



Artículo / Article

Histopatología de raíces de *Pinus patula* Schiede ex Schldtl. et Cham. y de *Pinus pseudostrobus* Lindl. infectadas con *Phytophthora cinnamomi* Rands, 1922

Histopathology of *Pinus patula* Schiede ex Schldtl. et Cham. and *Pinus pseudostrobus* Lindl. roots infected by *Phytophthora cinnamomi* Rands, 1922

Santos Gerardo Leyva Mir<sup>1</sup>, Nancy Patricia Nava García<sup>2</sup>, Betsabé Diego Martínez<sup>1</sup>, Alejandra Almaraz Sánchez<sup>3</sup>, Silvia Mariel Hernández Villalobos<sup>4</sup> y Juan Manuel Tovar Pedraza<sup>1</sup>

Resumen

*Phytophthora cinnamomi* es uno de los fitopatógenos más devastadores a nivel mundial, ya que ocasiona pudriciones de raíz y la muerte de numerosas especies vegetales. El objetivo de este estudio fue determinar los daños histológicos inducidos por este organismo a nivel radicular en *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus*. Se inocularon 48 árboles de 11 meses de edad de ambas especies forestales mediante la inmersión de sus raíces en una suspensión de fragmentos miceliales y como testigo, otras que fueron sumergidas en agua destilada estéril. Se tomaron muestras de tales estructuras cada cuatro días después de la inoculación por 20 días. Los síntomas microscópicos se manifestaron con mayor rapidez en *P. pseudostrobus*, aunque en las dos especies las raíces se tornaron frágiles y se necrosaron. Asimismo, los cambios histológicos se presentaron como un aumento en el contenido de polifenoles, degradación de las paredes celulares y necrosamiento de la peridermis. En *P. patula*, las plantas mostraron un marchitamiento de la copa, seguida por un amarillamiento de las acículas y, finalmente, en la muerte del árbol. Para *P. pseudostrobus* los síntomas fueron similares, pero el decaimiento de las acículas fue gradual y, posteriormente, se observó marchitez de las mismas hasta la muerte total del ejemplar.

**Palabras clave:** Cambios anatómicos, oomicete, patogenicidad, *Phytophthora cinnamomi* Rands, 1922, *Pinus patula* Schiede ex Schldtl. et Cham., *Pinus pseudostrobus* Lindl.

Abstract

*Phytophthora cinnamomi* is one of the most devastating plant pathogens worldwide, since it causes root rot and death of many plant species. The aim of this study was to determine the histological damage induced by this organism in roots of *Pinus patula* and *P. pseudostrobus*. Both *Pinus* species were inoculated by immersion of roots in a suspension of mycelial fragments. Roots of control trees were immersed in sterile distilled water. Root samples were taken every four days after inoculation for 20 days. Microscopic symptoms occurred more rapidly in *P. pseudostrobus*, although the two species exhibited fragile and necrotic roots. Also, the histological changes at the root of both species were presented with an increase in polyphenol content, degradation of cell walls and necrosis of the periderm. In the case of *P. patula*, plants showed wilting of the canopy, followed by a yellowing of needles and finally with the death of the tree. For *P. pseudostrobus* symptoms were similar, but in this case the decay of needles was gradual and subsequently wilt thereof was observed until the total death of the tree.

**Key words:** Anatomic changes, oomycete, pathogenicity, *Phytophthora cinnamomi* Rands, 1922, *Pinus patula* Schiede ex Schldtl. et Cham., *Pinus pseudostrobus* Lindl.

Fecha de recepción/ Reception date: 7 de julio de 2016; Fecha de aceptación/ Acceptance date: 22 de diciembre de 2016.

<sup>1</sup> Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, México. Correo-e: jmtovar@colpos.mx

<sup>2</sup> Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, México.

<sup>3</sup> Fitopatología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, México.

<sup>4</sup> Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional, Costa Rica.

## Introducción

*Phytophthora cinnamomi* Rands, 1922 es un patógeno del suelo causante de pudrición de la raíz, que en el siglo pasado devastó 200 mil hectáreas de vegetación natural en Australia, y destruyó a más de 400 especies hospedantes (Malajczuk, 1979). Es también responsable de serias pérdidas anuales de castaño (*Castanea sativa* Miller), plantas de arándano (*Vaccinium myrtillus* L.) y plantas ornamentales dentro de los viveros forestales de Estados Unidos de América. Este patógeno se ha registrado, además, en Argentina, España, Sudáfrica, Sudamérica y Taiwán donde ataca a un amplio número de hospederos (Zentmyer, 1980; Robin *et al.*, 1992; Brasier *et al.*, 1993; Erwin y Ribeiro, 1996). En México, *Ph. cinnamomi* ha causado daños en extensas áreas productoras de aguacate (*Persea americana* L.), como en Atlixco, Puebla, cuyo cultivo ha desaparecido de grandes regiones (Téliz y Mora, 2007). Además, incide en especies forestales en los bosques de El Arrayanal, en el estado de Colima, donde provocó la muerte de árboles de encino (Tainter *et al.*, 2000); lo mismo ocurrió en Tecoaapa, Guerrero (Alvarado *et al.*, 2008).

Este oomicete fitopatógeno es muy agresivo para las plantas, y repercute en aspectos económicos diversos (Hardham, 2005). Los síntomas característicos de la enfermedad a partir del daño radicular, consisten en clorosis del follaje, su marchitamiento y en un rápido desprendimiento del mismo, lo que propicia una reducción en la transpiración (Erwin y Ribeiro, 1996; Moralejo *et al.*, 2009). Ingresa a la planta a través de la raíz y también invade la base del tronco de su hospedante, pero las plantas poseen mecanismos de defensa que impiden que el organismo avance, limitando su infección; algunas de estas defensas son las barreras bioquímicas preformadas y los compuestos fenólicos. La resistencia de la planta a los patógenos que afectan la raíz con frecuencia se evalúa a nivel histológico (Glazebrook, 2005; Obwald *et al.*, 2014). Por lo anterior, los objetivos de este estudio consistieron en determinar la susceptibilidad de plántulas de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. y *P. pseudostrobus* Lindl. a la infección por *Phytophthora cinnamomi*, así como realizar un análisis histológico de la raíz para describir los daños inducidos por este hongo.

## Materiales y Métodos

Se trabajó con 48 árboles de 11 meses de edad donados por el vivero forestal Molino de las Flores, a razón de 24 individuos por especie (*P. patula* y *P. pseudostrobus*), que se mantuvieron en condiciones de invernadero, para posteriormente ser inoculados. El experimento se realizó en dos etapas: la primera fase consistió en la incorporación de *Phytophthora cinnamomi* en las plantas, mientras que la segunda se basó en el proceso histológico de las muestras inoculadas; se seleccionaron las especies forestales citadas, debido a su amplio intervalo de adaptación y a su importancia comercial.

## Introduction

*Phytophthora cinnamomi* Rands, 1922 is a soil pathogen that causes root rot, which in the last century devastated 200 000 hectares of natural vegetation in Australia, and destroyed more than 400 host species (Malajczuk, 1979). It is also responsible for serious annual losses of chestnut (*Castanea sativa* Miller), cranberry plants (*Vaccinium myrtillus* L.) and ornamental plants within the forest nurseries of the United States of America. This pathogen has also been reported in Argentina, Spain, South Africa, South America and Taiwan where it attacks a large number of hosts (Zentmyer, 1980; Robin *et al.*, 1992; Brasier *et al.*, 1993; Erwin and Ribeiro, 1996). In Mexico, *Ph. cinnamomi* has caused extensive damage to areas producing avocado (*Persea americana* L.), as in Atlixco, Puebla, where the crop has disappeared from large regions (Téliz and Mora, 2007). In addition, it affects species in El Arrayanal forests, in the state of Colima, where it caused the death of oak trees (Tainter *et al.*, 2000); the same is true in Tecoaapa, Guerrero (Alvarado *et al.*, 2008).

This phytopathogenic oomycete is very aggressive to plants, and has repercussions on diverse economic aspects (Hardham, 2005). The typical symptoms of this disease from root damage are foliar chlorosis, their wilting and rapid detachment, leading to a reduction in transpiration (Erwin and Ribeiro, 1996; Moralejo *et al.*, 2009). It enters the plant through the root and also invades the base of the trunk of its host, but the plants have defense mechanisms that prevent the organism from advancing, limiting its infection; some of these defenses are preformed biochemical barriers and phenolic compounds. Plant resistance to root-affecting pathogens is frequently assessed histologically (Glazebrook, 2005; Obwald *et al.*, 2014). Therefore, the objectives of this study were to determine the susceptibility of *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. and *P. pseudostrobus* Lindl. to infection by *Phytophthora cinnamomi*, as well as performing a histological analysis of the root to describe the damage induced by this fungus.

## Materials and Methods

A total of 48 trees of 11 months of age were donated by the Molino de las Flores forest nursery with 24 individuals per species (*P. patula* and *P. pseudostrobus*), which were kept in greenhouse conditions, to be inoculated later. The experiment was carried out in two stages: the first phase consisted of the incorporation of *Phytophthora cinnamomi* in the plants, while the second one was based on the histological process of the inoculated samples; the aforementioned forest species were selected because of their wide range of adaptation and their commercial importance.



## Prueba de patogenicidad

Se aplicó el método de inoculación de sustrato con micelio, que consiste en tomar colonias de *Phytophthora cinnamomi* para obtener inóculo a una concentración de  $3.3 \times 10^8$  fragmentos miceliales. Los árboles se inocularon a raíz desnuda por inmersión en la suspensión de fragmentos miceliales durante 3 h; como testigo se usaron 12 plantas de cada especie, a las cuales se les sumergió la raíz solo en agua destilada estéril. Una vez pasadas las 3 h, cada árbol se plantó en un sustrato estéril compuesto por Peat Moss y tierra de monte estéril en una relación de 3:1. Las plantas se sometieron a 100 % de humedad relativa y una temperatura  $22 \pm 3$  °C durante 72 h; se mantuvieron en el invernadero en condiciones de manejo normal.

Antes de la aparición de síntomas, se obtuvieron muestras de raíces de 10 mm de longitud, tanto de los árboles inoculados como de los testigo. Una vez que se observaron los primeros indicios de daño, se tomaron las siguientes muestras, para lo cual se realizó un corte de la raíz de aproximadamente 1 cm, que se sumergió en una solución fijadora a base de una mezcla de formaldehído, ácido acético glacial, agua destilada y alcohol etílico al 96 % (FAA). En total se realizaron seis recolecciones de muestras de cada especie de *Pinus* a intervalos de 4 días a partir de la inoculación.

## Análisis histológico

Para el procesamiento de las muestras para estudios histológicos, se siguió el procedimiento modificado descrito por Leyva *et al.* (2012) y Tovar *et al.* (2012). Para ello, se lavaron muestras de raíz fijadas en la solución de FAA con agua corriente durante 10 min y se infiltraron en un procesador automático de tejidos modelo 4640-B (Tissue-Tek II®). La deshidratación se realizó en una serie gradual de alcohol etílico (30, 50, 70, 85, 96 y 100 %), después de lo cual se pasaron por una mezcla de etanol absoluto-xileno (1:1) y tres cambios de xileno al 100 % a intervalos de 2 h en cada uno de los cambios. La inclusión en Paraplast (Sigma®) se llevó a cabo durante 96 h.

Con la ayuda de un micrótopo de rotación Spencer 820 (American Optical®) se obtuvieron cortes transversales de 10 µm de cada muestra, mismos que se colocaron en baño de flotación a 45-50 °C. Bajo estas condiciones los cortes se extendieron y adhirieron a los portaobjetos. Los cortes obtenidos se desparafinaron en tres cambios de xileno absoluto (3 min cada uno). Paso seguido, las se hidrataron en alcohol etílico al 100, 96 y 70 % (3 min en cada cambio); se tiñeron con safranina (Sigma®) al 1 % durante 24 h y se enjuagaron con agua corriente hasta que el agua se tornó cristalina. Enseguida, las secciones se lavaron con alcohol etílico al 50, 70 y 96 % (3 min cada uno) más ácido pícrico y se tiñeron con verde rápido (Química Técnica®) durante 10 s. Después, se lavaron con aceite de clavo para retirar el exceso de colorante y se aclararon con una mezcla de aceite

## Pathogenicity test

The inoculation method of substrate with mycelium was applied, which consists of taking colonies of *Phytophthora cinnamomi* to obtain inoculum at a concentration of  $3.3 \times 10^8$  mycelial fragments. The trees were inoculated bare root by immersion in the suspension of mycelial fragments for 3 h; 12 plants of each species were used as a control, to which their root was put just into sterile distilled water. After 3 h, each tree was planted on a sterile substrate composed of Peat Moss and sterile forest soil in a ratio of 3:1. The plants were subjected to 100 % relative humidity and at  $22 \pm 3$  °C for 72 h and were kept in the greenhouse under normal handling conditions.

Before the onset of symptoms, root samples of 10 mm in length were obtained from both inoculated and control trees. Once the first signs of damage were observed, the following samples were taken, for which a root cut of approximately 1 cm was made, which was immersed in a fixative solution based on a mixture of formaldehyde, glacial acetic acid, distilled water and 96 % ethyl alcohol (FAA). In total, six samples were collected from each species of *Pinus* at 4-day intervals after inoculation.

## Histological analysis

For the processing of the samples for histological studies, the modified procedure described by Leyva *et al.* (2012) and Tovar *et al.* (2012) was used. Thus, root samples fixed in the FAA solution were washed with running water for 10 min and infiltrated in an automated tissue processor model 4640-B (Tissue-Tek II™). Dehydration was carried out in a gradual series of ethyl alcohol (30, 50, 70, 85, 96 and 100 %), after which they were passed through a mixture of absolute ethanol-xylene (1:1) and three xylene changes at 100 % at 2 h intervals in each of the changes. Inclusion in Paraplast (Sigma™) was carried out for 96 h.

With the aid of a Spencer 820 (American Optical®) rotating microtome, 10 µm cross sections of each sample were obtained, which were placed in a flotation bath at 45-50 °C. Under these conditions the cuts were spread and adhered to the slides. The cuts were dewaxed in three changes of absolute xylene (3 min each). Subsequently, they were hydrated in ethyl alcohol at 100, 96 and 70 % (3 min at each change), and stained with safranin (Sigma™) 1 % for 24 h and rinsed with running water until the water became crystalline. The sections were then washed with 50, 70 and 96 % ethyl alcohol (3 min each) plus picric acid and stained with rapid green (Technical Chemistry™) for 10 s. Afterwards, they were washed with clove oil to remove excess dye and rinsed with a mixture of clove oil, xylene and absolute ethanol. To conclude, the samples were placed in 100 % xylene, mounted on synthetic resin and examined in a composite microscope (Olympus BX41).

de clavo, xileno y etanol absoluto. Para finalizar, las muestras se colocaron en xileno al 100 %, se montaron en resina sintética y se examinaron en un microscopio compuesto (*Olympus BX41*).

## Resultados y Discusión

### Prueba de patogenicidad

*Phytophthora cinnamomi* indujo diferentes síntomas según el tiempo de infección en las dos especies de *Pinus* inoculadas artificialmente, mientras que las plantas testigo no presentaron ningún cambio apreciable y permanecieron asintomáticas (Figura 1A y 2A). Cuatro días después de la inoculación (ddi), las plantas de *P. patula* mantuvieron su vigor y su apariencia (Figura 1B), además de que no exhibieron signos del patógeno. A los 8 ddi los árboles mostraron severo decaimiento de acículas, a partir de la sección superior del árbol (Figura 1C). A los 12 ddi, aunado al decaimiento del árbol, se apreció amarillamiento de las acículas, y, en la base del árbol, algunas de ellas se secaron y adquirieron una coloración amarilla y café-clara (Figura 1D). A los 16 ddi la deshidratación de acículas se tornó más evidente y la parte de arriba del tallo tomó una coloración grisácea (Figura 1E). A los 20 ddi los árboles estaban secos en más de tres cuartas partes y tenían color café intenso, además de pérdida de vigor y a los 24 ddi estaban completamente secos (Figura 1F).

## Results and Discussion

### Pathogenicity test

*Phytophthora cinnamomi* induced different symptoms according to the infection time in the two artificially inoculated *Pinus* species, whereas the control plants showed no appreciable change and remained asymptomatic (Figure 1A and 2A). Four days after inoculation (dai), *P. patula* plants maintained their vigor and appearance (Figure 1B), in addition to showing no signs of the pathogen. At 8 dai the trees showed severe decay of needles, from the upper section of the tree (Figure 1C). At 12 dai, together with the decay of the tree, yellowing of the needles was observed, and at the base of the tree some of them dried and got a yellow and light brown coloration (Figure 1D). At 16 dai the dehydration of needles became more evident and the top of the stem took a greyish colouration (Figure 1E). At 20 dai, the trees were dry in more than three-quarters and had an intense brown color in addition to loss of vigor and at 24 dai were completely dry (Figure 1F).

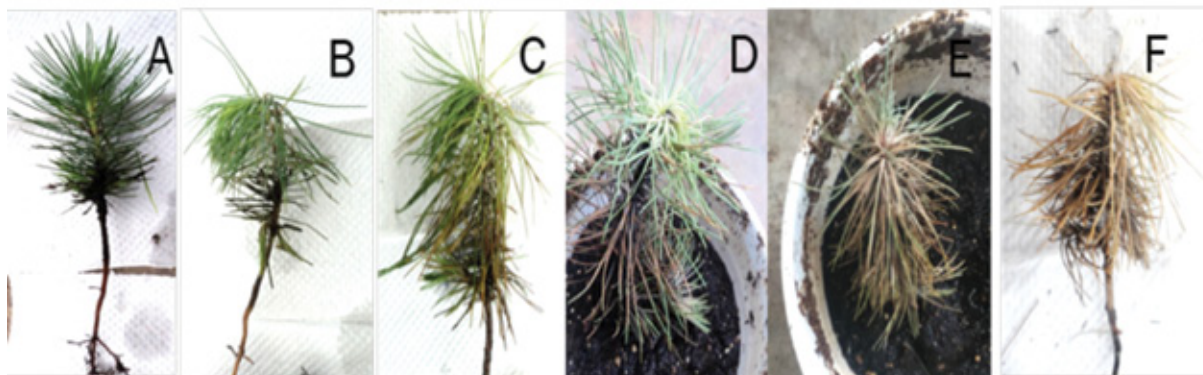


Figura 1. Síntomas causados por *Phytophthora cinnamomi* Rands, 1922 en plántulas de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. observados a diferentes días después de la inoculación (ddi). (A) Planta testigo, B) Planta a 4 ddi, C) Planta a 8 ddi, D) Planta a 12 ddi, E) Planta a 16 ddi, F) Planta a 20 ddi.

Figure 1. Symptoms caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands, 1922 in *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. seedlings observed at different days after inoculation (dai). (A) Control plant, B) Plant at 4 dai, C) Plant at 8 dai, D) Plant at 12 dai, E) Plant at 16 dai, F) Plant at 20 dai.

Por otra parte, los ejemplares de *P. pseudostrobus* inoculados no exhibieron signos que indicaran la presencia del patógeno, además de que conservaron su tono y su vigor hasta los 4 ddi (Figura 2B). A los 8 ddi se pudo distinguir un muy ligero decaimiento de acículas, las cuales empezaron a perder turgencia (Figura 2C). A los 12 ddi los árboles experimentaron un decaimiento visible de acículas con un amarillamiento incipiente (Figura 2D). A los

On the other hand, the inoculated *P. pseudostrobus* did not show signs indicating the presence of the pathogen, in addition to maintaining their tone and vigor until 4 dai (Figure 2B). At 8 dai it was possible to distinguish a very slight decay of needles, which began to lose turgor (Figure 2C). At 12 dai the trees experienced a visible decay of needles with incipient yellowing (Figure 2D). At 16 dai the weakening of the same

16 ddi el debilitamiento de las mismas prevaleció y comenzó a destacarse un color café claro en ellas (Figura 2E). A los 20 ddi estas estructuras ya no tenían turgencia y la mayor parte del árbol se cambió hacia un tono café (Figura 2F).

Los daños que evidenció la parte aérea de las plantas de *P. patula* fueron ostensibles a partir de la declinación del árbol, que consistió en un marchitamiento de la copa; a esto continuó un amarillamiento de las acículas para después tornarse café y luego marrón, lo que continuó hasta que el árbol quedó completamente seco. Las acículas se hicieron frágiles y se desprendían con facilidad, y, por su parte, las raíces se volvieron quebradizas y con necrosis.

En *P. pseudostrobus* los síntomas fueron semejantes, con la diferencia de que el decaimiento de las acículas fue gradual, es decir más lento, sin embargo, después se verificó su amarillamiento hasta que el árbol estuvo muerto. De igual forma, las raíces se tornaron frágiles y necrosadas. El aspecto anterior coincidió con lo descrito por Zentmyer (1980) y Chavarriga et al. (2007) para ejemplares de *Pinus* spp. infectados por *Phytophthora cinnamomi*.

#### Análisis histológico de raíces de *P. patula*

Los árboles testigo no registraron cambios significativos durante todo el proceso. El corte histológico correspondiente a las raíces de estos ejemplares reveló la presencia de la peridermis, conformada por una capa de células lignificadas (esclereidas) y por la hipodermis ubicada por debajo de la capa anterior (Figura 3A). El floema y el xilema no exhibieron ninguna alteración ni estructuras fúngicas (Figura 3B).

prevaleció and a light brown color began to appear in them (Figure 2E). At 20 dai these structures no longer had turgor and most of the tree changed to a brown tone (Figure 2F).

The damages that the aerial part of the plants of *P. patula* evidenced were ostensible from the decline of the tree, which consisted of a wilting of the crown; to this continued a yellowing of the needles to later become brown and then redish-brown, which continued until the tree was completely dry. The needles became fragile and easily detached, and the roots became brittle and necrotic.

In *P. pseudostrobus* the symptoms were similar, with the difference that the decay of the needles was gradual, i. e. slower, however, afterwards their yellowing was verified until the tree was dead. Similarly, the roots became brittle and necrotic. The previous aspect coincided with that described by Zentmyer (1980) and Chavarriga et al. (2007) for specimens of *Pinus* spp. infected by *Phytophthora cinnamomi*.

#### Histological analysis of roots of *P. patula*

Control trees did not register significant changes throughout the process. The histological cut corresponding to the roots of the controls revealed the presence of the periderm, made up of a layer of lignified cells (sclereids) and the hypodermis located below the previous layer (Figure 3A). Phloem and xylem exhibited no alteration or fungal structures (Figure 3B).

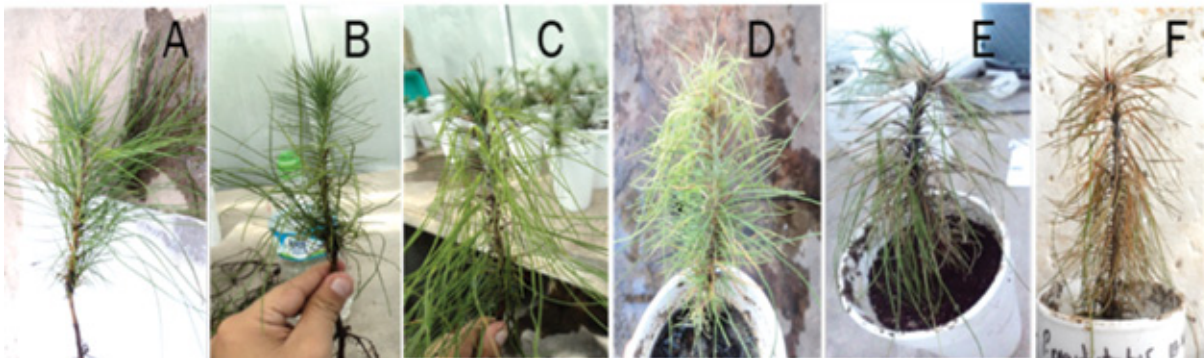


Figura 2. Síntomas causados por *Phytophthora cinnamomi* Rands, 1922 en plántulas de *Pinus pseudostrobus* Lindl. observados a diferentes días después de la inoculación (ddi). (A) Planta testigo, B) Planta a 4 ddi, C) Planta a 8 ddi, D) Planta a 12 ddi, E) Planta a 16 ddi, F) Planta a 20 ddi.

Figure 2. Symptoms caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands, 1922 in *Pinus pseudostrobus* Lindl. seedlings observed at different days after inoculation (dai). (A) Control plant, B) Plant at 4 dai, C) Plant at 8 dai, D) Plant at 12 dai, E) Plant at 16 dai, F) Plant at 20 dai.

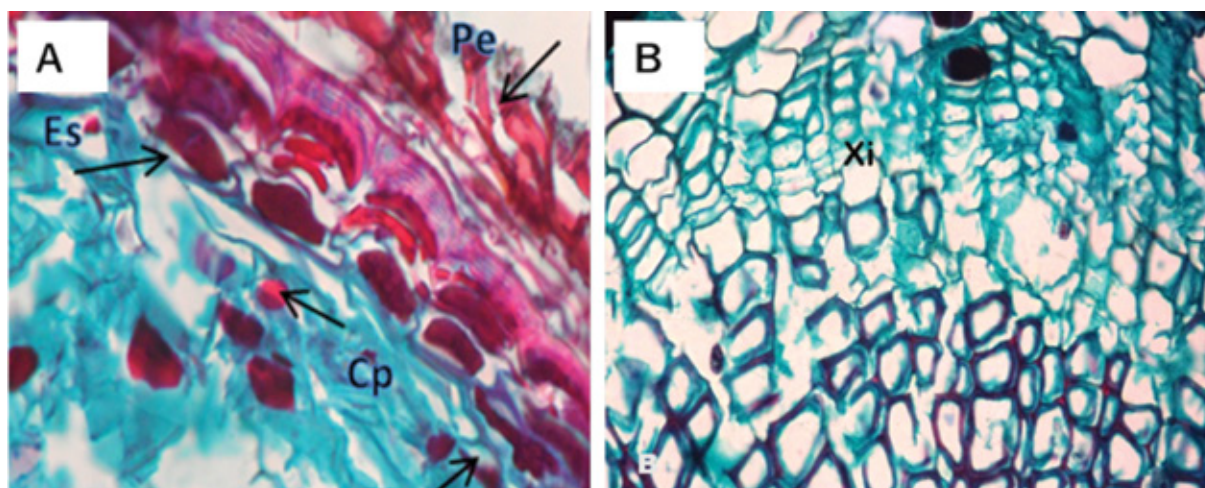


Figura 3. Microfotografía de corte transversal de raíz sana de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. A) Vista de peridermis (Pe), contenido de polifenoles (Cp) y esclereidas (Es). B) Floema (Flo) y xilema (Xi).  
 Figure 3. Cross-sectional micrograph of a healthy root of *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. A) View of periderm (Pe), content of polyphenols (Cp) and sclereids (Es). B) Phloem (Flo) and xylem (Xi).

El análisis histológico de raíces recolectadas a los 4 ddi no mostró modificaciones importantes, ya que la estructura celular (peridermis, floema y xilema) se mantuvo en orden. Sin embargo, se observaron indicios de polifenoles en las células del xilema (Figura 4A). A los 8 ddi, en este último ocurrió desprendimiento de paredes, pero sin taponamiento de haces vasculares, ni existencia de cuerpos fúngicos, y, al igual que en la muestra anterior, el contenido de polifenoles fue muy escaso (Figura 4B). A los 12 ddi, se identificó una reducción en los polifenoles en el xilema, que fueron densos y más grandes que en los materiales colectados a los 8 ddi, además de que hubo necrosamiento en la peridermis, aunque aún conservó su estructura (Figura 4C y D). En las muestras recolectadas a los 16 ddi se advirtió adelgazamiento de la peridermis, nula presencia de esclereidas y estabilidad en el contenido de polifenoles (Figura 4E). A los 20 ddi se formó una textura rugosa de las paredes del xilema, lo que es atípico en el tejido sano (Figura 4F). Asimismo, a los 32 ddi, los árboles mostraron necrosis generalizada en la peridermis de la raíz y los tejidos como el xilema y el floema ya no fueron reconocibles (Figura 4G).

#### Análisis histológico de raíces de *P. pseudostrobus*

Al igual que en *P. patula*, los árboles testigo no presentaron cambios significativos en ningún momento. La estructura del corte histológico correspondiente a sus raíces estaba constituida por la peridermis, que a su vez estaba conformada por una capa de células lignificadas (esclereidas), por debajo de la cual se identificó la hipodermis. El floema no sufrió alteraciones y el xilema no exhibió células con polifenoles ni estructuras fúngicas.

A los 4 ddi, la muestra histológica de los árboles inoculados de *P. pseudostrobus* mostró presencia moderada de polifenoles en el

The histological analysis of roots collected at 4 dai did not show any significant modifications, since the cellular structure (periderm, phloem and xylem) remained in order. However, evidence of polyphenols was observed in xylem cells (Figure 4A). At 8 dai, in the latter, there was wall detachment, but no vascular bundle obstruction, nor existence of fungal bodies, and, as in the previous sample, the polyphenol content was very scarce (Figure 4B). At 12 dai, a reduction in the polyphenols in the xylem was observed, which were dense and larger than in the materials collected at 8 dai, in addition to necrosis in the periderm, although the latter still retained its structure (Figure 4C and D). In the samples collected at 16 dai it was noticed thinning of the periderm, null presence of sclereids and stability in the content of polyphenols (Figure 4E). At 20 dai, a rough appearance of the xylem walls was found, which is atypical in healthy tissue (Figure 4F). Also, at 32 dai, trees showed generalized necrosis in the root periderm and tissues such as xylem and phloem were no longer recognizable (Figure 4G).

#### Histological analysis of roots of *P. pseudostrobus*

As in *P. patula*, control trees showed no significant changes at any time. The structure of the histological cut corresponding to its roots was constituted by the periderm, which in turn was conformed by a layer of lignified cells (sclereids), below which the hypodermis was identified. The phloem did not suffer alterations and the xylem did not exhibit cells with polyphenols or fungal structures.

At 4 dai, the histological sample of the inoculated trees of *P. pseudostrobus* showed moderate presence of polyphenols in the xylem (Figure 5A and B). At 8 dai it revealed a large number of them in both the xylem and the phloem, in addition

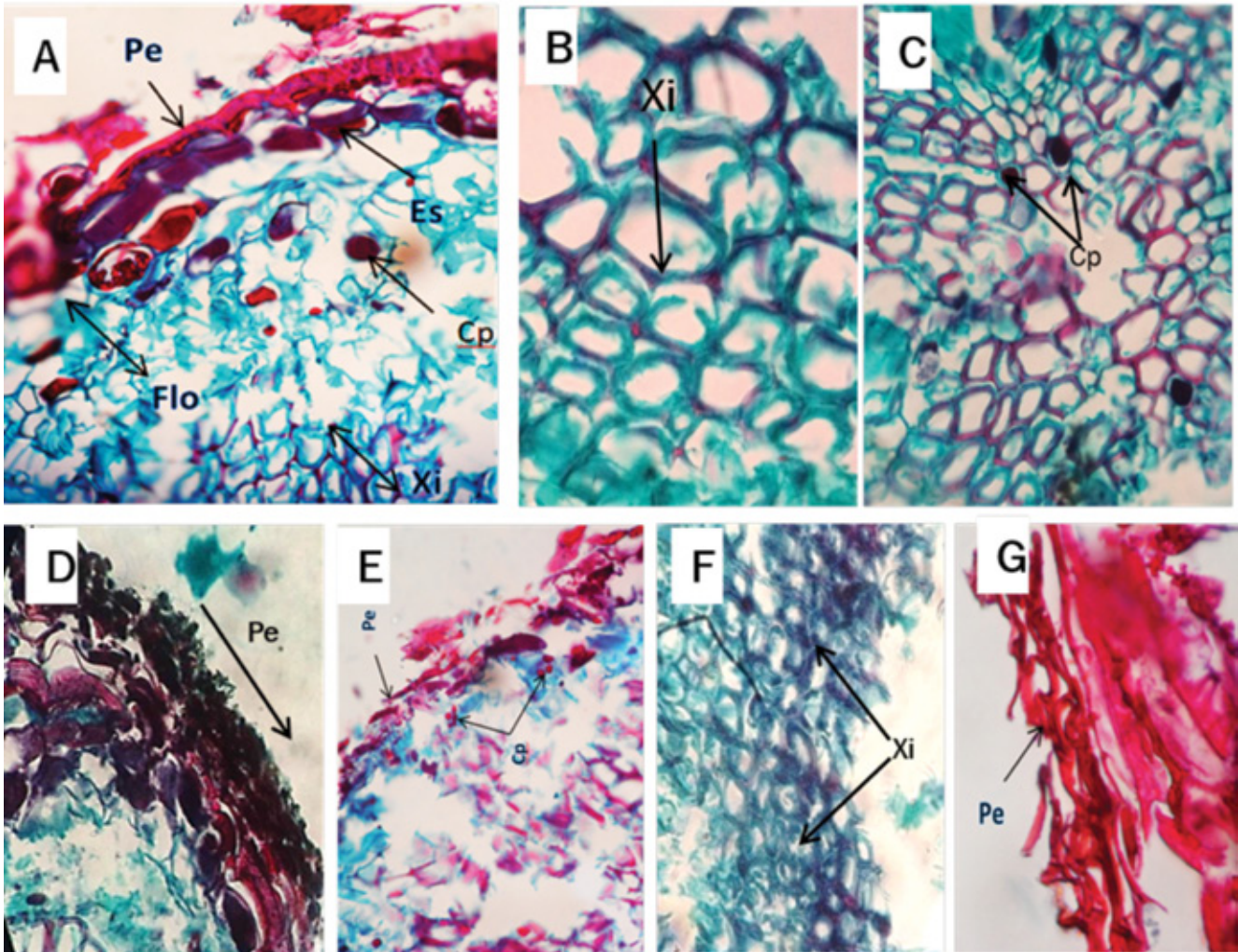


Figura 4. Microfotografía de corte transversal de la raíz de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. infectada por *Phytophthora cinnamomi* Rands, 1922. A) Peridermis (Pe), esclereidas (Es) floema (Flo), contenido de polifenoles (Cp) y xilema (Xi) a los 4 días después de la inoculación (ddi). B) Corte trasversal de raíz con alteraciones de los tejidos, observándose desprendimiento de las paredes del xilema (Xi) a los 8 ddi. C y D) Corte trasversal de raíz con presencia de polifenoles (Cp) en el xilema a los 12 ddi. E) Peridermis (Pe) y contenido de polifenoles (Cp) a los 16 ddi. F) Corte trasversal de raíz mostrando xilema (Xi) con paredes rugosas a los 20 ddi. G) Peridermis (Pe) a los 32 ddi.

Figure 4. Cross-sectional micrograph of the *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. root infected by *Phytophthora cinnamomi* Rands, 1922. A) Periderm (Pe), sclereids (Es) phloem (Flo), content of polyphenols (Cp) and xylem (Xi) at 4 days after inoculation (dai). B) Root cross section with alterations of the tissues, observing detachment of the xylem walls (Xi) at 8 dai. C and D) Root cross section with presence of polyphenols (Cp) in the xylem at 12 dai. E) Periderm (Pe) and content of polyphenols (Cp) at 16 dai. F) Root cross section showing xylem (Xi) with rough walls at 20 dai. G) Periderm (Pe) at 32 dai.

xilema (Figura 5A y B). A los 8 ddi reveló una gran cantidad de ellos tanto en el xilema como en el floema, además de la formación de tífides en los vasos del xilema (Figura 5C). A los 12 ddi se observó un adelgazamiento de la peridermis, mayor número de polifenoles e incluso incremento del tamaño en las células del floema (Figura 5D). A los 16 ddi el corte histológico del xilema mostró un engrosamiento de sus paredes (Figura 5E). A los 20 ddi se verificó una completa desorganización celular de los elementos de la raíz (Figura 5F) y a los 32 ddi los árboles se murieron.

to the formation of tyloses in the xylem vessels (Figure 5C). At 12 dai, there was a thinning of the periderm, a greater number of polyphenols and even an increase in size in phloem cells (Figure 5D). At 16 dai the histological section of the xylem showed a thickening of its walls (Figure 5E). At 20 dai, a complete cellular disorganization of the root elements was verified (Figure 5F) and at 32 dai the trees died.



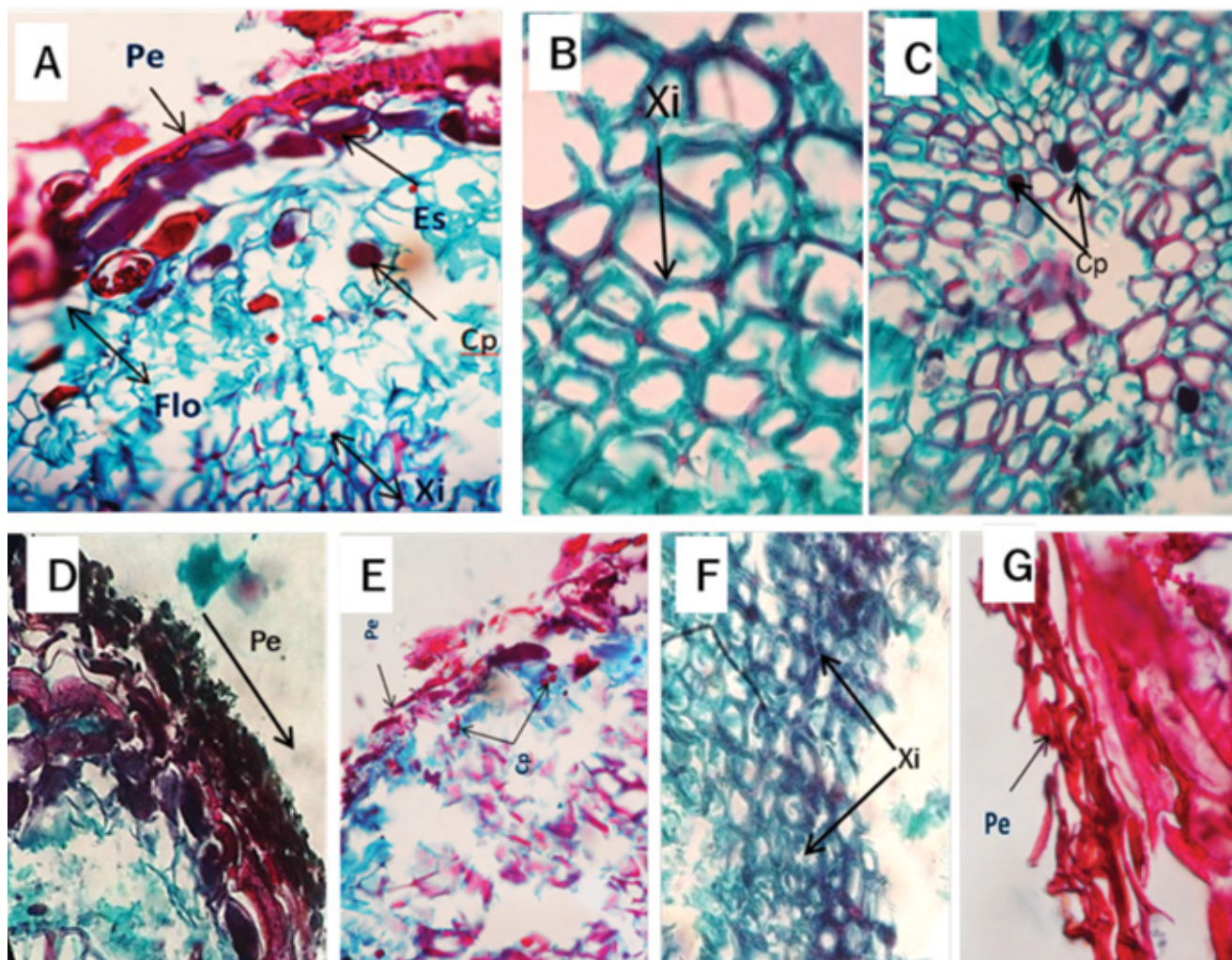


Figura 5. Microfotografía de corte transversal de la raíz de *Pinus pseudostrobus* Lindl. infectada por *Phytophthora cinnamomi* Rands, 1922. A y B) Presencia de polifenoles (Cp) en el xilema a los 4 días después de la inoculación (ddi). C) Tílides (Ti) en el xilema a los 8 ddi. D) Peridermis (Pe), contenido de polifenoles (Cp) y floema (Flo) a los 12 ddi. E) Xilema normal (XiN) y xilema engrosado (XiE) a los 16 ddi. F) Peridermis (Pe) a los 20 ddi.

Figure 5. Cross-sectional micrograph of the root of *Pinus pseudostrobus* Lindl. infected by *Phytophthora cinnamomi* Rands, 1922. A and B) Presence of polyphenols (Cp) in the xylem at 4 days after inoculation (dai). C) Tyloses (Ti) in the xylem at 8 dai. D) Periderm (Pe), content of polyphenols (Cp) and phloem (Flo) at 12 dai. E) Normal xylem (XiN) and thickened xylem (XiE) at 16 dai. F) Periderm (Pe) at 20 dai.

En el análisis histológico realizado en plantas de *P. patula* infectadas por *Ph. cinnamomi* se observó daño en el floema y en menor medida en el xilema, comportamiento propio de la infección por especies del género *Phytophthora* generalmente desarrollado como producto de la invasión de hifas sobre la corteza (Brummer *et al.*, 2002; Oh y Hansen, 2007; Horta *et al.*, 2010; Portz *et al.*, 2011). Además, el xilema exhibió desprendimiento celular, lo que indica la pérdida severa de turgencia, y degradación de las paredes celulares, probablemente por efecto de las enzimas extracelulares como pectinas, las cuales son producidas por especies de *Phytophthora* (Brummer *et al.*, 2002). Asimismo, se detectaron polifenoles y necrosamiento de

In the histological analysis carried out on *P. patula* plants infected with *Phytophthora cinnamomi*, phloem and, to a lesser extent, xylem damage, were observed. This behavior is typical of the infection of species of the genus *Phytophthora* generally developed as a result of the invasion of hyphae on the bark (Brummer *et al.*, 2002; Oh y Hansen, 2007; Horta *et al.*, 2010; Portz *et al.*, 2011). In addition, xylem exhibited cellular detachment, indicating severe loss of turgidity and degradation of cell walls was probably recognized by extracellular enzymes such as pectins, which are produced by *Phytophthora* species (Brummer *et al.*, 2002). Also, polyphenols and periderm necrosis were detected, which is common in infections induced by *Phytophthora* spp. (Erwin and Ribeiro, 1996).



la peridermis, lo cual es común en infecciones inducidas por el hongo. (Erwin y Ribeiro, 1996).

Por otra parte, las plantas inoculadas de *P. pseudostrabus* mostraron el xilema menos afectado en comparación con el floema, además de que hubo una gran concentración de polifenoles, principalmente en el xilema. Esto pudiera deberse a que la síntesis y la acumulación de fenoles aumenta después de haberse producido la infección; varios de estos compuestos son potentes inhibidores de diversas enzimas hidrolíticas incluyendo las pectolíticas. Se observaron tálides en los vasos del xilema, que debido a su tamaño y abundancia, pueden obstruir los vasos por completo y bloquear, así, el avance del patógeno. En general, las variedades vegetales que forman pocas tálides o ninguna frente al patógeno son siempre susceptibles a las enfermedades (Agrios, 2005).

Los tejidos presentaron engrosamiento de las paredes celulares debido a una plasmólisis por un desequilibrio grave en la osmorregulación de las raíces, así como necrosamiento de la peridermis.

A pesar de confirmar diversos cambios en los tejidos internos de la raíz, no se detectaron hifas de *Ph. cinnamomi*, debido, tal vez, a que varias de *Phytophthora* spp. son capaces de infectar directamente el tronco de ciertas especies hospedantes por medio de lenticelas, raíces adventicias o heridas, y luego invaden y destruyen con suma rapidez la corteza y el tejido del floema. Tal es el caso de la acción del patógeno referido sobre *Eucalyptus marginata* Donn ex Sm. (Hardy *et al.*, 1996) y *E. calophylla* Lindl. (O'Gara *et al.*, 1997), que invadió a los ejemplares por el tronco. Sin embargo, estudios realizados por Ruiz *et al.* (2015) en plantas de *Quercus ilex* L. de seis meses de edad e inoculadas con *Ph. cinnamomi*, registraron una colonización del apoplasto y penetración en las células corticales. Al llegar a los tejidos parenquimatosos del cilindro central, el hongo desarrolló diferentes estructuras reproductivas dentro de la célula y provocó algunas respuestas por parte del hospedante como el engrosamiento de la pared celular y la acumulación de compuestos fenólicos.

## Conclusiones

Las raíces de *Pinus pseudostrabus* y de *Pinus patula* infectadas con *Phytophthora cinnamomi* mostraron diversas alteraciones histológicas como aumento del contenido de polifenoles, degradación de paredes celulares, presencia de tálides y necrosamiento de la peridermis. Las alteraciones fueron más ostensibles en los árboles de *P. pseudostrabus*.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Elizabeth Cárdenas Soriano por el apoyo otorgado durante la interpretación de los

On the other hand, the inoculated plants of *P. pseudostrabus* showed the less affected xylem in comparison to the phloem, in addition to that there was a great concentration of polyphenols, mainly in the xylem. This could be explained by the synthesis and accumulation of phenols increases after infection has occurred; several of these compounds are potent inhibitors of various hydrolytic enzymes including the pectolytics. Tyloses were observed in the vessels of the xylem, which because of their size and abundance, can obstruct the vessels completely and thus block the progression of the pathogen. In general, plant varieties that form few tyloses or none against the pathogen are always susceptible to diseases (Agrios, 2005).

The tissues showed thickening of the cell walls due to a plasmolysis from a serious imbalance in the osmoregulation of the roots, as well as necrosis of the periderm.

Despite confirming various changes in the internal tissues of the root, no hyphae of *Ph. cinnamomi* were detected, perhaps due to several of *Phytophthora* spp. Are capable of directly infecting the trunk of certain host species by means of lenticels, adventitious roots, or wounds, and then rapidly invade and destroy the bark and phloem tissue. Such is the case of the action of the pathogen on *Eucalyptus marginata* Donn ex Sm. (Hardy *et al.*, 1996) and *E. calophylla* Lindl. (O'Gara *et al.*, 1997), which invaded the specimens by the trunk. However, studies by Ruiz *et al.* (2015) in six-month-old *Quercus ilex* L. plants inoculated with *Ph. cinnamomi* recorded colonization of apoplast and penetration into cortical cells. Upon reaching the parenchymal tissues of the central cylinder, the fungus developed different reproductive structures within the cell and caused some host responses such as thickening of the cell wall and accumulation of phenolic compounds.

## Conclusions

The roots of *Pinus pseudostrabus* and *Pinus patula* infected with *Phytophthora cinnamomi* showed diverse histological alterations such as increase of polyphenol content, degradation of cell walls, presence of tyloses and necrosis of the periderm. The alterations were more evident in the trees of *P. pseudostrabus*.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Elizabeth Cárdenas Soriano for the support given during the interpretation of results. Likewise, to Dr. Guadalupe Valdovinos Ponce, from *Colegio de Postgraduados* for facilitating the laboratory equipment to perform the histological analysis.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

resultados. Asimismo, a la Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce, del Colegio de Postgraduados por facilitar el equipo de laboratorio para la realización del análisis histológico.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Contribución por autor

Santos Gerardo Leyva Mir: definición del estudio, toma de datos y redacción del manuscrito; Nancy Patricia Nava García y Betsabé Diego Martínez: prueba de patogenicidad y análisis histopatológico; Alejandra Almaraz Sánchez: análisis histopatológico; Silvia Mariel Hernández Villalobos: prueba de patogenicidad y revisión del manuscrito; Juan Manuel Tovar Pedraza: definición del estudio, redacción y revisión del manuscrito.

## Referencias

- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. Elsevier Academic Press. San Diego, CA, USA. 922 p.
- Alvarado R., D., R. L. Saavedra y S. A. Almaraz. 2008. Primer reporte de *Phytophthora cinnamomi* Rands asociado al encino (*Quercus* spp.) en Tecoaapa, Guerrero, México. *Agrociencia* 42: 565-572.
- Brasier, C. M., F. Robredo and J. F. P. Ferraz. 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathology* 42: 140-145.
- Brummer, M., M. Arend, J. Fromm, A. Schlenzig and W. F. Obwald. 2002. Ultrastructural changes and immunocytochemical localization of the elicitor quercinin in *Quercus robur* L. roots infected with *Phytophthora quercina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 109-120.
- Chavarriga, D., W. J. A. Bodles, C. Leifert, L. Belbahri and S. Woodward. 2007. *Phytophthora cinnamomi* and other fine root pathogens in north temperate pine forests. *FEMS Microbiology Letters* 276(1): 67-74.
- Erwin, D. C. and O. K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press. St. Paul, MN, USA. 562 p.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanism of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-227.
- Hardam, A. R. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology* 6(6): 589-604.
- Hardy, G. E. St. J., I. J. Colquhoun and P. Nielsen 1996. The early development of disease caused by *Phytophthora cinnamomi* in *Eucalyptus marginata* and *Eucalyptus calophylla* growing in rehabilitated bauxite mined areas. *Plant Pathology* 45: 944-54.

## Contribution by author

Santos Gerardo Leyva Mir: definition of the study, data collection and writing of the manuscript; Nancy Patricia Nava García and Betsabé Diego Martínez: pathogenicity test and histopathological analysis; Alejandra Almaraz Sánchez: histopathological analysis; Silvia Mariel Hernández Villalobos: pathogenicity test and review of the manuscript; Juan Manuel Tovar Pedraza: definition of the study, writing and review of the manuscript.

End of the English version



- Horta, M., P. Caetano, C. Medeira, I. Maia and A. Cravador. 2010. Involvement of the beta-cinnamomin elicitor in infection and colonization of cork oak roots by *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology* 127: 427-436.
- Leyva M., S. G., E. Cárdenas S., J. M. Tovar P., J. Huerta E. y H. E. Villaseñor M. 2012. Estimación histopatológica del grado de infección inducido por *Stagonospora nodorum* en plántulas de trigo. *Agronomía* 20(1): 7-16.
- Malajczuk, N. 1979. Biological suppression of *Phytophthora cinnamomi* in eucalyptus and avocado in Australia. In: Schippers, B. and W. Gams (eds). *Soil plant pathogens*. Academic Press. New York, NY, USA. pp. 635-652.
- Moralejo, E., M. J. García and E. Descals. 2009. Susceptibility of Iberian trees to *Phytophthora ramorum* and *P. cinnamomi*. *Plant Pathology* 58: 271-283.
- Obwald, W., F. Fleischmann, D. Rigling, J. Diez, A. C. Coelho, A. Cravador, R. J. Dalio, M. Horta, H. Pfanz, C. Robin, G. Sipos, A. Solla, T. Cech, A. Chambery, S. Diamandis, E. Hansen, T. Jung, L. B. Orlikowski, J. Parke, S. Prospero and S. Werres. 2014. Strategies of attack and defense in woody plant-*Phytophthora* interactions. *Forest Pathology* 44: 169-190.
- Oh, E. and E. M. Hansen. 2007. Histopathology of infection and colonization of susceptible and resistant Port-Orford-Cedar by *Phytophthora lateralis*. *Phytopathology* 97(6): 684-693.
- O'Gara, E., J. A. McComb, I. C. Colquhoun and G. E. St. J. Hardy. 1997. The infection of non-wounded and wounded periderm tissue at the lower stem of *Eucalyptus marginata* by zoospores of *Phytophthora cinnamomi*, in a rehabilitated bauxite mine. *Australasian Plant Pathology* 26: 135-141.

- Portz, R. L., F. Fleischmann, J. Koehl, J. Fromm, D. Ernst, S. F. Pascholati and W. F. Osswald. 2011. Histological, physiological and molecular investigations of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola*. *Forest Pathology* 41: 202-211.
- Robin, C., M. L. Desprez L. and C. Delatour. 1992. Spatial and temporal enlargement of cankers of *P. cinnamomi* in red oak. *Canadian Journal of Forest Research* 22: 362-366.
- Ruiz G., F. J., R. M. Navarro C., R. Sánchez C. and A. Pérez de L. 2015. Histopathology of infection and colonization of *Quercus ilex* fine roots by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* 64:605-616.
- Tainter, F. H., J. G. O'Brien, A. Hernández and F. Orozco. 2000. *Phytophthora cinnamomi* as a cause of oak mortality in the state of Colima, Mexico. *Plant Disease* 84(4): 394-398.
- Téliz O., D. y A. Mora A. 2007. El aguacate y su manejo integrado. Ediciones Mundi-Prensa. México, D.F., México. 321 p.
- Tovar P., J. M., J. A. Mora A., C. Nava D., G. Valdovinos P., D. Téliz O., A. Villegas M. and J. Hernández M. 2012. Identification, pathogenicity and histopathology of *Lasiodiplodia theobromae* on sapote mamey grafts in Guerrero, Mexico. *Agrociencia* 46(2): 147-161.
- Zentmyer, A. G. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, USA. 96 p.

