

**Univarsidad de la República**  
**Facultad de Ciencias**

**Aislamiento e identificación de  
especies de *Mycosphaerella* y  
*Teratosphaeria* asociadas a la  
enfermedad de la mancha de la  
hoja en *Eucalyptus* spp.**

**Fernando Navarrete**

**Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**Laboratorio de Micología**

**Orientador, Dra. Sandra Lupo**

# Agradecimientos

Antes de comenzar quiero dejarles unas palabras que no son tan serias como pretende ser el presente trabajo pero si son sinceras.

Agradezco a mi orientadora, Sandra, por el continuo apoyo, gran cariño y por el estricto control que llevó sobre el avance de la redacción de este trabajo, de otra forma no lo hubiera terminado en tiempo y forma.

A la Dra. Lina Bettucci por aceptarme como integrante de su laboratorio, por la lectura y sugerencias sobre el manuscrito y también por confiar en mí incluso cuando mis dibujos de peritecios en el curso de contaminantes no eran muy convincentes.

Agradezco a Raquel por las sugerencias sobre el manuscrito.

Agradezco a todos los compañeros del laboratorio: Anita, Agustina, Belén, Carlos, Dinorah, Eduardo, Flavia, Luís, Lucía, Natalia, Rafael, Raquel, Sebastián (Titán) Martínez, Sebastián Sánchez, Silvina, Susana y Welker. Gracias por aguantarme cuando ando en busca de algo que no logro encontrar.

Mis agradecimientos a Carlos Pérez por proporcionarnos algunos de los primers utilizados este trabajo.

Principalmente agradezco a mis padres. Todo lo que hice es “culpa” de ustedes.

# Índice

<b>Introducción</b> .....	2
Eucalyptus spp. y su empleo en la forestación.....	2
Enfermedades del <i>Eucalyptus</i> .....	5
Mancha foliar causada por <i>Mycosphaerella</i> (MLD).....	9
Descripción de los síntomas.....	9
Efectos de la MLD sobre el crecimiento de <i>Eucalyptus</i> spp. ....	10
<i>Mycosphaerella</i> y géneros relacionados.....	12
Patogenicidad de <i>Teratosphaeria</i> spp. ....	13
Identificación de las especies de <i>Mycosphaerella</i> y <i>Teratosphaeria</i> .....	16
Antecedentes de <i>Mycosphaerella</i> spp y <i>Teratosphaeria</i> spp. en Uruguay.....	18
<b>Objetivos</b> .....	20
<b>Hipótesis</b> .....	20
<b>Materiales y Métodos</b> .....	21
Colecta del Material.....	21
Aislamiento de <i>Mycosphaerella</i> spp. y <i>Teratosphaeria</i> spp.....	21
Extracción de ADN a partir de micelio vegetativo.....	21
Amplificación mediante PCR de la región ITS y análisis mediante electroforesis.....	22
Extracción de ADN y amplificación por PCR a partir de material vegetal con síntomas.....	23

Secuenciación y análisis filogenético.....	24
Evaluación del crecimiento en diferentes medios de cultivo.....	25
<b>Resultados.....</b>	<b>26</b>
Identificación de los aislamientos de <i>Mycosphaerella</i> y <i>Teratosphaeria</i> .....	26
Identificación de <i>Mycosphaerella</i> spp. y <i>Teraosphaeria</i> spp. a partir de material vegetal.....	27
Análisis filogenético.....	31
Evaluación de la velocidad de crecimiento en diferentes medios de cultivo.....	33
<b>Discusión.....</b>	<b>36</b>
Identificación de especies por métodos moleculares.....	36
Medidas de crecimiento en diferentes medios.....	40
<b>Conclusiones.....</b>	<b>42</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>43</b>
<b>Anexo1.....</b>	<b>47</b>
<b>Anexo2.....</b>	<b>48</b>

# Introducción

## ***Eucalyptus* y su empleo en la forestación**

El género *Eucalyptus* incluye más de 700 especies, pertenece a la familia *Myrtaceae* y se caracteriza por presentar flores con pétalos y sépalos fusionados que forman uno o dos opérculos que cubren numerosos estambres y un único estilo siendo el fruto una cápsula. Las especies de *Eucalyptus* son árboles de madera dura y larga vida que típicamente alcanzan entre 10 y 50 metros de altura, aunque algunas especies como *Eucalyptus regnans* pueden llegar a medir más de 100 m y otras como *E. vernicosa* y *E. fruticosa* presentan características arbustivas. La mayoría de las especies son de hojas perennes y muchas presentan heterofilia. La anatomía, filotaxia y fisiología de las hojas de la etapa juvenil son muy diferentes a las de la etapa adulta (Potts & Pederick., 2000).

La diversidad de este género también se ve reflejada en el tipo de corteza, que puede ser caduca (se renueva anualmente) o persistente (en la cual las sucesivas capas se acumulan durante varios años y se rasgan por el crecimiento del árbol) (Brussa, 1994). La corteza a menudo envuelve numerosas yemas vegetativas en estado latente que brotan luego de una defoliación o daño producido por fuego (brotes epicórnicos) (Potts & Pederick, 2000; Brussa, 1994).

Tradicionalmente se ha considerado Australia como el centro de origen de este género en base a que la distribución de las especies extintas se restringe casi exclusivamente a este continente y a que en las islas vecinas de Nueva Guinea y Nueva Caledonia existen géneros muy relacionados (*Corimbia* y *Angophora*). Sin embargo, en los últimos años se han encontrado microfósiles con características del género en la Patagonia y Nueva Zelanda (Potts & Pederick., 2000), lo que sugiere que la distribución de las especies de *Eucalyptus* no ha estado siempre restringida a Australia y sus Islas vecinas. Entre las especies actuales, solo cinco son endémicas de áreas ajenas a Australia y otras pocas se dan de forma natural en Papua Nueva Guinea además de Australia.

Actualmente, las especies de *Eucalyptus* son dominantes en alrededor de 124 millones de hectáreas de los bosques nativos de Australia (Turnbull, 2000), donde tienen gran importancia cultural y ecológica además de ser una fuente importante de madera y

productos derivados. Sin embargo solo un 20% de ese territorio es potencialmente aprovechable para fines productivos debido a dificultades de accesibilidad o a que los bosques se encuentran en reservas naturales (Turnbull, 2000).

La producción australiana de *Eucalyptus* spp. se basó en el uso mixto de los bosques (producción de madera, protección de cursos de agua, recreación y preservación) desde principios del siglo XX hasta principios de la década de 1970. Fue entonces cuando se incrementó y pasó a hacerse de forma intensiva, destinada a la exportación de chips de madera para la industria del papel, especialmente en Tasmania, el sudeste y oeste de Australia (Turnbull, 2000).

La dispersión de éste género fuera de Australia comenzó en los jardines botánicos de Europa a finales del siglo XVIII, donde se plantaban como curiosidades botánicas. Luego pasaron a ser centros de dispersión secundaria hasta la actualidad en que han llegado a ser dominantes en muchas regiones de la Península Ibérica, Sud América, África, China y la India.

Más adelante, en el Siglo XIX, cuando el potencial de varias especies de *Eucalyptus* para crecer rápido y producir troncos rectos era bien conocido, fueron exportados directamente desde Australia. En ese entonces se plantaban como ornamentales, para formar barreras contra el viento, producción de aceites esenciales y a lo largo de las vías férreas para proporcionar madera para los trenes a vapor. Las razones para plantar *Eucalyptus* se fueron diversificando a medida que avanzaba el Siglo XX, entre ellas la producción de madera para aserradero, vigas, postes, madera para combustible, pulpa de celulosa, carbón, producción de miel y taninos, además de sombra y protección para otros cultivos y el ganado (Turnbull, 2000). El 90% de los bosques introducidos de *Eucalyptus* en los distintos países han sido establecidos luego de 1955 (Crous, 1998).

Varias especies de éste género presentan características deseables para su uso en la forestación, como son la gran velocidad de crecimiento, la adaptación a suelos pobres y climas diversos, fácil manejo cultural y escasa o nula tendencia a dispersarse como malezas en la mayoría de los climas. Estas características inciden en gran medida en la decisión de que especie(s) plantar (Turnbull, 2000).

En el medio rural, el uso de la madera del Eucalipto como combustible es la principal forma de aprovechamiento de este cultivo, donde las plantaciones pueden verse como una inversión a largo plazo. Sin embargo, hay ejemplos de sistemas de producción mixtos, en los cuales los productores rurales se asocian con industrias papeleras para proveerles pulpa de celulosa a la vez que obtienen ingresos por la producción de miel y aceites esenciales (Turnbull, 2000).

A pesar de lo mencionado más arriba, actualmente el sector de la forestación que más se expande a nivel mundial es el destinado al uso industrial del *Eucalyptus*. La mayoría de las plantaciones se destinan a la producción de pulpa de celulosa para la fabricación de papel. En la región Brasil es el mayor productor, con más de 11 millones de toneladas de pulpa exportadas en 2006, principalmente a partir de *E. grandis* (FAO, 2008). No obstante la mayor parte de la producción brasileña se destina a la producción de carbón para la industria del hierro y acero. Hay muchas empresas privadas vinculadas a la producción de estos metales que manejan más de cien mil hectáreas de plantaciones cada una (Turnbull, 2000).

En Uruguay la producción forestal experimentó un desarrollo significativo a partir de la década de 1990 luego de la aprobación de la ley forestal de 1987. La superficie forestada con especies de *Eucalyptus* era de 676 096 ha al año 2007 (Figura 1), siendo las especies más importantes *E. globulus* y *E. grandis* (Dirección General Forestal, 2007). Esto determinó la exportación 2 450 097 m<sup>3</sup> de madera bruta en 2004 (Dirección General Forestal, 2005).



Figura 1: Evolución de la superficie forestada en Uruguay (tomado de [www.spf.org.uy](http://www.spf.org.uy)).

Para la producción industrial de pasta de celulosa se requiere de grandes inversiones. Por ejemplo, en Chile la inversión privada en forestación fue de US\$ 4 mil millones solo en el año 1996; en Brasil la empresa Aracruz S.A. invirtió US\$ 1, 15 mil millones para aumentar su área plantada en un 20% y su producción a un millón de toneladas de pulpa por año en 1990 (Turnbull, 2000). En Uruguay, a modo de ejemplo, la empresa ENCE (actualmente Montes del Plata) invirtió alrededor de US\$ 160 millones para el establecimiento de viveros, plantaciones y plantas de procesamiento (ENCE en Uruguay, 2004).

Debido a estas grandes inversiones, las empresas que manejan las plantaciones buscan maximizar el rendimiento de las mismas por unidad de área y tiempo, mediante la selección de especies, mejora genética, prácticas intensivas de cultivo, y propagación clonal de plantas, en los últimos años. Al mismo tiempo, las plantaciones con fines industriales, en las cuales los árboles están muy densamente plantados y además presentan edad y genotipo muy uniformes, reúnen las condiciones óptimas para el desarrollo de epidemias de plagas y/o patógenos. Además el establecimiento de estos cultivos como exóticos contribuye a la dispersión de sus patógenos hacia zonas más allá de su hábitat natural.

### **Enfermedades del *Eucalyptus***

Las plantas conviven con una gran variedad de microorganismos, de los cuales solo una minoría de las especies tiene la capacidad de utilizarlas como sustrato para su crecimiento y producirles daño, por lo tanto son consideradas patógenas.

Cuando sus poblaciones alcanzan un tamaño que amenaza la sobrevivencia de las plantas de las cuales se alimentan, estos se consideran plagas (Niks & Lindhout, 2004).

A lo largo de todo el ciclo de producción de *Eucalyptus* pueden aparecer diferentes patógenos que tienen el potencial de producir enfermedades que reducen el rendimiento del cultivo.

En relación a esto, un punto muy importante en la cadena productiva de este cultivo es la etapa de vivero, ya que los patógenos que lo ataquen en ese momento tienen el

efecto de reducir el stock del material que va ser plantado en campo y distorsionar el programa de plantaciones por la pérdida de material recientemente trasplantado.

Muchas de estas enfermedades son causadas por hongos, que pueden aparecer desde el momento de la germinación de la semilla hasta las últimas etapas del período de vivero y pueden causar desde pequeñas manchas foliares hasta la muerte de las plántulas. El desarrollo de las mismas se ve favorecido por las condiciones de alta humedad y temperatura típicas de vivero (Brown & Ferreira, 2000).

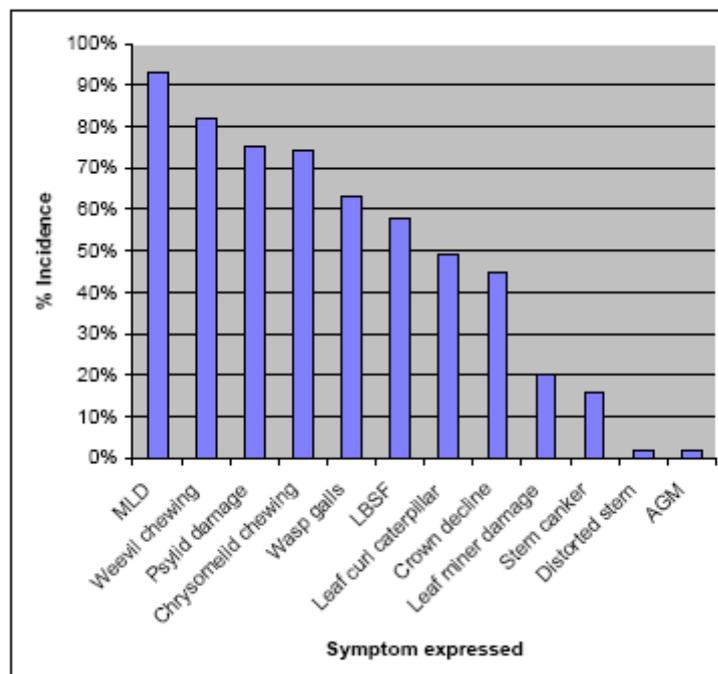
Entre las principales enfermedades características de vivero e implantación se puede encontrar el damping-off (*Cylindrocladium* spp., *Cylindrocladiella* spp., *Phytium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp., *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp.) la antracnosis, (*Colletrotrichum gleosporoides*), la reducción en el crecimiento debido a oídios, las manchas foliares causadas por *Teratosphaeria* spp. (Brown & Ferreira, 2000) y por *Sporothrix eucalypti* que además produce lesiones en los tallos (Alfenas *et al.*, 2004).

En el campo, la gama de patógenos que amenazan las plantaciones comerciales de *Eucalyptus* spp. en su región de origen difiere en cierta medida de lo observado en plantaciones en otras partes del mundo. Esto se debe a que cuando se plantan como exóticos, los árboles pueden escapar de algunos patógenos que han coevolucionado con ellos en su área de distribución natural. Un ejemplo de este fenómeno se observa con *Phytophthora cinnamomi*, que es una de las principales amenazas para las plantaciones de *Eucalyptus* en Australia (Maxwell, 2004) pero no en el resto del mundo.

Por otro lado, el estrés abiótico producido cuando los árboles se plantan en suelos o climas adversos para su crecimiento, puede causar un aumento en la susceptibilidad a patógenos, que no están presentes en la zona de origen del cultivo y para los cuales la planta no ha desarrollado mecanismos de defensa efectivos facilitando el desarrollo de epidemias. Este fenómeno ha sido observado en especies *Eucalyptus* frente a *Puccinia psidii* y a *Cylindrocladium* spp. (Brown & Ferreira, 2000; Maxwell, 2004; Alfenas *et al.*, 2004).

Existen otros patógenos que afectan la producción de *Eucalyptus* a lo largo de todo el mundo, como es el caso de *Mycosphaerella* spp. (Park *et al.*, 2000). Estos hongos causan una de las enfermedades más severas de las plantaciones de *Eucalyptus* spp. en

Australia (Park & Keane. 1982a). Más recientemente, Maxwell (2004) realizó un estudio comparativo de la incidencia y severidad de diferentes plagas y enfermedades en plantaciones de *E. globulus* (1-2 años) en el sur oeste de Australia donde encontró que los síntomas más frecuentemente observados correspondían a especies de *Mycosphaerella* (incidencia mayor al 90%) seguidos por los daños provocados por gorgojos (*Gonipterus scatelatus*, *Catasarcus* sp. y *Oxiopsis* sp.), luego crisomelidos (*Cadmus excrementarius* y *Chrysophtharta* sp.) y la mosca *Phylacteophaga froggattii*. En todos los casos el promedio de área foliar afectada fue entre 1 y 3%, pero ésta aparente baja severidad en el daño provocado por estos patógenos y plagas se debe al método de muestreo utilizado. Además el daño provocado por *Mycosphaerella* y *Teratosphaeria* spp. y por gorgojos fue mayor en las plantaciones de 2 años que en las de 1 año. Los porcentajes de incidencia de estas y otras plagas y enfermedades que afectan plantaciones en el sur oeste de Australia se muestran en la figura 2.



**Figura 2:** Porcentaje (%) de incidencia de diferentes plagas y enfermedades en plantaciones de *E. globulus* de 1 y 2 años en el sur oeste de Australia (Tomado de Maxwell, 2004).

MLD: manchas necróticas en la hoja provocadas por *Mycosphaerella* spp. o *Teratosphaeria* spp.

Weevil chewing: daño por mordedura de gorgojos (*Gonipterus scatelatus*, *Catasarcus* sp. y *Oxiopsis* sp.). Psylid damage: necrosis de la yema de la hoja causada por *Ctenarytaina eucalypti*.

Wasp galls: galladuras provocadas por avispas parásitas. LBSF: ampollas en la hoja provocadas por la “mosca de aserradero” (*Phylacteophaga froggattii*). Leaf curl caterpillar: “enrollamiento de la hoja” daño causado por *Ardozyga* sp..

Crown decline: decaimiento de la copa (provocado por deficiencia de micronutrientes).

Leaf miner damage: daño provocado por insectos minadores.

Stem canker: canchros en el tronco causados por *Cryphonectria* sp.

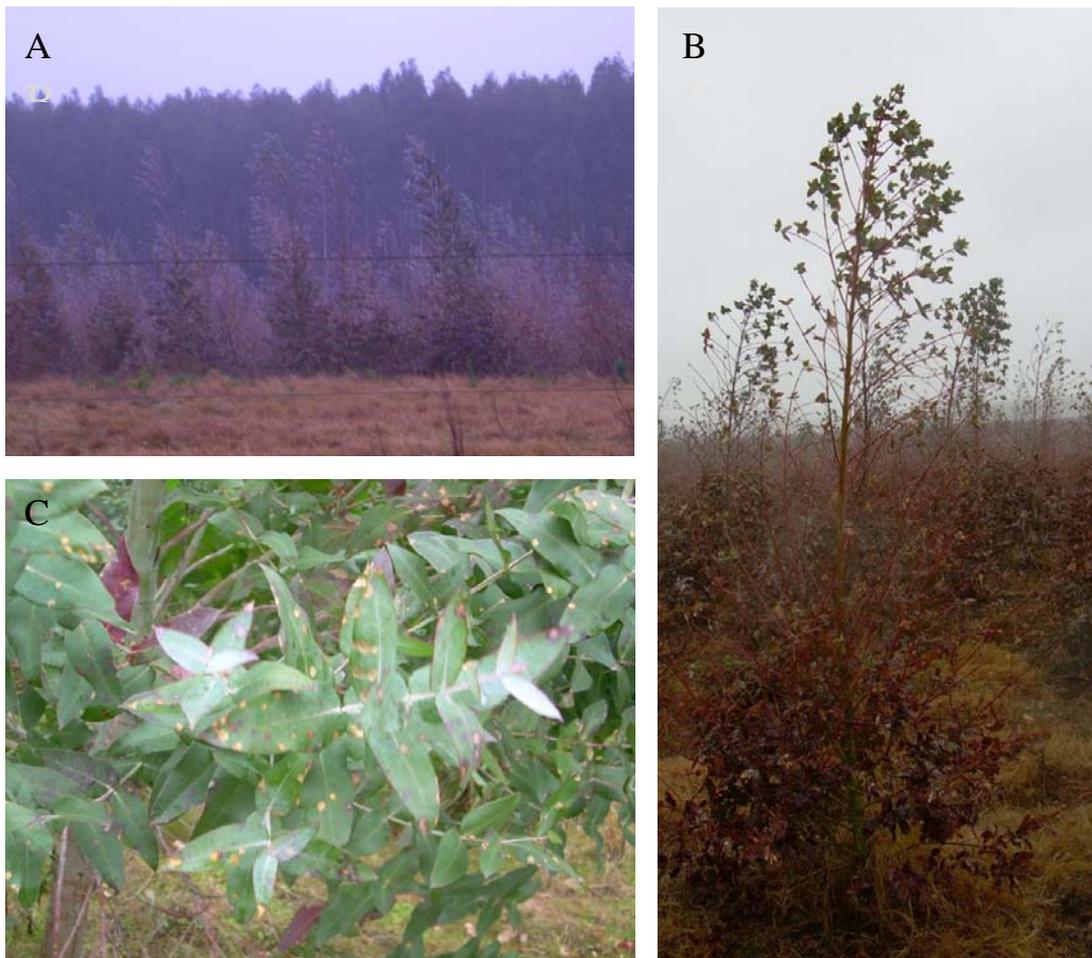
Distorted stem: deformaciones en el tronco (debidas a deficiencia de micronutrientes y daño por mordedura de insectos). AGM (autumn gum moth): “esqueletización” de la hoja provocada por la “polilla del otoño” (*Mesampela privata*).

## Mancha foliar causada por *Mycosphaerella* (MLD)

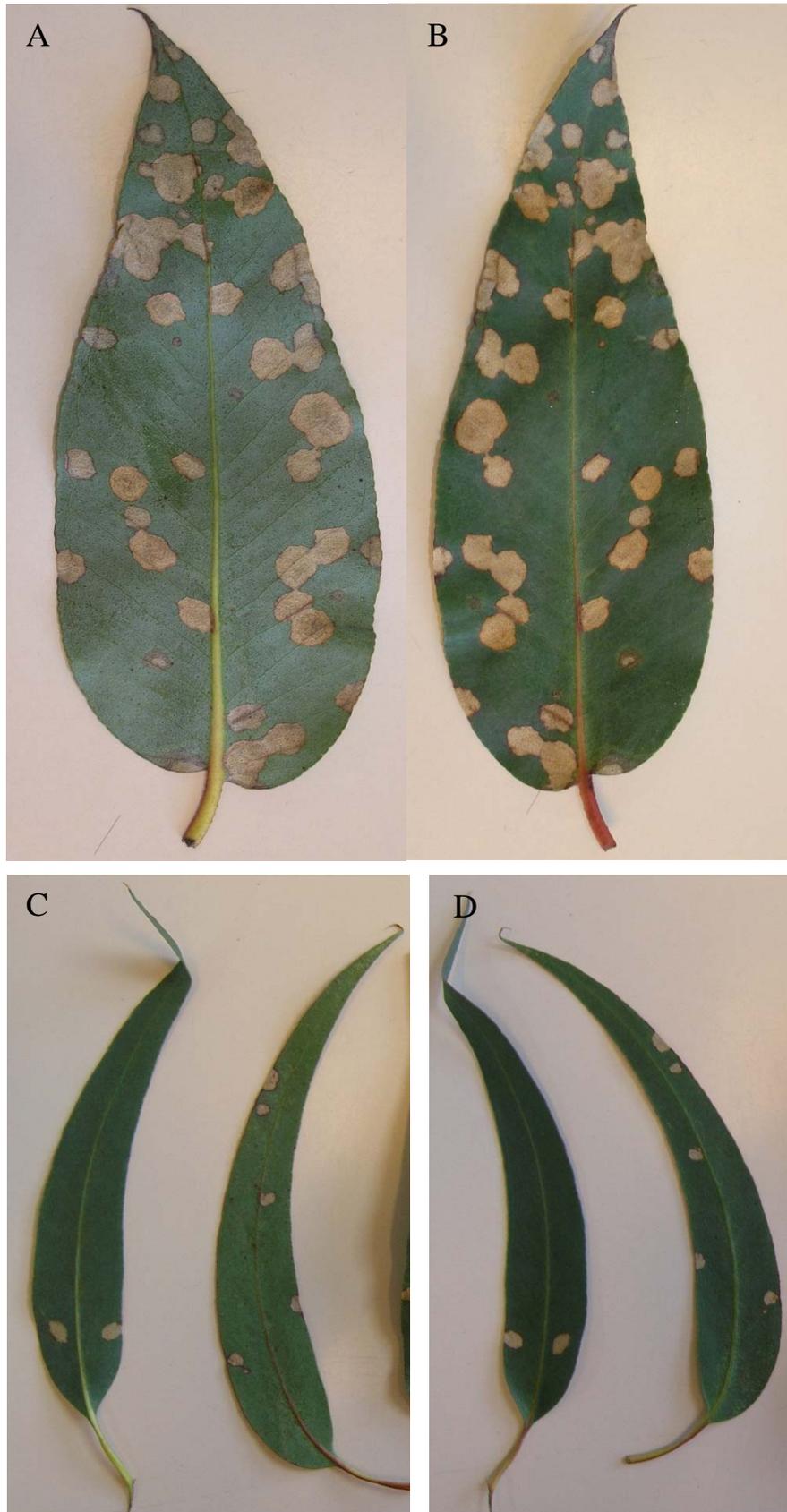
### Descripción de los síntomas

La enfermedad de la hoja de *Mycosphaerella* (MLD por sus siglas en inglés) es causada por hongos de los Géneros *Mycosphaerella*, *Teratosphaeria* y sus anamorfos.

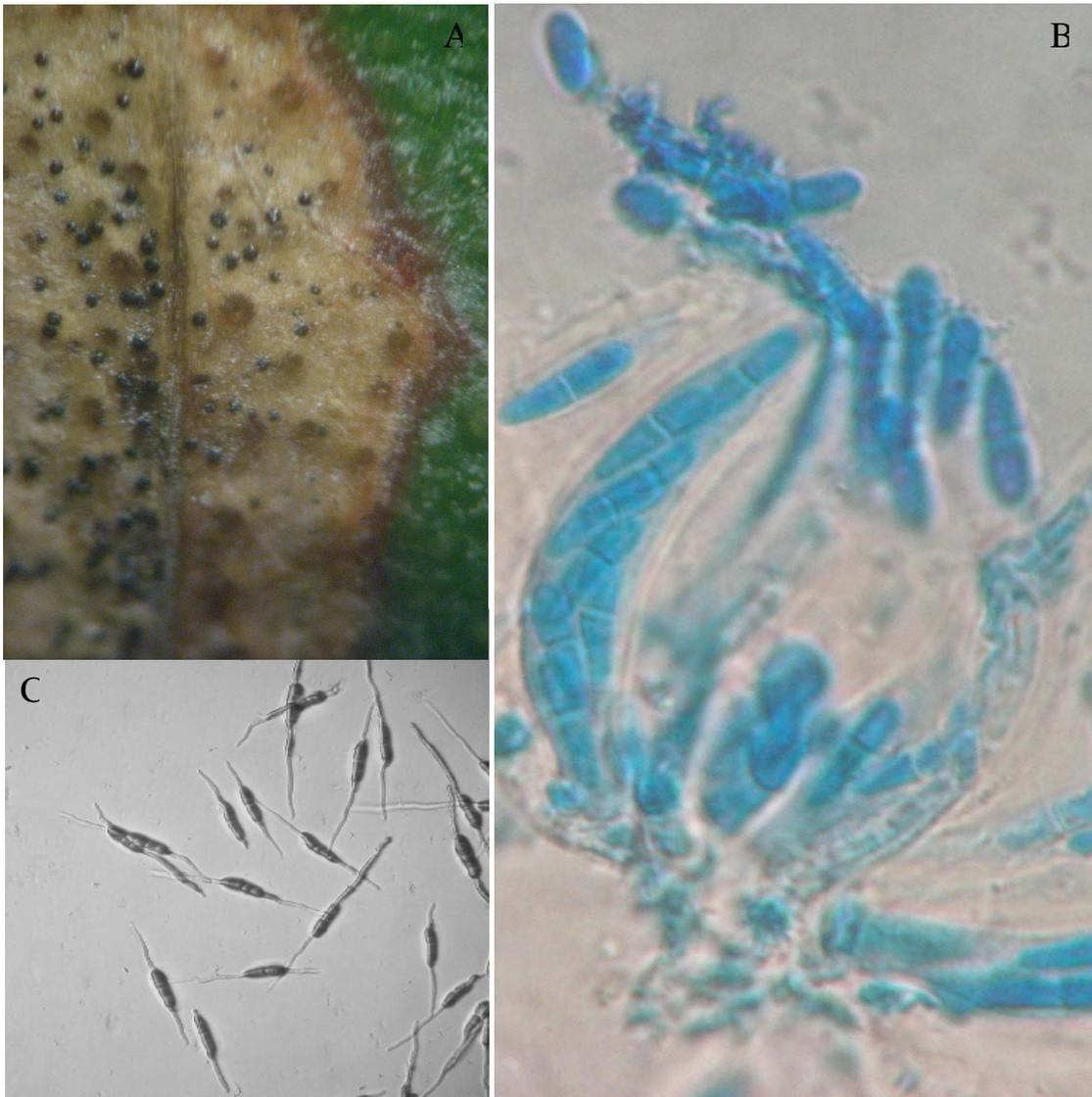
El síntoma más importante y perjudicial que caracteriza a ésta enfermedad es la defoliación (Park & Keane, 1982a, 1982b; Lundquist & Prunell, 1987) (Figura 3A y B). En las hojas que permanecen unidas al árbol aparecen manchas necróticas que varían desde angulares, circulares o irregulares que frecuentemente coalescen para formar manchas que pueden ocupar toda la hoja y deformar la lámina (figura 3C, figura 4). Las lesiones son típicamente claras al inicio del desarrollo de la infección y luego se vuelven más opacas, con los bordes elevados y de color rojizo o morado ( Figura 4 y 5). En la mancha se desarrollan las fructificaciones del organismo causal –seudotecios– que contienen ascos con ascosporas bicelulares (Figura 4 y 5).



**Figura 3:** Síntomas de MLD en *Eucalyptus globulus*. A) Plantación de dos años afectada. B) Árbol de 2 años con síntomas severos de defoliación. C) Manchas necróticas en hojas juveniles.



**Figura 4:** Manchas necróticas causadas por *Mycosphaerella* spp. o *Teratosphaeria* spp. en hojas de *Eucalyptus globulus*. Los puntos negros sobre las manchas corresponden a las fructificaciones del hongo. A) superficie abaxial de hoja juvenil. B) superficie adaxial de hoja juvenil. C) superficie abaxial de hoja adulta. D) superficie adaxial de hoja adulta.



**Figura 5:** A) pseudotecios *Teratosphaeria* spp. en mancha necrótica sobre hoja de *E. globulus*, B) Asco y ascosporas de *Teratosphaeria* sp. C) ascosporas de *Teratosphaeria* sp. geminando sobre agar agua.

Efectos de la MLD sobre el crecimiento de *Eucalyptus* spp.

En lo que respecta a la fotosíntesis, la infección por *Mycosphaerella* o *Teratosphaeria* spp. provoca una disminución en la asimilación de CO<sub>2</sub>, afectando las reacciones de carboxilación a varios niveles: disminuyendo la eficiencia de la carboxilación, el límite de asimilación de la Ribulosa bis-fosfato Carboxilasa y su regeneración, y la tasa máxima de flujo de la cadena de transporte de electrones del cloroplasto. Además la reducción en la asimilación de CO<sub>2</sub> es proporcionalmente mayor al área foliar afectada, debido a que las zonas no lesionadas de la hoja infectada también disminuyen su tasa fotosintética y a cambios en la conductancia al CO<sub>2</sub> en el mesófilo. Esto resulta en una

disminución de entre 25 y 50% en el tamaño de las hojas que emerjan luego de una infección severa (Pinkard & Mohammed, 2006).

Cuando se produce defoliación, los efectos en el crecimiento del árbol pueden ser de dos tipos. En la respuesta tipo 1 se observa una disminución inicial en el crecimiento pero a largo plazo la tasa de crecimiento de los árboles afectados es igual o muy similar a la de los árboles no afectados. En la respuesta tipo 2 en cambio los árboles que sufrieron la defoliación nunca vuelven a alcanzar la misma tasa de crecimiento que los árboles no afectados. Generalmente la respuesta de tipo 2 se da cuando la defoliación sobrepasa un determinado umbral (Smith, 2006).

Lundquist & Prunell (1987) midieron el efecto de diferentes grados de severidad de manchas necróticas y defoliación sobre el crecimiento de *E. nitens* durante sus primeros 6 años. Estos autores hallaron una alta correlación entre el área de la hoja afectada por manchas necróticas y la defoliación. Los efectos en el crecimiento fueron apreciables cuando el porcentaje de defoliación era mayor al 12% (efectos sobre el crecimiento en diámetro) o mayor al 25 % (efectos sobre el crecimiento en altura y volumen). Esta aparente alta tolerancia de *E. nitens* a la defoliación puede deberse a que la misma afecta primero a las hojas del centro y de la parte inferior de la copa que, al estar sombreadas por las hojas más externas, no son las que más aportan a la producción de fotoasimilados. Con un 50% de la copa defoliada la reducción en el volumen fue de casi 20% y cuando la defoliación alcanzó un 75% de la copa el crecimiento se detuvo. Además los árboles que antes del inicio de la infección tenían menor tamaño se vieron más afectados.

Valores similares fueron encontrados para plantaciones de *E. globulus*, utilizando parcelas tratadas con fungicida como control, donde se encontró que con un 20% de la copa defoliada la reducción en el volumen final fue de 17%. Pero luego de 24 meses (cuando se produjo el cambio de hoja) los síntomas disminuía en gran medida y la tasa de crecimiento de los árboles infectados no presentaba diferencias significativas con la tasa de crecimiento de los árboles tratados con fungicidas (Smith, 2006).

En una epidemia de MLD que se dio a principios de la década de 2000 en Tasmania, Smith (2006) encontró que las plantaciones de *E. globulus* afectadas presentaban un promedio de 40% de defoliación a lo largo de la misma (pero hasta un 88% hacia

finales de este período), lo que resultó en una reducción (en comparación con plantaciones no afectadas) de 30% y 27 % en diámetro y altura respectivamente, a los 4 años de plantados los árboles. Esto representa un retardo de cerca de 1,3 años en el crecimiento de las plantaciones afectadas.

Pinkard *et al.* (2010), utilizaron una serie de modelos climáticos y de respuesta de *E. globulus* a factores ambientales para predecir el crecimiento de los árboles (expresado como volumen del tronco a los 10 años de la plantación) frente a valores crecientes de defoliación. Para ello tomaron en cuenta diferentes combinaciones de temperatura media anual, precipitación media anual y nivel de fertilización nitrogenada (diferentes sitios). Estos autores encuentran gran variabilidad en el volumen final de los árboles, por ejemplo en el sitio más afectado, un 40% de defoliación causaría una reducción de 12,5% en el volumen final, mientras que en el sitio menos afectado no habrían diferencias de volumen entre los árboles no afectados y los que sufren un 30% de defoliación. En uno de los sitios, los árboles afectados por un 30% de defoliación sufrirían un retardo en su crecimiento de alrededor de 1,5 años (muy similar al valor hallado por Smith, 2006).

Los autores concluyen que la gran variabilidad observada responde a las características de cada sitio, pero ninguno de los factores analizados determinaría de forma preponderante el volumen final de árboles, sino que el resultado dependería de las características que presente cada sitio.

### ***Mycosphaerella* y géneros relacionados**

Los organismos causales de las sintomatologías antes descritas pertenecen a los géneros *Mycosphaerella* y otros relacionados. El Género *Mycosphaerella* Johanson , pertenece al Phylum Ascomycetes Orden Dothideales, Familia Mycosphaerellaceae, (Arx, 1983; Arx & Müller, 1975; Barr, 1972, 1979, 2001, Luttrell 1955). *Mycosphaerella* es un género muy diverso que presenta más de 2000 especies, de las cuales aproximadamente 60 han sido asociadas a enfermedades foliares de *Eucalyptus* spp. (Hunter *et al.*, 2006). Otras especies de este género también son patógenas de otros cultivos con importancia comercial, como *Mycosphaerella graminicola* (trigo) y *Mycosphaerella fijensis* (banana). A pesar de ello varios trabajos basados en el análisis

de las secuencia de la región ITS del genoma nuclear u otros genes han concluido que éste género es monofilético (Crous *et al.*, 2001, 2004; Hunter *et al.*, 2006).

Más recientemente, a través de un análisis más exhaustivo de la secuencia del operón del ADN ribosomal nuclear se llegó a la conclusión de que éste género es en realidad polifilético (Crous *et al.*, 2007). Estos autores dividen el “complejo *Mycosphaerella*” en distintos géneros. El género *Schizothyrium*, que presenta pseudotecios del tipo tiriotecios y anamorfos del género *Zygophiala*; el Género *Davidiella*, que presenta pseudotecios, ascosporas con lumen angular y anamorfo *Cladosporium s. str.*; el género *Mycosphaerella s. str.*, con pseudotecios no unidos por estroma, ascosporas bicelulares sin lumen angular con vaina y endotúnica compuesta por varias capas y el género *Teratosphaeria*, con pseudotecios frecuentemente ligados por estroma superficial, ascosporas bicelulares sin lumen angular y con vaina, que frecuentemente se vuelven marrones dentro del asco.

#### **Patogenicidad de *Teratosphaeria* spp.**

Se han realizado pocos estudios a cerca de la patogenicidad de las especies de *Mycosphaerella* (y sus géneros relacionados) que afectan a *Eucalyptus* spp. Gran parte del conocimiento sobre este tema proviene de los trabajos realizados por Park y Keane en la década del 1980. Estos autores estudiaron las especies más frecuentemente asociadas a plantaciones afectadas por defoliación en Australia. *Teratosphaeria cryptica* es un hemibiótrofo que afecta tanto a hojas juveniles, en las que produce manchas pequeñas y formación de callo a su alrededor, como a hojas adultas donde produce manchas grandes que pueden cubrir toda la hoja en los subgéneros *Symphyomyrtus* y *Monocalyptus* de *Eucalyptus*. Tanto las ascosporas (dispersadas por el viento) como los conidios (dispersados por gotas de lluvia) son capaces de infectar hojas o tallos jóvenes directamente a través de la cutícula, u ocasionalmente por los estomas. Las esporas que germinan sobre la superficie de las hojas de *Eucalyptus* spp. desarrollan un tubo germinativo que forma un protoapresorio y éste a su vez desarrolla un tubo de infección que penetra la cutícula y posteriormente se desarrolla en una masa irregular de hifas que crecen entre la

cutícula y las células epidérmicas. Más adelante, las hifas invaden todo el apoplasto de la hoja y se acumulan en las cavidades subestomáticas donde luego empiezan a diferenciarse los seudotecios. Éstos se desarrollan preferentemente en la cara abaxial de la hoja (por la mayor densidad de estomas) aunque también son abundantes en la cara adaxial produciéndose entre 8 y 12 semanas luego del inicio de la lesión. Las lesiones aparecen 1 o 2 semanas luego de la infección como manchas cloróticas de margen púrpura, que a medida que avanza la infección se vuelven marrones-rojizos. Se ha observado que también se pueden formar canchales en tallos jóvenes, como es el caso de *E. obliqua* (Park & Keane, 1982b).

*Teratosphaeria nubilosa* es un hemibiótrofo homotálico, pero ataca solo hojas juveniles de especies de *Eucalyptus* pertenecientes al Subgénero *Symphyomyrtus* (Park & Keane, 1982a), muchas de las cuales se emplean para la forestación con fines industriales fuera de Australia (Potts & Pederick, 2000). En esta especie, la única estructura capaz de llevar a cabo la infección es la ascospora (no presenta anamorfo) (figura 5 C). Las ascosporas, al germinar sobre la superficie de una hoja, desarrollan tubos germinativos que se ramifican y penetran los estomas (a diferencia de *T. cryptica* no se forman protoapresorios pero se observan un hinchamiento de las hifas en la cavidad subestomática) 24 horas luego de la inoculación. Los estomas constituyen la única vía de infección para *T. nubilosa*. La penetración es mayormente en la cara abaxial de la hoja debido a la mayor densidad estomática y el desarrollo de las hifas se da en el apoplasto del parénquima esponjoso, estando ausentes del parénquima en empalizada. Al igual que en el caso de *T. cryptica*, no se observan haustorios a lo largo del proceso de infección de *T. nubilosa* y las hifas se acumulan en las cavidades subestomáticas (luego de ocurrida la necrosis) para formar los seudotecios (2 o 3 meses después del inicio de la lesión). Las lesiones se desarrollan entre 4- 8 semanas luego de la infección y son inicialmente manchas cloróticas con bordes purpura-rojizos que se vuelven de color amarillo pálido o marrones luego de la necrosis (Figura 5A) (Park & Keane, 1982b).

*Teratosphaeria parva* es considerada una especie saprófita ya que sus peritecios se encuentran solo en lesiones viejas, asociadas a los de *T. nubilosa* y luego de la inoculación de *E. globulus* con ascosporas de *T. parva* se produce solo el crecimiento

superficial sobre las hojas pero no se observa penetración o desarrollo de lesiones (Park & Keane, 1982b).

Todas las especies requieren alta humedad relativa (h.r) para la liberación de las ascosporas de los ascos. En cambio, por debajo de un 90% de h.r la liberación es mínima para *T. cryptica*, *T. nubilosa* y *T. parva*. Las condiciones de humedad óptimas para la liberación de las ascosporas son: 98% h.r para *T. nubilosa* y casi 100 % para las otras dos especies. Estas son capaces de germinar a temperaturas entre 3 y 30°C siempre que haya agua líquida disponible, siendo la temperatura óptima 15°C para *T. cryptica*, 20°C para *T. nubilosa* y *T. parva* (Park & Keane, 1982b). Además, el área foliar afectada es máxima a esta temperatura (Park, 1988a).

El periodo de tiempo que las hojas permanecen mojadas también afecta el desarrollo de los síntomas, siendo óptimo entre 5 y 7 días para *T. nubilosa*, aunque 24 horas son suficientes para provocar lesiones que cubren 60% de la superficie de la hoja. Las ascosporas de *T. cryptica* necesitan al menos 48h de contacto con la hoja mojada para que se produzca la infección (Park, 1988a). A pesar de ello, las ascosporas toleran bien la desecación, conservando la capacidad de infectar a las plantas de *Eucalyptus* luego de 4 o 7 días para *T. cryptica* y *T. nubilosa* respectivamente (Park, 1988a).

Otra diferencia entre las infecciones causadas por *T. nubilosa* y *T. criptica* es que en el primer caso las mismas son mono o bi-cíclicas mientras que en el segundo son típicamente policíclicas (Park, 1988b), aunque en ambos casos los mayores niveles de infección se dan en los meses más cálidos y húmedos del año (Park & Keane 1987).

Una vez que las ascosporas (o conidios, en el caso de *T. cryptica*) infectan la hoja, necesitan que la hoja permanezca adherida al tallo para que se inicie el desarrollo de los ascos. Éstas hojas son la mayor fuente de inóculo, produciendo ascosporas durante 6 meses, que (en el caso de *T. nubilosa*) es suficiente para iniciar la infección en el próximo ciclo de crecimiento vegetativo de *Eucalyptus* spp. En hojas que se desprendieron del árbol no se desarrollan ascos nuevos pero los que ya estaban presentes siguen liberando ascosporas hasta 3 meses, por lo que contribuyen a aumentar el inóculo (Park & Keane, 1987).

## Identificación de las especies de *Mycosphaerella* y *Teratosphaeria*

Tradicionalmente la identificación de las especies se ha basado de forma preponderante en el análisis de las características morfológicas del organismo que se pretende identificar. En el caso de los Géneros *Mycosphaerella* y *Teratosphaeria* los caracteres empleados son: forma y tamaño de las ascosporas, dimensiones del asco y pseudotecio, y tipo de anamorfo (cuando está presente). Estos caracteres presentan mucha variación intraespecíficas y solapamiento interespecífico (Crous, 1998; Park *et al.*, 2000) y como elemento de complejidad adicional la medición correcta de estos caracteres depende del colorante utilizado para teñir las estructuras y del estado del desarrollo de los ascos, si se trata de una muestra fresca o de herbario ( Park *et al.*, 2000).

El tipo de anamorfo que presenta un espécimen es importante pero no determinante para su identificación, ya que estos constituyen grupos polifiléticos dentro de los géneros *Mycosphaerella* y *Teratosphaeria* (Crous *et al.*, 2001).

Las características culturales de estas especies son muy variables e influenciadas por pequeñas diferencias en el medio de cultivo (Crous *et al.*, 2001). Las colonias presentan distintas tonalidades de verde o gris en Agar-extracto de malta (MEA). Los márgenes pueden ser enteros, lobados o desflecados. Algunas especies (*M. crystallina* y *M. heimioides*) forman cristales rojos en cultivo y otras secretan pigmentos que difunden en el medio. De igual forma existen diferencias en la velocidad de crecimiento en diferentes medios pero en general todas las especies presentan velocidades de crecimiento muy bajas en MEA, lo que dificulta su aislamiento y cultivo.

Otra característica que puede ayudar en la identificación de estas especies son los síntomas observados en las hojas, por ejemplo *Teratosphaeria fibrillosa* produce manchas foliares muy características, con forma de red (Crous *et al.*, 2007).

*Mycosphaerella marksii* produce lesiones con pseudotecios epifilos (Crous, 1998). Las lesiones causadas por *T. cryptica* pueden ocurrir tanto en follaje juvenil como adulto y los pseudotecios son anfígenos, aunque predominan en la cara abaxial, mientras que *T. nubilosa* produce lesiones principalmente en follaje juvenil (Park & Keane, 1982a; Crous, 1998). De todos modos este criterio nunca es decisivo ya que pueden ocurrir hasta 4 especies en una misma mancha foliar (Crous, 1998).

Un carácter morfológico importante para la identificación de estas especies es el patrón de germinación de las ascosporas, introducido por Park & Keane (1982a) y posteriormente ampliado por Crous (1998). Este es un carácter bastante reproducible (cuando las esporas germinan sobre agar-agua) y que inicialmente contribuyó a la identificación, pero que resultó menos útil a medida que se fueron descubriendo nuevas especies. Asimismo presenta algún nivel de variación intraespecífica, como en el caso de *T. nubilosa* que típicamente presenta un patrón de germinación tipo F (Crous, 1998) (figura 5 C) pero aislamientos de Nueva Gales del Sur, Australia pueden presentar además múltiples tubos germinativos (Hunter *et al.*, 2009).

Todos estos caracteres deben emplearse en forma conjunta para identificar correctamente un espécimen. La identificación de las especies de *Mycosphaerella* y *Teratosphaeria* es muy importante, ya que a estos géneros pertenecen especies con grados de patogenicidad muy distintos, desde especies patógenas capaces de provocar grandes eventos de defoliación a otras saprófitas (Park & Keane, 1982b) y endófitas (Crous, 1998). A pesar de ello, y debido a su complejidad, varios errores en la identificación aparecen en la literatura. Por ejemplo, el anamorfo de *T. cryptica* (*Colletogloeum nubilosum*) fue originalmente atribuido a *T. nubilosa* (Ganapathi & Corbin, 1979). *T. nubilosa* fue identificada erróneamente como *Teratosphaeria molleriana* en 1950 en Sud África y *Teratosphaeria juvenis*, la cual inicialmente se creía que era una especie distinta a *T. nubilosa*, resultó ser un sinónimo de ésta (Hunter *et al.*, 2008).

A partir de la década de 1990 los métodos basados en técnicas de biología molecular se han utilizado muy frecuentemente para la identificación de estos hongos, y hoy en día se utilizan para confirmar las identificaciones basadas en caracteres morfológicos. Estas técnicas tienen la ventaja de ser altamente reproducibles, confiables y no depender, en gran medida, del estado del espécimen que está siendo analizado (muestra fresca o de herbario).

La secuenciación de algunos genes y/ o regiones del genoma seguida del análisis filogenético de las mismas es muy utilizada. La región del genoma que más frecuentemente se analiza es el ADNr nuclear principalmente ITS pero muchas veces esta región no presenta suficiente variabilidad para distinguir entre ciertas especies de

*Mycosphaerella* o *Teratosphaeria* (Crous *et al.*, 2004; Hunter *et al.*, 2006) y el análisis de otros genes nucleares se emplean con ese fin (Actina,  $\beta$ -Tubulina, Factor de Elongación 1). Esta metodología también permite detectar especies crípticas (Hunter *et al.*, 2006).

La técnica denominada RAPD también ha sido empleada para distinguir entre especies morfológicamente muy similares de *Mycosphaerella* y *Teratosphaeria*. Mediante el uso de esta técnica se han logrado identificar exitosamente *T. cryptica*, *T. nubilosa*, *Mycosphaerella gregaria* y *M. marksii* y (Carnegie *et al.*, 2001). Sin embargo, los RAPD presentan la desventaja de ser difíciles de estandarizar entre laboratorios (Hunter *et al.*, 2008).

Iniciadores (primers) especie específicos han sido desarrollados para la identificación de estas especies mediante PCR. Entre los ejemplos que aparecen en la literatura encontramos los primers desarrollados para PCR-RFLP por Kularante *et al.* (2004) que permiten distinguir entre *T. cryptica*, *T. nubilosa*, *T. parva*, *M. tasmaniensis* y *Mycosphaerella vespa*. Maxwell *et al.* (2005) también desarrollaron primers capaces de identificar en una única reacción de PCR, *Mycosphaerella lateralis*, *M. marksii*, *T. cryptica*, *T. nubilosa* y *T. parva*. Más recientemente Glen *et al.* (2007) también desarrollaron primers específicos para estas especies. Todos los primers mencionados se basan en la región ITS del ADNr.

El empleo de primers específicos presenta la ventaja de ser un método rápido que puede ser empleado para la evaluación rutinaria de la presencia de *Mycosphaerella* spp. o *Teratosphaeria* spp. en plantaciones o viveros.(Hunter *et al.*, 2008). De hecho, los primers ya han sido empleados para detectar las mencionadas especies a partir de lesiones maduras u hojas con síntomas de MLD apenas visibles (Kularante *et al.*, 2004; Maxwell *et al.*,2005; Glen *et al.*, 2007).

### **Antecedentes de la presencia de *Mycosphaerella* spp. y *Teratosphaeria* spp. en Uruguay**

Si bien la expansión de la forestación en Uruguay comenzó en la década de 1990, recién en 2004 se citó por primera vez la presencia de especies de los géneros

*Mycosphaerella* y *Teratosphaeria* asociadas a manchas necróticas en *Eucalyptus* spp. Las especies halladas fueron *M. marksii*, *Mycosphaerella walkeri*, *M. vespa* y *Teratoapheria suberosa* (Balmelli *et al.*, 2004), pero ninguna de estas son conocidas como patógenos agresivos.

Posteriormente fueron aisladas e identificadas *Mycosphaerella heimii*, *M. marksii*, *Mycosphaerela aurantia*, a partir de manchas de hojas de Myrtaceas nativas, hecho que sugiere que los patógenos de especies exóticas (en este *Eucalyptus*) podrían haber afectado a las especies nativas (Pérez C. *et al.*, 2009a).

En 2007 hubo un gran evento de defoliación en plantaciones de *E. globulus* de entre 6 meses y 2 años, a partir de lesiones provenientes de plantaciones afectadas se aislaron e identificaron *M. lateralis* y *T. parva* (Lupo *et al.*, 2007) y posteriormente *T. nubilosa* (Lupo *et al.*, 2008; Pérez G. *et al.*, 2009a).

En un relevamiento más amplio que abarcó todas las zonas de importancia de plantaciones de *Eucalyptus* spp. del Uruguay, un gran número de especies fueron aisladas a partir de lesiones necróticas en hojas y tallos: *M. aurantia*, *M. scytalidii*, *M. marksii*, *M. lateralis*, *M. heimii*, *T. pluritubularis*, *T. molleriana*, *T. ohnowa*, *Kirramyces gauchensis* y *Pseudocercospora norchiensis*, las dos últimas son formas anamórficas asociadas a los géneros *Mycosphaerella* y *Teratosphaeria* pero cuyos teleomorfos se desconocen (Pérez C. *et al.*, 2009b).

# Objetivos

## Objetivo General

Relevar e identificar directamente de hojas, las principales especies de los géneros *Mycosphaerella* y *Teratosphaeria* asociadas a daños en plantaciones de *Eucalyptus* spp. en diferentes zonas del Uruguay.

## Objetivos específicos:

1. Aislar e identificar las especies a partir de hojas con síntoma
2. Diagnosticar la presencia de las especies por medio de la amplificación del DNA directamente de hojas con síntomas
3. Evaluar la efectividad de distintos primers específicos para algunas especies de *Mycosphaerella* y *Teratosphaeria* en materiales provenientes de plantaciones de Uruguay
4. Evaluar la velocidad de crecimiento de las especies encontradas en distintos medios de cultivo reducir el tiempo de producción de biomasa

# Hipótesis

Es posible identificar las especies de *Mycosphaerella* y *Teratosphaeria* asociadas con daños en plantaciones de *Eucalyptus* utilizando métodos moleculares a partir de material vegetal

# Materiales y métodos

## **Colecta del material**

Se colectaron hojas con síntomas característicos de la enfermedad de la hoja de *Mycosphaerella* (MLD) en plantaciones de *Eucalyptus* spp. localizadas en distintos departamentos del país. Las mismas fueron enviadas al Laboratorio de Micología por técnicos de la empresa Eufores S.A. para su identificación o colectadas durante salidas a campo.

## **Aislamiento de *Mycosphaerella* spp. y *Teratosphaeria* spp.**

Las hojas sintomáticas fueron sumergidas en agua durante 12 horas, luego se cortaron las lesiones que contenían pseudotecios y se adhirieron a la tapa de cajas de Petri con agar-agua al 2% con los pseudotecios enfrentadas hacia el agar (Crous, 1998). Las placas se incubaron por 24-48 horas. Se observó el patrón de germinación de las ascosporas bajo microscopio estereoscópico y las mismas se transfirieron a cajas de Petri con agar malta al 2%, usando aguja estéril, para su posterior cultivo.

## **Extracción de ADN a partir de micelio vegetativo**

El ADN se extrajo a partir de colonias cultivadas en agar malta según el método de Lee & Taylor (1990). Se raspó el micelio con bisturí estéril y se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se agregaron 400 µl de buffer de lisis (Tris HCL pH 8 (50 mM), EDTANa<sub>2</sub> (50 mM), SDS 0.3%) y 5 µl de proteinasa K 2% (wt/vol). Se realizó la lisis mecánica con un machacador plástico estéril. La muestra se incubó a 60° C durante 30 minutos. Se agregaron 112 µl de NaCl 5M y 52 µl de CTAB 10x (CTAB 10% (wt/vol), Tris HCL 100 mM pH 8, NaCl 1,4M, EDTA 20 mM, β-mercaptoetanol 0,2% (vol/vol)). Se incubó a 65° C durante 10 minutos. Se agregaron 570 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, vol/vol), se agitó enérgicamente y se incubó a -20° C durante 30 minutos. Se centrifugó a 10.000 RPM durante 10 minutos. Se transfirieron 400-500 µl de sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 ml, se agregaron 20 µl de acetato de

Na 3M y se incubó a -20° C durante 30 minutos. Se centrifugó a 10.000 RPM durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y se agregaron 0,55 volúmenes de isopropanol. Se agitó suavemente, se incubó a -20° C durante 30 minutos y se centrifugó a 10.000 RPM durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 200 µl de etanol 70% (vol/vol). Se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 RPM. Se descartó el etanol y se dejó secar el pellet. Se resuspendió el pellet en 50-100 µl de agua destilada estéril a 60° C. Se agregó 1 µl de RNAsa (5 µg/mL) y se incubó a 37° C durante 60 minutos. Se almacenó a -20° C.

### **Amplificación mediante PCR de la región ITS y análisis mediante electroforesis**

Se amplificó el ADN de la región ITS1, ITS2 y el gen ribosomal 5.8 s utilizando los primers generales ITS4 e ITS5. Los primers se obtuvieron de INVITROGEN ARGENTINA S.A. Los parámetros de ciclado fueron los siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min; 35 ciclos de desnaturalización (30 s a 94°C), “annealing” (30 s a 50°C) y extensión (1 min a 72°C); seguidos de un ciclo de extensión final de 4 minutos a 72°C.

También se amplificó parte de la región ITS utilizando primers específicos desarrollados por Maxwell *et al.* (2005) para *T. nubilosa* (MN1F/MN1R), *T. parva* (MP1F/MP1R) y *M. lateralis* (ML1F/ML1R). En este caso las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 96°C por 2 minutos; 2 ciclos de 94°C por 30 s, 68°C por 30 s y 72°C por 2 minutos; 4 ciclos de 94°C por 30 s, 66°C por 30 s y 72°C por 2 minutos; 8 ciclos de 94°C por 30 s, 64°C por 30 s y 72°C por 2 minutos; 8 ciclos de 94°C por 30 s, 63°C por 30 s y 72°C por 2 minutos; 8 ciclos de 94°C por 30 s, 62°C por 30 s y 72°C por 2 minutos; seguidos de un ciclo de extensión final de 4 minutos a 72°C.

La amplificación se realizó en un termociclador Corbett Research CG1--96.

En todos los casos la mezcla de reacción contenía 2,5 µl de Buffer 10X, 2,5 µl de dNTPs (2,5 mM), 0,75 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5 µl de primer 1 (10 µM), 0,5 µl de primer 2 (10 µM), 0,25 µl de Taq Polimerasa(1,25 U) y 16 µl de agua (25 µl de volumen final). Los primers utilizados se indican en la Tabla 1.

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV en un transiluminador. Como marcador de peso molecular se utilizó DNA mass ruler 100bp (Fermentas).

**Tabla 1:** Lista de primers utilizados en las PCRs.

Primer	Secuencia (5' 3')	Referencia
ITS4	tcctccgcttattgatatgc	White <i>et al.</i> (1990)
ITS5	ggaagtaaaagtctgtaacaagg	White <i>et al.</i> (1990)
MN1F	gcgccagcccgacctcc	Maxwuell <i>et al.</i> (2005)
MN1R	ggtccccgtcagcgaaacagt	Maxwuell <i>et al.</i> (2005)
ML1F	aaacgccggggccttcg	Maxwuell <i>et al.</i> (2005)
ML1R	cgacgtctccgcatggtttcc	Maxwuell <i>et al.</i> (2005)
MP1F	cctccgggctcgacctcca	Maxwuell <i>et al.</i> (2005)
MP1R	tctcgcaagcggatgattaaacc	Maxwuell <i>et al.</i> (2005)

#### **Extracción de ADN y amplificación por PCR a partir de material vegetal con síntomas**

De cada muestra se seleccionaron hojas (juveniles o adultas) con síntomas, de las que se cortaron las manchas y desinfectaron superficialmente por inmersiones sucesivas en EtOH 80% (1min), NaClO 4% (2min) y agua destilada estéril (dos veces). Para la extracción de ADN se empleó el método de Jaslavich *et al.* (2000). En un tubo Eppendorff de 1,5 ml se agregaron las manchas desinfectadas superficialmente (100-300 mg) y 600 µl de buffer de lisis (CTAB 1% (wt/vol), Tris HCl pH 8 100 mM, NaCl 1,4 M, EDTA 20mM, β-mercaptoetanol 0,2% (vol/vol)). Se realizó la lisis mecánica con un machacador plástico estéril. Se incubó a 65° C durante 120 minutos. Se agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, vol/vol) y se agitó enérgicamente. Se centrifugó a 10.000 RPM durante 10 minutos. Se transfirieron aprox. 500 µl de sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 1/10 volúmenes de CTAB 10% en NaCl 0,7 M. Se mezcló e incubó a 65° C durante 60 minutos. Se agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, vol/vol) y se agitó enérgicamente. Se centrifugó a 10.000 RPM durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml, se agregó un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1, vol/vol/vol) y se agitó enérgicamente. Se centrifugó a 10.000 RPM durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 ml, se

agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol, se agitó suavemente y se incubó a -20° C durante 30 minutos. Se centrifugó a 12.000 RPM durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet 2 veces con 200 µl de etanol 70% (vol/vol) y se centrifugó a 10.000 RPM durante 5 minutos. Se resuspendió el pellet en 50-100 µl de agua mQ a 60°C. Se agregó 1 µl de RNAsa (5 µg/mL) y se incubó a 37° C durante 60 minutos. Se almacenó a -20° C.

Para establecer la temperatura óptima de “annealing” utilizando los primers ITS4 e ITS5 se realizó un PCR en gradiente (50°C, 51.5°C, 54°C, 55.5°C, 57°C y 58°C).

Los primers específicos para *T. nubilosa* (MN1F y MN1R), para *T. parva* (MP1F y MP1R) o para *M. lateralis* (ML1F y ML1R), también se utilizaron para amplificar, de forma parcial, esta región del genoma.

Las condiciones de los PCRs llevados a cabo con los primers MN1, MP1, ML1 y las electroforesis fueron iguales a las descritas anteriormente.

### **Secuenciación y análisis filogenético**

Los productos de PCR obtenidos a partir de los primers ITS4 e ITS5 y algunos de los obtenidos a partir de los primers MN1 y ML1 fueron secuenciados por MACROGEN, Corea. Las secuencias obtenidas fueron alineadas contra las secuencias presentes en la base de datos del National Center for Biotechnology Investigation (GenBank) utilizando la herramienta BLAST.

Con el objetivo de confirmar las identificaciones se realizó un análisis filogenético de las secuencias obtenidas en el presente trabajo. Dichas secuencias se alinearon con aquéllas que presentaron mayor puntaje en el BLAST y con secuencias de referencia de cada especie (también obtenidas de GenBank). El alineamiento se llevó a cabo con el algoritmo ClustalW de MEGA 4.0 y luego fue optimizado manualmente.

Se construyó un árbol filogenético utilizando el método de máxima parsimonia con un test de Bootstrap con 1000 pseudo réplicas.

### **Evaluación del crecimiento en distintos medios de cultivo**

En base a características morfológicas de las colonias se seleccionaron cuatro aislamientos (uno de *T. nubilosa*, uno de *T. ohnowa* y dos de *M. lateralis*) para evaluar su crecimiento en diferentes medios de cultivo mediante medición del diámetro de la colonia a lo largo del tiempo. Para cada colonia se registraron y promediaron los diámetros mayor y menor dos veces por semana durante tres semanas. Las mediciones se hicieron por triplicado para cada aislamiento. A partir de estos valores se elaboró una gráfica de diámetro (promedio) de la colonia (mm) en función del tiempo (en días) y se calculó el valor de la pendiente por el método de mínimos cuadrados utilizando el programa MICROCAL ORIGIN 6.0.

Se evaluó el crecimiento a 25 ° C en los siguientes medios: ADT, EGSL, YPD, EGA, EGS, EGE; MEA (apéndice 1) y en “ADT +vit”, “EGA+ vit”, “MEA, vit” los cuales consistían en los mismos medios mencionados anteriormente, adicionados con una solución de vitaminas y sales minerales obtenidas a partir de un suplemento multivitamínico comercial Supradin<sup>®</sup>, BAYER (apéndice 2).

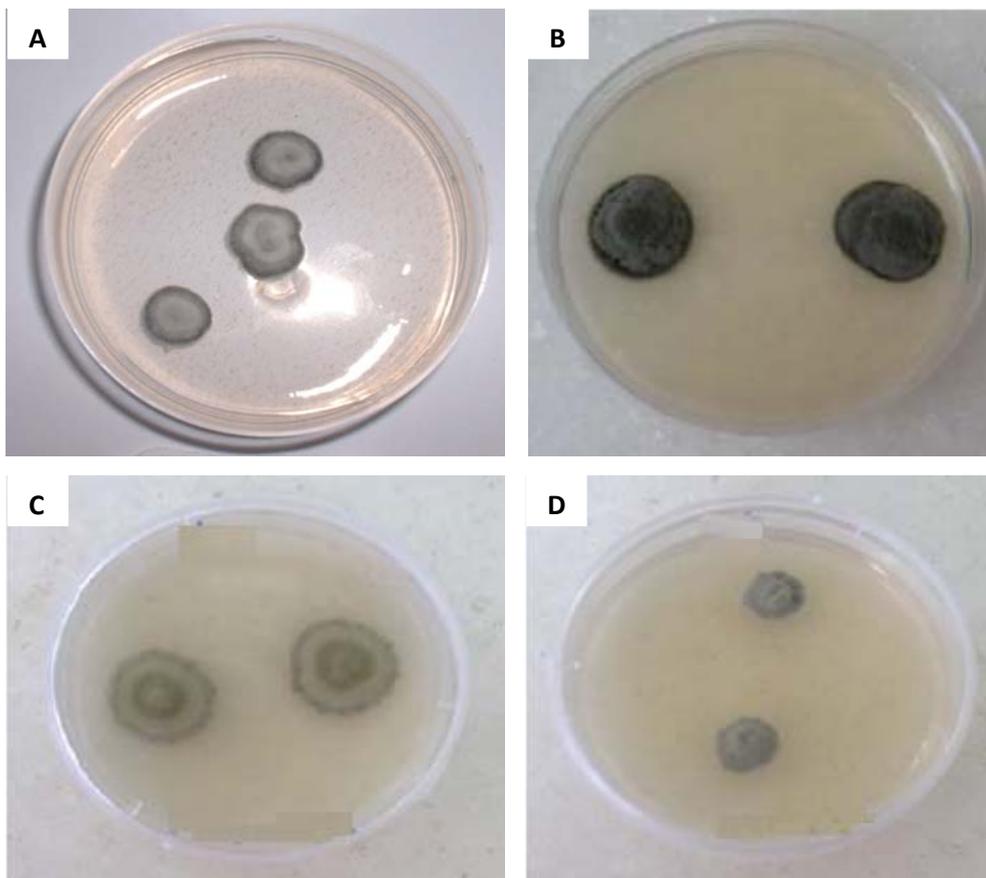
# Resultados

## Identificación de los aislamientos de *Mycosphaerella* y *Teratosphaeria*

A partir de las muestras se aislaron colonias de *Mycosphaerella* spp. y *Teratosphaeria* spp. que presentaban 4 tipos diferentes de morfología (Figura 6).

La amplificación mediante PCR (utilizando ITS4 e ITS5) del ADN genómico extraído de las colonias puras produjo fragmentos de 600pb aproximadamente.

A partir de la secuencia de los productos de PCR obtenidos, se identificaron las siguientes especies: *M. lateralis*, *T. ohnowa* y *T. nubilosa*. Las cepas identificadas de esta forma así como su lugar de origen se muestran en la Tabla 4.



**Figura 6:** Colonias de *Mycosphaerella* sp. y *Teratosphaeria* spp. en agar malta. A) *Teratosphaeria nubilosa*, B) *Teratosphaeria ohnowa*, C y D) *Mycosphaerella lateralis*.

**Tabla 4:** Especies identificadas a partir de las distintas muestras que presentaban síntomas de MLD.

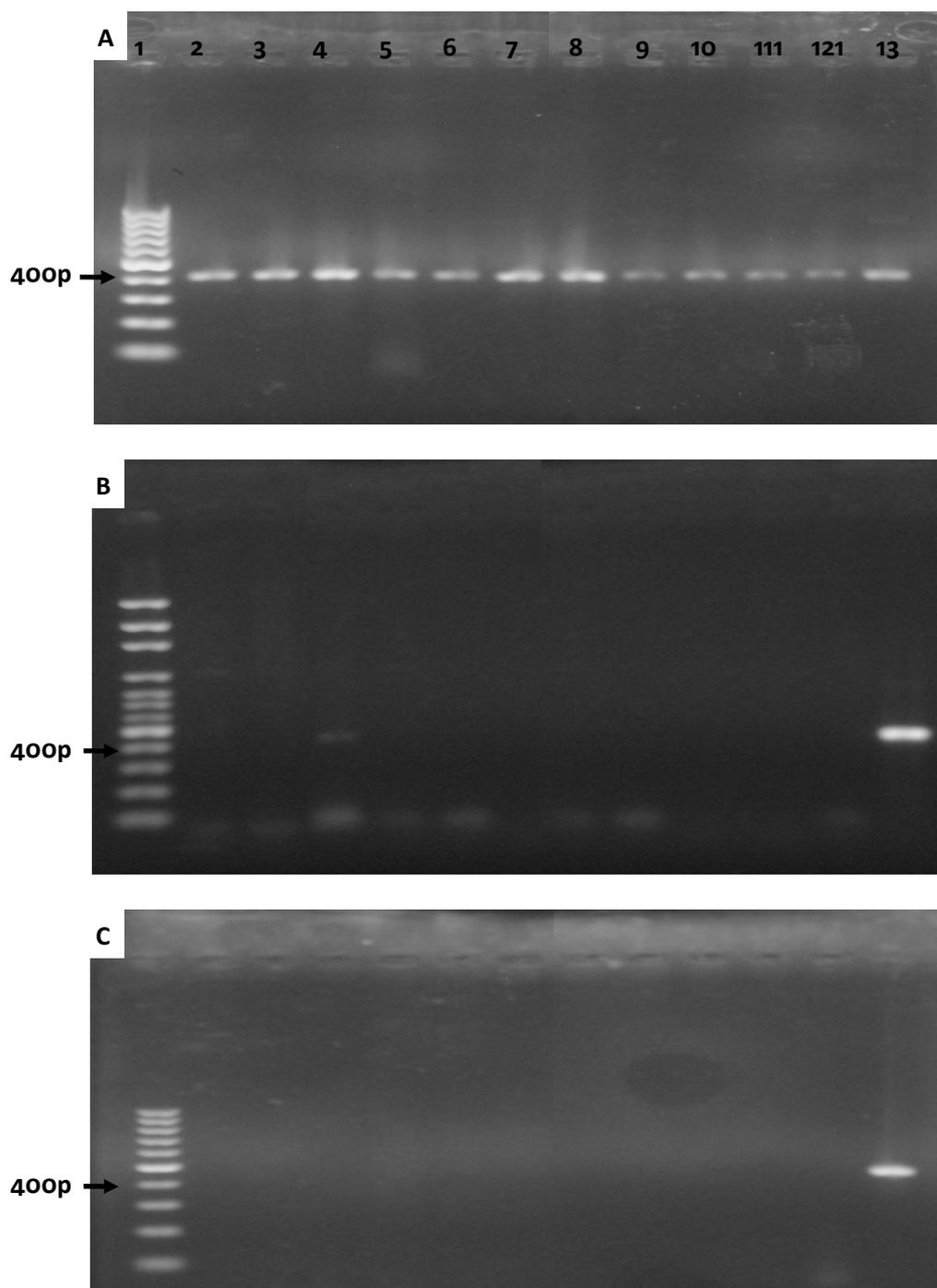
Muestra	Localidad	Departamento	Hospedero	Estado de desarrollo	Especie identificada
M2	Capilla Vieja	Paysandú	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>
M5	Santa Teresa	Lavalleja	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. ohnowa</i> <i>M. lateralis</i>
M6	El Metal	Lavalleja	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>
M9	El Rocío	Río Negro	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>
S3	El Cármen	Durazno	<i>E. grandis</i>	Juvenil	<i>M. lateralis</i>
T7		Tacuarembó	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>M. lateralis</i>

#### **Identificación de *Mycosphaerella* spp. y *Teraosphaeria* spp. a partir de material vegetal**

Mediante PCR en gradiente se determinó que la temperatura de “annealing” adecuada para la amplificación a partir de material vegetal utilizando los primers ITS4 e ITS5 fue 57°C. A dicha temperatura se produjo una única banda de 600pb aproximadamente. El tamaño de los amplicones obtenidos con los primers específicos MN1, MP1 o ML1 fue de 400pb (Figura 7).

Mediante el uso de los primers MN1 (o ITS4 y 5) se identificó *T. nubilosa* a partir de hojas sintomáticas provenientes de distintas plantaciones de *Eucalyptus* spp. en Uruguay, en los departamentos de Colonia, Durazno, Lavalleja, Paysandú, Río Negro, Rocha, Soriano y Tacuarembó. Los primers MP1 permitieron detectar *Teratosphaeria parva* en una única muestra colectada en el departamento de Lavalleja. En ninguna de las muestras se detectó *M. lateralis* (directamente a partir de material vegetal).

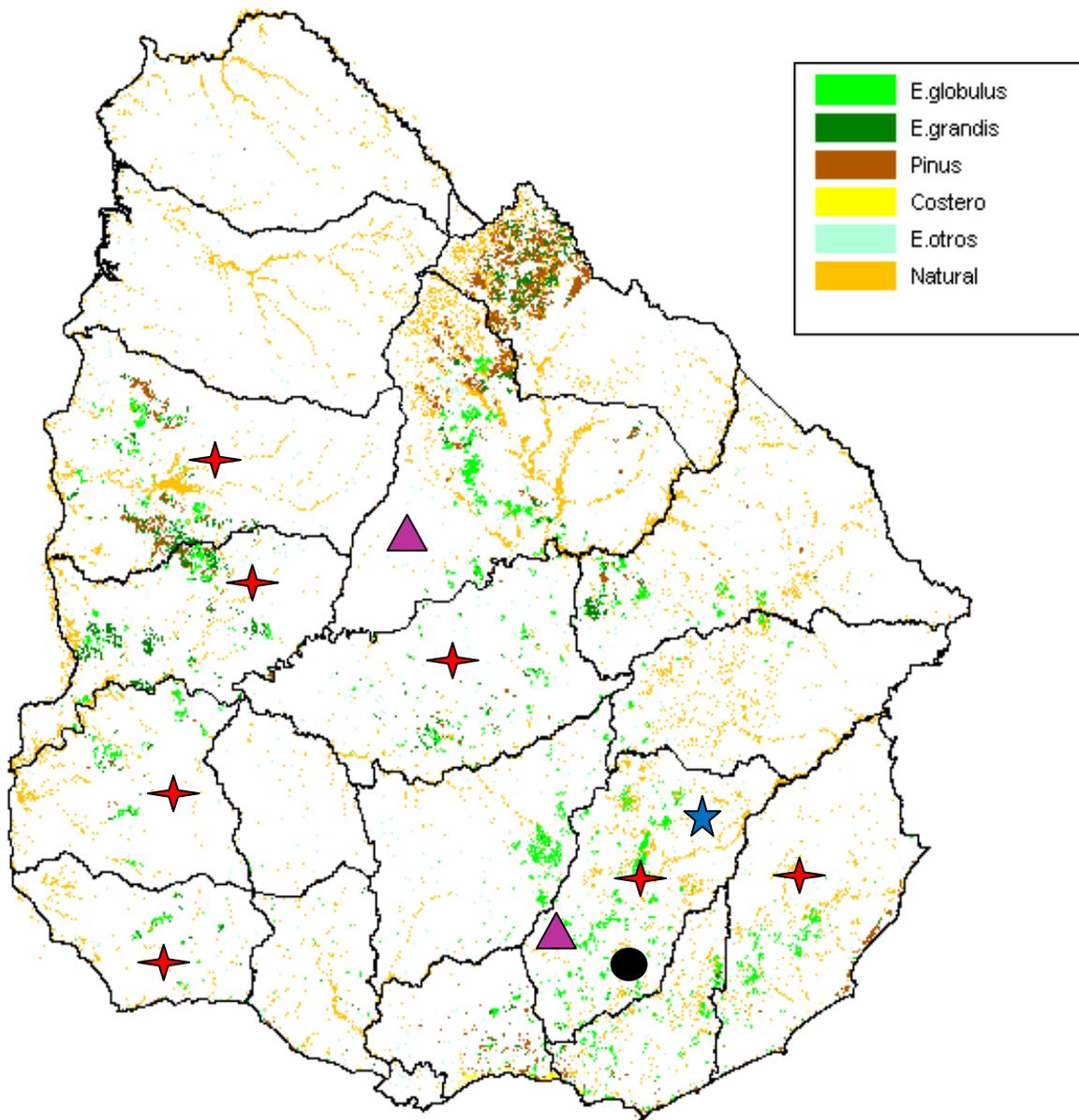
En la Tabla 5 se resumen las especies de *Mycosphaerella* y *Teratosphaeria* identificadas (a partir de aislamientos o directamente de material vegetal) y las características de cada muestra y en la Figura 8 se muestra la distribución geográfica de las especies encontradas.



**Figura 7:** Amplificación por PCR a partir de material vegetal con síntomas utilizando los primers MN1 (a) MP1 (b) o ML1 (c). Carril 1: Marcador de peso molecular 100pb. Carril 2: M1. Carril 3: M2. Carril 4: M6. Carril 5: M7. Carril 6: M8. Carril 7: M8. Carril 8: M14. Carril 9: M16. Carril 10: M20. Carril 11: M21. Carril 12: S1. Carril 13: E2O2. Carril 14: ADN genómico de *T. nubilosa* (a), *T. parva* (b) o *M. lateralis* (c).

**Tabla 5.** Especies de *Mycosphaerella* y *Teratosphaeria* identificadas mediante PCR. ITS: primers generales para hongos. MN1: primers específicos para *T. nubilosa*. MP1: primers específicos para *T. parva*. ML1: primers específicos para *M. lateralis*.

Muestra	Localidad	Depto.	Hospedero	Estado de desarrollo	Especie identificada	Primers/ tipo de muestra
M1	Capilla vieja	Paysandú	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>	ITS-hoja MN1- hoja
M2	Capilla vieja	Paysandú	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>	ITS-micelio ITS-hoja MN1- hoja
M3	Pindó	Rocha	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>	MN1- hoja
M5	Sta. Teresa	Lavalleja	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>M. lateralis</i> <i>T. ohnowa</i>	ITS -micelio ITS-micelio
M6	El metal	Lavalleja	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i> <i>T. parva</i>	ITS-hoja-micelio MN1- hoja MP1-hoja
M7	Ptas. Barriga Negra	Lavalleja	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>	ITS-hoja MN1- hoja
M8	Nva. Escocia	Río Negro	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>	ITS-hoja MN1- hoja
M9	El Rocío	Río Negro	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>	ITS-hoja-micelio MN1-hoja
M10	El Rocío	Río Negro	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>	ITS-hoja MN1-hoja
M13	El minero	Soriano	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>	MN1-hoja
M14	Sarandí	Soriano	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>	MN1- hoja
M16	Los Cercos	Río Negro	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>	ITS-hoja MN1- hoja
M19	Nva. Escocia	Río Negro	<i>E. globulus</i> ssp. <i>bicostata</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>	ITS-hoja MN1- hoja
M20	Nva. Escocia	Río Negro	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>	MN1- hoja
M21		Colonia	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>	MN1- hoja
S1	El Carmen	Durazno	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>T. nubilosa</i>	MN1- hoja
S3	El Carmen	Durazno	<i>E. grandis</i>	Juvenil	<i>M. lateralis</i>	ITS/ML1-micelio
T7		Tacuarembó	<i>E. globulus</i>	Juvenil	<i>M. lateralis</i>	ITS-micelio
E20		Río Negro	<i>E. globulus</i>	Adulta	<i>T. nubilosa</i>	MN1- hoja



**Figura 8:** Distribución geográfica (por departamentos) de las especies encontradas: *M. lateralis* ▲ *T. ohnowa* ★, *T. parva* ● *T. nubilosa* ✦. Los puntos de colores que aparecen sobre el mapa del Uruguay (DGF, 2007) representan zonas forestadas con distintas especies (ver referencia en la figura).

## Análisis filogenético

En el análisis de filogenético de la región ITS se incluyeron secuencias obtenidas a partir de las amplificaciones con ITS5 y MN1F. Como grupo externo se utilizó *Botryosphaeria rhodinia*. Se incluyeron un total de 53 OTUs.

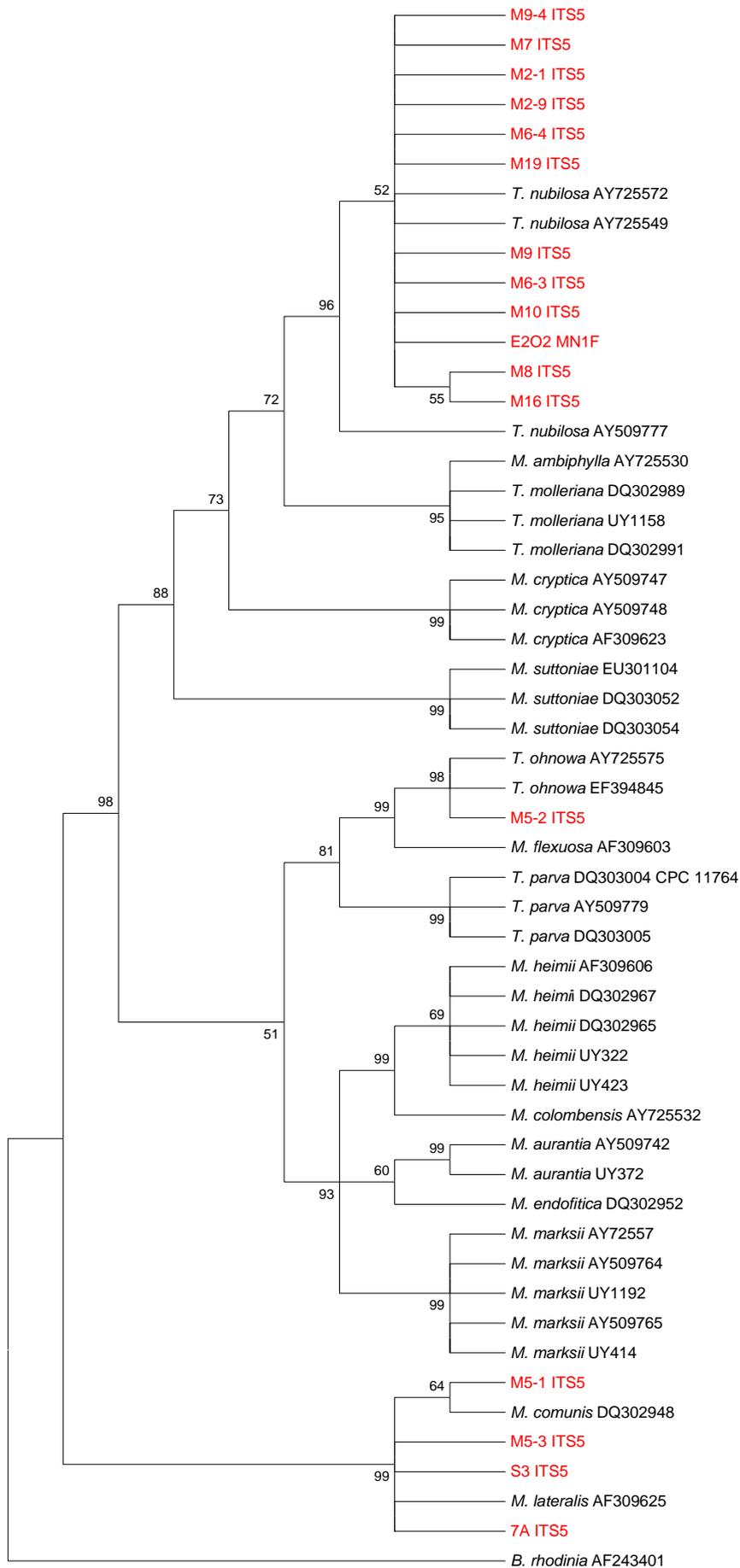
El conjunto de secuencias analizado produjo 151 árboles igualmente parsimoniosos con un largo de 464 pasos (CI = 0.67).

El árbol consenso se muestra en la figura 9. El mismo muestra dos clados mayores (uno perteneciente a *Mycosphaerellaceae* y el otro a *Teratosphaeriaceae*) dentro de los cuales cada especie se agrupa en un único subclado independiente con soporte por bootstrap igual o mayor a 95 puntos, a excepción de *T. ambifylla* y *T. molleriana* que agrupan juntas. *T. heimii* que presenta soporte por bootstrap relativamente bajo (69). *M. lateralis* y *M. comunis* son especies sinónimas.

Los altos valores de bootstrap que soportan los nodos a los cuales pertenecen las secuencias obtenidas en este trabajo ratifican la identificación de las muestras como *T. nubilosa*, *T. ohnowoa* o *M. lateralis*.

En todos los casos, las secuencias obtenidas mediante los primers MN1 o ML1 correspondieron a la especie para la cual fueron diseñadas (*T. nubilosa* y *M. lateralis* respectivamente).

El producto de PCR obtenido con los primers MP1 no fue secuenciado.



*Teratosphaeriaceae*

*Mycosphaeralleaceae*

**Figura 9 (página anterior):** Análisis filogenético por máxima parsimonia de la región ITS de algunas especies de *Mycosphaerella* y *Teratosphaeria*. El número arriba de cada nodo corresponde al apoyo por bootstrap, los nodos con apoyo menor a 50 aparecen colapsados. El nombre de la especie a la que pertenece cada secuencia aparece seguido de su número de acceso en Genbank. Las secuencias obtenidas en este trabajo aparecen en rojo seguidas del nombre del primer a partir del cual se obtuvo la secuencia. Las secuencias con número de acceso de Genbank UY1192, UY414, UY372, UY423 y UY322 pertenecen a aislamientos uruguayos.

### **Evaluación de la velocidad de crecimiento en diferentes medios de cultivo**

La velocidad de crecimiento se expresó como la pendiente del diámetro de la colonia en mm en función del tiempo en días  $\pm$  el desvío estándar (Figura 10).

Para todos los medios ensayados *T. ohnowa* (M5-2) alcanzó mayor velocidad de crecimiento en el medio ADT ( $1,09 \pm 0,03$  mm/día) y la menor en el medio YPD ( $0,73 \pm 0,09$  mm/día) (Figura 10). Evidentemente la adición de vitaminas al medio EGA produjo reducción en el crecimiento respecto al mismo medio sin vitaminas.

En los otros medios ensayados las velocidades de crecimiento observadas fueron intermedias (Figura 10).

Los dos aislamientos de *M. lateralis* evaluados (M5-3, aislada de *E. globulus* y S3, aislada a partir de *E. grandis*) mostraron su máxima velocidad de crecimiento en MEA + vit (M5-3:  $0,67 \pm 0,01$  mm/día y S3:  $0,54 \pm 0,06$  mm/día) y la mínima velocidad de crecimiento en ADT o ADT + vit (Figura 10). *M. lateralis* aumentó sensiblemente su velocidad de crecimiento cuando se agregó vitaminas al medio MEA a diferencia de *M. ohnowa*. La velocidad de crecimiento aumentó por un factor de 2 aproximadamente para la cepa M5-3 y por un factor de 1,4 aproximadamente para la cepa S3 (Figura 10).

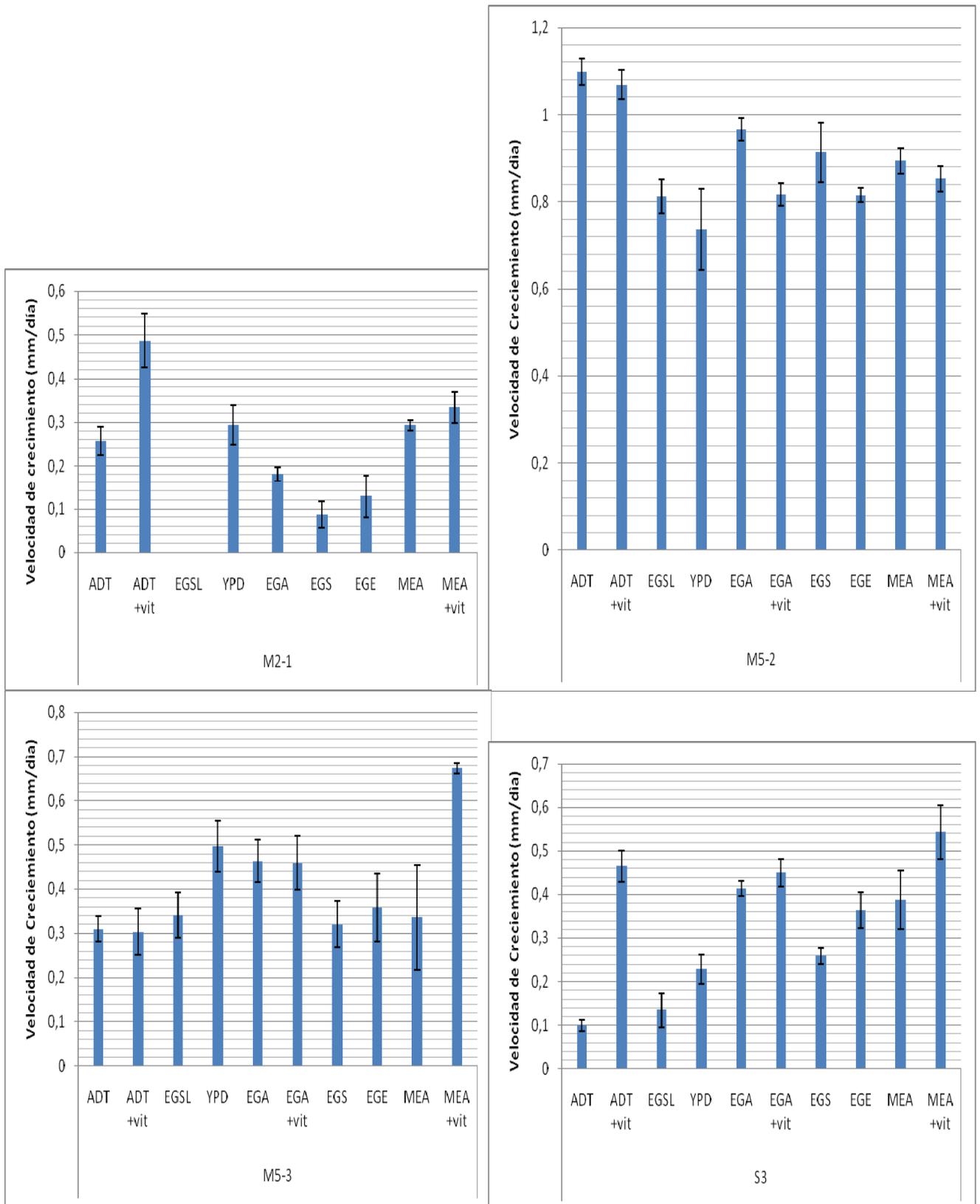
El agregado de la solución de vitaminas al medio EGA no mostró diferencias en la velocidad de crecimiento de *M. lateralis*. Por el contrario, el agregado de la solución de vitaminas en el medio ADT produjo diferentes resultados en ambos aislamientos. El aislamiento M5-3, no presentó diferencia significativa en el crecimiento en ambos medios; mientras que la velocidad de crecimiento de S3 en ADT + vit aumentó por un factor de 5 aproximadamente (Figura 10). La velocidad de crecimiento de ambos aislamientos en YPD también fue diferente. M5-3 creció a una tasa de  $0,50 \pm 0,06$  mm/día (aproximadamente 1,4 veces más rápido que su crecimiento en MEA), mientras que S3 creció a una tasa de  $0,23 \pm 0,03$  mm/día (aproximadamente 1,7 veces

menor a la velocidad observada en MEA). El comportamiento de ambos aislamientos en los demás medios también fue variable (Figura 10).

*T. nubilosa* fue la especie que presentó menor velocidad de crecimiento en la mayoría de los medios ensayados. Esta especie alcanzó su velocidad de crecimiento más elevada en el medio ADT + vit ( $0,49 \pm 0,06$  mm/día), mientras que la menor velocidad la alcanzó en el medio EGS ( $0,09 \pm 0,03$  mm/día); además no fue capaz de crecer en el medio EGSL (Figura 10).

La adición de la solución de vitaminas al medio ADT (ADT + vit) provocó un aumento considerable en la velocidad de crecimiento con respecto al mismo medio sin dicha solución (ADT). Se observó un aumento por un factor de 2 aproximadamente (Figura 10).

En el caso del medio MEA, la adición de la solución de vitaminas (MEA + vit) provocó un aumento leve en la velocidad de crecimiento, la cual aumentó por un factor de 1,1 aproximadamente.



**Figura 10:** Velocidad de crecimiento de *Mycosphaerella* y *Teratosphaeria* en diferentes medios de cultivo. A) *T. nubilosa* (cepa M2-1), B) *T. ohnowa* (cepa M5-2), C) *M. lateralis* (cepa M5-3), D) *M. lateralis* (cepa S3).

# Discusión

## **Identificación de especies por métodos moleculares**

El conocimiento de las especies patógenas que amenazan a un cultivo en una zona geográfica determinada es fundamental para su correcto establecimiento y manejo. En el caso del patosistema *Mycosphaerella/Teratosphaeria-Eucalyptus* esto es imprescindible ya que las distintas especies coocurren en una misma plantación o incluso en una misma lesión pero no todas son patógenos agresivos (Park & Keane, 1982b, 1987, Crous, 1998).

Con este propósito se siguieron dos estrategias: aislamiento de las especies fúngicas asociadas a MLD y posterior identificación mediante secuenciación de la región ITS del ADNr nuclear y amplificación directa del ADN extraído de las lesiones mediante PCR (utilizando primers específicos o primers generales para hongos).

Si bien las reacciones enzimáticas pueden verse inhibidas por sustancias presentes en los tejidos vegetales (Wilson, 1997, Holden *et al.*, 2003) los protocolos de extracción de ADN que emplean CTAB suelen mostrar buenos resultados (Holden *et al.*, 2003). En el presente trabajo se observó inhibición de la reacción de PCR en muchas muestras por lo que a las mismas se les realizó extracción de ADN más de una vez. A pesar de ello, esta estrategia permitió alcanzar el éxito en la identificación de un mayor número de muestras además de lograrse en un menor tiempo.

El empleo de los primers generales para hongos (ITS4 e ITS5) para la amplificación del ADN extraído directamente del material vegetal mostró ser viable para la identificación de estos hongos a pesar de que es sabido que varias especies pueden convivir en la misma lesión (Crous, 1998). El éxito obtenido mediante esta estrategia puede deberse a que las lesiones analizadas hayan estado colonizadas por una única especie, o que haya una especie que predomine en la(s) mancha(s) (*T. nubilosa* en el presente trabajo). Ésta posibilidad sería la especie más probable ya que en una de las muestras se detectaron tanto *T. nubilosa* como *T. parva* a partir del ADN extraído del material vegetal. Sin embargo, debido a que no se realizó un muestreo sistemático y exhaustivo de las plantaciones no es posible sacar conclusiones acerca de la estructura

de la comunidad de *Mycosphaerella* spp. y *Teratosphaeria* spp. en las lesiones provocadas por éstas.

En el presente estudio, todos los productos de PCR obtenidos mediante el uso de primers desarrollados por Maxwell *et al.* (2005) (MN1 y ML1) fueron específicos ya que la secuencia de los mismos correspondía a la especie para la que fueron diseñados. Esto indicaría que dichos primers son adecuados para realizar evaluaciones periódicas del estado fitosanitario de las plantaciones o viveros uruguayos. Sin embargo un muestreo más amplio es necesario para validar estos resultados.

Mediante el empleo de esta metodología se logró identificar *T. nubilosa* a partir de lesiones en hoja adultas de *E. globulus* que no presentaban pseudotecios y por tanto imposibilitaban realizar aislamientos monospóricos y cultivos para su identificación. Este constituye el primer registro de *T. nubilosa* asociada a hojas adultas de *E. globulus* en nuestro país, hecho significativo ya que esta especie se encuentra típicamente asociada a hojas juveniles. Asimismo, esta metodología permitió identificar *T. nubilosa* en todas las zonas importantes de producción de *E. globulus* del país (litoral oeste, centro, y litoral atlántico). La presencia de *T. nubilosa* es preocupante ya que esta especie es muy agresiva y ha sido hallada como la causa de defoliación en *Eucalyptus* spp. en muchas partes del mundo, siendo *E. globulus* una de las especies más susceptibles a este patógeno (Park *et al.*, 2000). Debido a epidemias causadas por *T. nubilosa* se abandonó la plantación de *E. globulus* en Sud África a principios de la década de 1930 (Lundquist & Prunell, 1987).

Otros factores de riesgo para la infección por *T. nubilosa*, en Uruguay donde *E. globulus* es la especie con mayor área plantada son las condiciones climáticas (precipitaciones anuales y temperatura media) apropiadas para el desarrollo de este patógeno (Park & Keane 1988a).

*Mycosphaerella lateralis* es la segunda especie en cuanto a su frecuencia de detección. Sin embargo, su papel en el desarrollo de la enfermedad no está claro. Inicialmente se postuló que podía ser un hiperparásito de *T. nubilosa* y *T. cryptica* (De Hog *et al.*, 1991), pero esta posibilidad fue luego descartada (Jackson *et al.*, 2004). *M. lateralis* puede sobrevivir en la filósfera y penetrar por los estomas pero no hay evidencia que desarrolle estructuras de penetración o cause lesiones en las hojas. Mas

aun, la anastomosis de conidios e hifas observada cuando crece sobre el filoplano es muy similar a lo observado en medios pobres en nutrientes y pone en duda su capacidad como colonizador primario de las hojas de *E. globulus* (Jackson *et al.*, 2004). Esta especie no se detectó nunca mediante la amplificación directa del ADN extraído de las hojas sino que solo fue detectada mediante el aislamiento a partir de las lesiones. El hecho de haber aislado *M. lateralis* independientemente de *T. nubilosa* puede deberse a que pueda causar lesiones por si sola (que es improbable debido a lo expuesto más arriba), a que se encuentre asociada a otras especies que no se detectaron en el presente trabajo o a que la temperatura de incubación de los aislamientos no sea la adecuada. La temperatura óptima de germinación de las ascosporas de *T. nubilosa* es 20° C (Park & Keane, 1982; Park, 1988a), la temperatura óptima de germinación de las ascosporas de *M. lateralis* se desconoce pero su temperatura óptima de crecimiento es 25°C (Crous, 1998). Adicionalmente, la velocidad de crecimiento de *M. lateralis* en MEA es mayor a la de *T. nubilosa* (Crous, 1998).

*T. ohnowa* fue encontrada en una única muestra (aislada a partir de una lesión). No hay estudios acerca de la patogenicidad de esta especie y durante el presente trabajo no se observó el desarrollo de estructuras reproductivas en los cultivos (de hasta 30 días), que pudieran permitir ensayos de inoculación. Por otro lado las altas velocidades de crecimiento observadas en los diferentes medios en comparación con otras *Mycosphaerella* spp. y *Teratosphaeria* spp (Crous, 1998) indicarían que esta especie es saprófita. Sin embargo, estos datos no son para nada concluyentes y la determinación de las estrategias nutricionales de los aislamientos obtenidos va más allá de los objetivos del presente trabajo.

*T. parva* fue encontrada en una única muestra, en la cual también estaba presente *T. nubilosa*, al igual que lo observado por Park & Keane (1982b, 1987).

Pérez, C. *et al.* (2009), realizó un muestreo más extenso y encontró *M. lateralis* asociada a *E. dunii* en el departamento de Río Negro, mientras que Lupo *et al.* (2007) encontraron dicha especie asociada a *E. globulus* en los departamentos de Río Negro y Paysandú. En este trabajo dicha especie fue encontrada en los departamentos de

Lavalleja y Tacuarembó, lo que muestra que la distribución geográfica de esta especie es más amplia de lo hallado previamente.

Por otro lado, *T. ohnowa* fue aislada a partir de *E. viminalis* en el departamento de Lavalleja (Pérez, C. *et al.* 2009b), el mismo departamento en el cual se la aisló en el presente estudio, lo que indicaría en principio, que esta especie tiene una distribución bastante restringida en nuestro país.

A pesar del intenso muestreo, Pérez C. *et al.* (2009b), no aislaron *T. nubilosa* o *T. parva*.

Lupo *et al.*, 2007 encontraron *T. parva* asociada a *E. globulus*, en los departamentos de Río Negro, curiosamente a partir de muestras donde no se aisló *T. nubilosa*. Esto pudo deberse a que las hojas analizadas estaban en un estado de senescencia muy avanzado y por tanto la esporulación de *T. parva* era muy abundante (Park & Keane, 1987), o a que la temperatura de incubación de los aislamientos no fue la óptima para la germinación de las ascosporas de *T. nubilosa*.

La presencia de *T. nubilosa* ya ha sido citada en nuestro país (Lupo *et al.*, 2008; Pérez G. *et al.*, 2009a) sin embargo ésta es la primera vez que se la encuentra en todas las zonas importantes de producción de *E. globulus*.

En la región, *T. nubilosa* también ha sido encontrada en el sur de Brasil. Este patógeno probablemente ha sido introducido desde nuestro país (Pérez G. *et al.*, 2009b) donde *E. globulus* (muy susceptible a *T. nubilosa*; Park & Keane, 1982b; Park *et al.*, 2000) es la especie forestal de mayor importancia. Dicha dispersión de haberse originado desde nuestro país pudo ocurrir a través de infecciones por ascosporas (dispersadas por el viento) o debido al intercambio de semillas y plántulas entre los dos países (Pérez, G. *et al.*, 2009b).

Lo encontrado en el presente estudio junto a lo hallado por otros autores (Balmelli *et al.*, 2004; Lupo *et al.*, 2008; Pérez C. *et al.*, 2009a, 2009b; Pérez G. *et al.*, 2009a, 2009b) sugieren la expansión de las poblaciones de *Mycosphaerella* spp. y *Teratosphaeria* spp. en nuestra región, lo que constituye una creciente amenaza para las plantaciones de *Eucalyptus* spp. fundamentalmente para las especies y/o variedades más susceptibles como *E. globulus*.

### **Medidas de crecimiento en diferentes medios**

En cuanto a los medios ensayados para velocidad de crecimiento, en general, los que fueron adicionados con la solución de vitaminas mostraron mayor velocidad de crecimiento.

Esto no es sorprendente ya que las deficiencias en la síntesis de vitaminas, particularmente las del complejo B, son bien conocidas en hongos (Griffin, 1994). Esto sería esperable, al menos para *T. nubilosa*, que es un hemibiótrofo y por tanto muy probablemente sea nutricionalmente dependiente de su hospedero, ya sea porque es incapaz de sintetizar algún metabolito o porque su síntesis es deficiente y por tanto no se alcanzan los niveles necesarios para llevar a cabo algún determinado proceso fisiológico.

Por otra parte, la solución utilizada fue elaborada para ser similar a la empleada por Serrano (1993) que es una solución diseñada para el cultivo de levaduras, por lo que al evaluar el efecto de los distintos componentes de la solución por separado (y en diferentes concentraciones) se podrían lograr mejores resultados.

Ninguno de los aislamientos ensayados mostró un buen crecimiento YPD indicando que estas especies no tendrían requerimientos altos de aminoácidos.

La única excepción en cuanto al resultado de la adición de la solución de vitaminas fue *T. ohnowa*, que no mostró diferencias significativas entre los medios adicionados con dicha solución y sus correspondientes medios sin la adición de ésta. Ésta fue la especie que presentó mayor velocidad de crecimiento en todos los medios ensayados, indicando que esta sería saprófita.

Los dos aislamientos de *M. lateralis* ensayados presentaron la máxima velocidad de crecimiento en "MEA+vit" y la mínima en "ADT" aunque su comportamiento en otros medios no fue igual, lo que indica que existe buena diversidad genética en cuanto a la capacidad de aprovechar diferentes recursos además de la diversidad morfológica.

Para todas las especies ensayadas se logró encontrar medios en los cuales estas presentarían velocidades de crecimiento sensiblemente mayores a la observada en MEA. Para *T. nubilosa*, se halló que esta crece en el medio "ADT+vit"

aproximadamente 1,4 veces más rápido de lo que lo hace en MEA. *M. lateralis* crece en

“MEA+vit” casi 2 veces más rápido de lo que lo hace en MEA y *T. ohnowa* crece en “ADT” 1,3 veces más rápido que en MEA.

Estos medios pueden ser empleados en estudios más exhaustivos de la fisiología de estas especies así como en estudios poblacionales, donde disminuir el tiempo empleado en el cultivo de grandes cantidades de aislamientos es muy importante desde un punto de vista práctico.

## Conclusiones

El empleo de métodos moleculares mostró ser eficiente para para el diagnóstico de *Mycosphaerella* spp. y *Teratosphaeria* spp. directamente a partir de lesiones. Éstos tienen la ventaja de ser más rápidos que la secuenciación de ADN a partir de micelio ya que no es necesario aislar y cultivar estos hongos.

*T. nubilosa*, uno de los patógenos que causan mayor daño en *Eucalyptus* spp. a nivel mundial fue encontrado, en hojas juveniles y adultas, en varias zonas de producción de este cultivo en Uruguay, y por tanto representa una amenaza importante para su avance en nuestro país.

Otras especies cuyo rol en el desarrollo de la MLD es poco conocido también fueron encontradas en varias regiones del Uruguay.

Se obtuvieron medios de cultivos que permiten un crecimiento de *Mycosphaerella* spp. y *Teratosphaeria* spp. más rápido a lo observado en MEA, los que serían útiles para efectuar, de forma más ágil, estudios sobre la genética de las poblaciones de estas especies, lo que es fundamental a la hora de decidir qué estrategia usar para su control.

# Bibliografía

- Alfenas A. C., Valverde Zauza E. A., Goncalves Mafia R., de Asis T. F. 2004. Clonagem e doenças do Eucalipto. Editora UFV. Vicoso, MG. Brasil.
- Balmelli G., Marroni V., Altier N., Garcia R. (2004). Potencial del mejoramiento genético para el manejo de enfermedades en *Eucalyptus globulus*. Serie Técnica INIA Tacuarembó, Uruguay, 143, 1–43.
- Arx J.A.V. 1983. *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Mycology*, 86: 15–58.
- Arx J.A.V. & Müller E. (1975). A re-evaluation of the bitunicate Ascomycetes with keys to families and genera. *Studies in Mycology*, 71: 935–954.
- Barr, M.E. 1972. Preliminary studies on the Dothideales in temperate North America. *Contributions from the University of Michigan Herbarium*, 9: 523–638.
- Barr M.E. (1979). A classification of the loculoascomycetes. *Mycologia*, 71: 935–957.
- Barr M.E. (2001). Ascomycota. In: *The Mycota VII Part A*. McLaughlin/Lemke, M. Berlin, Springer-Verlag. Editors. VII Part A: 161–174.
- Brown B. N. and Ferreira F. A. 2000. Disease during Propagation of *Eucalyptus*. In: *Diseases and Pathogens of Eucalyptus*. Keane P. J., Kile G. A. Podger F. D., and Brown B. N. (Editors). 119–151. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, 3066, Australia.
- Brussa C. A. 1994. *Eucalyptus*. Editorial Emisferio Sur S. R. L. Montevideo, Uruguay.
- Carnegie, A.J., Ades, P.K. and Ford, R. 2001. The use of RAPD-PCR analysis for the differentiation of *Mycosphaerella* species from *Eucalyptus* in Australia. *Mycological Research*, 105: 1313–1320.
- Crous P.W. 1998. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf diseases of *Eucalyptus*. *Mycologia Memoir* N° 21.
- Crous P.W., Hong L., Wingfield B. D., Wingfield M. J. 2001. ITS rDNA phylogeny of selected *Mycosphaerella* species and their anamorphs occurring on Myrtaceae. *Mycological Research*, 105: 425–431.
- Crous P. W., Groenwald J. Z., Mansilla J. P., Hunter G. C., Wingfield M. J.. 2004. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. *Studies in Mycology*, 50:195–214.
- Crous P. W., Braun U., Groenwald J. Z. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology*, 58: 1–32.
- De Hog G. S., Higwegen T., Batenburg-van der Vegte W. H. 1991. *A new species of Disconium*. *Mycological Research*. 95: 679–682.

- Dirección General Forestal. 2005. Boletín Estadístico
- Dirección General Forestal. 2007. <http://www.mgap.gub.uy/Forestal/DGF.htm>
- ENCE en Uruguay. 2004. *Memoria Anual*.
- FAO. 2008. Statistical Yearbook. <http://www.fao.org/economic/ess/publications-studies/statistical-yearbook/fao-statistical-yearbook-2007-2008/b-agricultural-production/en/>
- Ganapathi A. & Corbin J. B. 1979a. *Colletogloeum nubilosum* sp. nov., The imperfect state of *Mycosphaerella nubilosa* on *Eucalyptus* in New Zealand. Transactions of the British Mycological Society, 72: 237-244.
- Glen M., A. H. Smith, Langrell S. R. H, Mohammed C. L. 2007. Development of Nested Polymerase Chain Reaction Detection of *Mycosphaerella spp.* and Its Application to the Study of Leaf Disease in Eucalyptus Plantations. Phytopathology, 97:132-144.
- Griffin D. H. 1994. Fungal physiology. 2ed. Wiley-Liss. New York, USA.
- Holden M. J., Blasic Jr J. R., Bussjaeger L. 2003. Evaluation of Extraction Methodologies for Corn Kernel (*Zea mays*) DNA for Detection of trace Amounts of Biotecnology-Derived DNA. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 2468-2474.
- Hunter G. C., Wingfield, B. D. Crous P. W., Wingfield M. J. 2006. A multi-gene phylogeny of species of *Mycosphaerella* occurring on *Eucalyptus*. Studies in Mycology, 55: 147-161.
- Hunter G. C., Crous P. W., Carnegie A. J., Wingfield M. J. 2009. *Teratosphaeria nubilosa*, a serious disease pathogen of *Eucalyptus spp.* in native and introduced areas. Molecular Plant Pathology, 10:1-14 .
- Jackson S. L., Maxwell A., Neumeister-Kemp H. G., Hardy G. E. 2004. Infection, hyperparasitism and conidiogenesis of *Mycosphaerella lateralis* on *Eucalyptus globules* in Western Australia. Australasian Plant Patology, 33: 49-53.
- Jasalavich C. A., Ostrofsky A., Jellison J. 2000. Detection and identification of decay fungus in spruce Wood by Restriction fragment length Polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 66: 4725-4734.
- Kularante, H. A. G. C. Lawrie A. C., Barber P. A., Keane P. J.. 2004. A specific primer PCR and RFLP assay for the rapid detection and differentiation in planta of some *Mycosphaerella* species associated with foliar diseases of *Eucalyptus globulus*. Mycological Research, 108: 1476-1496.
- Maxwell A. 2004. The Taxonomy, Phylogeny and Impact of *Mycosphaerella* species on *Eucalypts* in South-Western Australia. Tesis doctoral.
- Maxwell A., Sarah Jackson S. L., Dell B., St j. Hardy G. E.. 2005. PCR-identification of *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of *Eucalyptus*. Mycological Research, 109: 992-1004.

- Niks R. E. & W. Lindhout W. H.. 2004. Mejoramiento para resistencia durable a patógenos especializados. 3ª ed. Quito, Ecuador.
- Lee S. & Taylor J. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: PCR protocols: a guide to methods and aplicaciones. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. and White t. J. Academic Press, San Diego, California. 282-287.
- Lundquist J. E. & Purnel R. C. 1987. Effects of *Mycosphaerella* Leaf Spot on Growth of *Eucalyptus nitens*. Plant Disease, 71: 1025-1029.
- Lupo S., Alonso R., Bettucci L. 2007. Evaluación de la presencia de *Mycosphaerella* en plantaciones de *Eucalyptus globulus* del litoral oeste. Informe Técnico.
- S. Lupo; F. Navarrete, R. Alonso, D. Carrau, L. Bettucci. 2008. Especies de *Mycosphaerella* presentes en plantaciones de *Eucalyptus* en Uruguay. VI Congreso Latinoamericano de Micología, Mar del Plata, Argentina.
- Luttrell, E.S. (1955). The ascostromatic ascomycetes. *Mycologia*, 47: 511–532.
- Park R. F. 1988a. Effect of certain host, inoculum, and environmental factors on infection of *Eucalyptus species* by two *Mycosphaerella species*. Transactions of the British Mycological Society, 90: 221-228.
- Park R. F. 1988b. Epidemiology of *Mycosphaerella nubilosa* and *M. Cryptica* on *Eucalyptus spp.* in South-eastern Australia. Transactions of the British Mycological Society, 91: 261-266.
- Park R. F. & Keane P. J.. 1982a. Three *Mycosphaerella* species from leaf diseases of *Eucalyptus*. Transactions of the British Mycological Society, 79: 95-100.
- Park R. F. & Keane P. J. 1982b. Leaf diseases of *Eucalyptus* associated with *Mycosphaerella species*. Transactions of the British Mycological Society, 79: 101-115.
- Park R. F. & Keane P. J. 1987. Spore production by *Mycosphaerella* species causing leaf diseases of *Eucalyptus*. Transactions of the British Mycological Society, 89: 461-470.
- Park R. F., Keane P. J., Wingfield M. J. and Crous P. W. 2000. Fungal Diseases of *Eucalypt* Foliage. In: Diseases and Pathogens of *Eucalyptus*. Keane P. J., Kile G. A. Podger F. D., and Brown B. N. (Editors). 153-239. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, 3066, Australia.
- Pinkard E. A. & Mohammed C. L. 2006. Photosynthesis of *Eucalyptus globules* with *Mycosphaerella leaf disease*. New Phytologist, 170:119-127.
- Pinkard E. A., Battaglia, M. Bruce J., Leriche A., Kriticos D. J. 2010. Process-based modeling of the severity and impact of foliar pest attack on eucalypt plantation productivity under current and future climates. Forest Ecology and Management, 259: 839-847.
- Pérez G., Hunter G. C., Slippers B., Pérez C., Wingfield B. D, Wingfield M. J. 2009a. *Teratosphaeria nubilosa*, the causal agent of *Mycosphaerella leaf disease (MLD)*, recently introduced into Uruguay. European Journal of Plant Pathology, 125: 109-118.

Pérez G., Slipers B., Wingfield B. D., Finkenauer E., Wingfield M. J. 2009b. *Mycosphaerella* leaf disease (MLD) outbreak on *Eucalyptus globulus* in Brazil caused by *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa*. *Phytopathologia Mediterranea*, 48:302-306.

Pérez, C.A., Wingfield, M.J., Altier N.; Blanchette, R. Pathogens shared by introduced *Eucalyptus* and native *Myrtaceae* species in Uruguay. The case of *Mycosphaerella* Leaf Diseases. Congreso Forestal Mundial, 2009 Buenos Aires, Argentina.

Pérez C. A., Wingfield M.J., Altier N.A., Blanchette R. A.. 2009b. *Mycosphaerellaceae* and *Teratosphaeriaceae* associated with *Eucalyptus* leaf diseases and stem cankers in Uruguay. *Forest Pathology*, 39: 349-360.

Potts B. M. and Pederick L. A. 2000. Morphology, Origin, Distribution and Genetic diversity of the Eucalyptus. In: Diseases and Pathogens of Eucalyptus. Keane P. J., Kile G. A. Podger F. D., and Brown B. N. (Editors). 11-34. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, 3066, Australia.

Serrano R. 1993. Métodos de bioquímica y Biología molecular. European Molecular Biology Laboratory. Hiedelberg, Alemania. pp140.

Smith A. 2006. The Development of Strategies for the Management and Research of foliar Pathogens on *Eucalyptus* plantations: *Mycosphaerella* as a Case Study. Tesis Doctoral.

Sociedad de productores Forestales [www. spf.org.uy](http://www.spf.org.uy)

Turnbull J. W. 2000. Economic and Social Importance of Eucalyptus. 1-9 In: Diseases and Pathogens of Eucalyptus. Keane P. J., Kile G. A. Podger F. D., and Brown B. N. (Editors). 1-9. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, 3066, Australia.

White T. J., Burns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (Editors) 315-322. Academic Press, Inc.: New York)

Wilson G. I. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3741-3751.

## Apéndice 1: Medios utilizados en las mediciones de velocidad de crecimiento

**Tabla A1:** Medios utilizados en las mediciones de velocidad de crecimiento, composición y forma de preparación.

Medio	Composición	Preparación
MEA	Extracto de malta 20g	
	Agar 20g	
	Agua 1L	
YPD	Glucosa 20g	
	Peptona 5g	
	Extracto de levadura 10g	
	Agar 20g	
	Agua 1L	
ADT	Glucosa 20g	
	Pulpa de tomate comercial 180 ml	
	Agar 20g	
	Agua 1L	
EGS	Hojas juveniles asintomáticas de <i>E. globulus</i> 25g	
	extracto de malta 5g	
	Agar 20g	
	Agua 1L	
EGE	Hojas juveniles de <i>E. globulus</i> con síntomas de MLD 25g	Hervir las hojas en 250 ml de agua por 30 minutos aproximadamente. Descartar las hojas. Completar hasta 1L con agua. Agregar el extracto de malta y el agar.
	Extracto de malta 5g	
	Agar 20g	
	Agua 1L	
EGA	Hojas adultas asintomáticas de <i>E. globulus</i> 25g	Hervir las hojas en 250 ml de agua por 30 minutos aproximadamente. Descartar las hojas. Completar hasta 1L con agua. Agregar el extracto de malta y el agar.
	Extracto de malta 5g	
	Agar 20g	
	Agua 1L	
EGSL	Hojas adultas asintomáticas molidas de <i>E. globulus</i> 25g	
	Extracto de malta 5g	
	Agar 20g	
	Agua 1L	
vit	solución de vitaminas (ver tabla A2)	

## Apéndice 2: Solución de vitaminas

Para la elaboración de la solución de vitaminas y sales se prosiguió de la siguiente manera: cada comprimido de SUPRADYN (sin su cubierta) fue molido hasta obtener un polvo fino y disuelto en 40 ml de agua destilada. Se incubó dicha solución a 4°C toda la noche y el sobrenadante fue esterilizado por filtración a través de un filtro de 0,22 µm y agregado al medio de cultivo a razón de 1,066 ml por cada litro de medio de cultivo. La solución fue ajustada según Serrano, 1993(modificado) para que su contribución final al medio de cultivo fuera 400 µg/l de tiamina y 5 µg/l de biotina. Se supuso una pérdida de 25% en masa durante la elaboración de la solución. Las concentraciones finales de otras vitaminas y minerales aportados por esta solución se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla A2:** Composición de la solución final de vitaminas con que se suplementaron los medios de cultivo. Composición de los comprimidos utilizados en su preparación y de la solución de referencia (Serrano, 1993). (\*: mg/l).

Componente (µg/l)	Serrano, 1993	µg/comprimido	Conc. final en el medio de cultivo
B1 (Tiamina)	400	20000	400
B2 (Riboflavina)	200	5000	100
B3 (Niacina)	400	50000	1000
B5 (Ac. Pantotenico)	400	11600	232
B6 (Pirodoxina)	400	10000	200
B7 (Biotina)	2	250	5
Ac. fólico	2	1000	20
Ca *	36	51,3	1,026
Fe	66,6	10000	200