., De Beer, Z.W., Bloomer, P., Wingfield, M.J. y Wingfield, B.D., 2010. *Ophiostoma tsotsi* sp. nov., A Wound-infesting Fungus of Hardwood Trees in Africa. Mycopathologia, 169: 413-423.
- Guajardo Becchi, F.G., 2006. Determinación del estado sanitario de los bosques de *Nothofagus pumilio*, en la XI región de Aysén del General Ibañez del Campo Pontificia Universidad Católica de Chile Facultad de Agronomía e ingeniería Forestal Departamento de Ciencias Forestales
- Guerrero, R.T., 1966. Una nueva especie de hongo imperfecto asociado con el coleóptero *Platypus sulcatus* Chapuis. Revista de Investigaciones Agropecuarias. Serie 5, Patología Vegetal, 3: 97-103.
- Guerrero, R.T., 1971. On the real nature of the "setae" in *Tremella fuciformis*. Mycologia, 63: 920-924.
- Guidon, S. y Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematic Biology, 52(5): 696-704.
- Haddow, W.R. y Newman, F.S., 1942. A disease of the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) caused by *Diplodia pinea* Kickx associated with the pine spittlebug (*Aphrophora parallela* Say.). Transactions Royal Canadian Institute, 24: 1-18.
- Hansen, P.V., Bianchinotti, M.V. y Rajchenberg, M., 2007. Anatomy and cytology of *Taphrina entomospora* during infection of *Nothofagus*. Mycological Research, 111(5): 592-8.
- Harrington, T.C., 1981. Cycloheximide sensitivity as a taxonomic character in *Ceratocystis*. Mycologia, 73(6): 1123-1129.
- Harrington, T.C., 1993. Diseases of conifers caused by *Ophiostoma* and *Leptographium*. En: M.J. Wingfield, K.A. Seifert and J.F. Webber (Editors), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*, Taxonomy, Ecology and Pathogenicity. APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 161-172.
- Harrington, T.C., Fraedrich, S.W. y Aghayeva, D.N., 2008. *Raffaelea lauricola*, a new ambrosia beetle symbiont and pathogen on the Lauraceae. Mycotaxon, 104: 399-404.
- Harrington, T.C., McNew, D.L., Steimel, J.P., Hofstra, D. y Farrell, R.L., 2001. Phylogeny and taxonomy of the *Ophiostoma piceae* complex and the dutch elm disease fungi Mycologia, 93(1): 111-136.

- Hausner, G. y Reid, J., 2003. Notes on *Ceratocystis brunnea* and *Ophiostoma* based on partial ribosomal DNA sequence data. *Canadian Journal of Botany*, 81: 865-876.
- Hausner, G., Reid, J. y Klassen, G.R., 1992. Do galeate-ascospore members of the Cephaloascaceae, Endomycetaceae and Ophiostomataceae share a common phylogeny? *Mycologia*, 84: 870-881.
- Hausner, G., Reid, J. y Klassen, G.R., 1993a. On the phylogeny of *Ophiostoma*, *Ceratocystis* s.s., and *Microascus*, and relationships within *Ophiostoma* based on partial ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany*, 71: 1249-1264.
- Hausner, G., Reid, J. y Klassen, G.R., 1993b. On the subdivision of *Ceratocystis* s.l. based on partial ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany*, 71: 59-114.
- Heath, R.N., Wingfield, M.J., Wingfield, B.D., Meke, G., Mbaga, A. y Roux, J., 2009. *Ceratocystis* species on *Acacia mearnsii* and *Eucalyptus* spp. in eastern and southern Africa including six new species. *Fungal Diversity*, 34: 41-68.
- Hedgcock, G.G., 1906. Studies upon some chromogenic fungi which discolor wood. *Missouri Botanical Garden Annual Report*, 17: 59-114.
- Henry, B.W., Moses, C.S., Richards, C.A. y Riker, A.J., 1944. Oak wilt, its significance, symptoms and cause. *Phytopathology*, 34: 636-647.
- Hutchison, L.J. y Reid, J., 1988. Taxonomy of some potential wood-staining fungi from New Zealand 2. Pyrenomycetes, Coelomycetes and Hyphomycetes. *New Zealand Journal of Botany* 26: 83-98.
- Ishizaki, H., Kawasaki, M., Aoki, M., Matsumoto, T., Padhye, A., Mendoza, M. y Negroni, R., 1998. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in North and South America. *Mycopathologia*, 142: 115-118.
- Jacobs, K., Bergdahl, D.R., Wingfield, M.J., Halik, S., Seifert, K.A., Bright, D.E. y Wingfield, B.D., 2004. *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycological Research*, 108: 411-418.
- Jacobs, K. y Wingfield, M.J., 2001. *Leptographium* species, tree pathogens, insect associates and agents of blue-stain. American Phytopathological Society press, St. Paul, Minnesota.
- Jewell, T.R., 1974. A qualitative study of cellulose distribution in *Ceratocystis* and *Europhium*. *Mycologia*, 66: 139-146.
- Johnson, J.A., Harrington, T.C. y Engelbrecht, C.J., 2005. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex. *Mycologia*, 97(5): 1067-1092.
- Jovanovski, A., 1993. Propuesta de un Método de Secado Natural para Lenga (*Nothofagus pumilio*) en Chubut. Seminario de Graduación Thesis, UNPSJB, Esquel, Chubut, 35 pp.
- Juzwik, J., Appel, D.N., MacDonald, W.L. y Susan, B., 2011. Challenges and Successes in Managing Oak Wilt in the United States. *Plant Disease*, 95(8): 888.
- Juzwik, J., Cease, K.R. y Meyer, J.M., 1998. Acquisition of *Ophiostoma quercus* and *Ceratocystis fagacearum* by Nitidulids from *O. quercus*-Colonized Oak Wilt Mats. *Plant Disease*, 82(2): 239-243.
- Kamgan Nkuekam, G., De Beer, Z.W., Wingfield, M.J., Mohammed, C., Carnegie, A., Pegg, G. y Roux, J., 2011. *Ophiostoma* species (Ophiostomatales, Ascomycota), including two new taxa on eucalypts in Australia. *Australian Journal of Botany*, 59: 283-297.
- Kamgan Nkuekam, G., De Beer, Z.W., Wingfield, M.J. y Roux, J., 2012. A diverse assemblage of *Ophiostoma* species, including two new taxa on eucalypt trees in South Africa. *Mycological Progress*, 11: 515-533.
- Kamgan Nkuekam, G., Jacobs, K., De Beer, Z.W., Wingfield, M.J. y Roux, J., 2008. *Ceratocystis* and *Ophiostoma* species, including three new taxa, associated with wounds on native South African trees. *Fungal Diversity*, 29(37-59).

- Katoh, S., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 772-780.
- Kile, G.A., 1993. Plant diseases caused by species of *Ceratocystis* sensu stricto and *Chalara*. En: M.J. Wingfield, K.A. Seifert and J.F. Webber (Editors), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*. Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 173-183.
- Kile, G.A. y Walker, J.M., 1987. *Chalara australis* sp. nov. (Hyphomycetes), a vascular pathogen of *Nothofagus cunninghamii* (Fagaceae) in Australia and its relationship to other *Chalara* species. *Australian Journal of Botany*, 35: 1-32.
- Kirisits, T., Konrad, H., Wingfield, M.J. y Chhetri, D.B., 2013. Ophiostomatoid fungi associated with the Eastern Himalayan spruce bark beetle, *Ips schmutzenhoferi*, in Bhutan and their pathogenicity to *Picea spinulosa* and *Pinus wallichiana*. En: K.A. Seifert, Z.W. De Beer and M.J. Wingfield (Editors), *The Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, pp. 99-112.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. y Stalpers, J.A., 2008. *Dictionary of the Fungi*. CABI Europe - UK.
- Kitzberger, T., Veblen, T.T. y Villalba, R., 1997. Climatic influences on fire regimes along a rain forest-to-xeric woodland gradient in northern Patagonia, Argentina. *Journal of Biogeography*, 24(35-47).
- Kowalski, T. y Butin, H., 1989. Taxonomie bekannter und neuer *Ceratocystis*-Arten an Eiche (*Quercus rubur* L.). *Journal of Phytopathology*, 124: 236-248.
- Krokene, P., Roux, J., Solheim, H. y Wingfield, M.J., 2010. Pathogenicity of *Ceratocystis resinifera* to Norway spruce. *Forest Pathology*, 40: 458-464.
- Krokene, P. y Solheim, H., 1997. Pathogenicity of Four Blue-Stain Fungi Associated with Aggressive and Nonaggressive Bark Beetles. *Phytopathology*, 88: 39-44.
- Lanfranco, D., Ide, S., Ruiz, C., Peredo, H. y Vives, I., 2002. Escarabajos de la corteza presentes en plantaciones de *Pinus radiata* en Chile. *Bosque*, 23(1): 101-109.
- Lanza, E., Ko, K.H. y Palmer, J.K., 1976. Aroma production by cultures of *Ceratocystis moniliformis*. *Journal of Agriculture, Food and Chemistry*, 24: 1247-1250.
- Laughton, F.S., 1937. The effects of soil and climate on growth and vigour of *P. radiata* Don. in South Africa. *South African Journal of Science*, 33: 589-604.
- Lim, Y.W., Kim, J.-J., Chedgy, R., Morris, P.I. y Breuil, C., 2005. Fungal diversity from western redcedar fences and their resistance to β -thujaplicin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87(2): 109-117.
- Lindgren, R.M. y Scheffer, T.C., 1939. Effect of blue stain on the penetration of liquids into air-dry southern pine wood. *American Wood Preservation Association*(35): 325-336.
- Linnakoski, R., 2009. *Ophiostoma denticiliatum* sp. nov. and other *Ophiostoma* species associated with the birch bark beetle in southern Norway. *Persoonia*, 23: 9-5.
- Linnakoski, R., de Beer, C., Rousi, M., Niemelä, P., Pappinen, A. y Wingfield, M.J., 2008. Fungi, including *Ophiostoma karelicum* sp. nov., associated with *Scolytus ratzeburgi* infesting birch in Finland and Russia. *Mycological Research*, 112: 1475-1488.
- Linnakoski, R., De Beer, Z.W., Ahtiainen, J., Sidorov, E., Niemelä, P., Pappinen, A. y Wingfield, M.J., 2010. *Ophiostoma* spp. associated with pine-and spruce-infesting bark beetles in Finland and Russia. *Persoonia*, 25: 72-93.
- Linnakoski, R., De Beer, Z.W., Duong, T.A., Niemelä, P., Pappinen, A. y Wingfield, M.J., 2012. *Grosmannia* and *Leptographium* spp. associated with conifer-infesting bark beetles in Finland and Russia, including *Leptographium taigense* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102(2): 375-399.

- Loguercio, G.A. y Deccechis, F., 2006. Forestaciones en la patagonia andina: potencial y desarrollo alcanzado. *Patagonia Forestal*, 1(Marzo): 4-6.
- López Romero, S., Ochoa Romón, P., Iturrondobeitia Bilbao, J.C. y Goldarazena Lafuente, A., 2007. Los escolítidos de las coníferas del País Vasco. Colección LUR N11. Vitoria-Gasteiz, San Sebastián.
- Madrid, H., Cano, J., Gené, J., Bonifaz, A., Toriello, C. y Guarro, J., 2009. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(3): 218-222.
- Madrid, H., Gené, J., Cano, J., Silvera, C. y Guarro, J., 2010. *Sporothrix brunneoviolacea* and *Sporothrix dimorphospora*, two new members of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia*, 102(5): 1193-1203.
- Malloch, D. y Blackwell, M., 1993. Dispersal Biology of the Ophiostomatoid fungi. En: M.J. Wingfield, K.A. Seifert and J.F. Webber (Editors), *The Ophiostomatoid Fungi*. APS, Minnesota, pp. 293.
- Marimon, R., Cano, J., Gené, J., Sutton, D.A., Kawasaki, M. y Guarro, J., 2007. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, Three New *Sporothrix* Species of Clinical Interest *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10): 3198-206.
- Marimon, R., Gené, J., Cano, J., Trilles, M., Dos Santos, L. y Guarro, J., 2006. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 3251-3256.
- Masuya, H., Yamaoka, Y. y Wingfield, M.J., 2013. Ophiostomatoid fungi and their associations with bark beetles in Japan. En: K.A. Seifert, Z.W. De Beer and M.J. Wingfield (Editors), *The Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, pp. 77-90.
- Mathiesen-Käärik, A., 1960. Studies on the ecology, taxonomy and physiology of Swedish insect-associated blue stain fungi, especially the genus *Ceratocystis*. *Oikos*, 11: 1-25.
- Mattes Fernández, H., Fontana, V., Álvarez Mansilla, H. y Soto, G., 2010. Primera cita de *Sphaeropsis sapinea* en *Pinus ponderosa* en Neuquén, Argentina. *Quebracho*, 18: 120-125.
- Mausel, D.L., Gara, R.I., Lanfranco, D., Ruiz, C., Ide, S. y Azat, R., 2007. The introduced bark beetles *Hylurgus ligniperda* and *Hylastes ater* (Coleoptera:Scolytidae) in Chile: seasonal flight and effect of *Pinus radiata* log placement on colonization. *Canadian journal of Forest Research*, 37: 156-169.
- McNeill, J. et al., 2012. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). *Regnum Vegetabile* 154. Koeltz Scientific Books.
- Mendes, M.A.S. et al., 1998. *Fungos em Plantas no Brasil*, Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília.
- Minter, D., Kirk, P. y Sutton, B., 1983. Thallic phialides. *Transactions of the British Mycological Society*, 80(1): 39-66.
- Minter, D.W., Cannon, P.F., Romero, A.I. y Peredo, H., 1998. A new member of the Rhytismatales from southern South America. *Systema Ascomycetum*, 16(1-2): 27-37.
- Morris, M.J., Wingfield, M.J. y de Beer, C., 1993. Gummosis and wilt of *Acacia mearnsii* in South Africa caused by *Ceratocystis fimbriata*. *Plant Pathology*, 42: 814-817.
- Munsell, A.H., 1912. A Pigment Color System and Notation. *The American Journal of Psychology*, 22(2): 236-244.
- Naumann-Etienne, K., 1978. Morphological, zoogeographical and biological aspects of the scolytidae from *Nothofagus dombeyi* in Argentina *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 13(1): 51-62.

- O'Donnell, K. y Cigelnik, E., 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7: 1103-1116.
- Olchowecki, A. y Reid, J., 1974. Taxonomy of the genus *Ceratocystis* in Manitoba. *Canadian Journal of Botany*, 52: 1675-1727.
- Osorio, M., 1985. *Ceratocystis pilifera*, hongo causante de mancha azul en madera de *Pinus radiata*. *Bosque*, 6(2): 116-119.
- Palmer, M.A., Stewart, E.L. y Wingfield, M.J., 1987. Variation among isolates of *Sphaeropsis sapinea* in the north central United States. *Phytopathology*, 77: 944-948.
- Panconesi, A., 1999. Canker stain of plane trees: a serious danger to urban plantings in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 81: 3-15.
- Paritsis, J. y Veblen, T.T., 2011. Dendroecological analysis of defoliator outbreaks on *Nothofagus pumilio* and their relation to climate variability in the Patagonian Andes. *Global Change Biology*, 17: 239-253.
- Parra, P., 1996. Estudio de los antecedentes biológicos y patrones de ataque en *Pinus radiata* D. Don de *Hylurgus ligniperda* (F.) (Coleoptera:Scolytidae) en la zona de Concepción, VIII Región, Universidad de Concepción, Concepción.
- Peredo, H. y Alonso, O., 1988. Mycoflora of *Pinus radiata* pulpwood and outdoor storing in central Chile. *Material und Organismen*, 23: 11-19.
- Peterson, G.W., 1977. Infection, epidemiology and control of *Diplodia* blight of Austrian, Ponderosa and Scots pines. *Phytopathology*, 67: 511-514.
- Pfenning, L. y Oberwinkler, F., 1993. *Ophiostoma bragantinum* n. sp., a possible teleomorph of *Sporothrix inflata*, found in Brazil. *Mycotaxon*, 46(381-385).
- Pinho, D.B., Dutra, D.C. y Pereira, O.L., 2013. Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 38(2): 152-157.
- Piontelli, E., Palma, M.A. y Torelli, L., 2006. *Ectinogonia buquetti* Spinola (COLEOPTERA) vector de *Ophiostoma stenoceras* (Robak) Melin & Nannf. en bosques de *Eucalyptus* de la V Región. *Boletín Micológico*, 21: 63-70.
- Posada, D. y Crandall, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14(9): 817-8.
- Punithalingam, E. y Waterston, J.M., 1970. *Diplodia pinea*. *Commonwealth Mycological Institute Descriptive Pathogenic Fungi Bact.*, 273: 2.
- Rajchenberg, M., 2006. Polypores (Basidiomycetes) from the Patagonian Andes forests of Argentina. *Bibliotheca mycologica Band 201 J. Cramer Verlag, Stuttgart, Germany*.
- Réblová, M., Gams, W. y Seifert, K.A., 2011. *Monilochaetes* and allied genera of the Glomerellales, and a reconsideration of families in the Microascales. *Studies in Mycology*, 68: 163-191.
- Rodas, C.A., Roux, J., van Wyk, M., Wingfield, B.D. y Wingfield, M.J., 2008. *Ceratocystis neglecta* sp. nov., infecting *Eucalyptus* trees in Colombia. *Fungal Diversity*, 28: 73-84.
- Rodríguez, C.M. et al., 2013. Esporotricosis cutánea linfangítica por mordedura de murciélago vampiro (*Desmodus rotundus*). *Dermatología Revista Mexicana*, 57: 468-472.
- Roux, J., van Wyk, M., Hatting, H. y Wingfield, M.J., 2004. *Ceratocystis* species infecting stem wounds on *Eucalyptus grandis* in South Africa. *Plant Pathology*, 53: 414-421.
- Roux, J. y Wingfield, M.J., 2009. *Ceratocystis* species: emerging pathogens of non-native plantation *Eucalyptus* and *Acacia* species. *Southern Forests*, 71(2): 115-120.
- Ruiz, C. y Lanfranco, D., 2008. Los escarabajos de corteza en Chile: una revisión de la situación actual e implicancias en el comercio internacional. *Bosque*, 29(2): 109-114.

- Samuels, G.J. y Müller, E., 1978. Life-History studie of Brazilian Ascomycetes 5: two new species of *Ophiostoma* and their *Sporothrix* anamorphs. *Sydowia*, 31: 169-179.
- Sánchez, R.M., 2011. Estudio sistemático de micromicetes de la región andino-patagónica, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina, PhD Thesis, p 238.
- Schedl, K.E., 1975. Fauna Argentinensis VII Der Nahuel Huapi National Park. *Studies on Neotropical Fauna*, 10(1): 1-18.
- Seifert, K.A., 1993. Sapstain of commercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. En: M.J. Wingfield, K.A. Seifert and J.F. Webber (Editors), *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology and Parthogenicity*. APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 141-152.
- Seifert, K.A., De Beer, W.Z. y Wingfield, M.J., 2013. The Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers. CBS Biodiversity Series 12. CBS-KNAW Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, 322 pp.
- Sinclair, W.A. y Lyon, H.H., 2005. *Disease of trees and shrubs*. Cornell University Press, Ithaca.
- Six, D.L. y Wingfield, M.J., 2011. The role of phytopathogenicity in bark beetle-fungus symbioses: a challenge to the classic paradigm. *Annual Review of Entomology*, 56: 255-272.
- Solheim, H., 1988. Pathogenicity of some *Ips typographus*-associated blue-stain fungi to Norway spruce. *Meddelelser fra Norsk Institutt for Skogforskning*, 40: 1-11.
- Spatafora, J.W. y Blackwell, M., 1994. The polyphyletic origins of Ophiostomatoid fungi. *Mycological Research*, 98: 1-9.
- Spencer, J.F.T. y Gorin, P.A.J., 1971. Systematics of the genera *Ceratocystis* and *Graphium*. Proton magnetic resonance spectra of the mannose-containing polysaccharides as an aid in classification. *Mycologia*, 63: 387-402.
- Suarez, M.L., Ghermandi, L. y Kitzberger, T., 2004. Factors predisposing episodic drought-induced tree mortality in *Nothofagus* - site, climatic sensitivity and growth trends. *Journal of Ecology*, 92: 954-966.
- Swart, W.J., Knox-Davies, P.S. y Wingfield, M.J., 1985. *Sphaeropsis sapinea*, with special reference to its occurrence on *Pinus* spp. in South Africa Suid-Afrikaanse Bosboutydskrif: 1-8.
- Swart, W.J. y Wingfield, M.J., 1991. Biology and Control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. *Plant Disease*, 75(8): 761-766.
- Sydow, H. y Sydow, P., 1919. Mykologische Mitteilungen. *Annales Mycologici*, 17: 33-47.
- Tamura, K., Peterson, D., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S., 2011. Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tarigan, M., Roux, J., van Wyk, M., Tjahjono, B. y Wingfield, M.J., 2011. A new wilt and die-back disease of *Acacia mangium* associated with *Ceratocystis manginecans* and *C. acaciivora* sp. nov. in Indonesia. *South African Journal of Botany*, 77: 292-304.
- Tarigan, M., van Wyk, M., Roux, J., Tjahjono, B. y Wingfield, M.J., 2010. Three new *Ceratocystis* spp. in the *Ceratocystis moniliformis* complex from wounds on *Acacia mangium* and *A. crassicarpa*. *Mycoscience*, 51: 53-67.
- Thwaites, J.M. et al., 2005. Survey of potential sapstain fungi on *Pinus radiata* in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, 43: 653-663.
- Thwaites, J.M., Read, J., Schirp, A., Grinter, W. y Farrell, R.L., 2013. Ophiostomatoid fungi and blue-stain in New Zealand. En: K.A. Seifert, Z.W. De Beer and M.J. Wingfield (Editors), *The Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, pp. 113-118.
- Tiranti, S., 2010. Observaciones sobre los escolítidos de los pinos en la Patagonia andina, con el primer registro del género *Orthotomicus* para la Argentina. *Boletín de Sanidad vegetal*. *Plagas*, 36: 87-90.

- Travassos, L.R. y Lloyd, K.O., 1980. *Sporothrix schenckii* and related species of *Ceratocystis*. Microbiological Reviews, 44(4): 683-721.
- Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G.M., Guerrero, J.C., Guevara, J. y Gubler, W.D., 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. Plant Disease, 92(4): 519-529.
- van Wyk, M. et al., 2007. *Ceratocystis manginecans* sp. nov., causal agent of a destructive mango wilt disease in Oman and Pakistan. Fungal Diversity, 27: 213-230.
- van Wyk, M., Roux, J., Barnes, I., Wingfield, B.D., Chhetri, D.B., Kirisits, T. y Wingfield, M.J., 2004. *Ceratocystis bhutanensis* sp. nov., associated with the bark beetle *Ips schmutzenhoferi* on *Picea spinulosa* in Bhutan. Studies in Mycology, 50: 365-379.
- van Wyk, M., Roux, J., Kamgan Nkuekam, G., Wingfield, B.D. y Wingfield, B.D., 2012. *Ceratocystis eucalypticola* sp. nov. from *Eucalyptus* in South Africa and comparison to global isolates from this tree. IMA Fungus, 3(1): 45-58.
- van Wyk, M., Wingfield, B.D., Al Adawi, A.O., Rossetto, C.J., Fumiko Ito, M. y Wingfield, M.J., 2011a. Two new *Ceratocystis* species associated with mango disease in Brazil. Mycotaxon, 117: 381-404.
- van Wyk, M., Wingfield, B.D., Marin, M. y Wingfield, M.J., 2010. New *Ceratocystis* species infecting coffee, cacao, citrus and native trees in Colombia. Fungal Diversity, 40: 103-117.
- van Wyk, M., Wingfield, B.D., Mohali, S. y Wingfield, M.J., 2009. *Ceratocystis fimbriatomima*, a new species in the *C. fimbriata* sensu lato complex isolated from *Eucalyptus* trees in Venezuela. Fungal Diversity, 34(175-185).
- van Wyk, M., Wingfield, B.D. y Wingfield, M.J., 2011b. Four new *Ceratocystis* spp. associated with wounds on *Eucalyptus*, *Schizolobium* and *Terminalia* trees in Ecuador. Fungal Diversity, 46: 111-113.
- Vanneste, J.L., Hill, R.A., Kay, S.J., Farrell, R.L. y Holland, P.T., 2002. Biological control of sapstain fungi with natural products and biological control agents: a review of the work carried out in New Zealand. Mycological Research, 106(2): 228-232.
- Veblen, T.T., Donoso, C., Kitzberger, T. y Robertus, A.J., 1996. Ecology of Southern Chilean and Argentinean *Nothofagus* forests. En: T.T. Veblen, R.S. Hill and J. Read (Editors), Ecology and Biogeography of *Nothofagus* forests. Yale University Press, Michigan, pp. 293-353.
- Vilgalys, R., 2013.
- Villalba, R. et al., 2003. Large-scale temperature changes across the southern Andes: 20th-century variations in the context of the past 400 years. Climatic Change, 59: 177-232.
- Wang, C.-G., Blanchette, R.A., Jackson, W.A. y Palmer, M.A., 1985. Differences in conidial morphology among isolates of *Sphaeropsis sapinea*. Plant Disease, 69: 838-841.
- Warwick, D.R.N. y Passos, E.E.M., 2009. Outbreak of stem bleeding in coconuts caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Sergipe, Brazil. Tropical Plant Pathology, 34(3): 175-177.
- Waterman, A.M., 1943. *Diplodia pinea* and *Sphaeropsis malorum* on soft pines. Phytopathology, 33: 828-831.
- Weijman, A.C.M. y De Hoog, G.S., 1975. On the subdivision of the genus *Ceratocystis*. Antonie van Leeuwenhoek, 41: 353-360.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (Editors), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press Inc., New York, pp. 315-324.
- Wingfield, B.D., van Wyk, M., Roos, H. y Wingfield, M.J., 2013a. *Ceratocystis*: emerging evidence for discrete generic boundaries. En: K.A. Seifert, W.Z. De Beer and M.J. Wingfield (Editors),

- The Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, pp. 57-64.
- Wingfield, M.J., Roux, J., Wingfield, B.D. y Slippers, B., 2013b. *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: international spread, new associations and plant health En: K.A. Seifert, W.Z. De Beer and M.J. Wingfield (Editors), The ophiostomatoid fungi: Expanding Frontiers. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.
- Wingfield, M.J., Seifert, K.A. y Webber, J.F., 1993. *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota.
- Zhou, X. et al., 2007. High intercontinental migration rates and population admixture in the sapstain fungus *Ophiostoma ips*. *Molecular Ecology*, 16: 89-99.
- Zhou, X., De Beer, Z.W., Ahumada, R., Wingfield, B.D. y Wingfield, M.J., 2004. *Ophiostoma* and *Ceratocystiopsis* spp., associated with two pine-infesting bark beetles in Chile. *Fungal Diversity*, 15: 261-274.
- Zhou, X., De Beer, Z.W. y Wingfield, M.J., 2006. DNA sequence comparisons of *Ophiostoma* spp., including *Ophiostoma aurorae* sp. nov., associated with pine bark beetles in South Africa. *Studies in Mycology*, 55: 269-277.
- Zhou, X., De Beer, Z.W. y Wingfield, M.J., 2013. Ophiostomatoid fungi associated with conifer-infesting bark beetles in China. En: K.A. Seifert, Z.W. De Beer and M.J. Wingfield (Editors), The Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, pp. 93-100.
- Zipfel, R.D., De Beer, Z.W., Jacobs, K., Wingfield, B.D. y Wingfield, M.J., 2006. Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma*. *Studies in Mycology*, 55: 75-97.
- Zwolinski, J.B., Swart, W.J. y Wingfield, M.J., 1990. Economic impact of a post-hail outbreak of dieback induced by *Sphaeropsis sapinea*. *European Journal of Forest Pathology*, 20: 405-411.

ANEXO I

A- Clave taxonómica de hongos manchadores de la región andino patagónica de Argentina en base a sus fases asexuales

1 Conidioma tipo picnidio o acérvulo.....	2
1' Conidioma tipo sinema o ausente	5
2 Conidios pequeños, sin superar los 15 µm de largo.....	3
2' Conidios grandes, superando los 15 µm de largo.....	4
3 Conidios ovoides.....	<i>Sclerophoma pityophila</i>
3' Conidios alantoides.....	<i>Pilidium concavum</i>
4 Conidios lisos, melanizándose antes de abandonar el picnidio, rara vez septados.....	<i>Diplodia pinea</i>
4' Conidios levemente rugosos, madurando antes de abandonar el picnidio, inclusive antes de desprenderse de la célula conidiógena, 1-septados.....	<i>Dothiorella sarmentorum</i>
5 Estado asexual con conidiogénesis por 'ring wall building'.....	6
5' Estado asexual con conidiogénesis diferente.....	7
6 Sobre <i>Nothofagus</i>	complejo <i>Huntiaella decorticans</i>
6' Sobre <i>Pseudotsuga menziesii</i>	complejo <i>Endoconidiophoracoerulescens</i>
7 Estado asexual con sinema	8
7' Estado asexual sin sinema	11

8 Estado asexual tipo- <i>Sporothrix</i> también presente.....	9
8' Estado asexual tipo- <i>Sporothrix</i> ausente, sobre pino.....	<i>Graphilbum</i> sp1
9 Cultivos claros, melanizándose luego de 2 semanas.....	10
9' Cultivo oscuro, melanizándose rápidamente, usualmente sobre pino.....	
.....	<i>Ophiostoma peregrinum</i>
10 Sin micelio aéreo, cultivo blanco, produciendo el estado sexual fácilmente en cultivo.....	
.....	<i>Ophiostoma patagonicum</i>
10' Con micelio aéreo, cultivo hialino, ausencia del estado sexual en cultivo.....	
.....	<i>Ophiostoma quercus</i>
11 Conidióforo conspicuo.....	12
11' Conidióforo inconspicuo.....	15
12 Estado asexual tipo- <i>Hyalorhinocladiella</i>	<i>Ophiostoma ips</i>
12' Estado asexual tipo- <i>Leptographium</i>	13
13 Asociado a galerías de escarabajos ambrosiales en especies de <i>Nothofagus</i> , conidióforo siempre solitario.....	<i>Leptographium gestamen</i>
13' Asociado a galerías de escarabajos de corteza en especies de pino, conidióforos a veces agrupados laxamente.....	14
14 Cultivo oscuro, presencia de hifas en espiral.....	<i>Grosmannia radiaticola</i>
14' Cultivo de tono amarillo claro, ausencia de hifas en espiral,.....	<i>Grosmannia huntii</i>
15 Estado asexual tipo- <i>Sporothrix</i>	16

15' Estado asexual tipo- <i>Phialophora</i>	23
16 Sobre <i>Pinus</i>	17
16' Sobre <i>Nothofagus</i> o <i>Tepualia</i>	18
17 Cultivos melanizándose rápidamente, abundante micelio aéreo formando cordones hifales con conidióforos perpendiculares a los mismos, esporas obovoides.....	
..... <i>Ophiostoma piliferum</i>	
17' Cultivos hialinos, levaduriformes, sin micelio aéreo, esporas globosas.....	
..... <i>Ophiostoma subannulatum</i>	
18 Esporas alantoides.....	complejo <i>Ophiostoma nothofagi</i>
18' Esporas obovoides.....	19
19 Cultivo de tonos claros, con o sin micelio aéreo, sin fase sexual.....	20
19' Cultivo de tonos oscuros, melanizándose rápidamente, abundante micelio aéreo, producción de la fase sexual frecuente.....	22
20 Abundante micelio aéreo, conidióforo superando los 70 μm de longitud.....	
..... <i>Sporothrix cabralii</i>	
20' Sin micelio aéreo, conidióforo sin superar los 70 μm de longitud.....	21
21 Conidióforo ramificado.....	<i>Ophiostoma valdivianum</i>
21' Conidióforo simple.....	<i>Sporothrix</i> sp1
22 Sobre <i>Tepualia stipularis</i>	<i>Ophiostoma</i> sp2
22' Sobre <i>N. obliqua</i>	<i>Ophiostoma</i> sp3

22'' Sobre *N. dombeyi*.....*Ophiostoma novae-zelandiae*

23 Cultivo de tonos amarillos, células conidiógenas dispersas.....
.....*Coniochaeta rophalochaeta*

23' Cultivo de tonos rosados, células conidiógenas agrupadas.....
.....*Coniochaeta pulveraceae*

B- Clave taxonómica de hongos manchadores de la región andino patagónica de Argentina basada en las fases sexuales

- 1 Ascoma peritecial sin cuello evidente, sin exudar gotas de esporas pegajosas en el ápice, ascos no evanescentes, ascosporas oscuras con surco germinativo2
- 1' Ascoma peritecial de cuello evidente, exudando gotas de esporas pegajosas en el ápice, ascos evanescentes, ascosporas hialinas sin surco germinativo.....3
- 2 Ascoma ornamentado con hifas rectas *Coniochaeta pulveraceae*
- 2' Ascoma ornamentado con hifas cuyo ápice termina en forma de clava.....
.....*Coniochaeta rophalochaeta*
- 3 Ascospora con vaina mucilaginosa.....4
- 3' Ascospora sin vaina mucilaginosa.....8
- 4 Ascospora en forma de sombrero.....5
- 4' Ascospora elipsoidal o cilíndrica.....6
- 5 Sobre *Nothofagus*, cuello con hifas ostiolares.....complejo *Huntella decorticans*
- 5' Sobre *Pinus*, ascoma sin hifas ostiolares.....*G. huntii/G. radiaticola*
- 6 Ascospora elipsoidal, de gran tamaño (6-10 x 2-3 μm), ostiolo con ornamentaciones, sobre *Pseudotsuga menziesii*.....complejo *Endoconidiophora coerulescens*
- 6' Ascospora cilíndrica (oblonga), de tamaño pequeño o mediano (3-5 x 1-2,5 μm),
Ostiolo sin ornamentaciones.....7

7 Ascospora de ápices redondeados, de pequeño tamaño (4-2 x 1,5-2 µm), cuello del ascoma con engrosamientos por debajo del ostíolo.....	<i>Ophiostoma subannulatum</i>
7' Ascospora de ápices rectos, cuya vaina le confiere aspecto de 'almohada' típico, de tamaño medio (4-5 x 2-3 µm), cuello del ascoma recto.....	<i>Ophiostoma ips</i>
8 Ascospora en forma de cuarto creciente, 2-3 x 1 µm.....	9
8' Ascospora en forma de gajo de naranja, 3-5 x 1-1,5 µm.....	10
8 Ascoma atravesando la corteza, vientre rugoso.....	<i>Ophiostoma nothofagi</i>
8' Ascoma sin atravesar la corteza, vientre liso.....	<i>Ophiostoma grandicarpum</i>
9 Ascoma de cuello corto, apariencia robusta.....	<i>Ophiostoma valdivianum</i>
9' Ascoma de cuello largo, apariencia estilizada.....	10
10 Sobre <i>Pinus</i> , sin engrosamientos en el cuello.....	<i>Ophiostoma piliferum</i>
10' Sobre <i>Nothofagus</i> , con 0-5 engrosamientos en el cuello.....	11
11 Sobre <i>Nothofagus obliqua</i> , de 3-5 engrosamientos en el cuello del ascoma.....	<i>Ohiostoma nova-zelandiae</i>
11' Sobre <i>Tepualia stipularis</i> , engrosamientos a lo largo del cuello poco frecuentes.....	<i>Ophiostoma</i> sp2
11'' Sobre <i>Nothofagus dombeyi</i> , engrosamientos a lo largo del cuello poco frecuentes.....	<i>Ophiostoma</i> sp3

ANEXO II

A- Autorizaciones para el muestreo dentro de la Administración de Parques Nacionales, desde el año 2009 al 2014.

**AUTORIZACIÓN PARA REALIZAR INVESTIGACIÓN
EN JURISDICCIÓN DE LA
ADMINISTRACIÓN DE PARQUES NACIONALES**



Nº: 1012

Se autoriza a

Nombre: **DE ERRASTI, Andrés; RAJCHENBERG, Mario y Alina GRESSEBIN.**

Institución: Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico

Correo electrónico: alerrasti@ciefap.org.ar

Dirección y Teléfono: Ruta 259 Km 4, Esquel, Chubut. Tel y Fax 0245 – 453948.

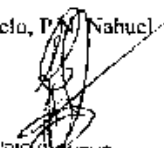
a realizar, bajo las condiciones establecidas en el presente documento, exclusivamente las siguientes actividades:

- Recolección de hasta un máximo de cinco muestras de madera muerta/especie de árboles de los géneros que se citan a continuación: *Nothofagus*, *Austrocedrus* y *Fitzroya*. Las muestras serán cubos de 5 cm de lado en el caso de árboles caídos o apeados y en el caso de ramas muertas con diámetros entre 5 y 10 cm, se cortarán 10 cm de longitud.
- Colectar hasta un máximo de 5 ejemplares de insectos de las clase coleóptera, lepidóptera y díptera que se encuentren presentes en restos de madera muerta asociada con hongos.
- Dos muestreos en otoño y dos en primavera en los siguientes sitios:
En la zona incendiada en la entrada del Parque Los Alerces, Zona del Río Cisne y Puerto Chucan en Lago Menéndez
Zona de la desembocadura del Río Turbio.
Isla Victoria
Zona de Ea. Quechuquina y Nonthue.

en el marco del proyecto : "Manchas azules y otras asociadas a coníferas exóticas y especies nativas de los Andes Patagónicos"

Lugar de desarrollo de las actividades del Proyecto: P.N. Los Alerces, P.N. Lago Puelo, P.N. Nahuel Huapi y P.N. Lanín.

Durante el período: agosto 2009 - 2010


Lic. CLAUDIO ECHEBERA
Director a/c.
Delegación Regional
Patagónica

SAN CARLOS DE BARTOLOME,

18 AGO 2009

fe

LEA ATENTAMENTE AL DORSO LAS CONDICIONES GENERALES

**AUTORIZACIÓN PARA REALIZAR INVESTIGACIÓN
EN JURISDICCIÓN DE LA
ADMINISTRACIÓN DE PARQUES NACIONALES**



Proyecto N°: 993

Se autoriza a:

Nombre: RAJCHENBERG, Mario; GRESLEBIN, Alina; DE ERRASTI, Andrés; SILVA, Valeria y Sergio PÉREZ GORJÓN.

Institución: Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP)

Correo electrónico: mrajchenberg@ciefap.org.ar

Dirección y Teléfono: Ruta 259, km 4. Esquel Chubut. Tel: 02945-453948 Fax: 02945-n 453948. Argentina

a realizar, bajo las condiciones establecidas en el presente documento, las siguientes actividades:

- Colectar muestras de hojas de *Gevulna avellana*, *Lomatia hirsuta*, *Lomatia ferruginea* y *Embothrium coccineum* que presenten síntomas de enfermedades producidas por hongos.
- Recolectar hasta un máximo de 10 ejemplares por especie de hongos degradadores de la madera en material vivo y en pic (ramas y troncos) de *Nothofagus dombeyi*, separando las fructificaciones con un cuchillo.
- Tomar muestras de patógenos de ramas y hojas que tengan patógenos asociados a ellas.

Nota 1: Los ejemplares colectados serán depositados en el Herbario Fitopatológico y en la colección de cultivos del CIEFAP y eventualmente los duplicados en otros herbarios nacionales.

NOTA 2: las muestras deberán extraerse en sitios tales que no sean visibles desde circuitos, áreas o senderos de uso público.

en el marco del proyecto: "Hongos degradadores y patógenos en bosques de *Nothofagus dombeyi* (coihue)".

Lugar de desarrollo de las actividades del Proyecto: Parque Nacional Los Alerces, Parque Nacional Lanín, Parque Nacional Puelo, Parque Nacional Nahuel Huapi.

durante el período: Marzo 2010 – Marzo 2011

SAN CARLOS DE BARILOCHE, 15 FEB 2010

PC


Mr. CLAUDIO E. FERNÁNDEZ
Director General
Delegación Regional
Patagonia

LEA ATENTAMENTE AL DORSO LAS CONDICIONES GENERALES

**AUTORIZACIÓN PARA REALIZAR INVESTIGACIÓN
EN JURISDICCIÓN DE LA
ADMINISTRACIÓN DE PARQUES NACIONALES**



Proyecto N°: 667

Se autoriza a

Nombre: BIANCHINOTTI, María; RAJCHENBERG, Mario; SÁNCHEZ, Romina.

Institución: Universidad Nacional del Sur (Dto. de Biología); CONICET; CIEFAP.

Correo electrónico: vbianchi@uns.edu.ar

Dirección y Teléfono: San Juan 670 - 8000 Bahía Blanca.

a realizar, bajo las condiciones establecidas en el presente documento, las siguientes actividades:

- **Colección de muestras de hojas, tallos y trozos de corteza de plantas leñosas que presenten síntomas de enfermedades producidas por hongos.**

en el marco del proyecto: "Estudios sistemático-descriptivos de Coelomycetes de la región andinopatagónica"

Lugar de desarrollo de las actividades del Proyecto: Parque Nacional Lanín, Parque Nacional Nahuel Huapi, Parque Nacional Lago Puelo y Parque Nacional Los Alerces.

durante el periodo: **Marzo 2011- Marzo 2012.**

SAN CARLOS DE BARILOCHE, 11 FEB 2011

PC



Jc. GERARDO E. CHEBAR
Director a/c.
Delegación Regional
Patagonia

ADMINISTRACION DE PARQUES NACIONALES

Ley 22.351



FORMULARIO III

Autorización de Investigación

Proyecto Número 1287

La Administración de Parques Nacionales autoriza a los investigadores **RAJCHENBERG, Mario y Andrés DE ERRASTI**.

Institución *Centro Forestal CIEFAP*

Correo electrónico *mrajchenberg@ciefap.org.ar*

Dirección y teléfono *Ruta 259 Km 4,9200 Esquelk. Chubut. Tel y Fax : 02945-453948*

a realizar, bajo las condiciones establecidas en el presente documento, las siguientes actividades

Colecta de un máximo de 30 fragmentos de 10 x 10cm aproximadamente de madera de troncos caídos y raíces, ramas de árboles caídos.

Recolección de hongos asociados con madera, ramas, hojas y raíces de árboles vivos o sus tejidos muertos/caídos. Secado y herborización.

Colecta eventual de insectos (Coleoptera, Scolytidae, Nitidulidae) en un máximo de 5 sitios por parque, asociados con las manchas en la madera para verificar su rol de vectores de los hongos, sólo cuando sus galerías están asociadas a machas.

En el marco del Proyecto *Manchas azules y otras asociadas a coníferas exóticas y especies nativas de los Andes Patagónicos. Etiología*

Depósito de material *Herbario Fitopatológico CIEFAP (BAFFC)*

En las siguientes unidades de conservación de jurisdicción de la Administración de Parques Nacionales *Parque Nacional Los Alerces, Parque Nacional Lago Puelo, Parque Nacional Nahuel Huapi, Parque Nacional Lanín.*

Durante el período comprendido entre *Abril 2013 - Abril 2014*

FC

Fecha:

11 de mayo de 2013

Firma:

J.C. CLAUDIO E. CHICHÉBAR
Director s/c.
Delegación Regional
Patagonia

B- Autorización para el ensayo de patogenicidad a campo dentro de la provincia del Chubut.



MINISTERIO DE AGRICULTURA
GANADERIA, BOSQUES Y PESCA

Esquel (Ch), 16 de Noviembre de 2012.
NOTA N° 2201/12-P-SSB

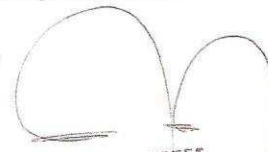
Al Director
Dr. en Ciencias Forestales
LENCINAS, José Daniel
Centro de Investigación y Extensión
Forestal Andino Patagónico (CIEFAP)
Esquel Chubut
S D

Ref. Nota N° 192/12 s/Ensayos de
patogenicidad del hongo
Ceratomyces sp. en zona El Coihue.

De mi consideración:

Por disposición del Sr Pablo Delgado Subsecretario de Bosques elevo a Usted documentación de referencia comunicando no existir objeción para autorizar el estudio. Solicitando informar a la Delegación Forestal de Epuén y al Municipio al momento de iniciar las actividades en terreno (aclaración realizada, por el Dpto de Parques y Reservas Sr. Roveta Rodrigo, al dorso en Nota Interna N° 406/12 P-SSB)

Sin más saludo a Usted atentamente.


Olga FUERTES
Secretaria
Subsecretaria de Bosques


Dr. José D. Lencinas
DIRECTOR
Centro de Investigación y Extensión
Forestal Andino Patagónico (CIEFAP)

*irse a María Andrea
por su conocimiento.
tener reuniones de informar
tal vez exprese la nota*

Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico	Nota N°
Esquel	NE 219/12
16.11.12	

CHUBUT
UNIDOS PODEMOS MÁS

SUBSECRETARIA DE BOSQUES

C- Autorización para el ingreso de cepas desde el exterior

DE :

N° DE TEL :



"2011 - Año del Trabajo Decente, la Salud y Seguridad de los Trabajadores"

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

Buenos Aires, 04 de abril de 2011

Nota DCV N° 39

Dr. Mario Rejchenberg

Área de Protección Forestal
CIEFAP - CONICET

S / I / D

Me dirijo a Usted con relación al ingreso de 1 vía de la cepa fúngica *Ceratocystis novae-zelandiae* (*Ophiostoma novae-zelandiae*) licofilizada, remitida por la University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium (UAMH), Canadá.

Al respecto, informo a Usted que se autoriza el ingreso de dicho material bajo las siguientes condiciones:

- § El material deberá estar acompañado por un documento emitido por la Universidad de Alberta donde se certifique la identidad y pureza del mismo, lo que será constatado por personal de SENASA en el punto de ingreso al país.
- § El material deberá estar debidamente identificado y su acondicionamiento deberá garantizar una correcta hermeticidad.
- § A su ingreso al país el material deberá ser sometido a una inspección de rutina. Para ello, se deberá avisar con 48 hs. de anticipación a la Oficina Local SENASA correspondiente, la fecha y hora de arribo de la partida.
- § El material sólo podrá utilizarse en los laboratorios del CIEFAP.
- § Deberán aplicarse todas las medidas de bioseguridad necesarias para evitar posibles escapes.

Saluda a Usted atentamente

ma

Ing. Agr. Julia PALACIN
Dirección de Cuarentena Vegetal
SENASA