

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS



**Facultad de
Ciencias**
Universidad Católica de la Santísima Concepción

**EVALUANDO EL DAÑO FOLIAR QUE AMENAZA LA *ARAUCARIA
ARAUCANA* (MOL.) K. KOCH, ESPECIE MILENARIA DEL BOSQUE
TEMPLADO DE CHILE USANDO CERAS DE HOJAS**

Por

GERALD ESTEBAN CIFUENTES PÉREZ

Memoria entregada a la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de la Santísima Concepción para optar al título profesional de Químico Ambiental.

Profesor Guía: Dr. Sergio Contreras

Concepción

2018



Acta de Certificación

Certifico que el trabajo de Tesis se realizó bajo mi dirección y ha sido aprobado.

Profesor Guía: Dr. Sergio Contreras Q.

Declaro que el contenido de esta tesis no se ha presentado total o parcialmente para optar a otro Título o Grado Académico.

Gerald Esteban Cifuentes Pérez

Nota del Informe de Práctica o Tesis: 6.90

Fecha de aprobación del Examen de Título y Grado:

_____ de _____ de 2019

Ministro de Fe: _____

AGRADECIMIENTOS

Me imagino que la estancia universitaria es distinta para cada estudiante, pero siempre y para todos existen y existirán altos y bajos. Tuve la suerte de conocer hermosas personas que ayudaron a ser más venidera y grata mi estadía, me apoyaron en momentos difíciles y me dieron risas y aventuras que siempre recordare, gracias Mari y Pollo.

Agradezco a la Universidad, a la Facultad de Ciencias y muchos docentes y compañeros que aportaron para ser la persona que soy ahora. Agradezco a mi profesor guía el Dr. Sergio Contreras que me mostro el camino y pude darme cuenta el deseo de hacer ciencia que tenía, por entregarme su confianza y ganas de superarme en cada momento. Les doy las gracias a los compañeros de Laboratorio de Ciencias Ambientales, Eduardo, Carol y Paty por aportar con sus conocimientos y disposición para cualquier duda que surgió en el desarrollo de la Tesis. Agradecer al proyecto Fondecyt 1160719 por entregar apoyo técnico y económico que sirvió para la realización de esta investigación.

Agradezco a mi familia, padres y hermanos por el amor y cariño, entrega, apoyo, fuerza y comprensión que me brindaron todos estos años.

A todos los mencionado y más, gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	12
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos.....	19
METODOLOGÍA.....	20
Área de estudio	20
Protocolo de muestreo	21
Extracción de lípidos de ceras de hojas.....	23
Derivatización.....	25
Cuantificación.....	25
Análisis de datos	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28

Abundancia total de ceras de hojas (ácidos grasos, alcanos y alcoholes) en individuos de <i>A. araucana</i> enferma y sana	28
Diferencias entre clases de ceras (ácidos grasos, n-alcanos y alcoholes) en individuos de <i>A. araucana</i> enferma y sana	34
<i>Ácidos grasos</i>	34
<i>n-alcanos</i>	39
<i>Alcoholes</i>	44
Factores causantes de la enfermedad o daño foliar	49
CONCLUSIÓN	53
BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXOS	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fracciones de lípidos separados con la columna de sílica gel.	24
Tabla 2. Clase de ceras de hojas analizadas expresadas en porcentaje promedio y desviación estándar.	29
Tabla 3. Abundancia total promedio y desviación estándar de largas cadenas (>C ₂₃) dominantes de ácidos grasos (cadenas pares), n-alcanos (cadenas impares) y alcoholes (C ₂₄ a C ₂₈) en µg g ⁻¹ hoja seca, la sumatoria de las cadenas dominantes (C _{max}), ACL, CPI y la abundancia total de todas sus largas cadenas de individuos enfermos (n=5), y los tres estados identificados (sin daño, mediano daño y completo daño foliar) de <i>A. araucana</i> enferma (n = 5) y <i>A. araucana</i> sana (n=3) en µg g ⁻¹ hoja seca (todos los promedios son expresados con sus respectiva desviación estándar).	33
Tabla 4. Precipitación mensuales (mm) de los años 2017 y 2018 en Laguna Malleco, estación metereológica más cercana a Laguna verde, Tolhuaca del PNT (Latitud: 38° 12' 55" S, Longitud: 71° 48' 40" W), extraída de la Dirección General de Aguas (www.dga.cl), Ministerio de Obras Públicas (Gobierno de Chile).	65

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Área de estudio. a) Zona de muestreo en Chile, recuadro rojo. b) Parque Nacional Tolhuaca (PNT) con la zona de Laguna Verde Tolhuaca en cuadro rojo. c) Laguna Verde y zona de muestreo de *A. araucana* (punto amarillo). Fuente: Google Earth con edición propia..... 20
- Figura 2. Individuos de *A. araucana*: a) *A. araucana* sana, b) *A. araucana* enferma, c) *A. araucana* enferma con completo daño foliar, d) *A. araucana* enferma con mediano daño foliar y e) *A. araucana* enferma sin daño foliar (Edición propia). ... 21
- Figura 3. Muestra visual de hojas recolectadas: A) café o con completo daño foliar, B) hojas con mediano daño foliar (verde con partes café) y C) hojas sin daño foliar (de color verde). D) Se muestra a modo de comparación con la longitud en centímetros de las hojas en sus distintos grados de daño foliar (Edición propia)....22
- Figura 4. Abundancia total promedio de largas cadenas de ácidos grasos (C_{24} a C_{34}), n-alcanos (C_{23} a C_{33}) y alcoholes (C_{24} a C_{28}) en hojas de *A. araucana* enfermas ($n = 15$); sin daño, mediano daño y completo daño (i.e. $n = 5$, respectivamente) y hojas de *A. araucana* sanas ($n=3$) en $\mu\text{g g}^{-1}$ de hojas secas. En cada barra se muestra la desviación estándar respectiva..... 29
- Figura 5. Abundancia total promedio de largas cadenas de ceras (suma de ácidos grasos [C_{24} a C_{34}], n-alcanos [C_{23} a C_{33}] y alcoholes [C_{24} a C_{28}]) en hojas de *A. araucana* enfermas ($n=5$) y hojas de *A. araucana* sanas ($n=3$) en $\mu\text{g g}^{-1}$ de hojas secas. En cada barra se muestra la desviación estándar respectiva. 30
- Figura 6. Abundancia total promedio de largas cadenas de ácidos grasos (C_{24} a C_{34}), en hojas de *A. araucana* enfermas ($n = 15$); sin daño, mediano daño y completo

daño (i.e. n = 5, respectivamente) y hojas de *A. araucana* sanas (n=3) en $\mu\text{g g}^{-1}$ de hojas secas. En cada barra se muestra la desviación estándar respectiva..... 35

Figura 7. Abundancia total promedio de cada una de las largas cadenas de ácidos grasos (C_{24} a C_{34}) en: a) hojas de enfermas (n = 15) promedio de hojas sin daño, mediano daño y completo daño (i.e. n = 5, respectivamente) y hojas de *A. araucana* sanas (n=3) en $\mu\text{g g}^{-1}$ de hojas secas. b) Abundancia total promedio de cada una de las largas cadenas de ácidos grasos (C_{24} a C_{34}) en hojas de los 3 estados de *A. araucana* enferma (n = 5, en cada estado). Las barras con la desviación estándar respectiva..... 36

Figura 8. Diagrama de cajas: a) ACL (cadenas C_{24} a C_{34}) y b) CPI (cadenas C_{24} a C_{34}), de ácidos grasos en hojas de *A. araucana* enferma con completo daño, mediano daño y sin daño foliar y hojas de *A. araucana* sana, donde la mediana de los datos está representada como una línea dentro de la caja, la mediana de los valores más altos y más bajos son los que cierran esta caja, los valores dentro de los bigotes son valores fuera de la media y los valores atípicos están marcados con un punto. 37

Figura 9. Abundancia total promedio de largas cadenas de n-alcanos (C_{23} a C_{33}) en hojas de *A. araucana* enfermas (n = 15); sin daño, mediano daño y completo daño (i.e. n = 5, respectivamente) y hojas de *A. araucana* sanas (n=3) en $\mu\text{g g}^{-1}$ de hojas secas. En cada barra se muestra la desviación estándar respectiva. 40

Figura 10. Abundancia total promedio de cada una de las largas cadenas de n-alcanos (C_{23} a C_{33}) en: a) hojas de *A. araucana* enfermas (n = 15) promedio de hojas sin daño, mediano daño y completo daño (i.e. n = 5, respectivamente) y hojas de *A. araucana* sanas (n=3) en $\mu\text{g g}^{-1}$ de hojas secas. b) Abundancia total promedio de

cada una de las largas cadenas de n-alcanos (C ₂₃ a C ₃₃) en hojas de los 3 niveles de daño en <i>A. araucana</i> enferma (n = 5, en cada estado). Las barras con la desviación estándar respectiva.	41
Figura 11. Diagrama de cajas: a) ACL (cadenas C ₂₃ a C ₃₃) y b) CPI (cadenas C ₂₃ a C ₃₃), de n-alcanos en hojas de <i>A. araucana</i> enferma con completo daño, mediano daño y sin daño foliar y hojas de <i>A. araucana</i> sana, donde la mediana de los datos está representada como una línea dentro de la caja, la mediana de los valores más altos y más bajos son los que cierran la caja, los valores dentro de los bigotes son valores fuera de la media y los valores atípicos están marcados con un punto. ...	42
Figura 12. Abundancia total promedio de largas cadenas de alcoholes (C ₂₄ a C ₂₈) en hojas de <i>A. araucana</i> enfermas: Completo daño, mediano daño y sin daño (i.e. n = 5, respectivamente) y hojas de <i>A. araucana</i> sanas (n=3) en µg g ⁻¹ de hojas secas. En cada barra se muestra la desviación estándar respectiva.	44
Figura 13. Abundancia total promedio de cada una de las largas cadenas de alcoholes (C ₂₄ a C ₂₈) en hojas de los 3 niveles de daño de hojas de <i>A. araucana</i> enferma, completo, mediano y sin daño foliar (n = 5, en cada estado) y hojas de <i>A. araucana</i> sana (n = 3). Las barras con la desviación estándar respectiva.....	46
Figura 14. Temperatura (°C) y humedad relativa (%) mensual promedio del aire en laguna verde del PNT desde enero a diciembre del 2017 (Tiempo en que se realizaron los muestreos de <i>A. araucana</i>). Datos proporcionados por Dr. Sergio Contreras proyecto Fondecyt 1160719.	64
Figura 15. Ejemplo de un cromatograma de la fracción de alcoholes derivatizados en hojas de <i>A. araucana</i> enferma y fragmentos de masa característicos (m/z 363, 157 y 337) del compuesto ergosterol TMS (Trimetilsilil).....	65

RESUMEN

La *Araucaria araucana* (*mol*) *k. Koch* es un árbol milenario, endémico del bosque templado chileno y argentino, declarado monumento natural y actualmente en peligro de extinción. Recientemente, los individuos de *A. araucana* comenzaron a mostrar diferente magnitud y grado de daño foliar (*i.e.*, decoloración) en ramas y copas. La decoloración comienza desde la base hasta la parte superior y desde el tronco hasta las ramas con anillos necróticos en lugares aleatorios de sus ramas, causando en algunos casos la muerte. Estos síntomas y muerte se han atribuido a una enfermedad aún desconocida. Las ceras de la hoja son compuestos principales de la cutícula de las plantas superiores, responsables de reducir la pérdida de agua y la difusión del gas, evitar la acumulación de agua y polvo, facilitar la interacción planta-insecto y controlar las fluctuaciones de temperatura. Este estudio evalúa el daño foliar utilizando tres clases diferentes de ceras de hojas (ácidos grasos, n-alcanos y alcoholes) en individuos de *A. araucana* del Parque Nacional Tolhuaca - Chile, con ($n = 5$) y sin síntomas ($n = 3$) de la enfermedad. Comparamos la abundancia y distribución de la cera de la hoja (longitud de cadena promedio [ACL] e índice de preferencia de carbono [CPI]) de individuos de *A. araucana* con y sin síntomas; Distinguiendo entre tres niveles de daño foliar (sin, medio y completo daño foliar). Se extrajeron los lípidos totales (DCM : MeOH v / v 9:1) con microondas de extracción asistida, separando las clases de ceras con pequeñas columnas cromatográficas. La cuantificación e identificación se realizó mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama y espectrometría de masas, respectivamente. Los n-alcanos y alcoholes son significativamente más

abundante en individuos con daño foliar ($77,1 \pm 25,5$ y $23,1 \pm 15,1 \mu\text{g g}^{-1}$) que sin daño (sano) ($28,9 \pm 18,8$ y $2,2 \pm 3,5 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente), observando a su vez un mayor ACL de ácidos en individuos con daño foliar. Una tendencia decreciente en el CPI de ácidos grasos y ACL de n-alcanos se observa con un mayor nivel de daño foliar. Esta es la primera evidencia de la respuesta de *A. araucana* a una enfermedad aún desconocida que mata a esta especie endémica. Las ceras de hoja pueden ser una buena herramienta para evaluar esta enfermedad desconocida antes de ver los síntomas como daño foliar a nivel de la población.

Palabras claves: *A. araucana*, ácidos grasos, alcoholes, ceras de hojas, enfermedad, n-alcanos.

INTRODUCCIÓN

En los bosques templados del extremo noroeste de la Patagonia Argentina y centro sur de Chile, y de manera óptima sobre los 1000 msnm crece un árbol endémico llamado *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch o pehuén. Es una antigua especie de gimnosperma (productora de semillas) de la división Pinophyta (conífera) (Montaldo, 1974), de lento crecimiento y longevo, alcanzando edades mayores a mil años (Donoso, 1993). Se destacan sus troncos, rectos, largos y desprovistos de ramas (en su etapa adulta), que sostienen copas simétricas (Montaldo, 1974). Hace miles de años que el pueblo mapuche se ha identificado con este árbol realizando prácticas culturales, sociales y espirituales. Prácticas que perduran hasta hoy, combinando aspectos económicos, ideológicos y de organización social, como sucede con la recolección de piñones (semilla de *A. Araucana*) (Díaz *et al.*, 2016).

La distribución de *A. araucana* se ha visto reducida drásticamente desde la colonización europea del norte de la Patagonia a mediados del siglo XIX, principalmente por el aumento de plantaciones forestales de especies exóticas (pino y eucalipto) e incendios forestales (González *et al.*, 2006). Razón por la cual se considera una especie de alto valor de conservación, declarada monumento natural en Chile desde 1990 (DS N°43, 1990). *A. araucana* es una especie protegida en ambos lados de la Cordillera de Los Andes por CITES (sigla en inglés de The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). Además, según criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), el Ministerio del Medio Ambiente tiene esta especie en las

categorías: Vulnerable (VU) a la población de la cordillera de los Andes y en peligro de extinción (EN) a la población de la Cordillera de Nahuelbuta (DS N°29, 2018), aumentando con esto la protección y el debido cuidado que hay que tener con esta especie endémica.

Hace algunos años se detectó la presencia de daños foliares en ramas y copas (en caso de individuos adultos) en distinta magnitud y grado de avance en varios ejemplares de *A. araucana*. El daño foliar se presenta como un anillo necrótico, hojas de color café, que aparece en un lugar “aleatorio” de alguna de sus ramas expandiéndose a la totalidad de esta y en algunos casos al resto del árbol provocándole la muerte (Corporación Nacional Forestal [CONAF], 2016; Nuñez, 2017). Las hojas se decoloran (de verde a café) hasta secarse (CONAF, 2017). Este problema ha llevado a que la CONAF, expertos de la Universidad de Concepción (UDEC) y el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) hicieran un catastro a nivel nacional determinando que el 93% de la población de *A. araucana* adulta se encuentra afectada por esta condición (ya sea parte de sus ramas o su copa completa) donde el 1% del total de individuos adultos se encontraron muertos (CONAF, 2017). Los ejemplares jóvenes afectados alcanzan el 86% con un 8% de ejemplares muertos (CONAF, 2017; Bevilacqua, 2017). Por lo preocupante de esta situación el Ministerio de Agricultura, el SAG y CONAF lideran un equipo multidisciplinario público-privado, nacional e internacional para afrontar esta situación a través de distintas líneas investigativas en el que los principales postulados responsables de este fenómeno se asocian a patógenos como, escarabajos de corteza americanos, barrenadores y hongos (CONAF, 2017). Resultados

preliminares de investigadores de UDEC, Universidad de California y Universidad Andrés Bello han realizado un catastro de las poblaciones biológicas presentes en *A. araucana* encontrando especies patógenas en mayor cantidad en *individuos* enfermos que en los sanos (Bevilacqua, 2017). También se han encontrado hongos que según investigadores de la UFRO (Universidad de la Frontera) al parecer no serían relevantes en el daño y muerte de las Araucarias (Nuñez, 2017). Por otra parte, Investigadores de UDEC, UFRO y Universidad Austral asocian este daño foliar a cambios climáticos, ya que, si cambia la temperatura y se ve afectado el equilibrio hídrico existirá una alteración en el ambiente en el que las plantas (*i.e.*, *A. araucana*) se verán forzados a adaptarse en cortos periodos de tiempo. Esto los llevaría a un estrés que se traduciría en un debilitamiento contra organismos patógenos que por lo general están presente en el ambiente (Herrera, 2017; Martínez, 2017). Las investigaciones se encuentran abiertas y en proceso, encontrando sólo una publicación y una nota referente al tema en la base bibliográfica SCOPUS (Medina *et al.*, 2018; Pérez *et al.*, 2018).

Sea cual sea el efecto del ambiente u organismos patógenos, una respuesta a esta enfermedad foliar, podría encontrarse en una de las principales adaptaciones de las plantas vasculares para la vida en el ambiente terrestre, la cutícula (Jetter *et al.*, 2006). La cutícula es un recubrimiento de lípidos que cubre las hojas de las plantas y está compuesta básicamente de dos materiales lipofílicos: cutina y ceras (Jeffree, 2006; Bargel *et al.*, 2006). Las ceras son de vital importancia ya que cumplen la función de limitar la pérdida de agua por la cutícula, minimizando el intercambio (y pérdida) de gases (CO₂, O₂) y agua (H₂O) (Jeffree, 2006; Jetter y Riederer, 2016).

Las ceras también inducen el desprendimiento de gotas de agua y partículas de polvo, así como de esporas (Jeffree, 2006; Samuels *et al.*, 2008). Son una barrera protectora contra insectos, evitan la proliferación de microbios patógenos, actúan como barrera termorreguladora, protegiendo contra rayos UV e impidiendo la adhesión incontrolada de las células epidérmicas de los órganos en las primeras fases de desarrollo (correcta formación de órganos) (Riederer, 2006; Stark y Tian, 2006; Leide *et al.*, 2011; Ebada *et al.*, 2017).

Químicamente, las ceras son una mezcla de compuestos alifáticos en series homólogas de cadenas largas como alcoholes, ácidos grasos, n-alcanos, ésteres, aldehídos y cetonas (Bargel *et al.*, 2006; Jetter *et al.*, 2006; Dragota y Riederer, 2008; Tafolla *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2018). Las interacciones de estas cadenas alifáticas con otras moléculas provienen de fuerzas de tipo London-Van der Waals por lo que poseen una alta hidrofobia y bajo punto de fusión. Estas ceras en las plantas están compuestas por *metabolitos secundarios* y *metabolitos primarios*, los cuales son considerados sustancias esenciales para la vida de la célula (Marco, 2006). Las cadenas alifáticas de alcoholes, ácidos grasos y n-alcanos son ceras que se puede caracterizar por su largo (> C24), según su abundancia o concentración total y su distribución, distribución referida a la dominancia de cadenas homólogas par sobre impar (e.g. alcoholes y ácidos grasos) o impar sobre par (e.g. n-alcanos) (Kerstiens, 2007; Dragota y Riederer, 2008; Tafolla *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2018). Existen varios índices que permiten evaluar su distribución, como por ejemplo el largo de cadenas promedio (ACL, por su sigla en inglés) que describe el promedio de número de átomos de carbono por molécula ponderada por

la abundancia del compuesto y el índice de preferencia de carbono (CPI, por su sigla en inglés) que mide la abundancia relativa del largo de cadenas de carbonos pares sobre el largo de las cadenas impares (Jetter *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2015).

Metabólicamente, los ácidos grasos son precursores de las otras ceras, considerado como un policétido debido a que la fuente única de todos sus átomos de carbono proviene del ácido acético (en su forma biológicamente activa, acetilCoA) (Marco, 2006). Los ácidos grasos por procesos de elongación, están presentes en mayor abundancia como homólogos pares de largas cadenas (C₂₀-C₃₄) que por reducción forma alcoholes primarios (C₂₂-C₄₀) y a través de procesos de descarboxilación pierden un carbono en la forma de CO₂, explicando la presencia de números impar de átomos de carbono en las cadenas homologas de n-alcanos (C₂₁-C₃₅) (Marco, 2006; Tafolla *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2018).

Varios estudios han demostrado que la concentración y distribución de ceras (*e.g.*, n-alcanos y ácidos grasos) puede variar dentro de una misma especie, anualmente o por temporadas, en órganos de un mismo individuo (*i.e.*, entre hojas), por su ontogenia y por cambios de temperatura y/o presión atmosférica (*e.g.*, Bargel *et al.*, 2006; Jetter *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2018). Todas estas variaciones pueden influir en las funciones de las ceras, ya que están directamente relacionadas con su estructura, composición química y proporción entre una y otra (Tafolla *et al.*, 2013). También la alteración de la homeostasis de lípidos se ha asociado a diversas enfermedades (Harayama y Riezman, 2018), por lo que el

estudio de las ceras cuticulares de *A. araucana* parece oportuno e interesante, más aún por la condición y mortandad que están padeciendo en el centro-sur de Chile. Existen pocas investigaciones de ceras cuticulares de *A. araucana* (Rafiia y Dodd, 1998; Dragota y Riederer, 2008), y a pesar del uso de diversas metodologías hay evidencia de una mayor concentración de n-alcanos de cadenas largas (destacando series homologas impares de C₂₉, C₃₁ y C₃₃, siendo C₃₃ el principal) comparado con las concentraciones de ácidos grasos (C₂₀-C₃₄) y alcoholes primarios (C₂₀-C₃₀) (Dragota y Riederer, 2008). En este último trabajo se utilizaron muestras de hojas de *A. araucana* juveniles cultivados en invernaderos. Otro estudio compara n-alcanos entre poblaciones de *A. araucana* de la Cordillera de Nahuelbuta con individuos de la Cordillera de los Andes encontrando una mayor cantidad de homólogos impares de n-alcanos (en mayor abundancia C₂₉) en individuos de la Cordillera de Nahuelbuta (Rafiia y Dodd, 1998) lo que puede ser interpretado como una adaptación ambiental de estas ceras frente a climas más áridos. Puesto que el principal contribuyente de la barrera de transpiración cuticular proviene de derivados de ácidos grasos de cadenas muy largas como n-alcanos y alcoholes (Jetter y Riederer, 2016), se puede esperar un cambio en la abundancia y distribución de ceras de hojas en individuos enfermos de *A. araucana*. La presente tesis propone estudiar la composición de ceras cuticulares (n-alcanos, alcoholes y ácidos grasos de cadenas largas [$>C_{23}$]) de hojas de *A. araucana* comparando su abundancia y distribución en individuos enfermos y sanos, y a su vez comparar las hojas con daño foliar de hojas sin daño de individuos enfermos del bosque templado del Parque Nacional Tolhuaca de la Región de la Araucanía, Chile.

HIPÓTESIS

- **Hip 1:** Existe una mayor abundancia de ceras (ácidos grasos, n-alcanos y alcoholes de cadenas largas [$>C_{23}$]) en hojas de individuos de *Araucaria araucana* enfermos que en hojas de individuos sanos.
- **Hip 2:** Existe diferencia en la abundancia y distribución (índices: largo de cadenas promedio [ACL] e índice de preferencia de carbono [CPI]) de las ceras de hojas (ácidos grasos, n-alcanos y alcoholes de cadenas largas) en individuos sanos y enfermos de *A. araucana* al comparar ceras de hojas sin daño (color verde), con mediano daño (empezando a decolorarse) y completo daño foliar (decoloradas completamente o cafés).

OBJETIVOS

Objetivo General: Comparar la abundancia y distribución de tres clases de ceras de hojas (ácidos grasos, n-alcanos y alcoholes) en hojas de individuos enfermos y sanos de *A. Araucana* del bosque templado del Parque Nacional Tolhuaca de la Región de la Araucanía, Chile.

Objetivos Específicos:

- Evaluar si las clases de ceras difieren en abundancia y distribución (índices: CPI y ACL) en hojas de *A. araucana* enferma y sanas.
- Evaluar si la distribución (índices: CPI y ACL) de las ceras de hojas difieren entre los 3 niveles de daño foliar de hojas (hojas sin daño, mediano daño y completo daño) de *A. araucana* enferma.

METODOLOGÍA

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en la zona centro sur de Chile, en la precordillera de la IX Región de la Araucanía, específicamente en la ribera de la Laguna verde ($38^{\circ}12'48.3''$; $71^{\circ}44'10.5''$) a 1385 msnm (Fig. 1) de la reserva y Parque Nacional Tolhuaca (PNT). La vegetación de esta zona pertenece al bosque templado con características hidromórficas y andosuelos (suelos de ceniza volcánica) y debido a su altitud predominan arboles de Araucarias y Lengas. El clima es lluvioso con cierta sequia relativa de verano con una precipitación que varía de 2500 a 3000 mm en el año y temperaturas moderadas. El principal efluente del lago es el Río Malleco que nace al Sudeste, constituyendo el límite sur del PNT (CONAF, 2014).

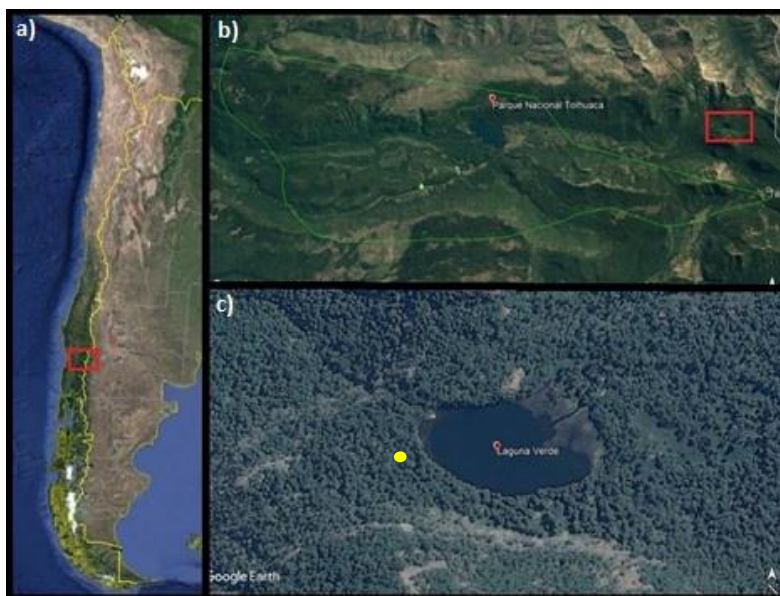


Figura 1. Área de estudio. a) Zona de muestreo en Chile, recuadro rojo. b) Parque Nacional Tolhuaca (PNT) con la zona de Laguna Verde Tolhuaca en cuadro rojo. c) Laguna Verde y zona de muestreo de *A. araucana* (punto amarillo). Fuente: Google Earth con edición propia.

Protocolo de muestreo

Las muestras de hojas de árboles fueron recolectadas en dos campañas, en el área ribereña de la Laguna verde del PNT (Fig. 1), donde se eligieron individuos de *A. araucana* sanos en enero del año 2017 (muestreo en el cual no se encontraron *A. araucana* enfermos o con daño foliar) y *A. araucanas* enfermas (con daño foliar) en Diciembre del mismo año. El sitio muestreado de la Laguna Verde fue elegido de acuerdo a la accesibilidad, evitando senderos y el fácil acceso humano para minimizar las perturbaciones antropogénicas (Pu y Weiguo, 2011). Se recolectaron hojas de 3 individuos sanos y 5 individuos enfermos de *A. araucana*, para este último caso se seleccionaron 3 niveles de daño: hojas sin daño (verdes), hojas con medio daño (decoloradas y con color verde y café) y completo daño foliar (totalmente cafés) (Fig. 2).



Figura 2. Individuos de *A. araucana*: a) *A. araucana* sana, b) *A. araucana* enferma, c) *A. araucana* enferma con completo daño foliar, d) *A. araucana* enferma con mediano daño foliar y e) *A. araucana* enferma sin daño foliar (Edición propia).

Para asegurarse de obtener condiciones similares en un mismo sitio (*i.e.*, régimen de luz, ubicación vertical en el dosel) se eligieron de preferencia árboles alejados de otros árboles, con hojas expuestas al sol pero bajo el dosel, considerando recolectar aquellas sin daño evidente de herbivoría (Feakins *et al.*, 2016). Los individuos elegidos fueron adultos de *c.a.* 10 metros de altura para evitar que los distintos estados de ontogenia influyan en el análisis (Dodd y Afzal-Rafii, 2000). Las muestras se tomaron a una altura mayor a 5 metros, con una podadora de ganchos. Finalmente, hojas del follaje fueron recolectadas, guardadas y enumeradas en bolsas de papel kraft. Una vez en el laboratorio se mantuvieron a 50°C en estufa (Memmert, modelo Schutzart DIN 40050) hasta sequedad (Fig. 3).



Figura 3. Muestra visual de hojas recolectadas: A) cafés o con completo daño foliar, B) hojas con mediano daño foliar (verde con partes café) y C) hojas sin daño foliar (de color verde). D) Se muestra a modo de comparación con la longitud en centímetros de las hojas en sus distintos grados de daño foliar (Edición propia).

Extracción de lípidos de ceras de hojas

Una vez secas las hojas se seleccionaron aquellas con un mínimo daño (*i.e.*, herbivoría), las cuales fueron cortadas con tijeras de acero inoxidable limpiadas previamente con solventes orgánicos (Metanol, Acetona, Hexano). Se extrajeron los lípidos de 0,5 gramos de hoja por individuo en 20 mL de Diclorometano:Metanol (DCM:MeOH) (9:1 v/v) y 25 μ L de estándar interno (cis-10-nonadecenoico, 5-alfacolestano y nonadecanol) para calcular la recuperación de ácidos grasos, n-alcanos y alcoholes respectivamente. Para la extracción de lípidos totales se utilizó un microondas de extracción asistida (MAE, por sus siglas en inglés), con una rampa de 100°C a los 10 min, un tiempo de espera de 15 min a 100°C y 30 min de enfriamiento, repitiendo este proceso 3 veces. El extracto total de lípidos (ETL) fue depositado en tubos de vidrios previamente calcinados y secados bajo N₂ gaseoso en un Flexi-vap (Glas-Col, Modelo 109A-YH-1), concentrándolo para ser guardado en viales de 4 mL.

El ETL se separó en 3 fracciones de distinta polaridad en una columna de separación de fase sólida de aminopropil (Marca Clean up), previamente lavada con 10 mL de metanol, repitiendo el proceso 4 veces. El ETL se hidrato con 100 μ L DCM:2-propanol (2:1 v/v) y se cargó a la columna, se esperó 1 min y se repitió este proceso (3 veces). Los n-alcanos y alcoholes fueron eluidos en una fracción neutral con 10 mL de DCM:2-propanol (2:1 v/v), que corresponde a la primera fracción neutra. Los ácidos grasos se eluyeron con 10 mL de AAG:éter (1:24 v/v) (Ácido Acético Glacial: Dietil-Eter) que corresponde a la segunda fracción de elución. La última fracción que contiene fosfolípidos fue eluída con 10 mL de Metanol (100%).

Todas las fracciones fueron concentradas por secado facilitado con un flujo de N₂ gaseoso por Flexi-vap y concentradas en un vial de 4 mL. La primera fracción neutral que contiene n-alcanos y alcoholes y la segunda fracción que contiene los ácidos grasos fueron analizadas en este estudio.

Para el análisis de n-alcanos y alcoholes, la fracción neutral fue separada en 5 fracciones de acuerdo a sus polaridades, en una columna de sílica gel 60 (0,065-0,200 marca Meck) activada a 450°C. La muestra se cargó con un pequeño volumen de DCM y se dejó secar (24 hrs aprox.). Las fracciones se eluyeron con 4 mL de los solventes de la tabla N°1 y depositados en viales de 4 mL.

Tabla 1. Fracciones de lípidos separados con la columna de sílica gel.

Fracción	Solvente	Compuestos
F1-F2	Hexano	n-Alcanos saturados e insaturados
F3	DCM	Cetonas
F4	DCM:ETOAc (8:2 v/v)	Alcoholes
F5	ETOAc	Ácidos y dioles
F6	DCM:MeOH (7:3 v/v)	Ácidos y dioles más polares.

La fracción F1-F2 se cargó con 100 µL de hexano en la columna de Silver sílica (preparada en laboratorio por proceso de impregnación de nitrato de plata) previamente lavada con hexano, para eluir con hexano la fracción saturada y DCM:MeOH (1:1 v/v) la insaturada, donde se analizó la fracción de n-alcanos saturados.

Derivatización

La fracción de ácidos grasos y alcoholes necesitaron ser derivatizadas para reducir la polaridad de sus moléculas. En el caso de los ácidos grasos se procedió a metilarlos, esto reduce la polaridad de la molécula al reemplazar los hidrógenos activos por grupos metilos, generando ácidos grasos metil éster (sigla en Inglés, FAMES). En breve, se le agregaron 500 μL de BF_3 (Metanol trifluoruro de boro) a cada muestra acelerando la reacción a 60°C por 20 min. Una vez que se enfriaron se procedió a adicionarles 500 μL de agua mili-Q y 500 μL de DCM. La mezcla fue homogeneizada en vortex y se dejó reposar hasta que se formaron dos fases. La fase orgánica se extrajo y se llevó a un vial de 4 mL, este proceso se repitió 3 veces, fracción que fue secada bajo N_2 gaseoso.

Para la cuantificación de los alcoholes se procedió a sililarlos, reemplazando un hidrógeno activo por un grupo alquilsililo, disminuyendo la polaridad y haciéndolo más volátil para su cuantificación. Para ello se le agregó 25 μL de piridina y 25 μL de BSTFA [Bis (trimetilsililo)-trifluoro-acetamida] a cada muestra acelerando la reacción a 60°C por 40 min, una vez terminado este proceso las muestras se secaron bajo N_2 gaseoso.

Cuantificación

Para la cuantificación las muestras (ácidos grasos, n-alcanos y alcoholes) se recuperaron con 100 μL de un estándar externo de cuantificación (Androstano). Las fracciones fueron analizadas usando cromatografía de gas de llama para su

cuantificación (GC-FID 7890A, Agilent) y masa para su identificación (CG-MS QP-5050A-Shimadzu). Una vez obtenido el cromatograma, se identificaron los ácidos grasos saturados, n-alcenos y alcoholes de cadenas largas que son los correspondientes a las ceras de hojas con estándares reales y espectros de masa (Jetter *et al.*, 2006). Se reporta la abundancia del largo de cadena de cada ácido grasos, n-alceno y alcohol por el peso seco de la hoja ~ 0,5 g de hoja ($\mu\text{g g}^{-1}$) y por área de hoja de *A. araucana* considerando cara abaxial y adaxial la cual es 42 y 50 cm^2 ($\mu\text{g cm}^{-2}$). La abundancia de las ceras de hojas (ácidos grasos, alcoholes y n-alcenos) de cadenas largas ($>C_{23}$) en este estudio se expresan en microgramos (μg) por gramos de hoja seca promedio ($\mu\text{g g}^{-1}$). Sin embargo, se adjuntan en anexo los valores de abundancia promedio expresados en μg por área de hoja, usados al comparar con otros estudios.

Para los índices de distribución se calculó el largo de cadena promedio (ACL, por sus siglas en inglés Average Chain Length), como:

$$ACL_{\text{total}} = \frac{\sum C_n \times n}{\sum C_n} \quad (1)$$

Donde $n > 22$ y C_n = concentración de un ácido graso o n-alceno con “n” carbonos (Luo *et al.*, 2012).

También el índice de preferencia de carbono (CPI, por sus siglas en inglés Carbon Preference Index) (Ohkouchi *et al.*, 1997), como:

$$CPI_{(\text{ácidos grasos})} = \frac{2 \times \text{pares}(C_{24}-C_{34})}{[\sum \text{impares}(C_{23}-C_{33}) + \sum \text{impares}(C_{25}-C_{35})]} \quad (2)$$

El CPI de n-alcenos se calculó usando la ecuación de Guo *et al.*, (2015) modificando el rango de cadenas de C_{24} a C_{34} :

$$\text{CPI}_{\text{total}} = \frac{1}{2} \left(\frac{\sum \text{odd } C_{n(17-31)}}{\sum \text{even } C_{n(18-32)}} + \left[\frac{\sum \text{odd } C_{n(23-33)}}{\sum \text{even } C_{n(18-32)}} \right] \right) \quad (3)$$

Donde C es el contenido relativo de n-alcanos y n es el número de carbono.

Estos resultados fueron expresados en gráficos utilizando los programas Sigma Plot 12.2, R-studio y Microsoft Excel.

Para poder ver el posible efecto de la enfermedad en la abundancia y distribución (ACL y CPI) de ceras de hojas (ácidos grasos, n-alcanos y alcoholes) en individuos de *A. araucana*, comparamos las clases de ceras analizadas entre hojas de *A. araucana* enferma con distintos niveles de daño: completo, mediano daño, sin daño, además de un control de hojas de *A. araucana* sana.

Análisis de datos

Para determinar diferencias de las abundancias de ácidos grasos, n-alcanos y alcoholes entre individuos de *A. araucana* enfermos (3 niveles de daño en hojas) y sanos, se calcularon medias y desviaciones estándar (SD sigla en inglés). Luego para evaluar diferencias significativas de abundancia, ACL y CPI de ácidos grasos, n-alcanos y alcoholes entre individuos enfermos (3 niveles de daño) y sanos se realizaron análisis estadísticos no paramétricos: Kruskal-Wallis para evaluar diferencia entre más de dos grupos y Mann-Whitney para evaluar diferencias entre dos grupos de datos. Donde los valores de $p < 0,05$ nos presentan diferencias significativas entre grupos de datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Abundancia total de ceras de hojas (ácidos grasos, alcanos y alcoholes) en individuos de *A. araucana* enferma y sana

En las hojas de los individuos de *A. araucana* enferma (abundancia promedio de los 3 niveles de daño en individuos enfermos) las abundancias de ácidos grasos variaron entre 317,3 y 819,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ con un promedio de $544,8 \pm 140,6 \mu\text{g g}^{-1}$ (SD). El contenido de n-alcanos fue mucho menor (e.g. más de 10 veces que en ácidos grasos) variando entre 40,3 a 143,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ con un promedio de $71,1 \pm 25,5 \mu\text{g g}^{-1}$ y los alcoholes presentaron las menores concentraciones entre 6,2 a 60,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ promediando $23,1 \pm 15,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (Fig. 4).

En hojas de individuos de *A. araucana* sana los ácidos grasos variaron entre 135,7 a 752,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ con una abundancia promedio de $445,8 \pm 308,3 \mu\text{g g}^{-1}$. Los n-alcanos fueron mucho menores a los ácidos grasos (al igual que en *A. araucana* enferma) variando entre 14,6 a 50,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ con un promedio de $28,9 \pm 18,8 \mu\text{g g}^{-1}$, con valores mínimos de abundancia en alcoholes que variaron entre 0,1 a 6,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ con un promedio de $2,2 \pm 3,5 \mu\text{g g}^{-1}$ (Fig. 4).

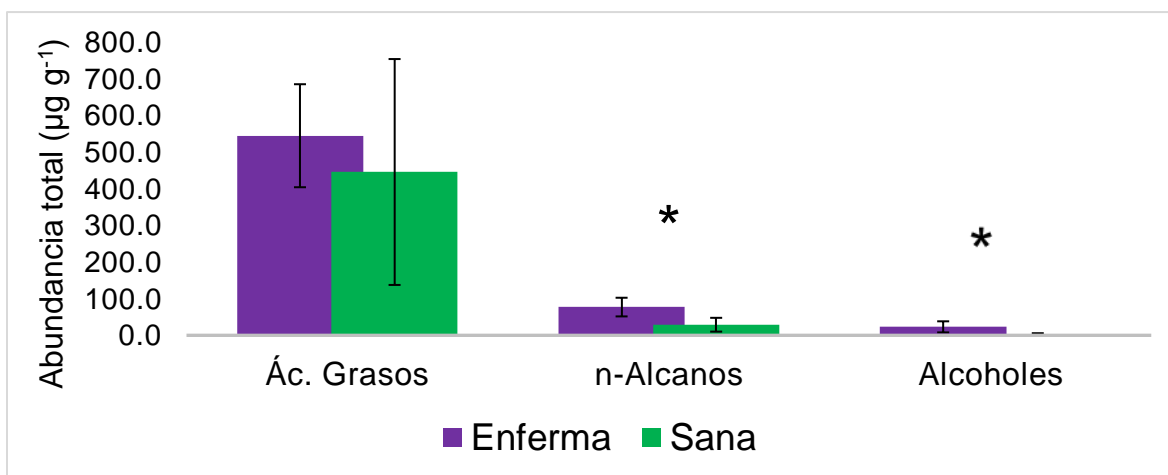


Figura 4. Abundancia total promedio de largas cadenas de ácidos grasos (C₂₄ a C₃₄), n-alcanos (C₂₃ a C₃₃) y alcoholes (C₂₄ a C₂₈) en hojas de *A. araucana* enfermas (n = 15); sin daño, mediano daño y completo daño (*i.e.* n = 5, respectivamente) y hojas de *A. araucana* sanas (n=3) en µg g⁻¹ de hojas secas. En cada barra se muestra la desviación estándar respectiva. * p<0,05.

Los ácidos grasos comprenden más del ca. 85% de las ceras de hojas analizadas (Tabla 2), sin importar que el individuo de *A. araucana* esté enfermo o sano. De hecho, al comparar la abundancia total de ceras (suma ácidos grasos, n-alcanos y alcoholes) (Fig. 5), sigue la misma tendencia vista al comparar los ácidos grasos en *A. araucana* enferma y sana (Fig. 4), más abundante en individuos enfermos que en sanos pero con altas desviaciones estándar. En literatura solo un trabajo reporta la abundancia de ácidos grasos de cadenas largas en hojas de *A. araucana* sanas (Dragota y Riederer, 2008), en dicho trabajo los n-alcanos dominan en concentración seguido de ácidos grasos y alcoholes.

Tabla 2. Clase de ceras de hojas analizadas expresadas en porcentaje promedio y desviación estándar.

	Ác. Grasos (%)	n-Alcanos (%)	Alcoholes (%)
<i>A. araucana</i> sana	93,5±64,6	6,1±4,0	0,5±0,7
<i>A. araucana</i> enferma	84,5±21,8	12,0±3,9	3,6±2,3



Figura 5. Abundancia total promedio de largas cadenas de ceras (suma de ácidos grasos [C₂₄ a C₃₄], n-alcenos [C₂₃ a C₃₃] y alcoholes [C₂₄ a C₂₈]) en hojas de *A. araucana* enfermas (n=5) y hojas de *A. araucana* sanas (n=3) en µg g⁻¹ de hojas secas. En cada barra se muestra la desviación estándar respectiva.

Es importante destacar que Dragota y Riederer (2008) utilizaron una metodología distinta a la de este estudio, analizando ceras epicuticulares y reportando solo un ca. 5,4% de ácidos grasos, contrastando con altas abundancias de n-alcenos (91,7%) y alcoholes (2,9%) en hojas sanas de *A. araucana* (Porcentaje promedio de ácidos grasos, n-alcenos y alcoholes analizados [suma = 100%]). Esta tesis utilizó un microondas de extracción asistida de última generación, extrayendo el total de lípidos de la hoja con una mezcla de diclorometano y metanol (9:1) incluyendo ceras epicuticulares e intracuticulares (contenidas en la cutícula). Sin embargo, esta diferencia metodológica no explica la mayor abundancia de ácidos grasos (>85%) respecto a las ceras de hojas analizadas. Las ceras epicuticulares se caracterizan por ser compuestos alifáticos de largas cadenas como ácidos grasos, n-alcenos, alcoholes (entre otros) (Jetter y Schäfer, 2001) y las ceras intracuticulares son dominadas por triterpenos y compuestos de cadenas cortas con pequeñas

cantidades de alcoholes primarios y n-alcanos (e.g. Buschhaus *et al.*, 2007; Tafolla *et al.*, 2013). Por lo tanto, la metodología aplicada no debería afectar la abundancia de ceras de cadenas largas en individuos *A. araucana*.

En 2011, Diefendorf y colaboradores reportaron muy bajas concentraciones de n-alcanos de cadenas largas en hojas de gimnospermas (grupo de plantas al que pertenecen la *A. araucana*) con significativamente más altas concentraciones de ácidos grasos y alcoholes de cadenas largas. Sin embargo, el mismo Diefendorf y colaboradores en 2015, extendiendo sus muestras a coníferas del hemisferio sur encontraron un mayor porcentaje de n-alcanos, seguido de ácidos grasos y alcoholes en especies de la familia Araucariaceae, a la cual pertenece *A. araucana*. Claramente, hay más que estudiar en esta especie que actualmente se encuentra en peligro de extinción (DS N°29, 2018). Es importante destacar que en estos estudios se analizaron hojas de individuos de *A. araucana* (Dragota y Riederer, 2008) y de la familia Araucariaceae (Diefendorf *et al.*, 2011; Diefendorf *et al.*, 2015) mantenidos por años en invernaderos y en algunos casos considerando individuos de corta edad ca. 2 a 5 años (Dragota y Riederer, 2008). A diferencia de este estudio, se seleccionaron individuos adultos (> 25 años) en su ambiente natural autóctono donde la especie ha vivido desde hace millones de años.

Las ceras de hojas son compuestos que se caracterizan por ser esqueletos de hidrocarburos totalmente saturados y no ramificados que pueden llevar una

funcionalidad primaria que contiene oxígeno, es decir, un grupo terminal hidroxilo, carbonilo o carboxilo (e.g. Jetter *et al.*, 2006). La mayor abundancia de ácidos grasos de cadenas largas en ceras de hojas de individuos de *A. araucana* (enfermos y sanos) propone una capa cerosa de amplia región apolar (hidrófoba) de largas cadenas de grupos alquilo unidos a un extremo carboxilo que confiere una pequeña región polar (hidrofílica) (Marco, 2006). Su alta concentración podría estar asociada a la necesidad de la capa cuticular de hojas de *A. araucana* con más afinidad por el agua del ambiente por razones de supervivencia y evolución. Distinto sería al tener mayor cantidad de n-alcános que le conferiría una capa más hidrófoba, la que tendría poca interacción con el agua del medio.

Tabla 3. Abundancia total promedio y desviación estándar de largas cadenas (>C₂₃) dominantes de ácidos grasos (cadenas pares), n-alcános (cadenas impares) y alcoholes (C₂₄ a C₂₈) en µg g⁻¹ hoja seca, la sumatoria de las cadenas dominantes (C_{max}), ACL, CPI y la abundancia total de todas sus largas cadenas de individuos enfermos (n=5), y los tres estados identificados (sin daño, mediano daño y completo daño foliar) de *A. araucana* enferma (n = 5) y *A. araucana* sana (n=3) en µg g⁻¹ hoja seca (todos los promedios son expresados con sus respectiva desviación estándar). ND (No detectado).

Ác. Grasos	C24	C26	C28	C30	C32	C34	Suma C max (C26+C28+C30)	ACL	CPI	Total
<i>A. Araucana Sana</i>	37,5±9,7	97,6±59,4	185,7±157,2	82,3±61,9	16,5±11,9	2,2±1,4	365,6	27,5	15,5	445,8±308,3
<i>A. Araucana Enferma</i>	54,6±19,4	95,7±22,2	192,9±59,3	135,8±52,0	31,4±15,5	2,9±1,6	424,4	27,9	15,4	544,8±140,6
<i>A. Araucana Enferma Sin daño</i>	32,6±9,6	88,1±23	223,0±70,4	125,8±59,9	30,2±16,6	3,4±1,4	436,9	28,1	19,8	526,8±178,2
<i>Mediano Daño</i>	65,6±11,6	109,1±13,3	208,0±6,4	171,2±37,5	40,5±14,2	3,6±1,6	488,3	28,0	13,5	639,3±43,9
<i>Completo Daño</i>	65,6±9,7	89,9±59,4	147,6±157,2	110,5±61,9	23,4±11,9	1,8±1,4	348,1	27,6	13,0	468,4±129,1
n-Alcanos	C23	C25	C27	C29	C31	C33	Suma C max (C27+C29+C31)	ACL	CPI	Total
<i>A. Araucana Sana</i>	1,1±0,4	2,3±0,9	5,1±3,0	8,2±5,7	5,0±3,9	2,6±2,6	18,4	28,6	5,6	28,9±18,8
<i>A. Araucana Enferma</i>	2,1±0,8	5,5±2,8	12,7±3,5	22,7±9,1	13,1±6,7	7,6±5,7	48,5	28,8	4,8	77,1±25,5
<i>A. Araucana Enferma Sin daño</i>	1,3±0,2	3,5±0,8	13,4±4,2	28,1±13,8	18,1±9,8	13,0±7,1	59,7	29,3	5,5	91,1±36,7
<i>Mediano Daño</i>	2,4±0,7	5,6±2,1	12,7±4,4	21,0±4,9	11,2±2,8	5,5±2,5	44,9	28,7	4,3	72,2±18,9
<i>Completo Daño</i>	2,6±0,8	7,5±3,6	12,0±1,9	19,0±4,0	9,9±2,6	4,4±1,4	41,0	28,4	4,7	67,9±13,5
Alcoholes	C24	C25	C26	C27	C28	C max (C24)	Total			
<i>A. Araucana Sana</i>	2,2±3,5	ND	ND	ND	ND	2,2	2,2±3,5			
<i>A. Araucana Enferma</i>	12,9±8,1	1,5±1,2	7,0±6,0	0,4±0,9	1,2±2,6	12,9	23,1±15,1			
<i>A. Araucana Enferma Sin daño</i>	11,2±4,7	1,6±1,6	6,5±4,9	0,4±1,0		11,2	19,8±11,1			
<i>Mediano Daño</i>	14,6±11,3	1,8±1,4	5,4±2,2	0,4±1,0	1,2±2,8	14,6	23,6±13,1			
<i>Completo Daño</i>	12,8±8,6	1,1±0,8	9,1±9,3	0,4±1,0	2,3±3,7	12,8	25,8±21,9			

Diferencias entre clases de ceras (ácidos grasos, n-alcenos y alcoholes) en individuos de *A. araucana* enferma y sana

Ácidos grasos

La abundancia total promedio de cadenas largas de ácidos grasos metil éster (suma de C₂₄ al C₃₄) en hojas de individuos de *A. araucana* enferma (n=5) (promedio 3 niveles de daño n=15) fue de 544,8±140,6 µg g⁻¹ y 445,8±308,3 µg g⁻¹ en hojas de individuos de *A. araucana* sana (n=3) (Fig. 4). No existen diferencias significativas entre la abundancia promedio de estos ácidos grasos en individuos de *A. araucana* enfermos y sanos (Mann-Whitney p=0,812). La mayoría de los trabajos que describen ceras de hojas se basan en análisis de uno o muy pocos individuos (e.g. Dragota y Riederer, 2008; Guo *et al.*, 2014; Racovita y Jetter, 2016). La mayor desviación estándar en la abundancia promedio de *A. araucana* sana podría deberse a que solo 3 individuos fueron analizados, ya que una menor desviación estándar fue observada en individuos enfermos en sus 3 niveles de daño (n=5 por 3 [cada nivel]). De hecho, al comparar la abundancia promedio de cada nivel de los 5 individuos enfermos muestreados con la de los individuos sanos (n=3), también se observa una menor desviación estándar que en la abundancia promedio de los sanos (Fig. 6).

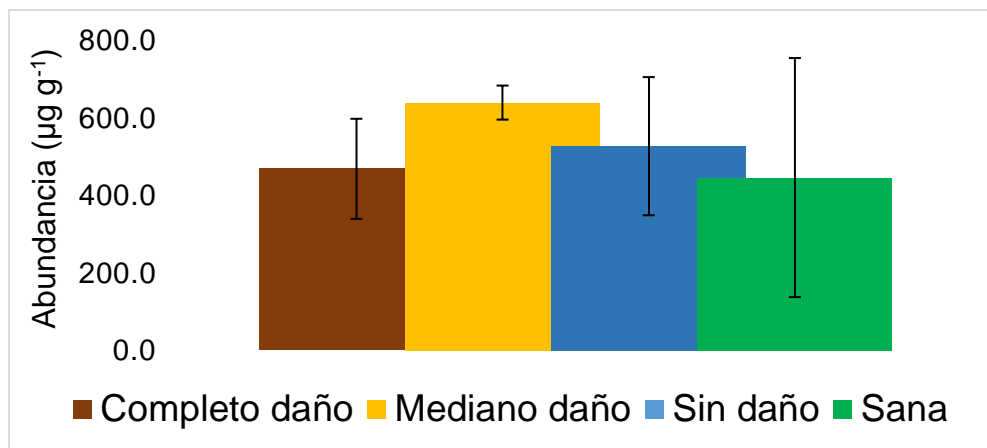


Figura 6. Abundancia total promedio de largas cadenas de ácidos grasos (C_{24} a C_{34}), en hojas de *A. araucana* enfermas ($n = 15$); sin daño, mediano daño y completo daño (*i.e.* $n = 5$, respectivamente) y hojas de *A. araucana* sanas ($n=3$) en $\mu\text{g g}^{-1}$ de hojas secas. En cada barra se muestra la desviación estándar respectiva.

En individuos de *A. araucana* enferma (promedio de sus 3 niveles de daño de hojas, $n=15$) y sana ($n=3$) las cadenas de ácidos grasos más abundantes fueron C_{26} , C_{28} y C_{30} (Fig. 7 a), donde el ácido octacosanoico (C_{28}) domina los homólogos ($192,9 \pm 59,3$ y $185,7 \pm 157,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de hoja seca respectivamente) en ambos individuos. No existen diferencias significativas entre la abundancia promedio de ceras de hoja en individuos enfermos y sanos, pero hay variaciones observables en la abundancia promedio de las cadenas más largas (C_{30} y C_{32}), con mayores abundancias en individuos de *A. araucana* enferma (Fig. 7 a). La distribución de ácidos grasos dominantes (C_{26} , C_{28} y C_{30}) con abundancia máxima del C_{28} se mantiene en los 3 niveles de daño de hojas de *A. araucana* enferma con leves diferencias en C_{28} , C_{30} y C_{32} (Fig. 7 b).

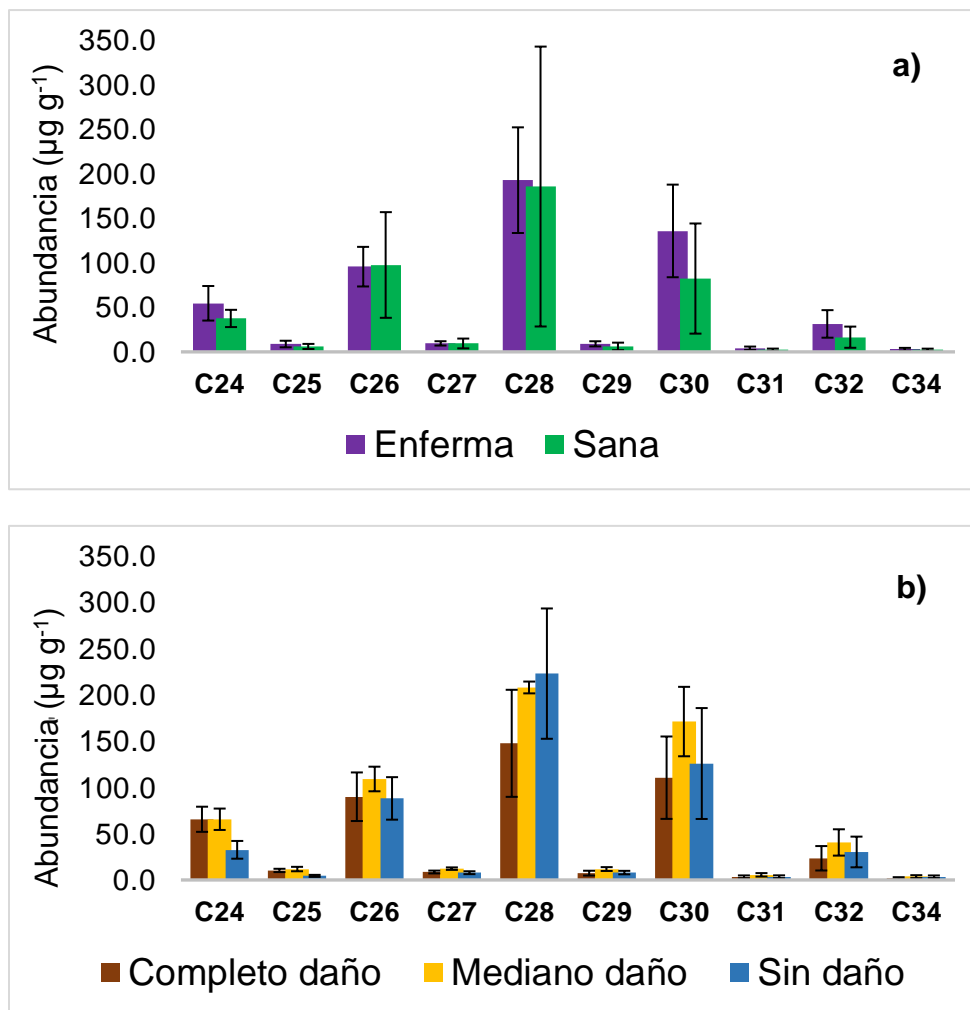


Figura 7. Abundancia total promedio de cada una de las largas cadenas de ácidos grasos (C₂₄ a C₃₄) en: a) hojas de enfermas (n = 15) promedio de hojas sin daño, mediano daño y completo daño (i.e. n = 5, respectivamente) y hojas de *A. araucana* sanas (n=3) en μg g⁻¹ de hojas secas. b) Abundancia total promedio de cada una de las largas cadenas de ácidos grasos (C₂₄ a C₃₄) en hojas de los 3 estados de *A. araucana* enferma (n = 5, en cada estado). Las barras con la desviación estándar respectiva.

Debido a esta mayor abundancia de las cadenas más largas pares (C₃₀ y C₃₂) en individuos de *A. araucana* enferma con respecto a la sana (Fig. 7 a), existen diferencias significativas entre el ACL de ácido grasos de hojas de individuos de *A. araucana* enferma sin daño y hojas de individuos de *A. araucana* sana (Mann Whitney p=0,036), donde el ACL promedio de las hojas de individuos sin daño

enfermos es mayor que el ACL promedio de las hojas de individuos sanos (Fig. 8 a). Aunque se han llevado a cabo varios estudios de fisiología de la cutícula y con ellos de ácidos grasos (e.g. Jetter y Schäfer, 2001; Buschhaus *et al.*, 2007; Racovita y Jetter, 2016), solo se encontró un trabajo que caracterice abundancia y distribución (en forma de ACL) de ácidos grasos. En este estudio, Freimuth y colaboradores (2017) evaluaron la distribución de los ácidos grasos en la forma del ACL, considerando especies de árboles angiospermas deciduas del bosque templado.

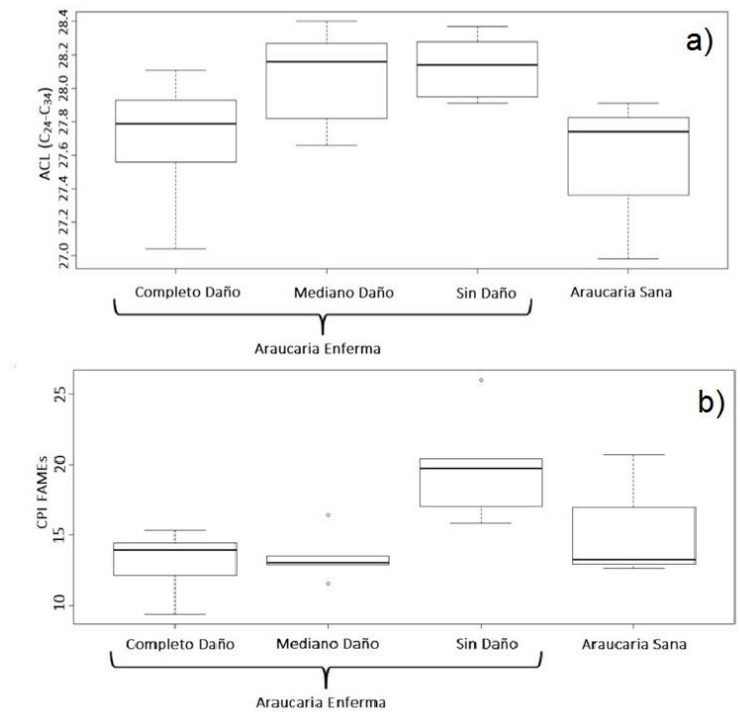


Figura 8. Diagrama de cajas: a) ACL (cadenas C₂₄ a C₃₄) y b) CPI (cadenas C₂₄ a C₃₄), de ácidos grasos en hojas de *A. raucana* enferma con completo daño, mediano daño y sin daño foliar y hojas de *A. raucana* sana, donde la mediana de los datos está representada como una línea dentro de la caja, la mediana de los valores más altos y más bajos son los que cierran esta caja, los valores dentro de los bigotes son valores fuera de la media y los valores atípicos están marcados con un punto.

Estas hojas deciduas son distintas a las hojas perennes de las *A. raucanas* del bosque templado, de hecho estas especies (angiospermas deciduas) poseen una

mayor abundancia en las cadenas de ácidos grasos de C₃₀ seguido por C₂₈ (a diferencia de la *A. araucana* con dominante C₂₈) con un ACL variando entre 24 a 27 unidades comparado con el de *A. araucana* que es mayor a 27 variando entre 27 y 28,4 (Fig. 8 a) para los 3 niveles de daño de hojas de *A. araucana* enferma y hojas de *A. araucana* sana.

Los autores (Freimuth *et al.*, 2017) reportan que un aumento en abundancias de ácidos grasos de cadenas más largas se observa al aumentar la madurez de las hojas en individuos de plantas vasculares aumentando con esto el ACL, debido al incremento en la abundancia de las cadenas más largas (e.g., C₃₀ y C₂₈). Es decir, la *síntesis de novo* de largas cadenas de ácidos grasos se inicia con la hoja madura y aumenta a medida que avanza su madurez. Sin embargo, esto no explica el mayor ACL en ceras de hojas de *A. araucana* enferma (hojas sin daño) que en hojas de individuos sanos, ya que ambos individuos son similares en altura y por ende de similar edad y con hojas maduras. Por lo tanto, sugerimos que hay un efecto en la producción de las cadenas más largas de ácidos grasos de ceras en individuos enfermos de *A. araucana* a causa de la enfermedad que están padeciendo.

El CPI de los ácidos grasos de hojas de individuos enfermos presentan diferencias significativas entre hojas sin daño y mediano daño (Mann-Whitney $p=0,021$), también entre hojas sin daño y completo daño (Mann-Whitney $p=0,012$), donde un menor CPI caracteriza las hojas con daño foliar. Una disminución del CPI ha sido asociada a degradación bacteriana de ceras hojas, donde una disminución en su valor es interpretado como una mayor degradación de material orgánico (e.g. Contreras *et al.*, 2016; Bliedtner *et al.*, 2018). Las ceras son compuestos

recalcitrantes y de lenta degradación (>2 años) (e.g. Tu *et al.*, 2017). Por lo tanto, sugerimos que hay un cese en la producción de largas cadenas de ácidos grasos (C₂₈, C₃₀ y C₃₂) en hojas con daño foliar de *A. araucana* enferma, que se observa de mejor manera con el CPI.

n-Alcanos

A diferencia de los ácidos grasos, existen diferencias significativas en las abundancia promedio de cadenas largas de *n*-alcanos (suma del C₂₃ al C₃₃) en hojas de individuos de *A. araucana* enferma (promedio de sus 3 niveles de daño) con $77,1 \pm 25,5 \mu\text{g g}^{-1}$ y $28,9 \pm 18,8 \mu\text{g g}^{-1}$ de hoja seca en individuos sanos de *A. araucana* (Tabla 3). Más abundantes en individuos enfermos de *A. araucana* (Mann-Whitney $p=0,017$), también al comparar la abundancia total promedio de cada nivel de daño de individuos enfermos (completo, mediano y sin daño foliar [$n=5$ respectivamente]) con la abundancia de individuos sanos ($n=3$) (Kruskal-Wallis $p=0,059$) (Fig. 9), sigue siendo mayor en individuos enfermos, significativamente entre *A. araucana* enferma con mediano daño foliar y *A. araucana* sana (Mann-Whitney $p=0,036$).

En individuos enfermos (promedio de sus 3 niveles de daño) y sanos de *A. araucana*, las cadenas largas de *n*-alcanos más abundantes fueron C₂₇, C₂₉ y C₃₁ (Fig. 10 a), donde el *n*-nonacosano (C₂₉) es el dominante ($22,7 \pm 9,1$ y $8,2 \pm 5,7 \mu\text{g g}^{-1}$ de hoja seca respectivamente) en individuos enfermos y sanos.

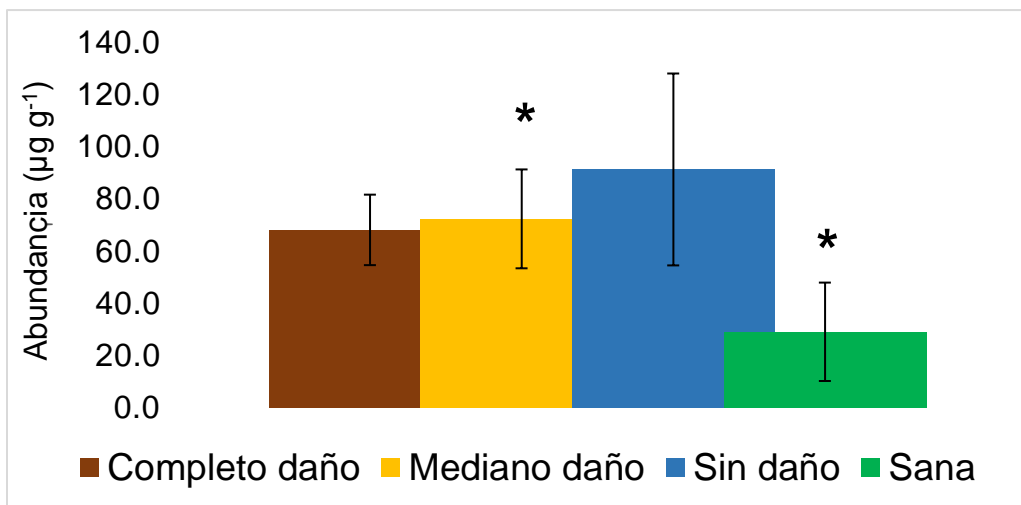


Figura 9. Abundancia total promedio de largas cadenas de n-alcenos (C_{23} a C_{33}) en hojas de *A. araucana* enfermas ($n = 15$); sin daño, mediano daño y completo daño (i.e. $n = 5$, respectivamente) y hojas de *A. araucana* sanas ($n=3$) en $\mu\text{g g}^{-1}$ de hojas secas. En cada barra se muestra la desviación estándar respectiva. * $p < 0,05$.

La dominancia de n-alcenos de cadenas largas impares C_{29} y C_{31} ha sido descrita también por 2 estudios de individuos de *A. araucana* por Raffi y Dodd (1998) y Dragota y Riederer (2008). Sin embargo, ambos trabajos reportan también al alcano C_{33} como dominante, algo que sólo se observa en *A. araucana* enferma sin daño foliar en este estudio (Fig. 10 b). Como se mencionó anteriormente, Dragota y Riederer (2008) trabajaron con individuos jóvenes colectados en invernaderos, donde el homólogo dominante fue C_{33} , mientras que el estudio de Raffi y Dodd (1998) fue con *A. araucanas* adultas de 4 zonas autóctonas de esta especie (Los Andes y las montañas costeras de Nahuelbuta en Chile) donde el homólogo dominante fue C_{29} . Por lo tanto, se podría suponer considerando la dominancia observada en este estudio (C_{27} , C_{29} y C_{31} , principal homólogo C_{29}) que son estos los n-alcenos dominantes de *A. araucana* en hábitat naturales.

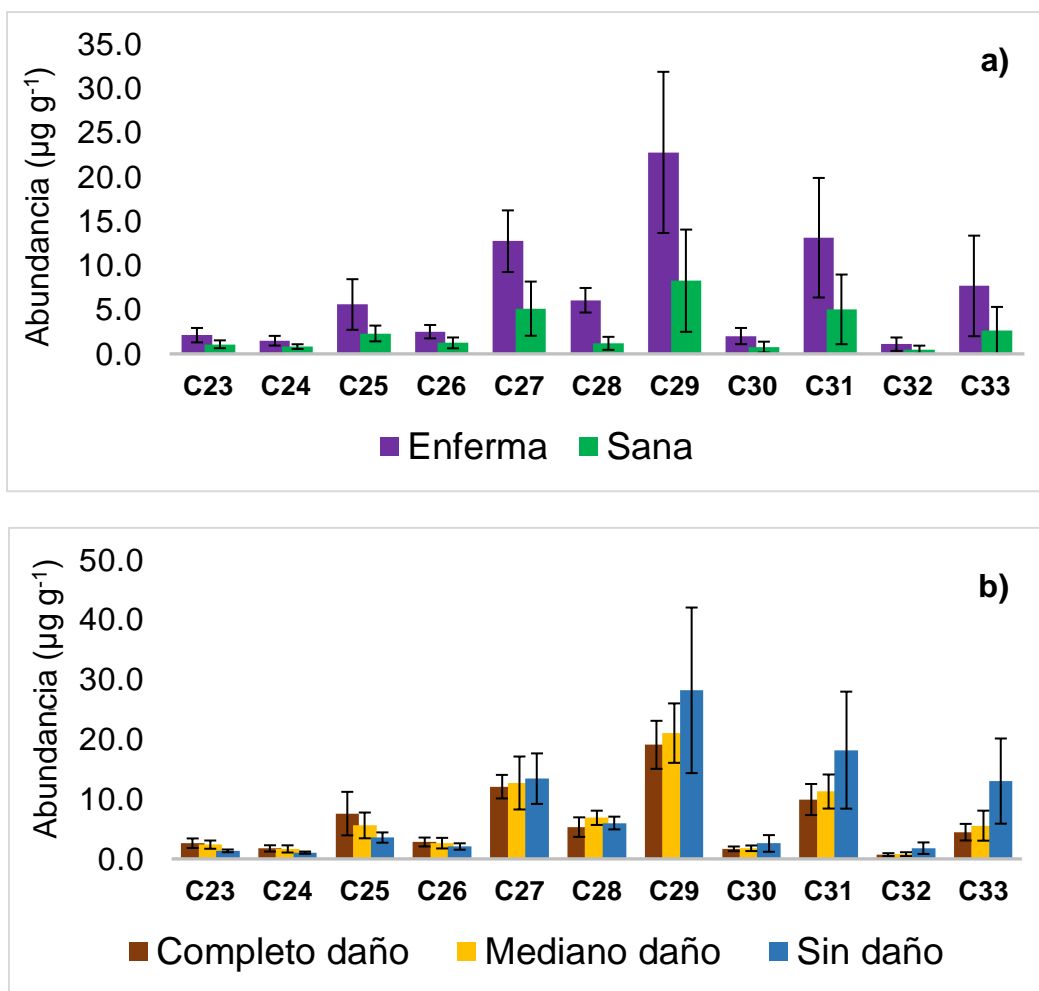


Figura 10. Abundancia total promedio de cada una de las largas cadenas de n-alcenos (C₂₃ a C₃₃) en: a) hojas de *A. araucana* enfermas (n = 15) promedio de hojas sin daño, mediano daño y completo daño (i.e. n = 5, respectivamente) y hojas de *A. araucana* sanas (n=3) en $\mu\text{g g}^{-1}$ de hojas secas. b) Abundancia total promedio de cada una de las largas cadenas de n-alcenos (C₂₃ a C₃₃) en hojas de los 3 niveles de daño en *A. araucana* enferma (n = 5, en cada estado). Las barras con la desviación estándar respectiva.

Los n-alcenos, debido a su alta conservación en medios terrestres y acuáticos, han sido las ceras de hojas más estudiados hasta ahora (e.g. Diefendorf *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012; Bush y McInerney, 2013; Diefendorf *et al.*, 2015). Aun así, no se ha reportado la distribución de n-alcenos en forma de ACL o CPI en muchas especies, entre ellas la *A. araucana*. En este estudio los valores de ACL varían de 28 a 30 unidades en individuos de *A. araucana* enferma (3 niveles de daño) y sana

respectivamente (Fig. 11 a), siendo estos valores menores a los reportados en hojas de individuos de la Familia Araucariaceae cuyo ACL varia de 30 a 32 unidades (Diefendorf *et al.*, 2015). De hecho los valores de ACL de hojas de *A. araucana* enferma y sana son comparables con el ACL de individuos de la familia pinaceas del América del Norte, los que varían de 27 a 30 unidades (Diefendorf *et al.*, 2011; Diefendorf *et al.*, 2015). Aunque existe una diferencia en el ACL de *A. araucana* enferma sin daño y *A. araucana* sana, siendo mayor en el individuo enfermo, esta diferencia no es significativa (Mann-Whitney $p=0,233$) por lo que serían necesarios estudios con más individuos para asegurar o concluir que esta diferencia es por la enfermedad que las está afectando.

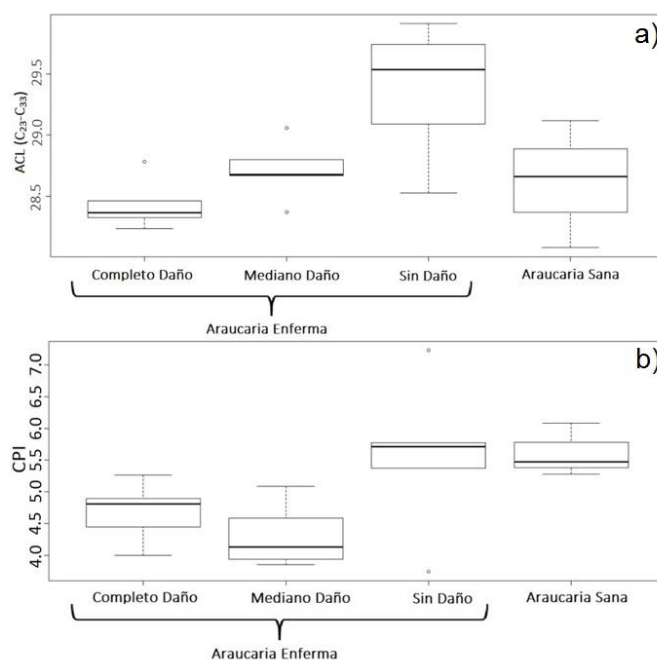


Figura 11. Diagrama de cajas: a) ACL (cadenas C₂₃ a C₃₃) y b) CPI (cadenas C₂₃ a C₃₃), de n-alcamos en hojas de *A. araucana* enferma con completo daño, mediano daño y sin daño foliar y hojas de *A. araucana* sana, donde la mediana de los datos está representada como una línea dentro de la caja, la mediana de los valores más altos y más bajos son los que cierran la caja, los valores dentro de los bigotes son valores fuera de la media y los valores atípicos están marcados con un punto.

Aunque los perfiles cualitativos de los homólogos de n-alcenos fueron similares para *A. araucana* enferma (promedio de sus 3 niveles de daño de hojas) y sana, existe una diferencia cuantitativa significativa entre las abundancias de sus largas cadenas (Fig. 10 a). También hay una mayor abundancia de las cadenas más largas de n-alcenos (C_{29} , C_{31} y C_{33}) en *A. araucana* enferma sin daño comparándola con las con daño foliar (Mediano y completo daño) (Fig. 10 b). Esta diferencia se refleja de manera significativa en el ACL, siendo mayor en individuos de *A. araucana* enferma sin daño que en individuos de *A. araucana* con completo daño foliar (Mann-Whitney $p=0,021$) (Fig. 11 a). Esto es interpretado como un posible cese de la biosíntesis *in vivo* de largas cadenas, como fue mencionado en la explicación del CPI de ácidos grasos. La disminución de ACL se ha estudiado por Bliedtner y colaboradores (2018) quienes reportaron la degradación de ACL de n-alcenos de hojas de árboles caducifolios en relación al material del suelo (0-5 cm) donde disminuye por acción de degradación de la materia orgánica. Sin embargo, esta degradación es menor ($<0,5$) que la observada en este estudio ($>0,5$), en caso de que exista degradación (Fig. 11 a). Por lo tanto, se sugiere que al igual que con los ácidos grasos, podría existir un cese de la biosíntesis *in vivo* de las cadenas más largas (y dominantes) de estos compuestos a medida que aumenta el daño foliar. Este efecto también puede ser interpretado a partir del valor CPI, el cual muestra una diferencia significativa entre individuos sanos y enfermos de *A. araucana* con mediano y completo daño foliar (Mann-Whitney $p=0,036$) (Fig. 11 b).

Es importante destacar que en n-alcenos se observan claras diferencias entre hojas de individuos enfermos y sanos, e incluso entre hojas con diferente daño foliar (Fig.

10 y 11). Esta clase de cera en hojas de *A. araucana* podría ser utilizado para detectar individuos enfermos sin daño aparente. En todo caso, más estudios son requeridos para confirmar lo propuesto, especialmente considerando que no se conoce el origen y tipo de enfermedad que está atacando a esta especie endémica de Chile y Argentina.

Alcoholes

La abundancia total promedio de cadenas largas de alcoholes (suma de C₂₄ al C₂₈) de los 3 niveles de daño de individuos de *A. araucana* enferma (n=5) fue de 23,1±15,1 µg g⁻¹ y en hojas de *A. araucana* sana (n=3) fue de 2,2±3,5 µg g⁻¹ (Fig. 4). Más abundante significativamente en individuos enfermos (Mann-Whitney p=0,017), y se puede observar que en todos los niveles de daño de hojas de individuos enfermos, los alcoholes fueron más abundantes que en individuos sanos (Fig. 12), pero solo es significativa al comparar hojas de *A. araucana* sana con hojas de *A. araucana* enferma con mediano daño (Mann-Whitney p=0,036) (Fig. 12).

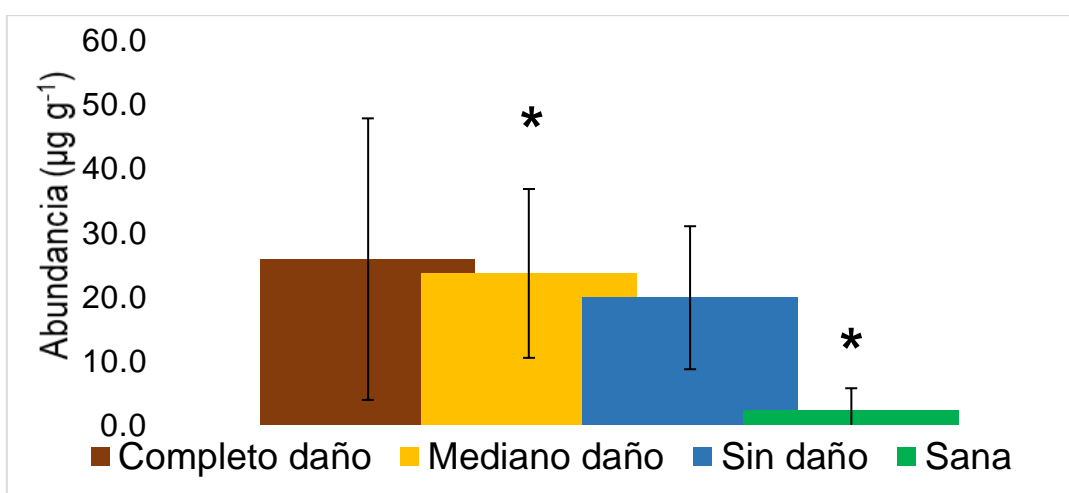


Figura 12. Abundancia total promedio de largas cadenas de alcoholes (C₂₄ a C₂₈) en hojas de *A. araucana* enfermas: Completo daño, mediano daño y sin daño (i.e. n = 5, respectivamente) y hojas

de *A. araucana* sanas (n=3) en $\mu\text{g g}^{-1}$ de hojas secas. En cada barra se muestra la desviación estándar respectiva.

Como ya se mencionó, los alcoholes son un menor porcentaje de las ceras de hojas en individuos enfermos y sanos de *A. Araucana* ($3,2\pm 2,3$ y $0,5\pm 0,7\%$ respectivamente), estos resultados son comparables con el estudio de Dragota y Riederer (2008) quienes reportan que los alcoholes (en forma de alcoholes primarios [largas cadenas de C_{22} a C_{30}]) son un 2,9% de las ceras de hojas de *A. araucana* (comparando ácidos grasos, n-alcenos y alcoholes).

En individuos de *A. araucana* enfermos (promedio de sus 3 niveles de daño de hojas) y sanos las cadenas de alcoholes más abundantes fueron C_{24} y C_{26} (Fig. 13), donde el tetracosanol (C_{24}) actúa como dominante ($12,9\pm 8,5$ y $2,2\pm 3,5 \mu\text{g g}^{-1}$ de hoja seca respectivamente) en ambos individuos. Es más abundante significativamente la cadena de alcohol C_{24} en *A. araucana* enferma que en sana (Mann-Whitney $p=0,017$). Esta diferencia se observa entre los 3 niveles de daño de hojas de *A. araucana* enferma y *A. araucana* sana (Fig. 13), significativamente entre la enferma con mediano daño y *A. araucana* sana (Mann-Whitney $p=0,036$). En *A. araucana* sana se identificó solo las cadenas C_{24} , que probablemente por la baja concentración de las cadenas más largas y por ende su baja intensidad (y/o superposición) de la señal no pudieron ser establecidas. Mientras que en *A. araucana* enferma dominan las cadenas pares (C_{24} , C_{26}) como ha sido determinado en otros estudios de alcoholes de ceras de hojas (e.g. Eglinton y Hamilton, 1967; Dragota y Riederer, 2008).

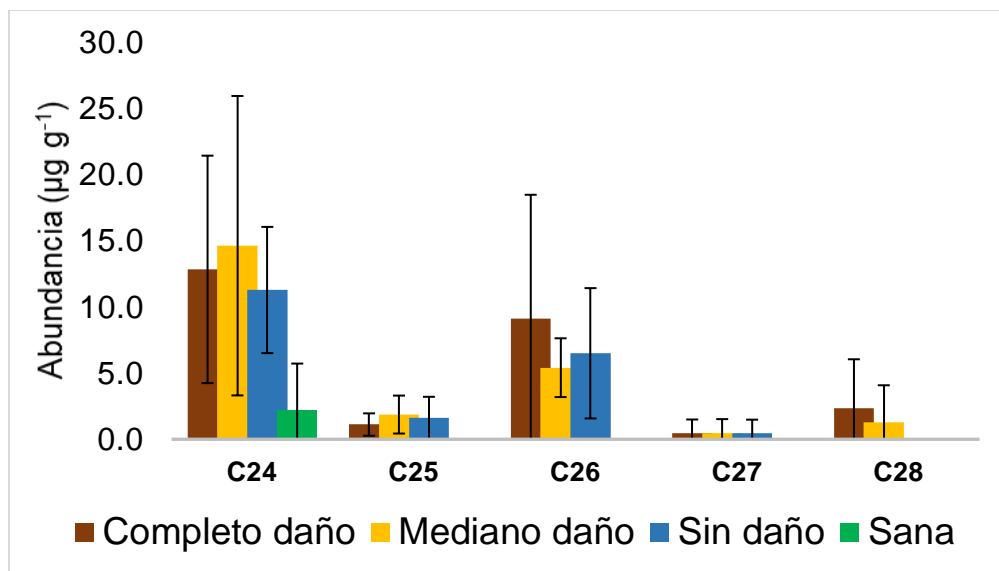


Figura 13. Abundancia total promedio de cada una de las largas cadenas de alcoholes (C₂₄ a C₂₈) en hojas de los 3 niveles de daño de hojas de *A. araucana* enferma, completo, mediano y sin daño foliar (n = 5, en cada estado) y hojas de *A. araucana* sana (n = 3). Las barras con la desviación estándar respectiva.

No se reportan efectos de cese de producción de cadenas largas de alcoholes en ceras de hojas de *A. araucana* enferma en hojas con daño foliar, como ocurre con los ácidos grasos y n-alcanos por lo que podrían ser compuestos que se generan *in vivo* aún después de secarse la hoja. También es importante destacar que al igual que en n-alcanos, se observan claras diferencias de abundancia total y abundancias de cadenas C₂₄ de alcoholes entre hojas de individuos enfermos y sanos, e incluso entre hojas de individuos enfermos con daño foliar. Por lo tanto, los alcoholes al igual que n-alcanos podrían ser utilizados para detectar individuos de *A. araucana* enfermos sin daño aparente.

Este estudio se focalizó en largas cadenas ($>C_{23}$) de ácidos grasos, n-alcanos y alcoholes que junto con los ésteres, aldehídos y cetonas han sido reportadas como los principales componentes de las ceras de hojas (e.g. Eglinton y Hamilton, 1967; Tafolla *et al.*, 2013). Aunque aún no están del todo claro los mecanismos de transporte en su producción, se sabe que los ácidos grasos de 16 y 18 carbonos son sintetizados *de novo* en los cloroplastos (Jetter *et al.*, 2006) donde son transportados al retículo endoplasmático sufriendo una elongación que genera ácidos grasos de cadenas más largas (de 20 a 34 carbonos) (Samuels *et al.*, 2008; Tafolla *et al.*, 2013). En esta etapa de elongación de ácidos grasos a cadenas más largas mediante procesos de reducción de acil-CoA (acetil Coenzima A) se forman alcoholes primarios, dominados por cadenas pares (Jetter *et al.*, 2006; Samuels *et al.*, 2008), y por procesos de descarboxilación (perdida de un átomo de carbono) se forman n-alcanos. Ya que tanto los n-alcanos como los alcoholes primarios se forman luego de los procesos de elongación, estos compiten por los precursores de Acil-CoA de varias longitudes de cadena (Samuels *et al.*, 2008; Tafolla *et al.*, 2013). Una vez producidos, estos compuestos son transportados fuera de la pared celular donde forman las ceras de la cutícula. Esto quiere decir que la distribución y composición de ceras de hojas viene determinada desde el crecimiento de la planta (Árbol), guardados en su información genética producto de la evolución de vivir con diversos factores ambientales. Esto se observa en la dominancia de carbonos en cada una de las ceras analizadas que no diferencian entre una *A. araucana* enferma de una sana. Por ejemplo, la mayor abundancia en cadenas de ácidos grasos son C_{26} , C_{28} y C_{30} con dominante común C_{28} ; la mayor abundancia en cadenas de n-alcanos son C_{27} , C_{29} y C_{31} con dominancia del C_{29} ; y en alcoholes el C_{24} . Estas

características son cualitativas y como se mencionó anteriormente, se comparten con otros estudios de *A. araucana* (Raffi *et al.*, 1998; Dragota y Riederer, 2008) con muy leves diferencias, pudiendo ser una característica químico taxonómica de la especie en su ambiente natural.

En resumen este estudio reporta altas abundancias de ácidos grasos y un menor porcentaje de n-alcanos y alcoholes tanto en *A. araucana* enferma como sana. Pero existe mayor abundancia en las cadenas más largas de ácidos grasos (C₂₈, C₃₀ y C₃₂) en hojas de individuos enfermos de *A. araucana* que en hojas de individuos sanos, lo que se refleja en el mayor ACL en hojas de individuos enfermos. Este aumento de las cadenas más largas en individuos de *A. araucana* enfermos, considerando su biosíntesis, probablemente intensificó la descarboxilación y reducción, generando con esto una mayor abundancia de largas cadenas de n-alcanos y alcoholes (respectivamente), diferentes significativamente a las de ceras de hojas de individuos de *A. araucana* sanos. En consecuencia, tanto n-alcanos como alcoholes pueden ser compuestos determinantes para identificar si individuos de *A. araucana* tienen esta enfermedad, independiente del nivel de daño foliar que tenga el árbol.

Otro punto importante, y que según tenemos entendido no se ha estudiado, es el cese de la biosíntesis *in vivo* de ceras de hojas (antes de caer del árbol) que generalmente es atribuida a la degradación bacteriana post depositacional en el suelo (*e.g.* Tu *et al.*, 2017; Bliedtner *et al.*, 2018). La disminución significativa de CPI en ácidos grasos y disminución significativa de ACL en n-alcanos es resultado de

una menor abundancia de las largas cadenas de estos compuestos en *A. araucana* enferma, lo cual podría ser interpretado como degradación de las largas cadenas de ácidos grasos a medida que aumenta el daño foliar. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, estas ceras de hojas son conocidas por su preservación post depositacional en suelos y sedimentos lacustres y marinos (e.g. Buggle *et al.*, 2010; Tu *et al.*, 2017; Bliedtner *et al.*, 2018). Una explicación alternativa sería que la enfermedad además de aumentar la producción de n-alcanos y alcoholes, termine por alterar la distribución de ácidos grasos y por ende la de n-alcanos disminuyendo significativamente el CPI en ácidos grasos y ACL en n-alcanos. Una explicación alternativa como se mencionó anteriormente es que podría existir un cese de la biosíntesis de ceras durante el daño foliar o decoloración de las hojas. Por lo tanto, un punto importante y a tener en consideración en futuros estudios es la producción ceras o cese de la biosíntesis por acción de daño foliar *in vivo* viendo compuestos específicos como las ceras de hojas.

Factores causantes de la enfermedad o daño foliar

Se han reportado varios estudios del papel que cumple la cutícula en enfermedades de plantas (e.g. Blakeman, 1973; Belding *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2018), estos estudios en general son por enfermedades producto de patógenos. Ya que, como se mencionó en la introducción las ceras de la cutícula evitan el ataque de bacterias y hongos (Blakeman, 1973; Belding *et al.*, 2000) y la protege de insectos (Znidarcic *et al.*, 2008). Belding y colaboradores (2000) estudiaron la mancha de hollín

(Hongos) específicamente *Peltaster fructicola* y *Leptodontidium elatius* en ceras epicuticulares de cultivares de manzana, aunque hubo diferencias en las proporciones relativas de n-alcanos, no se relacionaron con la gravedad de la mancha de hollín. Marcell y Beatti (2002) evaluaron la influencia de las ceras cuticulares foliares en la colonización bacteriana de las hojas de 4 mutantes de maíz brillante (*Zea mays L.*), determinando que el apoyo a la colonización bacteriana era producido por una menor densidad de las ceras cristalinas en las hojas. También se ha propuesto que grosor y la estructura tridimensional de los cristaloides de cera de hoja protegen las hojas y frutos de los patógenos fúngicos (*Uncinula necator*) en bayas de uva (Schwab *et al.*, 1995). Estos y otros estudios (Gentry y Barbosa, 2006; Baldotto y Olivares, 2008; Kosma *et al.*, 2010) nos hablan de lo determinante que son las ceras cuticulares para el crecimiento o expansión de patógenos en las hojas (o partes aéreas de las plantas), sugiriendo que una mayor densidad de las ceras conlleva a una mejor protección, ya que, habría una mayor permeabilidad cuticular, minimizando la exudación de nutrientes que favorecen el crecimiento de patógenos. Basándonos en esta información, podríamos esperar que una mejor adaptación de la composición química de las ceras de hojas a fin de mejorar su permeabilidad, sería aumentar los compuestos derivados de largas cadenas de ácidos grasos como lo sugiere Jetter y Riederer (2016). Pero no hay estudios que demuestren algún efecto en la composición química de las ceras de hojas, por lo que más estudios son necesarios para determinar la influencia de patógenos en ceras.

Se puede asegurar o descartar la presencia de organismos patógenos influyentes o desencadenantes de la enfermedad de *A. araucana*, por lo que se evalúa el contenido presencia de ergosterol (esterol que compone las membranas celulares

de los hongos y ciertos protistas) en la fracción polar conteniendo los alcoholes y esteroides con fragmentos característicos de ergosterol saturado (m/z 363, 157 y 337) en cromatogramas (CG-MS QP-5050A-Shimadzu) de *A. araucana* enferma (en sus 3 niveles de daño foliar) sin encontrarlos (Anexo, Fig. 15).

Dentro de los desencadenantes de enfermedades en plantas están los agentes primarios bióticos (ya mencionados) y los abióticos, estos últimos son factores físicos del medio ambiente que rodean la especie (en este caso *A. araucana*) y le permiten vivir. Como se mencionó en la introducción existen varios factores que afectan la abundancia y distribución de las ceras de hojas. En *A. araucana* enferma reportamos un aumento de las cadenas más largas de ácidos grasos ($>C_{28}$) (Demostrado significativamente en el ACL) y con esto una mayor abundancia de n-alcenos y alcoholes en ceras de hojas, esto no podría deberse a la madurez de las hojas, como lo reporta Freimuth y colaboradores (2017), debido a que en estos estudios están son de características similares (adultos y hojas muestreadas bajo el dosel). Se han reportado variaciones en las ceras (abundancia y/o distribución) producto de cambios de temperatura y aridez (humedad) (*e.g.* Cui *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2015), sin embargo, no se reportaron variaciones significativas de temperatura y humedad entre enero y diciembre (2017) en la Laguna Verde del PNT (Anexo, Fig. 14). Lo mismo es observado en la precipitación que no sufrió cambios significativos entre esos meses (Anexo, Tabla 4). Aún quedan por estudiar factores abióticos que podrían influir o ser determinantes directos de la enfermedad que acontece hoy en día esta endémica especie, como puede ser presión atmosférica o radiación (*e.g.* Gonzáles *et al.*, 1996; Pilon *et al.*, 1999), ya

que, no se encontraron registros del año 2017 en el PNT (Fuente: www.minenergia.cl/exploradorsolar/).

Nuestros resultados en ceras de hojas de individuos de *A. araucana* enferma, podrían ser una respuesta a cambios ambientales (como precipitación, radiación, temperatura, humedad, etc.) de las últimas décadas o incluso antes. Lo que debe ser corroborado con mas estudios para determinar las causas de la enfermedad. Este trabajo propone los compuestos n-alcanos y alcoholes de ceras de hojas, como una diagnostico de alarma temprana a la enfermedad que esta mermando a la población de *A. araucana*.

Una informacion relavante, de lo observado en los muestreos, es que en enero (2017) en la rivera de Laguna Verde del PNT no se reportaban individuos de *A. araucana* enfermos o con avance de daño foliar inusual, mientras que en diciembre del mismo año, varios individuos tenian la enfermedad. Tambien en zonas cercanas como el Parque Nacional Conguillio (Muestreo proyecto Fondecyt 1160719, diciembre 2018) se observó individuos de *A. araucanas* enferma principalmente en zonas bien expuestas, alejadas del dosel vegetal y cercanas a lagos (Laguna Captren y Lago Conguillío). Lo mismo fue observado en individuos de la rivera del Lago Galletué. Por lo que variaciones en la radiación, humedad (u otros factores fisicoquímicos) incluyendo la reducción de los bosques nativos de esta endemica especie, podrían haber desencadenado la enfermedad que esta padeciendo esta especie que hoy en dia se encuentra en peligro de extinción.

CONCLUSIÓN

Los individuos de *A. araucana* enfermas como las sanas en su ambiente natural poseen gran abundancia de ácidos grasos comparativamente con otros componentes de ceras de hojas como n-alcanos y alcoholes.

La *A. araucana* presenta características cualitativas quimio-taxonómicas idénticas para individuos enfermos y sanos, siendo las cadenas más abundantes para ácidos grasos C₂₆, C₂₈ y C₃₀ con dominante común C₂₈, para n-alcanos C₂₇, C₂₉ y C₃₁ con dominancia del C₂₉; y alcoholes con dominante C₂₄, respectivamente.

Las ceras de hojas permiten examinar y diferenciar no solo un individuo de *A. araucana* enfermo de uno sano, también permiten examinar y diferenciar los distintos niveles de daño de hojas (completo, mediano y sin daño foliar) de un individuo enfermo, ya que:

- Existe una mayor abundancia de cadenas largas de n-alcanos y alcoholes en hojas de individuos de *A. araucana* enferma que en hojas de individuos sanos, producto de un mayor ACL de ácidos grasos en hojas de individuos enfermos que en hojas de individuos sanos.
- Existe diferencias en la distribución (ACL y CPI) de las ceras de hojas de un individuo de *A. araucana* enfermo, comparando hojas con completo, mediano y sin daño foliar, donde: el CPI de ácidos grasos es mayor en hojas sin daño

que hojas con daño foliar y el ACL de n-alcanos es mayor en hojas sin daño que hojas con completo daño foliar.

Esta tesis muestra una clara respuesta a la enfermedad que padecen hoy en día poblaciones de *A. araucana* como mecanismo de protección, mejorando la capa externa con la que se protegen del medio ambiente. Este estudio es uno de los pocos que muestra una clara respuesta a condiciones hostiles para un árbol en la abundancia y distribución de ceras de hojas de plantas vasculares.

BIBLIOGRAFÍA

- Baldotto L. y Olivares F. (2008). Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. *Canadian Journal of Microbiology*, **54**(11), 918-931.
- Bargel H., Koch K., Cerman Z. y Neinhuis C. (2006). Structure–function relationships of the plant cuticle and cuticular waxes - a smart material?. *Csiro publishing*, **33**, 893–910.
- Belding D., Sutton B., Blankenship M., y Young, E. (2000). Relationship between apple fruit epicuticular wax and growth of *Peltaster fructicola* and *Leptodontidium elatius*, two fungi that cause sooty blotch disease. *Plant Disease.*, **84**(7), 767-772.
- Bevilacqua R., (2017). Misteriosa enfermedad ya afecta al 93% de las araucarias en Chile, Santiago: Ladera Sur.
- Blakeman P. (1973) The Chemical Environment of Leaf Surfaces with Special Reference to Spore Germination of Pathogenic Fungi. *Pesticides Group*, **4**(4), 575-588.
- Bliedtner M., Schäfer I., Zech R. y Suchodoletz H. (2018). Leaf wax n-alkanes in modern plants and topsoils from Eastern Georgia (Caucasus) - implications for reconstructing regional paleovegetation. *Biogeosciences*, **15**, 3927–3936.
- Buggle B., Wiesenberg L. y Glaser B. (2010). Is there a possibility to correct fossil n-alkane data for postsedimentary alteration effects?. *Applied Geochemistry*, **25**(7), 947–957.

- Buschhaus C., Herz H. y Jetter R., (2007). Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on adaxial sides of *Rosa canina* leaves. *Annals of Botany*, **100**(7), 1557–1564.
- Bush R. y McInerney F. (2013). Leaf wax n-alkane distributions in and across modern plants: Implications for paleoecology and chemotaxonomy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **117**, 161–179.
- CONAF (2014). Plan de manejo Parque nacional Tolhuaca, Santiago: Departamento de planificación y desarrollo.
- CONAF (2016). www.conaf.cl. [En línea] <http://www.conaf.cl/conaf-desarrolla-plan-de-trabajo-para-determinar-causa-de-muertes-de-araucarias/>. [Último acceso: 10 Marzo 2018].
- CONAF (2017). www.conaf.cl. [En línea] <http://www.conaf.cl/conaf-desarrolla-plan-de-trabajo-para-determinar-causa-de-muertes-de-araucarias/>. [Último acceso: 10 Marzo 2018].
- CONAF (2017). www.conaf.cl. [En línea] <http://www.conaf.cl/conaf-e-investigadores-dan-a-conocer-avances-en-el-dano-foliar-de-araucarias/>. [Último acceso: 10 Abril 2018].
- CONAF (2017). www.conaf.cl. [En línea] <http://www.conaf.cl/noruego-especialista-en-insectos-adelanta-sobrevivencia-de-las-araucarias/>. [Último acceso: 10 Abril 2018].
- Contreras S., Werne P., Brown T., Anderson R., y Fawcett J. (2016). A molecular isotope record of climate variability and vegetation response in southwestern North America during mid-Pleistocene glacial/interglacial cycles. *Palaeogeography, Palaeoclimatology y Palaeoecology*, **459**, 338-347.

- Cui W., Huang H. y Xie C. (2008). Characteristics of seasonal variations of leaf n-alkanes and n-alkenes in modern higher plants in Qingjiang, Hubei Province, China. *Chinese Science Bulletin*, **53**(17), 2659–2664.
- Decreto Supremo N°29. Diario oficial de la república de Chile, Santiago, Chile, 19 de diciembre de 2018.
- Decreto Supremo N°43. Diario oficial de la república de Chile, Santiago, Chile, 3 de abril de 1990.
- Díaz I., Mellado D., Godoy J. y Moreno R. (2016). Bosque Pehuén. Primera ed. Fundación mar adentro, Chile, 100.
- Dodd R. y Afzal-Rafii Z. (2000). Habitat-related adaptive properties of plant cuticular lipids. *Evolution*, **54**(4), 1438-1444.
- Diefendorf A., Freeman K., Wing S. y Graham H. (2011). Production of n-alkyl lipids in living plants and implications for the geologic past. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **75**(23), 7472–7485.
- Diefendorf A., Leslie A. y Wing S. (2015). Leaf wax composition and carbon isotopes vary among major conifer groups. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **170**, 145–156.
- Donoso C. (1993). Bosques templados de Chile y Argentina: variación, estructura y dinámica. Primera ed. Editorial Universitaria, Chile, 483.
- Dragota S. y Riederer M. (2008). Comparative study on epicuticular leaf waxes of *Araucaria araucana*, *Agathis robusta* and *Wollemia nobilis* (Araucariaceae). *Australian Journal of Botany*, **56**(8), 644-650.

- Ebada S., Talaat A., Labib R., Mándi A., Kurtán T., Müller W., Singab A. y Proksch P. (2017). Cytotoxic labdane diterpenes and bisflavonoid atropisomers from leaves of *Araucaria bidwillii*. *Tetrahedron*, **73**, 3048-3055.
- Eglinton G. y Hamilton R. (1967). Leaf Epicuticular Waxes. *Science*, **156**(3780), 1322–1335.
- Feakins S., Peters T., Wu M., Shenkin A., Salinas N., Girardin C. y Malhi Y. (2016). Production of leaf wax n-alkanes across a tropical forest elevation transect. *Organic Geochemistry*, **100**, 89-100.
- Freimuth J., Diefendorf F. y Lowell V. (2017). Hydrogen isotopes of n-alkanes and n-alkanoic acids as tracers of precipitation in a temperate forest and implications for paleorecords. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **206**, 166–183.
- Gentry G. y Barbosa P. (2006). Effects of leaf epicuticular wax on the movement, foraging behavior, and attack efficacy of *Diaeretiella rapae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **121**(12), 115-122.
- González M., Cortés M., Izquierdo F., Gallo L., Echeverría C., Bekkesy S. y Montaldo P. (2006). Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina: Autoecología. Primera ed. Universidad Austral de Chile, Chile, 36-53.
- Gonzalez R., Paul N., Percy K., Ambrose M., McLaughlin C., Barnes J., Areses M. y Wellburn A. (1996). Responses to ultraviolet-B radiation (280-315 nm) of pea (*Pisum sativum*) lines differing in leaf surface wax. *Physiologia Plantarum*, **98**(4), 852–860.

- Guo N., Gao J., He Y., Zhang Z. y Guo Y. (2014). Variations in leaf epicuticular n-alkanes in some *Broussonetia*, *Ficus* and *Humulus* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, **54**, 150–156.
- Guo Y., Guo N., He Y. y Gao J. (2015). Cuticular waxes in alpine meadow plants: climate effect. *Ecology and evolution*, **5**(18), 3954-3968.
- Harayama T. y Riezman H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **19**(5), 281-296.
- Herrera C. (2017). Diario concepción. [En línea]
<https://www.diarioconcepcion.cl/ciudad/2017/08/21/araucarias-en-peligro-extrana-enfermedad-pone-en-riesgo-a-milenario-arbol.html>. [Último acceso: 9 Abril 2017].
- Huang X., Zhao B., Wang K., Hu Y. y Meyers P. (2018). Seasonal variations of leaf wax n-alkane molecular composition and δD values in two subtropical deciduous tree species: Results from a three-year monitoring program in central China. *Organic Geochemistry*, **118**, 15-26.
- Jeffree C. (2006). The fine structure of the plant cuticle. En: *Biology of the Plant Cuticle*. Germany: *Blackwell publishing*, **23**, 11-125.
- Jetter R. y Schäfer S. (2001). Chemical Composition of the *Prunus laurocerasus* Leaf Surface. Dynamic Changes of the Epicuticular Wax Film during Leaf Development. *Plant Physiology*, **126**(4), 1725–1737.
- Jetter R., Kunst L. y Samuels A. (2006). Composition of Plant Cuticular Wax. *Annual Plant Reviews*, **23**, 145-185.
- Jetter R. y Riederer M. (2016). Localization of the Transpiration Barrier in the Epi- and Intracuticular Waxes of Eight Plant Species: Water Transport

- Resistances Are Associated with Fatty Acyl Rather Than Alicyclic Components. *Plant Physiology*, **170**(2), 921–934.
- Kerstiens G. (2007). Cuticle. En: K. Roberts, ed. Handbook of Plant Science. Inglaterra, **2**, 151-153.
- Kosma D., Nemacheck J., Jenks M. y Williams C. (2010). Changes in properties of wheat leaf cuticle during interactions with Hessian fly. *The Plant Journal*, **63**(1), 31-43.
- Leide J., Hildebrandt U., Vogg G. y Riederer M. (2011). The positional sterile (ps) mutation affects cuticular transpiration and wax biosynthesis of tomato fruits. *Journal of Plant Physiology*, **168**(9), 871–877.
- Luo P., Peng P., Lu H., Zheng Z. y Wang X. (2012). Latitudinal variations of CPI values of long-chain n-alkanes in surface soils: Evidence for CPI as a proxy of aridity. *Science China Earth Sciences*, **55**(7), 1134–1146.
- Marcell M. y Beattie A. (2002). Effect of Leaf Surface Waxes on Leaf Colonization by *Pantoea agglomerans* and *Clavibacter michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **15**(12), 1236–1244.
- Marco A. (2006). Química de los productos naturales. Primera ed. España: Editorial Síntesis, S. A.
- Martínez M. (2017). el definido. [En línea] <http://www.eldefinido.cl/actualidad/pais/9131/Mas-del-90-de-las-araucarias-tiene-una-misteriosa-enfermedad-que-se-esta-haciendo-para-salvarlas/>. [Último acceso: 9 Abril 2018].

- Medina, N., Vidal, P., Cifuentes, R., Torralba, J., y Keusch, F. (2018). Evaluación del estado de salud de los árboles de *Araucaria araucana* mediante imágenes hiperespectrales. *Revista de teledetección*, **52**, 41-53.
- Montaldo P. (1974). La Bio-ecología de *Araucaria araucana* (Mol) Koch. Instituto Forestal Latino-Americano de Investigación y Capacitación. 46 ed. Universidad de Chile, Chile, Boletín Técnico N° 55: 46-48.
- Núñez C. (2017). Conaf lidera estudio de investigadores Ufro por bacterias que causan muerte de araucarias, Temuco: Diario Tiempo21 Región de La Araucanía.
- Ohkouchi N., Kawamura K., Kawahata H. y Tairag A. (1997). Latitudinal distributions of terrestrial biomarkers in the sediments from the Central Pacific. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **61**(9), 1911-1918.
- Pérez S., Guerrero J. y Galdames R. (2018). First Report of *Neofusicoccum nonquaesitum* in Chile Causing Branch Dieback and Decline in *Araucaria araucana*. *Plant Disease*, **102**(7), 1460.
- Pilon J., Lambers H., Baas W., Tosserams M., Rozema J. y Atkin O. (1999). Leaf waxes of slow-growing alpine and fast-growing lowland *Poa* species: Inherent differences and responses to UV-B radiation. *Phytochemistry*, **50**(4), 571–580.
- Pu Z. y Weiguo L. (2011). Effect of plant life form on relationship between dD values of leaf wax n-alkanes and altitude along Mount Taibai, China. *Organic Geochemistry*, **42**, 100-107.

- Racovita C. y Jetter R. (2016). Composition of the epicuticular waxes coating the adaxial side of *Phyllostachys aurea* leaves: Identification of very-long-chain primary amides. *Phytochemistry*, **130**, 252–261.
- Rafii Z. y Dodd R. (1998). Genetic diversity among coastal and Andean natural populations of *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch. *Biochemical Systematics and Ecology*, **26**(4), 441-451.
- Riederer M. (2006). Introduction: Biology of the plant cuticle. En: M. Riederer y C. Müller, edits. *Biology of the plant cuticle*. Germany: *Annual Plant Reviews*, **23**.
- Samuels L., Kunst L. y Jetter R. (2008). Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *The Annual Review of Plant Biology*, **59**, 683-707.
- Schwab M., Noga G., Barthlott W. (1995). The significance of epicuticular waxes for defence of pathogens as shown for *Botrytis cinerea* infections of kohlrabi and pea plants. *Die Gartenbauwissenschaft*, **160**, 102-109.
- Sharma P., Kothari S., Rathore M. y Gour V. (2018). Properties, variations, roles, and potential applications of epicuticular wax: a review. *Turkish Journal of Botany*, **42**, 135-149.
- Stark R. y Tian S. (2006). The cutin biopolymer matrix. En: M. Riederer y C. Müller, edits. *Biology of the Plant Cuticle*. Germany: Blackwell publishing, 126-141.
- Tafolla J., Gonzáles A., Tiznado M., Zacarías L. y Báez R. (2013). Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Revista Fitotecnica Mexicana*, **36**(1), 3-12.

- Tu T., Egasse C., Anquetil C., Zanetti F., Zeller B., Huon S. y Derenne S. (2017).
Leaf lipid degradation in soils and surface sediments: A litterbag Experiment.
Organic geochemistry, **104**, 35-41.
- Wang Z. y Liu Ohkouchi, N., Kawamura, K., Kawahata, H. y Taira, A. (1997).
Latitudinal distributions of terrestrial biomarkers in the sediments from the
Central Pacific. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **61**(9), 1911-1918.
- Znidarcic D., Valic N. y Trdan S. (2008). Epicuticular wax content in the leaves of
cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata) as a mechanical barrier against
three insect pests. *Acta agriculturae Slovenica*, **91**(2), 361-370.

ANEXOS

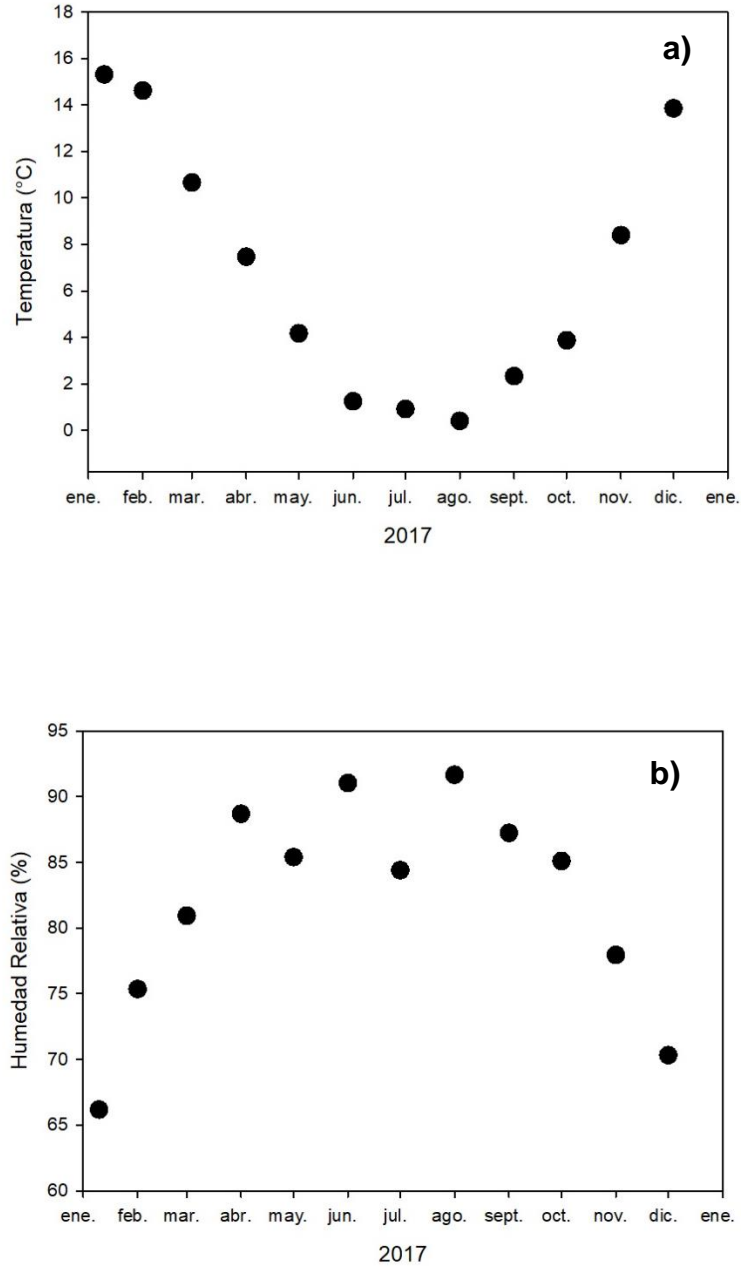


Figura 14. a) Temperatura (°C) y b) humedad relativa (%) mensual promedio del aire en Laguna Verde del PNT desde enero a diciembre del 2017 (Tiempo en que se realizaron los muestreos de *A. araucana*). Datos proporcionados por Dr. Sergio Contreras proyecto Fondecyt 1160719.

Tabla 4. Precipitación mensuales (mm) de los años 2009 al 2018 en Laguna Malleco, estación meteorológica más cercana a Laguna Verde Tolhuaca del PNT (Latitud: 38° 12' 55" S, Longitud: 71° 48' 40" W), extraída de la Dirección General de Aguas (www.dga.cl), Ministerio de Obras Públicas (Gobierno de Chile).

AÑO	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	Total anual
2009	26	78	35		459	459	331	484	75	377	241	97	2662
2010	47	82	85	79,5	94,5	557,6	115,5	175	73,5	146,5	88	170,5	1714,6
2011	79	69,2	185,4	289,3	55,5	560,6	276	611,2	259,2	58,4	132,7	20,7	2597,2
2012	144,8	228,3	54	96	609,6	604,3	138,9	200,2	122,8	103,9	95,1	342,1	2740
2013	29	98	84,8	91,5	587	355,1	413	523,1	315,2	116	128,4	17,5	2758,6
2014	127,5	59,5	205,5	178,5	395	665,5	627,6	260,6	459,8	143	47,5	56,2	3226,2
2015	0	0,2	2	92,6	432,5	540	578,7	594,5	286,7	216,2	88,6	101,2	2933,2
2016	25,5	6,5	49	299	124,3	32,5	687,7	338,2		276,7	122,9	242,6	2204,9
2017	57,8	67,3	108,6	137,6	294,7	632,1	368,2	630,5					2296,8
2018	64,1	40,5	216	368,2	393,8	443,7							1526,3

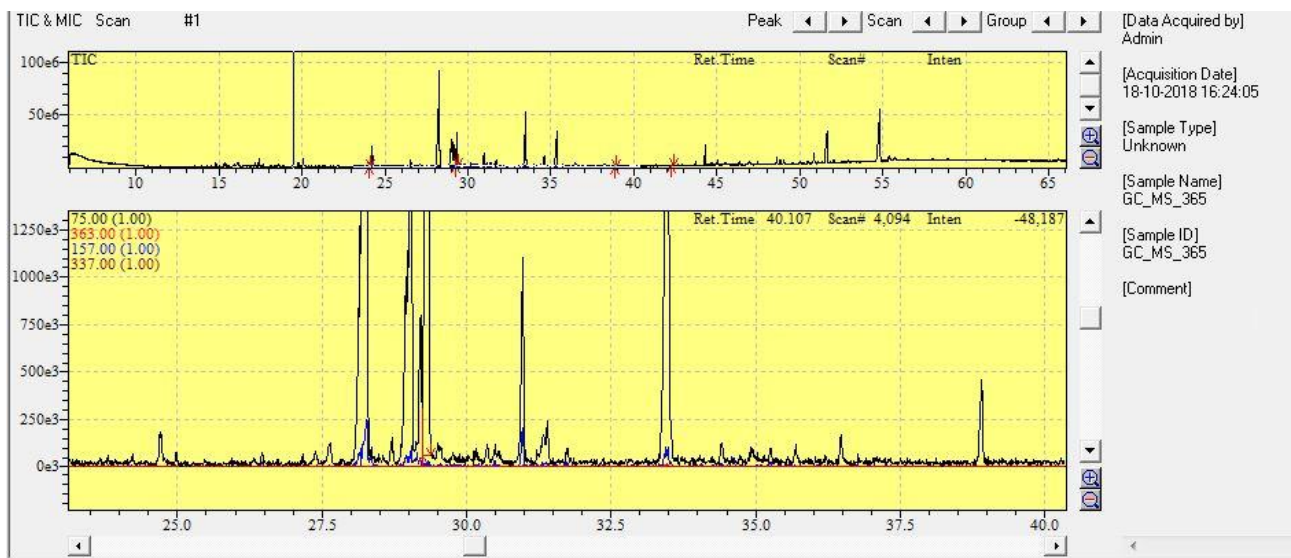


Figura 15. Ejemplo de un cromatograma de la fracción de alcoholes derivatizados en hojas de *A. araucana* enferma y fragmentos de masa característicos (m/z 363, 157 y 337) del compuesto ergosterol TMS (Trimetilsilil).