

TRABAJO CIENTÍFICO

Duramen de *Robinia pseudoacacia* con evidencias de pudrición: agente causal y caracterización anatómica y química de la madera atacada

Robinia pseudoacacia heartwood with evidence of rot: causal agent and anatomical and chemical characterization of the attacked wood.

Murace, M. A.^{1,4}; M. C. N. Saparrat^{2,4}; A. Perelló^{3,4} y M. L. Luna⁵

Recibido en juliode 2021; aceptado en agosto de 2022

RESUMEN

Robinia pseudoacacia es reconocida por su valor estético y por ello cultivada en ambientes urbanos. Objetivo: identificar al hongo responsable de la pudrición del duramen de *Robinia pseudoacacia* y analizar las alteraciones anatómicas y químicas que causa en el leño. Se trabajó con muestras provenientes de árboles de los espacios públicos de La Plata. El hongo fue identificado en base a sus características culturales. Se realizaron estudios anatómicos y químicos en duramen atacado y testigo. Para las observaciones con MO las muestras fueron fijadas en FAA y embebidas en Paraplast. Secciones sin teñir se utilizaron para detectar pérdida de birrefringencia (indicador de celulólisis). Las observaciones con MEB se realizaron en muestras montadas sobre platinas y cubiertas con oro. Para el análisis químico se usó FT-IR. Se estimaron las relaciones entre los niveles de absorbancia correspondientes a diferentes grupos funcionales químicos de los polímeros de la madera atacada versus aquellos obtenidos en muestras control. Las características de los cultivos se correspondieron con lo descrito para *L. sulphureus*. La madera atacada presentó coloración castaña, fractura cúbica, abundante micelio y clamidosporas. Con MO y MEB: deformación generalizada del tejido; fracturas; colapso de fibras; micelio en vasos, radios y fracturas; perforaciones en tñlides; punteaduras erosionadas y pérdida total de birrefringencia en fibras. Químicamente, fue notable la degradación de los carbohidratos por sobre la lignina y el ataque preferencial a las unidades guayacil del polímero aromático.

Palabras clave: falsa acacia, duramen, alteraciones microestructurales, FT-IR, pudrición castaña.

ABSTRACT

Robinia pseudoacacia is recognized worldwide for its aesthetic importance and so cultivated in urban environments. The objective of this paper was to: identify the fungus responsible for the rot of *Robinia pseudoacacia* heartwood and analyze the anatomical and chemical alterations it causes in the wood. The samples were obtained from trees growing in public spaces of La Plata City. The fungus identification was performed based on its cultural characteristics. Anatomical and chemical studies were performed in attacked and sound heartwood. For the LM observations the samples were fixed in FAA and embedded in Paraplast. The unstained sections were used to detect loss of birefringence (cellulolysis indicator). The MEB observations were made on samples mounted on stubs and covered with gold. For the chemical analysis FT-IR was used. The relationships between the absorbance levels corresponding to different chemical functional groups of the polymers of the attacked wood versus those obtained in control samples were estimated. The features of the pure cultures corresponded to *L. sulphureus*. The attacked wood presented brown discoloration, cubic pattern of fractures, abundant mycelium and chlamydo spores. With LM and MEB it was observed: generalized tissue deformation; fractures; collapse of fibers; mycelium in vessels, rays and fractures; perforation in tyloses; eroded pits and complete loss of birefringence in fibers. Chemically, both the degradation of the carbohydrates over the lignin and the preferential attack of the guayacil units of the aromatic polymer were noticeable.

Key words: black locust, heartwood, microstructural alterations, FT-IR, brown rot.

¹ Cátedra Protección Forestal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), calle 60 y 119 (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina. E-mail: mmurace@gmail.com

² Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Centro Científico Tecnológico (CCT) La Plata. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina / Instituto de Botánica Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.

³ Cátedra Fitopatología. Centro de Investigaciones en Fitopatologías (CIDEFI) -CONICET.

⁴ Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, (UNLP), calle 60 y 119 (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina.

⁵ Laboratorio de Anatomía Comparada, Propagación y Conservación de Embriofitas "Dr Elías de la Sota", Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. Boulevard 120 y 61, (B1900FWA), La Plata, Argentina

1. INTRODUCCIÓN

Los árboles desempeñan un papel fundamental en los núcleos urbanos, ya que contribuyen a mejorar la calidad de vida de sus habitantes aportando beneficios desde los puntos de vista ambiental, estético, paisajístico, recreativo, social y económico (Urcelay *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2020). Entre las especies representativas del arbolado urbano se encuentra *Robinia pseudoacacia* L. (“falsa acacia”, Fabaceae). Los atributos ornamentales de esta especie y su adaptación a las condiciones de estrés que se presentan en el contexto urbano determinan que sea ampliamente cultivada en parques, calles y avenidas en distintos continentes, fuera de su área natural de distribución (USA) (Cierjacks *et al.*, 2013). Por su porte y la forma y densidad de su copa, estos ejemplares aportan valor estético y ambiental a la forestación urbana. Sin embargo, con frecuencia se ven alterados por prácticas de manejo inadecuadas como también por la acción de diversos patógenos, entre ellos los hongos xilófagos, responsables de las pudriciones del leño o madera (Robles *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2020).

Los hongos xilófagos causan la pudrición de la madera a través de la degradación enzimática de las paredes celulares. Se reconocen dos tipos principales de pudriciones: blancas y castañas. Durante el curso de las pudriciones blancas, son atacadas la celulosa, las hemicelulosas y la lignina. En las pudriciones castañas son despolimerizadas la celulosa y hemicelulosas; la lignina es parcialmente modificada por oxidación (Blanchette, 1995; Riley *et al.*, 2014). Las pudriciones, en particular las castañas, afectan negativamente las propiedades de resistencia del duramen de los ejemplares atacados. Por ello, la presencia de estas enfermedades en los árboles significa un alto riesgo para el patrimonio forestal, la población y sus bienes, principalmente cuando se asocian con prácticas y/o decisiones de implantación y mantenimiento inadecuadas y fenómenos atmosféricos intensos (Schwarze *et al.*, 2000 a, b; Terho y Hallaksella, 2005). No obstante, para cada tipo de pudrición se reconocen diferentes patrones de degradación que impactan de modo diferente sobre las propiedades físico-mecánicas de las maderas. Dichos patrones son únicos para cada interacción hospedante-patógeno y resultan, entre otros, del potencial enzimático de la cepa fúngica y de las características del leño del hospedante (Schwarze *et al.*, 2000 a). En este sentido, la importancia de diagnosticar y caracterizar las pudriciones que afectan a los ejemplares ya que contribuye a explicar y dimensionar el riesgo que significa su presencia en los ambientes urbanos a la vez que aportan información valiosa para la toma de decisiones fitosanitarias. De acuerdo con ello, el objetivo del trabajo fue identificar al hongo responsable de la pudrición del duramen de *Robinia pseudoacacia* y analizar las alteraciones anatómicas y químicas que causa en el leño.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El material fue obtenido en el marco de un relevamiento de las pudriciones presentes en las especies arbóreas más representativas de los espacios públicos de la Ciudad de La Plata (34°55'17.2" S -57°57.272' W). Se recolectaron 60 muestras cúbicas de madera de *R. pseudoacacia*, de aproximadamente 2 cm de lado, correspondientes a duramen sano (testigo, N = 20) y duramen con rasgos de pudrición (N = 40), expuesto a través de heridas localizadas a lo largo del fuste de ejemplares en pie (vivos) (Fig. 1 A-C; foto C, ejemplar cortado luego del muestreo). De acuerdo con esto, el muestreo fue dirigido y se considera acorde al objetivo planteado.

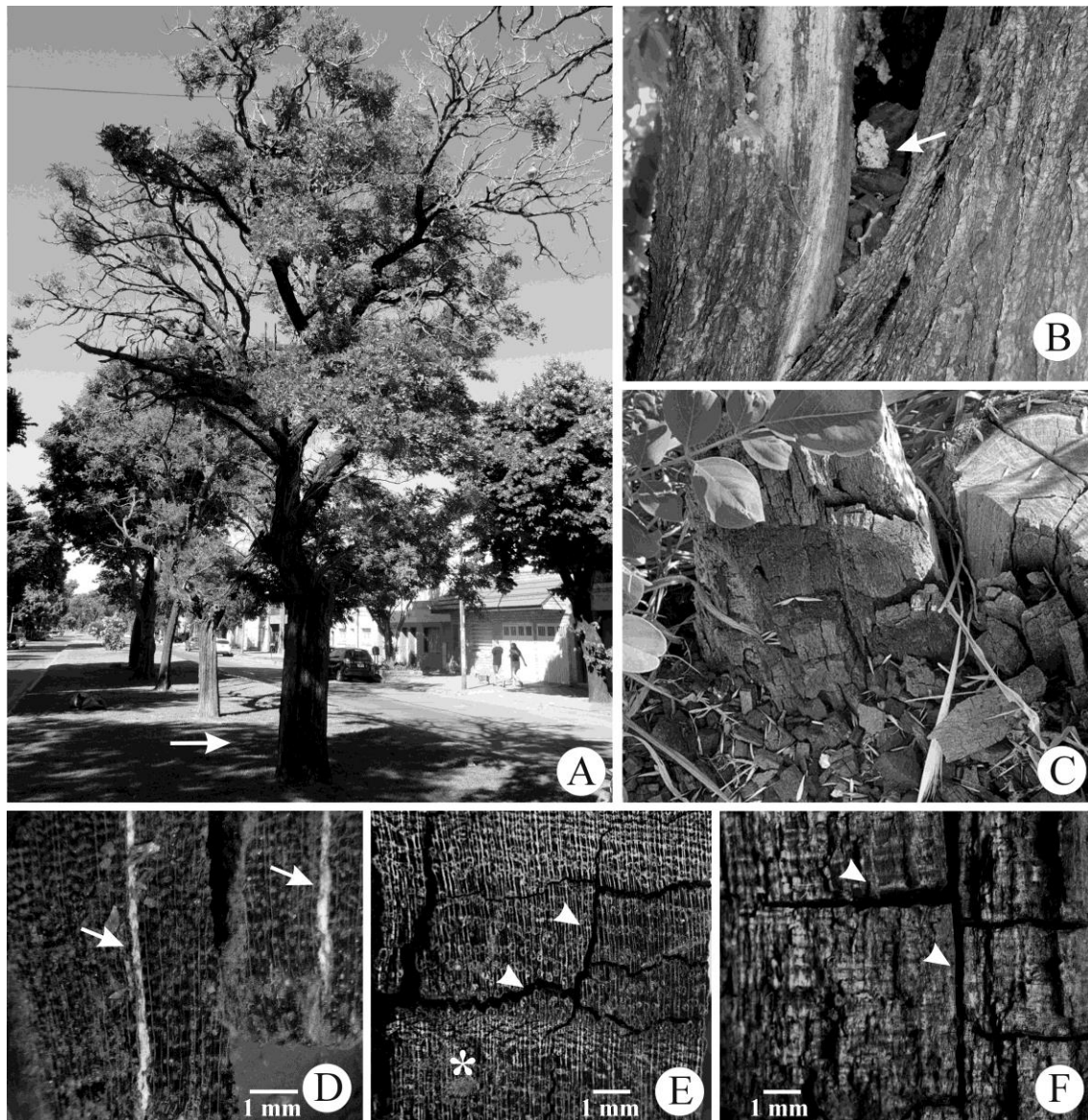


Figura 1. Ejemplares de *Robinia pseudoacacia* atacados por *Laetiporus sulphureus* y apariencia de la madera degradada.

A. Ejemplar de *R. pseudoacacia* implantado en la ciudad La Plata (flecha). **B.** Tronco con duramen degradado expuesto (flecha). **C.** Tocón con detalle de pudrición castaña en duramen, de ejemplar infectado en pie, mostrando el patrón de fractura cúbico y color castaño (flecha). **D-F.** Vistas con microscopio estereoscópico. **D.** Muestras de madera degradada mostrando el micelio fúngico localizado en las fracturas (flechas). **E.** Detalle de fracturas en vista transversal siguiendo un patrón cúbico (puntas de flecha). Clamidosporas también son observadas (asterisco). **F.** Muestra en vista longitudinal mostrando fracturas paralelas y perpendiculares al grano (puntas de flecha). Fracturas en la totalidad de los tipos celulares.

Aislamiento e identificación del hongo asociado a las muestras atacadas

Los aislamientos fueron obtenidos a partir de pequeños trozos de duramen con evidencias de ataque fúngico (alteraciones estructurales, micelio y clamidosporas). Las muestras fueron flameadas y sembradas en agar malta al 2 % suplementado con antibiótico y benomil e incubadas a 25 °C en condiciones de oscuridad (Murace *et al.*, 2017). La identificación fue realizada a partir de los rasgos morfo-biométricos de cultivos puros (Deschamps y Wright, 1976; Stalper, 1978). Lo obtenido fue confirmado mediante la confrontación de los rasgos de los cultivos obtenidos con los rasgos de los aislamientos identificados a partir de la amplificación de la región ITS (utilizando los primeros ITS4 e ITS5) por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siguiendo la metodología descrita por Lucentini *et al.* (2021) y posterior secuenciación en Macrogen (Seúl, Corea).

Estudios anatómicos

El material leñoso fue analizado con microscopios estereoscópico (lupa) Nikon SMZ 1000, óptico (MO) Nikon E200 y electrónico de barrido (MEB) FEI, modelo Quanta 200 (Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis del LIMF, Facultad de Ingeniería, UNLP). Para los estudios con MO, muestras de duramen sano y atacado fueron fijadas en formaldehído-ácido acético- alcohol (FAA), deshidratadas a través de una serie ascendente de etanol y embebidas en Paraplast. Las secciones de leño atacado (10-12 μm) realizadas en los tres planos de corte (transversal, longitudinal radial y longitudinal tangencial) fueron montadas sin teñir para su observación mediante luz polarizada con el fin de detectar la despolimerización de la celulosa (celulólisis), la cual se manifiesta como pérdida de birrefringencia. Las secciones microscópicas de material sano (testigo) (20-30 μm) en los tres planos de corte fueron obtenidas utilizando un xilótomo y teñidas con safranina *fast-green* (D'Ambroggio de Argüeso, 1986). Para las observaciones con MEB, porciones de leño obtenidas con cuchillas descartables fueron montadas sobre platinas y metalizadas con oro. La descripción de los caracteres de diagnóstico de la pudrición fue realizada siguiendo las directrices de Anagnost (1998) y Schwarze (2007). Para la descripción del material testigo se consultaron la lista de caracteres de la IAWA (1989) y la base de datos INSIDEWOOD-DATABASE.

Estudios químicos

El análisis químico del material atacado y testigo fue realizado mediante Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FT-IR). Para ello, el material fue particulado con una lima metálica (<0,4 mm), triturado con Nitrógeno líquido en mortero de porcelana y luego pasado por un lienzo de voile para homogeneizar el tamaño de las partículas. Posteriormente, las muestras fueron expuestas a una serie de lavados utilizando Triton X-100, agua, etanol, metanol y acetona, con el fin de eliminar sus extraíbles hidro- y liposolubles, siguiendo el procedimiento reportado por Espiñeira *et al.* (2011). Culminada la serie de lavados, el material fue secado en estufa a 60 °C y mantenido en una atmósfera libre de humedad hasta el momento de proceder al armado de las pastillas para FT-IR. Para obtener los espectros FT-IR se elaboraron pastillas de 13 mm de diámetro, utilizando 2 mg de cada muestra seca y 20 mg de bromuro de potasio grado infrarrojo, como así también pastillas blanco con sólo 22 mg de bromuro de potasio. Los espectros de absorción FT-IR fueron registrados entre 1.800 cm^{-1} y 800 cm^{-1} empleando un espectrómetro modelo *Spectrum* (Perkin- Elmer-Instruments). El análisis espectral se realizó a una velocidad de 1 cm s^{-1} con 4 cm^{-1} de resolución bajo atmósfera de aire seco (cámara con silicagel), obteniéndose un espectro promedio resultante de 64 escaneos. Se trabajó con 3 repeticiones por condición de la muestra. Para el procesamiento de los datos se utilizó el software EZ-OMNIC y se llevó a cabo la corrección de cada espectro, sustrayendo automáticamente aquel correspondiente a la pastilla blanco obtenida inmediatamente antes del registro de cada muestra. Se seleccionaron bandas de referencia dentro de la región 800-1.800 cm^{-1} que reflejan grupos funcionales característicos de los polímeros de la madera, y se estimaron sus intensidades relativas (Tabla 1). Entre tratamientos (madera testigo vs. atacada), se estimó la existencia de diferencias significativas en los valores de las intensidades de absorbancia relativas (IARs) según la prueba de Anova (Tukey, $P \leq 0,05$).

Tabla 1. Asignación de bandas de absorción en los espectros FT-IR de las muestras de madera

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupos funcionales	Referencia
896 ± 3	vibraciones de grupos C1-H en celulosa	Hinterstoisser <i>et al.</i> (2001)
1.164 ± 3; 1.158	vibraciones de grupos glicosílicos C-O-C (holocelulosa)	Fackler <i>et al.</i> (2010); Saparrat <i>et al.</i> (2010)
1.268 ± 2	vibraciones de C-O del anillo guayacil (lignina)	Pandey y Pitman (2003; 2004)
1.335 ± 3	vibraciones del C-O del anillo siringyl (lignina)	Pandey y Pitman (2003; 2004)
1.420 – 1.430	celulosa cristalina	Poletto <i>et al.</i> (2014)
1.508 ± 3	vibraciones de esqueletos aromáticos (lignina)	Saparrat <i>et al.</i> (2010); Jelle y Hovde (2012); Shi <i>et al.</i> (2012)
1.734	grupos carbonilos no conjugados de pectinas y hemicelulosas (xilanos)	Luna <i>et al.</i> (2015)

3. RESULTADOS

Identificación fúngica

Los rasgos morfo-biométricos de las esporas presentes en el material muestreado y de los cultivos obtenidos se correspondieron con aquellos que integran la clave-patrón de *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill (Deschamps y Wright, 1976; Stalper, 1978), LPSC1391; LPS 49110. Dichas características culturales además se correspondieron con las de otros aislamientos obtenidos en estudios previos (Murace *et al.*, 2017) que, según se indicó, fueron identificados mediante técnicas moleculares como *L. sulphureus* (OM574648, OM574635, OM574645).

Características macroscópicas de la madera atacada

A diferencia de la madera sana (duramen en tonos claros del color marrón), la madera con evidencias de pudrición presentó color castaño rojizo intenso y un patrón de fractura cúbico debido a la presencia de rajaduras paralelas y perpendiculares a la dirección del grano, algunas de ellas con abundante micelio (Fig. 1 D-F). Con lupa se identificaron clamidosporas del hongo a modo de eflorescencias ferruginosas (Fig. 1 E).

Características microscópicas de la madera sana (testigo) y atacada

En cortes transversales (CT), longitudinales radiales (CLR) y longitudinales tangenciales (CLT) de madera sana, con microscopio óptico (MO) se registraron los siguientes caracteres generales: anillos de crecimiento demarcados por la porosidad anular, vasos del leño temprano solitarios, los del leño tardío solitarios o agrupados en bandas tangenciales, en ambos casos con abundantes tílides obstruyendo los lúmenes (Fig. 2 A). Parénquima axial de tipo vasicéntrico confluyente, con depósitos de cristales en los lúmenes y fibras libriformes de paredes delgadas a gruesas, estas últimas en el leño tardío (Fig. 2 A). Radios parenquimáticos homocelulares, conformados por células procumbentes (Fig. 2 B), multiseriados (4-10 células de ancho) (Fig. 2 C). Elementos de vaso con placa de perforación simple, recta a levemente inclinada (Fig. 2 C).

En cuanto a la madera atacada, con MO se registró la deformación generalizada del tejido en todos los tipos de corte (Fig. 2 D-G) y la presencia de fracturas con abundantes hifas (Fig. 2 D, E). De acuerdo con ello, los vasos del leño temprano y tardío aparecieron deformados y los radios presentaron recorrido sinuoso. Las fracturas se extendieron por el leño temprano y el leño tardío alcanzando todos los tipos celulares (elementos de vaso, parénquima axial y radial y fibras) (Fig. 2 E). El micelio se alojó también en el interior de los vasos (Fig. 2 D, G). Las células más afectadas debido al ataque fúngico fueron las fibras, presentándose en ciertos sectores totalmente colapsadas (Fig. 2 F-G). Mediante luz polarizada se observó la pérdida de birrefringencia en los sectores

correspondientes a las fibras, con respecto al material testigo (Fig. 3 A-D). Tanto los vasos, como el parénquima axial y los radios parenquimáticos aparecieron en cambio birrefringentes, reflejando la descomposición diferencial de la celulosa entre tipos celulares (Fig. 3 C-D).

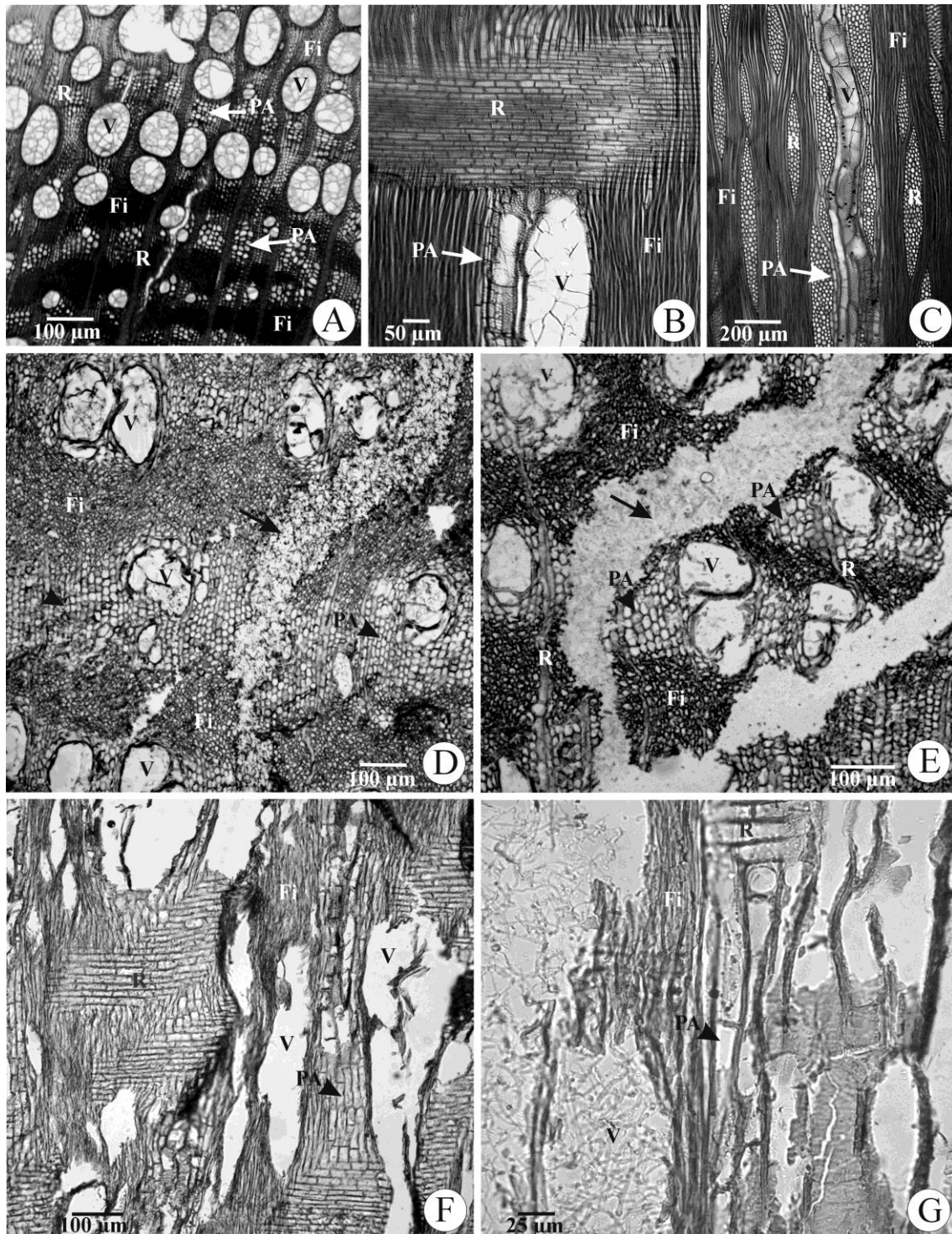


Figura 2. Características anatómicas de la madera sana y degradada de *Robinia pseudoacacia* observada con MO. A-C. Madera sana. Secciones teñidas con safranina *fast-green*. A. Sección transversal. B. Sección longitudinal radial. C. Sección longitudinal tangencial. D-G. Madera atacada. Secciones sin teñir donde se observa la coloración castaña característica. D. Sección transversal mostrando la deformación generalizada del tejido y el micelio fúngico localizado en las fracturas (flecha). E. Sección transversal de la madera con degradación avanzada. Hifas abundantes en las fracturas (flecha), degradación de tílides en vasos y ataque pronunciado en fibras. F. Sección longitudinal radial mostrando la deformación del tejido y el recorrido sinuoso de las células. El ataque es más pronunciado en las fibras. G. Sección longitudinal radial en detalle mostrando hifas en el interior de los vasos y erosión generalizada de la pared celular. Fi: fibra; PA: parénquima axial; R: radio parenquimático; V: vaso.

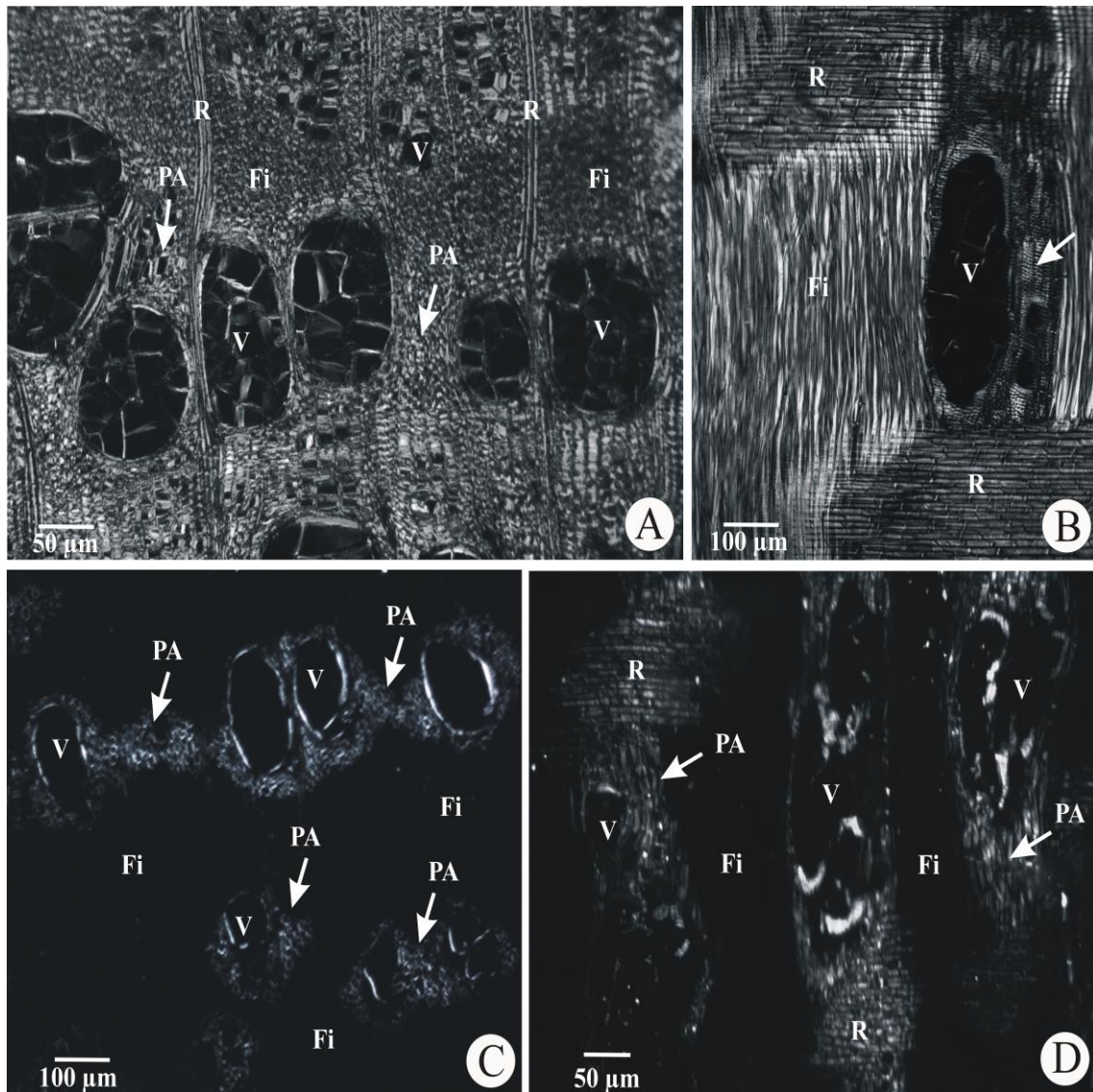


Figura 3. Características anatómicas de la madera sana y atacada de *Robinia pseudoacacia* observada con microscopio óptico y luz polarizada. **A-B.** Madera sana. Todos los tipos celulares presentan birrefringencia. **A.** Sección transversal. **B.** Sección longitudinal radial. **C-D.** Madera atacada. Pérdida de birrefringencia total en la pared de las fibras. **C.** Sección transversal. **D.** Sección longitudinal radial. Fi: fibra; PA: parénquima axial; R: radio parenquimático; V: vaso.

Con microscopio electrónico de barrido (MEB), se registró el desarrollo de micelio y la presencia de clamidosporas en el interior de los vasos (Fig. 4 A). Las tñlides se presentaron perforadas por las hifas fúngicas. En ciertas áreas de las muestras la degradación de las fibras fue total observándose clamidosporas en los agujeros resultantes (Fig. 4 B-C). El micelio se concentró también en los radios parenquimáticos y en las fracturas (Fig. 4 C-D). Las fracturas alcanzaron todos los tipos celulares (Fig. 4 D-E). En ocasiones se observó la erosión de punteaduras asociada a la presencia de hifas fúngicas (Fig. 4F).

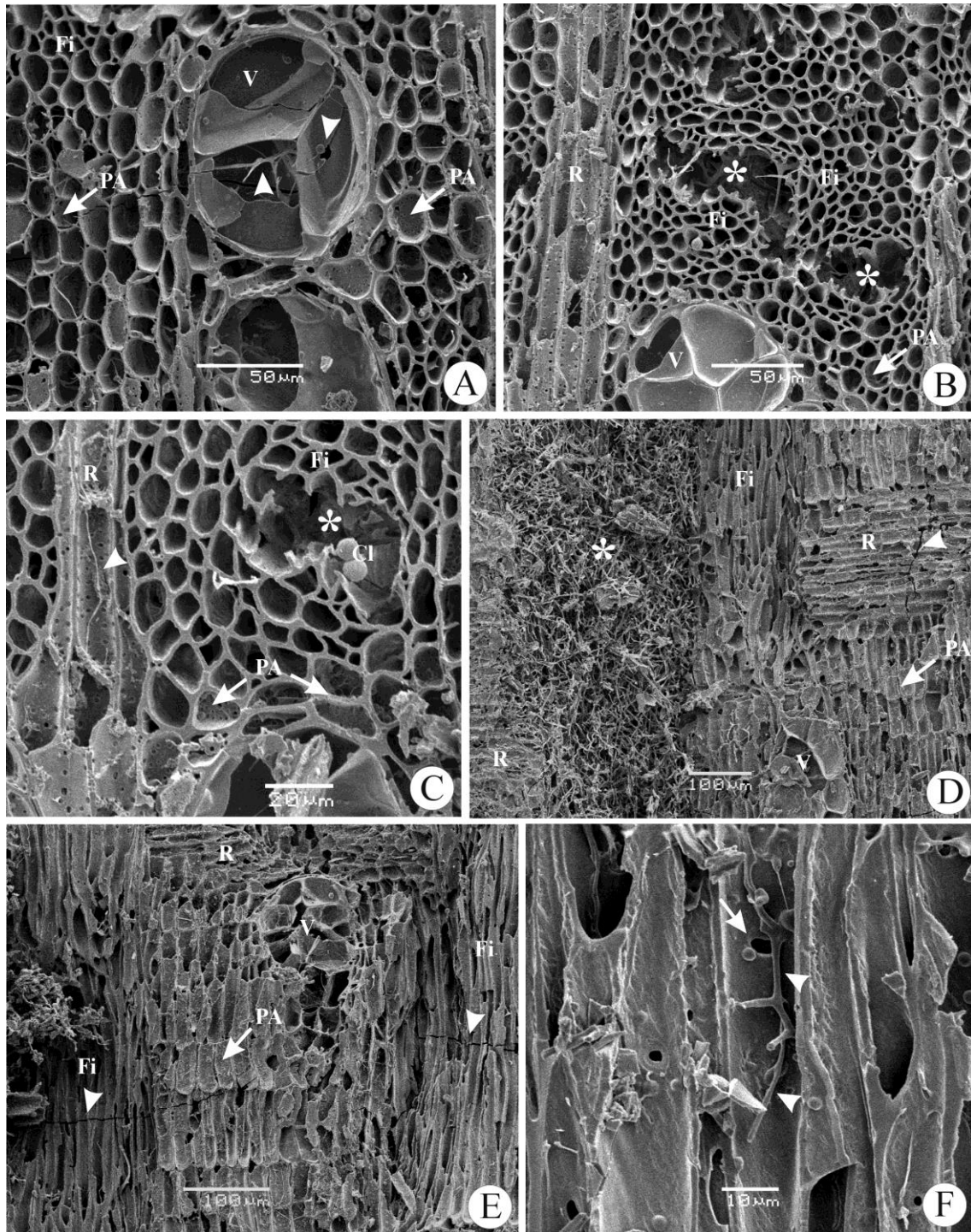


Figura 4. Alteraciones anatómicas en madera degradada de *Robinia pseudoacacia* observada con microscopio electrónico de barrido (MEB). **A-C.** Sección transversal. **D-F.** Sección longitudinal radial. **A.** Detalle de vaso con hifa y tílido perforada (puntas de flecha). **B.** Agujeros en el tejido producto del colapso de las fibras (asteriscos). **C.** Hifas en células parenquimáticas de los radios (punta de flecha) y clamidosporas fúngicas en agujeros (asterisco). **D.** Detalle de la presencia de abundante micelio en una fractura paralela al grano (asterisco). **E.** Fracturas perpendiculares al grano notables en las fibras (puntas de flecha). **F.** Detalle de hifa en el lumen de una fibra (puntas de flecha) y punteadura erosionada (flecha). Fi: fibra; PA: parénquima axial; R: radio parenquimático; V: vaso.

Estudios mediante FT-IR de las alteraciones químicas en la madera atacada

Respecto de las muestras testigo, en la madera atacada se registró un incremento en el índice de absorbancia relativa (IAR) I_{1508}/I_{1164} y reducciones en las relaciones I_{1734}/I_{1508} y I_{896}/I_{1508} . También

se detectaron menores IARs para I_{896}/I_{1164} e I_{896}/I_{1734} así como una mayor IAR para I_{1429}/I_{896} . En cuanto a la lignina, en la madera atacada se observó un incremento relativo en la relación I_{1335}/I_{1268} , respecto del testigo (Tabla 2; Fig. 5).

En términos generales, las modificaciones químico-anatómicas identificadas se corresponden con los rasgos de pudrición castaña (Anagnost, 1998; Schwarze, 2007).

Tabla 2. Intensidades de absorbancia relativa (IAR)¹ estimadas a partir de los datos de espectroscopía FT-IR

Muestra	I_{896}/I_{1164}	I_{896}/I_{1508}	I_{896}/I_{1734}	I_{1508}/I_{1164}	I_{1734}/I_{1508}	I_{1508}/I_{1335}	I_{1508}/I_{1268}	I_{1335}/I_{1268}	I_{1429}/I_{896}	I_{1429}/I_{1164}
Testigo	0,334a	0,664a	0,563a	0,594a	1,180a	0,740a	0,637a	0,861a	2,011a	0,672a
Atacada	0,232b	0,210b	0,326b	1,102b	0,646b	0,991b	1,009b	1,018b	4,396b	1,018b

¹Referencias: I_{896}/I_{1164} , celulosa/holocelulosa; I_{896}/I_{1508} , celulosa/lignina; I_{896}/I_{1734} , celulosa/hemicelulosa; I_{1508}/I_{1164} , lignina/holocelulosa; I_{1734}/I_{1508} , hemicelulosa/lignina; I_{1508}/I_{1335} , lignina/syringyl (S); I_{1508}/I_{1268} , lignina/guaiacyl (G); I_{1335}/I_{1268} , syringyl (S)/guaiacyl (G); I_{1429}/I_{896} , celulosa cristalina/celulosa; I_{1429}/I_{1164} , celulosa cristalina/holocelulosa. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$).

4. DISCUSIÓN

La presencia de *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. en el duramen de *Robinia pseudoacacia* L. con alteraciones químico-anatómicas compatibles con los de una pudrición castaña, se corresponde con el tipo de deterioro que causa esta especie. *Laetiporus sulphureus* es reconocido a nivel mundial como un patógeno del arbolado urbano, responsable de provocar pudrición castaña en la zona del duramen de falsa acacia (Schwarze *et al.*, 2000 a) y de numerosas Latifoliadas, y Coníferas (Schwarze, 2004; Ota *et al.*, 2009; Urcelay *et al.*, 2012; Murace *et al.*, 2017). Este hongo causa pudriciones de copa, produciéndose el ataque en las ramas con duramen expuesto y descendiendo luego hacia el tronco (Rayner y Boddy, 1988), sitio en el cual fue observada la pudrición en los ejemplares bajo estudio.

Los caracteres macro y microscópicos registrados en la madera atacada corresponden a un estado avanzado de pudrición castaña: color pardo intenso, patrón de fractura cúbico y presencia de micelio y de clamidosporas (Anagnost, 1998). En este tipo de deterioro, la despolimerización preferencial de los carbohidratos estructurales, tal como fue evidenciada mediante FT-IR y luz polarizada, provoca la deshidratación del tejido y su consecuente encogimiento, deformación y ruptura siguiendo un patrón cúbico característico. La madera degradada queda así constituida por un frágil marco de lignina que se desintegra bajo presión, tal como fue determinado en las muestras al presionarlas entre los dedos. La oxidación parcial de la lignina otorga la coloración castaña que caracteriza y da el nombre a este tipo de deterioro (Blanchette, 1995; Schwarze, 2007).

La contracción y deformación del tejido observadas, se corresponde con lo descrito para distintas Latifoliadas infectadas naturalmente por este hongo (Murace *et al.*, 2017). No obstante, en falsa acacia, la presencia de contenidos (tílides y cristales), el espesor de la pared de sus fibras y el ancho de sus radios atenuarían dicha condición. Murace *et al.* (2017) asocian la menor deformación y colapso del tejido de fresno, eucalipto y paraíso atacados por *L. sulphureus* con la presencia de tílides, compuestos gomosos, cristales, con el espesamiento de la pared de sus fibras y el ancho de sus radios. Los contenidos celulares y el grado de lignificación dificultan la deformación celular (Rivera y Lenton, 1999).

La mayor concentración de micelio detectada en los lúmenes de los vasos y en los radios parenquimáticos coincide con lo observado por Schwarze *et al.* (2000 a) y por Murace *et al.* (2017) en *R. pseudoacacia* y otras Latifoliadas respectivamente, atacadas por este patógeno. En las Latifoliadas la colonización se produce a través de los vasos (sistema axial), particularmente

los de diámetro mayor del leño temprano, y de las células parenquimáticas de los radios (sistema radial) (Schwarze *et al.*, 1997; Schwarze *et al.*, 2000 b). Si bien falsa acacia posee porosidad anular, el avanzado estado de pudrición identificado podría estar enmascarando la colonización preferencial por los vasos del leño temprano.

La presencia de agujeros en ciertos sectores de las muestras debido al colapso del tejido, junto con la erosión de las punteaduras, las cuales constituyen vías de colonización del sustrato, son también rasgos típicos de estadios avanzados de degradación (Wilcox 1993 a, b; Anagnost, 1998).

La observación de tílides perforadas suma evidencias respecto de la reconocida capacidad de *L. sulphureus* de superar las barreras a la colonización, entre las que se encuentran también la presencia de altas concentraciones de fenoles y flavonoides características del duramen maduro de *R. pseudoacacia* (Schwarze *et al.*, 1997; Schwarzey Fink, 1998; Dünisch *et al.*, 2010), extraíbles abundantes en vasos y parénquima axial (Latorraca *et al.*, 2011).

La pérdida acentuada de birrefringencia registrada en el leño atacado también se asocia con un estado avanzado de pudrición castaña. Autores como Wilcox (1993 a, b) y Anagnost (1998) consideran esta característica como la evidencia más relevante para diagnosticar este tipo de deterioro. En las muestras analizadas, la pérdida total de birrefringencia se observó en las paredes de las fibras, tipo celular estrechamente vinculado con la capacidad resistente de las maderas. Schwarze *et al.* (2000 a, b; 2003) atribuyen este rasgo a la disposición radial de las microfibrillas de celulosa en el estrato S2 de la pared (rasgo ausente en vasos y parénquima), lo cual favorece la difusión de los agentes de degradación. La birrefringencia observada en los elementos de vaso y en el parénquima axial también resultó compatible con la presencia de cristales y de los compuestos fenólicos citados para la especie.

El incremento relativo de la lignina respecto de la holocelulosa (I_{1164}), celulosa amorfa (I_{896}) y hemicelulosas (I_{1734}) determinado mediante FT-IR en las muestras con pudrición, evidencia el ataque preferencial de los polisacáridos estructurales, forma de ataque característica de los hongos de pudrición castaña. Pandey y Pitman (2004) y Fabiyi *et al.* (2011) arribaron a resultados similares utilizando esta técnica para la caracterización química de leños de Latifoliadas expuestos a los hongos de pudrición castaña *Coniophora puteana* y *Gloeophyllum trabeum*. Asimismo, en las muestras de *R. pseudoacacia* se registró una degradación pronunciada de la celulosa amorfa, la cual se halla de modo preponderante y es más susceptible a la descomposición, siendo rasgos que permiten explicar el notable incremento en el índice de cristalinidad (Fackler *et al.*, 2010; Gawron *et al.*, 2012; Hastrup *et al.*, 2012).

La detección de una mayor relación I_{1335}/I_{1268} (S/G) en la madera atacada, sugiere un ataque preferencial del hongo sobre las unidades de tipo guayacil (G) de la lignina. Lo hallado podría asociarse a la metoxilación de este tipo de subunidad y su consecuente transformación en syringil (S). La metoxidación/demetoxidación es considerada la principal estrategia empleada por los hongos de pudrición castaña para la transformación inicial de la lignina (Yelle *et al.*, 2011; Fackler y Schwanninger, 2012).

Laetiporus sulphureus es reconocido por disminuir notablemente la capacidad resistente de las maderas atacadas (Schwarze y Fink, 1998; Schwarze, 1995, tomados de Schwarze *et al.*, 2000 a). En las pudriciones castañas, la intensa despolimerización de la celulosa y hemicelulosas que ocurre desde las primeras etapas del proceso de degradación afecta negativamente las propiedades de resistencia de la madera, otorgadas principalmente por la celulosa (Schwarze, 2007).

Para nuestro país, este trabajo constituye el primer registro de la presencia de *L. sulphureus* asociado al duramen de *Robinia pseudoacacia* y de las alteraciones químico-anatómicas presentes en el leño de estos ejemplares, modificaciones resultantes de infecciones naturales en el contexto urbano. Lo hallado se suma a otras interacciones registradas previamente por Murace *et al.* (2017) entre este patógeno y distintas especies de Latifoliadas presentes en la ciudad de La Plata (Argentina).

5. CONCLUSIONES

Del duramen de ejemplares de falsa acacia con rasgos de pudrición castaña fue aislado *Laetiporus sulphureus*. Si bien este xilófago es reconocido como un patógeno frecuente en el contexto urbano, responsable de este tipo de deterioro, la realización de los postulados de Koch permitirá confirmar su rol patogénico en los árboles bajo estudio. Las alteraciones químico-anatómicas resultantes de la interacción *L. sulphureus*-*R. pseudoacacia* se corresponden con un estado avanzado de pudrición castaña, reflejando una probable pérdida de la capacidad resistente del leño y un riesgo en la estabilidad de estos árboles implantados en espacios urbanos.

AGRADECIMIENTOS:

Esta investigación fue parcialmente subsidiada por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva a través del proyecto PICT 2015-1620 (Mario Carlos Nazareno Saparrat), CONICET (PUE INFIVE) y UNLP, Argentina y por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de La Plata, a través de los Proyectos I+D A344 (Mario Carlos Nazareno Saparrat); A296 (Analía Perelló).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anagnost, S. E. 1998. Light microscopic diagnosis of Wood decay. *IAWA J.* 19:141-167.
- Blanchette, R. A. 1995. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Can. J. Bot.* 73(Suppl. 1):999-1010.
- Cierjacks, A.; I. Kowarik; J. Joshi; S. Hempel; M. Ristow; M. vander Lippe and E. Weber. 2013. Biological Flora of the British Isles: *Robinia pseudoacacia*. *Journal of Ecology* 101:1623-1640.
- D'ambrogio de Argüeso, A. 1986. *Manual de técnicas histológicas en plantas*. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Deschamps, J. R. y J. R. Wright. 1976. Clave para el reconocimiento en cultivo de las especies xilófagas de Basidiomycetes argentinae. *Rev. Invest. Agrop., INTA, Bs. As., Rep. Argentina. Serie 5, Pat. Veg.* 12(2).
- Ding, S.; H. Ho and J. D. Gu. 2020. Diversity, abundance and distribution of wood-decay fungi in major Parks of Hong Kong. *Forests* 11:1030.
- Dünisch, O.; H. G. Richter and G. Koch. 2010. Wood properties of juvenile and mature heartwood in *Robinia pseudoacacia* L. *Wood Science and Technology* 44(2):301-313.
- Espiñeira, J. M.; E. Novo Uzal; L. V. Gómez Ros; J. S. Carrión; F. Merino; A. Ros Barceló and F. Pomar. 2011. Distribution of lignin monomers and the evolution of lignification among lower plants. *Plant Biology* 13:59-68.
- Fabiyi, J. S.; A. G. Mcdonld; J. J. Morrell and C. Freitag. 2011. Effects of Wood species on durability and chemical changes of fung aldecayed of Wood plastic composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 42(5):501-510.
- Fackler, K. and M. Schwanninger. 2012. How spectroscopy and microspectroscopy of degraded Wood contribute to understand fung al Wood decay. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96:587-599.
- Fackler, K.; J. S. Stevanic; T. Ters; B. Hinterstoisser; M. Schwanninger and L. Salmén. 2010. Localization and characterization of incipient brown-rotdecay within spruce Wood cell walls using FT-IR imaging microscopy. *Enzyme Microbiology and Technology* 47(6): 257-267.

- Gawron, J.; M. Szczęśna; T. Zielenkiewicz and T. Gołofit. 2012. Cellulose crystallinity index examination in oak wood originated from antique woodwork. *Drewno. Pr. Nauk. Donies. Komunik* 55(188):109-114.
- Hastrup, A. C. S.; C. Howell; F. H. Larsen; N. Sathitsuksanoh; B. Goodell and J. Jellison. 2012. Differences in crystallinity in cellulose modification due to degradation by brown and white rot fungi. *Fungal Biology* 116(10):1052-1063.
- Hinterstoisser, B.; R. Jalkanen; M. Nowotny and M. Schwanninger. 2001. Lignification of Scots Pine trees from Arctic Circle up to timberline. *Buvisindi Icel. Agr. Sci.* 14:55-59.
- Iawa Committee. 1989. *List of Microscopic Features for Hardwood Identification*. Wheeler, Baas & Gasson (Eds).
- Insidewood Database. 2004 -onwards. Disponible en: insidewood.lib.ncsu.edu. [Fecha de consulta: Octubre del 2019]. Wheeler, E.A. 2011. InsideWood - a web resource for hardwood anatomy. *IWA Journal* 32(2):199-211.
- Jelle, B. P. and P. J. Hovde. 2012. Fourier Transform Infrared Radiation Spectroscopy for wood rot decay and mould fungi growth detection. *Advances in Materials Science and Engineering* Article ID 969360, 6 pp.
- Latorraca, J. V. F.; O. Dunisch and G. Koch. 2011. Chemical composition and natural durability of juvenile and mature heart Wood of *Robinia pseudoacacia* L. *An Acad. Bras. Cienc.* 83(3):1059-1068.
- Lucentini, C. G.; R. Medina; M. E. Franco; C. N. Saparrat and P. A. Balatti, 2021. *Fulvia fulva* [syn. *Cladosporium fulvum*, *Passalora fulva*] races in Argentina are evolving through genetic changes and carry polymorphic *vr* and *ecp* gene sequences. *Eur J Plant Pathol* 159:525-542.
- Luna, M. L.; J. P. Ramos Giacosa; G. E. Giudice; P. V. Fernández; M. Ciancia and M. C. N. Saparrat. 2015. Structure and chemistry of the xylem of arborescent species of *Blechnum* from South America. *IWA J.* 36:3-21.
- Murace, M. A.; M. L. Luna; M. G. García Ciuffani y A. Perelló, A. 2017. Modificaciones anatómicas y químicas en el leño de ejemplares del arbolado de la ciudad de La Plata (Buenos Aires) causadas por *Laetiporus sulphureus* (Basidiomycota, Polyporales). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 52(4):647-661.
- Ota, Y.; T. Hattori; M. T. Banik; G. Hagedorn; K. Sotome; S. Tokuda and Y. Abe. 2009. The genus *Laetiporus* (Basidiomycota, Polyporales) in East Asia. *Mycol. Res.* 113:1283-1300.
- Pandey, K. K. and A. J. Pitman. 2003. FTIR studies of the changes in Wood chemistry following decay by Brown rot and white-rot fungi. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 52:151-160.
- Pandey, K. K. and A. J. Pitman. 2004. Examination of the Lignin Content in a Softwood and a Hardwood Decayed by a Brown-Rot Fungus with the Acetyl Bromide Method and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 42:2340-2346.
- Poletto, M.; H. L. Ornaghi and A. J. Zattera. 2014. Native Cellulose: Structure, characterization and thermal properties. *Materials* 7:6105-6119.
- Rayner, A. D. M. and L. Boddy. 1988. *Colonization of the standing tree in Fungal decomposition of wood*. Wiley, Chichester, England.
- Riley, R.; A. A. Salamov; D. W. Brown; L. G. Nagy; D. Floudas; B. W. Held; A. Levasseur; V. Lombard; E. Morin; R. Otillar; E. A. Lindquist; H. Sun; K. M. Labutti; J. Schmutz; D. Jabbour; H. Luo; S. E. Baker; A. G. Pisabarro; J. D. Walton; R. A. Blanchette; B. Henrissat; F. Martin; D. Cullen; D. S. Hibbett and I. V. Grigoriev. 2014. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *PNAS* 111:9923-9928.
- Rivera, S. M. and M. S. Lenton. 1999. La xilología y las propiedades mecánicas de cinco maderas nativas argentinas. *Quebracho* 7: 72-78.

- Robles, C. A.; C. C. Carmarán and S. E. López. 2011. Screening of xylophagous fungi associated whit *Platanus acerifolia* in urban landscapes: Biodiversity and potential biodeterioration. *Landscape and Urban Planning* 10:129-135.
- Saparrat, M. C. N.; J. M. Estevez; M. I. Troncozo; A. Arambarri and P. Balatti. 2010. In-vitro depolymerization of *Scutiabuxifolia* leaf-litter by a dominant Ascomycota *Ciliochorella* sp. *International Biodeterioration and Biodegradation* 64:262-266.
- Schwarze, F. W. M. R. 2004. Forest Pathology: Heart Rot and Wood Decay. *En: Burley, J., J. Evans, J. Youngquist (Eds), Encyclopedia of Forest Sciences* (pp. 808-816). Elsevier Science.
- Schwarze, F. W. M. R. 2007. Review Wood decay under the microscope. *Fungal Biol. Rev.* 21:133-170.
- Schwarze, F. W. M. R.; D. Lonsdale and S. Fink. 1997. An overview of Wood degradation patterns and the implications for tree Hazard assessment. *Arb. Jour.* 21:1-32.
- Schwarze, F. W. M. R.; J. Engels and C. Mattheck. 2000a. *Fungal strategies of wood decay in trees*. Springer Verlag, Berlin.
- Schwarze, F. W. M. R.; S. Baum and S. Fink. 2000b. Resistance of fibre regions in wood of *Acer pseudoplatanus* degraded by *Armillaria mellea*. *Mycological Research* 104(9):1126-1132.
- Schwarze, F. W. M. R. and S. Fink. 1998. Host and cell type affect the mode of degradation by *Meripilus giganteus*. *New Phytol.* 139:721-731.
- Schwarze, F. W. M. R.; S. Fink and D. Deflorio. 2003. Resistance of parenchymacells in Wood to degradation by Brown rot fungi. *Mycological Progress* 2(4):267-274.
- Shi, J.; D. Xing and J. Li. 2012. FTIR Studies of the Changes in Wood Chemistry from Wood Forming Tissue under Inclined Treatment. *Energy Procedia* 16:758-762.
- Stalpers, J. A. 1978. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. *Stud. Mycol.* 16:1-248.
- Terho, M. and A. M. Hallaksela. 2005. Potential Hazard characteristic of *Tilia*, *Betula*, and *Hacer* trees removed in the Helsinki City Area during 2001-2003. *Urban Forestry & Urban Greening* 3:113-120.
- Urcelay, C.; G. Robledo; F. Heredia; G. Morera y F. García Montaña. 2012. *Hongos de la madera en el arbolado urbano de Córdoba*. 1ra ed. Córdoba: Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal. Universidad Nacional de Córdoba - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (UNC-CONICET).
- Wilcox, W. W. 1993 a. Comparative morphology of early stages of brown-rot wood decay. *IAWA J.* 14:127-138.
- Wilcox, W. W. 1993 b. Comparison of scanning electron microscopy and light microscopy for the diagnosis of early stages of Brown rot decay. *IAWA J.* 14:219-226.
- Yelle, D. J.; D. Wei; J. Ralph and K. E. Hammel. 2011. Multidimensional NMR analysis reveals truncated lignin structures in Wood decayed by the Brown rot basidiomycete *Postia placenta*. *Environmental Microbiology* 13:1091-1100.

