

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE LA AGRESIVIDAD *CALONECTRIA* EN
PLANTINES DE *EUCALYPTUS grandis* Y *EUCALYPTUS dunnii***

por

**Mariano BLANCO VIEIRA
Pía Valentina ROMERO CARDOZO**

**TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2017**

Tesis aprobada por:

Director: -----
Ing. Agr. (PhD.) Carlos A. Pérez

Ing. Agr. (Dr.) Gustavo D. Balmelli

Lic. Biol. (Msc.) Sofía Simeto

Fecha: 22 de noviembre de 2017

Autores: -----
Mariano Blanco Vieira

Pía Valentina Romero Cardozo

AGRADECIMIENTOS

A nuestros amigos y familia por su apoyo incondicional.

A nuestro tutor Carlos A. Pérez por su apoyo y sugerencias durante el desarrollo del trabajo práctico y de escritura.

A las personas que trabajan en el Laboratorio de Fitopatología por su ayuda.

A los funcionarios de la Estación Experimental Mario A. Cassinoni por su disponibilidad para conseguirnos alojamiento y ser atentos frente a nuestras solicitudes.

Al Ing. Agr. Oscar Bentancur por ayudarnos con el análisis estadístico.

A los compañeros de Facultad de Agronomía y de la generación forestal 2015.

Al tribunal por sus correcciones y sugerencias sobre nuestro trabajo.

A los compañeros de trabajo

A los funcionarios de Biblioteca por su enorme predisposición en la búsqueda de material

A UPM-Forestal Oriental por proporcionarnos los plantines de vivero

TABLA DE CONTENIDO

| | Página |
|--|--------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN..... | II |
| AGRADECIMIENTOS..... | III |
| LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES..... | VI |
| | |
| 1. <u>INTRODUCCIÓN</u> | 1 |
| 1.1. OBJETIVOS..... | 1 |
| 1.1.1 <u>Objetivo general</u> | 1 |
| 1.1.2 <u>Objetivos específicos</u> | 2 |
| 2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> | 3 |
| 2.1. IMPORTANCIA DEL SECTOR FORESTAL EN URUGUAY..... | 3 |
| 2.2. GÉNERO <i>Eucalyptus</i> | 4 |
| 2.2.1. <u>Caracterización de <i>Eucalyptus grandis</i> y <i>Eucalyptus dunnii</i></u> | 4 |
| 2.2.1.1. Descripción de <i>Eucalyptus grandis</i> | 4 |
| 2.2.1.2. Descripción de <i>Eucalyptus dunnii</i> | 4 |
| 2.3. GÉNEROS <i>Calonectria</i> , <i>Cylindrocladium</i> , <i>Nectricladiella</i> y <i>Cylindrocladiella</i> | 5 |
| 2.3.1. <u>Taxonomía y anatomía del género <i>Calonectria</i> y <i>Cylindrocladium</i></u> | 5 |
| 2.3.2. <u>Características generales del proceso de enfermedad causado por <i>Calonectria</i></u> | 6 |
| 2.3.3. <u>Taxonomía y anatomía del género <i>Nectricladiella</i> y <i>Cylindrocladiella</i></u> | 7 |
| 2.3.4. <u>Descripción general de síntomas causados por los géneros <i>Calonectria</i> y <i>Cylindrocladiella</i></u> | 8 |
| 2.3.4.1. Damping-off..... | 8 |
| 2.3.4.2. Podredumbre radicular..... | 8 |
| 2.3.4.3. Anillamiento de tallo..... | 9 |
| 2.3.4.4. Manchas foliares..... | 9 |
| 2.3.5. <u>Descripción general de los signos de <i>Calonectria</i> y <i>Cylindrocladium</i></u> | 9 |
| 2.3.6. <u>Mecanismos de ingreso del hongo en los hospederos</u> | 10 |
| 2.3.7. <u>Principales hospederos</u> | 10 |
| 2.3.8. <u>Principales vías de dispersión y estructuras de resistencia</u> | 11 |
| 2.4. ESTRATEGIAS DE CONTROL..... | 11 |
| 2.4.1. <u>Resistencia genética</u> | 12 |
| 2.4.2. <u>Medidas alternativas de control</u> | 13 |
| 2.5. MÉTODOS DE INOCULACIÓN PARA EVALUAR RESISTENCIA GENÉTICA..... | 13 |

| | |
|--|----|
| 3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> | 16 |
| 3.1. UBICACIÓN DE LOS ENSAYOS..... | 16 |
| 3.2. AJUSTE DEL MÉTODO DE INOCULACIÓN..... | 16 |
| 3.2.1. <u>Preparación del caldo de inóculo</u> | 17 |
| 3.2.2. <u>Inoculación</u> | 18 |
| 3.2.3. <u>Evaluación de resultados</u> | 19 |
| 3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA AGRESIVIDAD DE LA COLECCIÓN DE CEPAS DE <i>Calonectria</i> Y <i>Cylindrocladiella</i> DE FACULTAD DE AGRONOMÍA. EEMAC. LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA..... | 21 |
| 3.3.1. <u>Preparación del inóculo</u> | 22 |
| 3.3.2 <u>Procedimiento de inoculación</u> | 23 |
| 3.3.3. <u>Evaluación de resultados</u> | 25 |
| 3.4. CARACTERIZACIÓN DE RESISTENCIA GENÉTICA DE CLONES DE <i>E. dunnii</i> Y <i>E. grandis</i> | 27 |
| 3.4.1 <u>Inoculación</u> | 27 |
| 3.4.2 <u>Evaluación y análisis de resultados</u> | 28 |
| 4. <u>RESULTADOS</u> | 29 |
| 4.1. EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE INOCULACIÓN..... | 29 |
| 4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA AGRESIVIDAD DE CEPAS DE LA COLECCIÓN DE FACULTAD DE AGRONOMÍA. EEMAC. LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA..... | 32 |
| 4.3. CARACTERIZACIÓN DE RESISTENCIA GENÉTICA DE CLONES DE <i>Eucalyptus dunnii</i> Y <i>Eucalyptus grandis</i> | 33 |
| 5. <u>DISCUSIÓN</u> | 38 |
| 6. <u>CONCLUSIONES</u> | 42 |
| 7. <u>RESUMEN</u> | 43 |
| 8. <u>SUMMARY</u> | 44 |
| 9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 45 |
| 10. <u>ANEXOS</u> | 55 |

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

| Cuadro No. | Página |
|---|--------|
| 1. Resumen de los tratamientos evaluados combinando método de inoculación con la cepa del patógeno..... | 16 |
| 2. Cepas de la caracterización de la agresividad de la colección de cepas de <i>Calonectria</i> y <i>Cylindrocladiella</i> | 21 |
| 3. Porcentaje de plantas muertas de un clon de conocida susceptibilidad según cepa inoculada, evaluadas a los 30 días... | 31 |
| Figura No. | |
| 1. Procedimiento de preparación de inóculo..... | 18 |
| 2. Procedimiento del método de inoculación al sustrato..... | 19 |
| 3. Procedimiento del método de inoculación por inyección de suspensión de esporas..... | 19 |
| 4. Disposición de plantines en tarrinas bajo condiciones de invernáculo..... | 20 |
| 5. Preparación de inóculo utilizando arroz como sustrato..... | 23 |
| 6. Método de inoculación al sustrato con arroz, colocación del arroz posterior al llenado con 5 cm de la mezcla sustrato – tierra en macetas..... | 24 |
| 7. Procedimiento del método de inoculación con grano de arroz.... | 24 |
| 8. Plantas dispuestas en bandejas con 5 cm de agua dentro de una cámara de incubación..... | 25 |
| 9. Identificación de plantas muertas en la evaluación del ensayo.. | 26 |
| 10. Cortes longitudinales de raíz de plantas muertas para observar decoloración de tejidos internos..... | 26 |
| 11. Cámaras húmedas en incubadora a 25°C..... | 26 |
| 12. Fragmentos de tallos con signo de esporulación blanquecina posterior a su incubación en estufa..... | 27 |
| 13. Porcentaje de plantas muertas según método de inoculación (al sustrato o inyección) evaluadas a los 38, 69 y 87 días post Inoculación, el método de inoculación difirió significativamente en cada una de las determinaciones realizadas..... | 30 |
| 14. Porcentaje de plantas muertas según cepa, evaluadas a los 38, 69 y 87 días post inoculación, valores promedio de las cepas para los dos métodos de inoculación (sustrato e inyección)..... | 30 |
| 15. Porcentaje de plantas muertas según método de inoculación para la cepa PG17 evaluadas a los 38, 69 y 87 días post | |

| | |
|--|----|
| inoculación, no existieron diferencias significativas en ninguna de las fechas evaluadas..... | 31 |
| 16. Porcentaje de plantas muertas según método de inoculación para la cepa PG100 evaluadas a los 38, 69 y 87 días post inoculación..... | 32 |
| 17. Porcentaje de plantas muertas según cepa, promedio de los resultados obtenidos en todos los clones inoculados, evaluadas a los 30 días..... | 34 |
| 18. Porcentaje de plantas muertas según la cepa evaluada, en cada especie (<i>E. grandis</i> y <i>E. dunnii</i>). Valores promedio de los tres clones de cada especie..... | 33 |
| 19. Porcentaje de plantas muertas según clon de <i>E. grandis</i> (1, 2 y 3) y <i>E. dunnii</i> (4, 5 y 6), valores promedio de la inoculación con las tres cepas..... | 34 |
| 20. Porcentaje de plantas muertas según clon de <i>E. grandis</i> (1, 2 y 3) y <i>E. dunnii</i> (4, 5 y 6) para la cepa PG119..... | 35 |
| 21. Porcentaje de plantas muertas según clon de <i>E. grandis</i> (1, 2 y 3) y <i>E. dunnii</i> (4, 5 y 6) para la cepa PG100, no hubo efecto significativo del clon..... | 36 |
| 22. Porcentaje de plantas muertas según clon de <i>E. grandis</i> (1, 2 y 3) y <i>E. dunnii</i> (4, 5 y 6) para la cepa PG66, no hubo efecto significativo del clon..... | 36 |
| 23. Observación de esporas asexuales (conidios) de <i>Cylindrocladium</i> al microscopio óptico a un aumento de 100X y 200X..... | 37 |

1. INTRODUCCIÓN

Hacia fines de la década del '70 y principios del '80 ya habían sido reportados unos 600 taxones específicos y subespecíficos del género *Eucalyptus* en Australia e islas vecinas (Papúa, Nueva Guinea, Sulawesi, Mindano, Timor, Flores, Sunda, Alor y Wetar), y se había identificado al territorio australiano como centro de origen del género (Pryor, 1976, 1981). Sin embargo, las características asociadas a los diversos orígenes y procedencias de los eucaliptos, han contribuido al desarrollo del género en las más variadas condiciones ambientales, ecológicas, edáficas y climáticas, favoreciendo así su expansión y adaptabilidad hacia otras regiones (Brussa, 1994).

La producción de plantines de eucalipto se desarrolla generalmente en condiciones de espaciamento y ventilación reducida, alta temperatura y humedad relativa, con progresivo aumento en el suministro de fertilizantes y riego a intervalos regulares cortos, que favorecen el desarrollo de patógenos y enfermedades. Actualmente, se cita un importante número de enfermedades fúngicas afectando al género *Eucalyptus*, especialmente en la fase de vivero, dentro de las cuales se reportan especies del género *Calonectria* (estado sexual o teleomorfo de *Cylindrocladium*) y/o del género *Nectricladiella* (estado sexual o teleomorfo de *Cylindrocladiella*, Crous, 2002). Por tal razón, es que aquí se busca generar herramientas que puedan ser útiles al mejoramiento genético del género *Eucalyptus* por resistencia a los géneros *Calonectria* y *Nectricladiella*, evaluándose para cumplir con dicho objetivo, distintos métodos de inoculación, la caracterización de la agresividad de diferentes cepas de *Calonectria* y *Nectricladiella* generadas en Facultad de Agronomía, específicamente en la Estación Experimental Mario A. Cassinoni, Laboratorio de Fitopatología y la evaluación de diferentes clones que validen la metodología propuesta y determinen si existe variabilidad entre especies y/o clones de *Eucalyptus* respecto a estos géneros de hongos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Generar alternativas de apoyo al mejoramiento genético en la producción de *Eucalyptus* por resistencia al género *Calonectria* y *Nectricladiella*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un método de inoculación artificial que permita caracterizar la resistencia de germoplasma de eucaliptos frente a *Calonectria* y *Nectricladiella*.
- Caracterizar la agresividad de distintas especies de *Calonectria* y *Nectricladiella* en plantines de eucalipto.
- Caracterizar la resistencia genética de distintos genotipos de eucalipto (*E. dunnii* y *E. grandis*) frente a distintas cepas de *Calonectria* y *Nectricladiella*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTANCIA DEL SECTOR FORESTAL EN URUGUAY

Las especies pertenecientes al género *Eucalyptus* se han cultivado en otras regiones distintas a su centro de origen, promoviendo un incremento del cultivo en los últimos 50 años en América Latina y en regiones del mundo con condiciones climáticas y tipos de suelo similares a dicho centro (Brussa, 1994). Uruguay, por encontrarse en una zona climática similar a la del sur de Australia y en la misma latitud que los principales emprendimientos forestales del Hemisferio Sur, se ubica en una posición estratégica frente a países competidores dentro del sector forestal (Uruguay XXI, 2016).

El sector forestal uruguayo se muestra consolidado, con un crecimiento sostenido desde la aprobación de la segunda Ley Forestal en el año 1987, evidenciando su importancia en la economía del país a través del PBI del sector, el cual representó 2.51% del PBI nacional para el año 2015 (MGAP. OPYPA, 2016).

Los objetivos que ha perseguido el sector forestal en nuestro país resultan similares a los de otros países del mundo, centrándose en la producción de madera para abastecer plantas procesadoras de pasta de celulosa e industrias de transformación mecánica (Doughty 2000, Potts y Dungey 2004, Prakash y Gurumunthi 2010, Torre et al. 2014, Uruguay XXI 2016). Uruguay se destaca por la producción de *Eucalyptus grandis*, siendo una de las especies forestales más empleadas por su conformación y velocidad de crecimiento, las que pueden verse sensiblemente disminuidas en suelos con poco desarrollo y/o drenaje imperfecto, la producción de *E. dunnii* que se destaca como especie promisoría por considerarse más resistente al frío que la primera y la producción de *E. globulus* que tiene un crecimiento óptimo en suelos con buen drenaje (Golfari 1985, Brussa 1994).

La cadena forestal nacional para el año 2015 representó casi la cuarta parte de las exportaciones agroindustriales, siendo la celulosa el principal producto exportado, con un valor que alcanzó los 1.266 millones de dólares, posicionando al sector forestal como el segundo rubro exportador dentro del sector agropecuario nacional. El destino de las exportaciones abarcó a más de 60 países, destacándose países europeos y asiáticos con un 49% y 39% del total exportado respectivamente (MGAP. OPYPA, 2016).

La producción nacional de los viveros ascendió a casi 69 millones de plantas para el año 2015, existiendo una clara predominancia de especies del género *Eucalyptus* (99% del total producido) respecto a las especies del género *Pinus*. Dentro del género *Eucalyptus*, prevaleció la producción de *E. dunnii* representando un 58% del total, seguido de *E. grandis* con un 29% del total producido para este género (MGAP. OPYPA, 2016).

Los suelos declarados de prioridad forestal según datos del año 2016, representaron un 24% del total del área agropecuaria del país (4 millones de hectáreas), siendo cerca de un millón las hectáreas afectadas por especies del género *Pinus* y *Eucalyptus*. El 73% del total de área forestada está representada por el género *Eucalyptus*, mayoritariamente *E. grandis*, *E. dunnii* y *E. globulus*, mientras que en segundo orden de importancia se encuentra el género *Pinus* (Uruguay XXI, 2016).

2.2 GÉNERO *Eucalyptus*

2.2.1 Caracterización de *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus dunnii*

2.2.1.1 Descripción de *Eucalyptus grandis*

El área de distribución natural de esta especie se localiza en la costa este del territorio australiano, abarcando el noreste, sureste y centroeste. Se desarrolla en un promedio de temperaturas máximas de 24 a 30 °C y mínimas de 3 a 8 °C en el sureste y temperaturas máximas de 29 a 32 °C y mínimas de 10 a 17 °C en el noreste. Prevalece en sitios húmedos, con un régimen promedio anual de precipitaciones estivales de 1000-3500 mm (Hall et al. 1963, Jacobs 1981, Bolland et al. 1987). Para su desarrollo óptimo, precisa suelos con buena capacidad de retención de agua, profundos, de texturas limosas y bien drenados (Kelly et al. 1983, Bolland, citado por Brussa 1994).

Su cultivo en Uruguay se difundió en la década del 1960, posterior a su introducción en el año 1963 desde huertos semilleros de Sudáfrica, no obstante ello, ya existían algunas plantaciones escasas con esta especie en los departamentos de San José (Tuset, citado por Brussa, 1994) y Rivera (Krall, citado por Brussa, 1994).

2.2.1.2 Descripción de *Eucalyptus dunnii*

El área de distribución natural de esta especie se encuentra en una pequeña área en la región centro-este de Australia. Se trata de una especie que se desarrolla en zonas continentales principalmente, con altitudes que varían entre 300 y 750 m sobre el nivel del mar. Prevalece en zonas con clima

templado y con un promedio de temperaturas máximas de 27 a 30 °C y mínimas de 0 a 3 °C, con escasas heladas y en localizaciones alejadas de la costa, con un máximo de sesenta heladas por año, y con un régimen de precipitaciones estivales que oscila entre los 1000 a 1750 mm anuales (Bolland et al., 1987). Para su desarrollo óptimo, precisa suelos de alta fertilidad, buena capacidad de retención de agua y buena aireación, presentando una sensibilidad marcada frente al mal drenaje (Brussa, 1994).

2.3 GÉNEROS *Calonectria*, *Cylindrocladium*, *Nectriycladiella* y *Cylindrocladiella*

2.3.1 Taxonomía y anatomía del género *Calonectria* y *Cylindrocladium*

El desarrollo de nuevas técnicas de análisis molecular ha permitido aumentar la precisión en el reconocimiento y diagnóstico de las especies del género *Calonectria* (Crous y Kang 2001, Lombard et al. 2010c), registrándose según Bensch (2017) 346 especies de *Calonectria* y 120 especies de *Cylindrocladium*.

Según Alfenas et al. (2015), el género *Calonectria* (estado sexual o teleomorfo de *Cylindrocladium*) fue descrito por primera vez en el año 1867 por De Notaris, con el reconocimiento de *Calonectria daldiniana* como la especie tipo, siendo más tarde reidentificada como *Calonectria pyrochroa* en base a comparaciones morfológicas según Rossman (1979). Los representantes de este género fueron inicialmente reportados por Graves (1915) como saprófitos que no inducían síntomas de enfermedad al ser inoculados en sus huéspedes. Sin embargo, varios estudios han demostrado que son importantes patógenos vegetales que afectan un amplio rango de hospederos (Crous 2002, Lombard et al. 2010c).

Las especies de *Calonectria* se clasifican como *Ascomycetes*, pertenecientes a la familia *Nectriaceae* e integran el orden *Hypocreales* (Lombard et al., 2010c). Se reconocen por sus peritecios de origen sexual de color amarillo-anaranjado a rojo intenso, con paredes del ascocarpo algo brillantes, arcillosas, escamosas y/o verrugosas, que dan lugar a largas ascas clavadas con ascosporas septadas o multiseptadas (Rossman et al. 1999, Crous 2002, Lombard et al. 2010b).

Se ha reportado que las características morfológicas de ascas, ascosporas y del peritecio permiten el reconocimiento de especies del género *Calonectria* (Crous y Kang, 2001). Sin embargo, algunos autores citan la importancia de conocer las características del estado anamorfo (asexual, *Cylindrocladium*), el cual provee el mayor número de las características que

permiten identificar al estado sexual (*Calonectria*), y por ser la más conocida en la naturaleza (Lombard et al., 2010c). Ello determina que las especies de este género sean primariamente distinguidas por los caracteres del anamorfo antes que por las del teleomorfo (Boesewinkel 1982, Peerally 1991, Crous y Wingfield 1994, Schoch et al. 2001, Crous 2002).

El género *Cylindrocladium* fue descrito originalmente por Morgan (1892) en Estados Unidos y revisado por primera vez por los autores Boedijn y Reistma (1950). Crous y Kang (2001) observaron que la morfología del conidióforo, forma y tamaño de las fiálides así como el ancho y forma de sus vesículas terminales eran caracteres de valor taxonómico, que aportaban información para su identificación. La característica más relevante del género es la presencia de conidióforos ramificados con extensiones del filamento estéril terminando en vesículas apicales con formas características y produciendo conidios septados o multiseptados y cilíndricos (Boesewinkel 1982, Peerally 1991, Crous y Wingfield 1994, Crous 2002).

La forma de la vesícula resulta un criterio confiable cuando se examina a estos hongos en condiciones de crecimiento similares y bajo una metodología estandarizada (Boesewinkel 1982, Peerally 1991, Crous y Wingfield 1994, Crous 2002), pero aun así la confusión taxonómica es común, pues la variabilidad intraespecífica determina formas de vesículas y dimensiones del conidio diversas (Crous y Peerally 1996, Crous et al. 1998). El descubrimiento de Crous et al. (1992) de que la forma de la vesícula es influenciada por el potencial osmótico del medio de crecimiento, explicó por qué algunos taxónomos en el pasado rechazaban la morfología de la vesícula para la identificación de especies del género *Cylindrocladium*, mientras que otros lo entendían como un criterio confiable (Hunter y Barnett 1978, Rossman 1983).

2.3.2 Características generales del proceso de enfermedad causado por *Calonectria*

Según Alfenas et al. (2004) el proceso de enfermedad que inducen estos hongos depende de la especie de *Calonectria*, el hospedero y de las condiciones ambientales al momento de la interacción.

La predisposición al ataque por *Calonectria* es alta cuando se generan situaciones de estrés en las plantas, destacándose como las más importantes la disminución del pH del suelo, la presencia de luminosidad baja, temperaturas sub-óptimas y la exposición prolongada a déficit nutricional (Arentz 1991, Chase 1992, Alfenas et al. 2004).

Calonectria ha estado asociado a enfermedades en plantines de viveros, pero también a plantaciones comerciales de *Eucalyptus* de hasta un año en condiciones de campo, alcanzando niveles epidémicos y terminando en valiosas pérdidas (Jayashree et al. 1986, Lombard et al. 2010c). Cuando las defoliaciones ocurren en etapas tempranas del desarrollo de la planta pueden conducir a importantes reducciones en el incremento del volumen del árbol, por la interferencia que la enfermedad tiene sobre los procesos fisiológicos internos de la planta, especialmente fotosíntesis, metabolismo de nutrientes, hormonas y absorción de agua (Kozłowski 1969, Pulrolnik et al. 2005, Alfenas et al. 2009). Estos hongos pueden afectar al árbol incluso durante el cierre de copa, generando infección por encima de la corteza madura en plantaciones jóvenes (Ferreira y Muchovej, 1991). En Uruguay, en el año 2013 se realizó una primera aproximación al estudio de estos géneros de hongos, en donde se colectaron muestras de cuatro viveros de la zona de Paysandú y Guichón de sustratos como suelo, compost, plantines con síntomas, y lavado de bandejas, generándose una colección de 120 cepas de *Cylindrocladium*, en donde todas las cepas evaluadas resultaron ser patógenas del género *Eucalyptus* (Gasparri, 2013). Posteriormente Castro (2015) realizó otro estudio con el objetivo de identificar a las especies de *Calonectria* asociadas a la muerte de plantines de *Eucalyptus* spp. a campo mediante el estudio de caracteres morfológicos y análisis filogenéticos basados en caracteres moleculares.

2.3.3 Taxonomía y anatomía del género *Nectricladiella* y *Cylindrocladiella*

El género *Nectricladiella* es el estado teleomorfo correspondiente del género *Cylindrocladiella* (Boesewinkel 1982, Crous y Wingfield 1993, Schoch et al. 2000). Presenta peritecios con paredes lisas que se fraccionan lateralmente en presencia de humedad y setas de color marrón que salen de la pared superficial de dichos peritecios (Schoch et al., 2000).

El género *Cylindrocladiella* fue establecido originalmente por Boesewinkel, citado por Lombard et al. (2010c) y confirmado por Crous (1994) como un género diferente a *Cylindrocladium*, que incluye a aquellas especies de hongos patógenos o saprófitos de suelo con esporas pequeñas, conidios cilíndricos, filamentos carentes de septos o con un solo septo cercano al punto de emergencia de las ramas del conidióforo. Se distingue de *Cylindrocladium* (estado anamorfo de *Calonectria*), por el patrón simétrico de ramificación de los conidióforos que pueden ser en forma de mechones y/o subverticilados y por la forma y tamaño de conidios (Crous y Wingfield 1993, Schoch et al. 2000, Lombard et al. 2012). Se han reconocido nueve especies de *Cylindrocladiella*, existiendo solo dos de ellas conectadas al estado teleomorfo de *Nectricladiella* (Crous 2002, Van Coller et al. 2005).

2.3.4 Descripción general de síntomas causados por los géneros *Calonectria* y *Nectricladiella*

Los principales síntomas causados por el género *Calonectria* corresponden a la podredumbre de semilla, podredumbre de raíz, infección en los cotiledones, damping-off, tizón apical, manchas foliares, lesiones en el tallo, canchales de tronco, “die-back” y vuelco (Crous 2002, Lombard et al. 2015, Alfenas et al. 2015). Por su parte, el género *Nectricladiella* está asociado a síntomas como manchas foliares, podredumbre de semillas, tallos y/o estacas (Crous 2002, Van Coller et al. 2005, Scattolin y Montecchio 2007).

2.3.4.1 Damping-off

Los síntomas asociados a damping-off inducidos por *Calonectria* pueden provocar la muerte de la planta en la etapa de pre-emergencia y/o de post-emergencia. En el primer caso ocurre por una infección dada en el desarrollo de la radícula de la semilla y/o por defectos en la germinación, en el segundo caso la infección se extiende por el tallo de los plantines, tornándolos de una coloración ennegrecida con presencia de signos de esporulación, provocando posteriormente la muerte (Crous, 2002). Existen reportes de Crous (2002), Alfenas et al. (2009) de aparición de este síntoma en viveros forestales de Brasil y Sudáfrica. Castro recolectó y trabajó con plantines con esta sintomatología en viveros en Paysandú (Castro, 2015).

2.3.4.2 Podredumbre radicular

Las infecciones radiculares producidas por *Calonectria* comienzan en el cuello y en algunas de las raíces secundarias, dispersándose posteriormente a todo el sistema radicular, generando amarronamiento del tejido afectado, marchitamiento y vuelco de las plantas (Mohanan y Sharma, 1985). Aparecido y Finatti, citados por Gasparri (2013) detectaron que el daño en los plantines se iniciaba en la región de la interfase sustrato-corte de la estaca, extendiéndose hacia todos los tejidos. Otros autores describen el avance de este hongo a través de las hojas, pecíolos y tallos hacia el resto de la planta, incluso provocando la diseminación de la enfermedad hacia otras plantas dentro del vivero por medio de material infectado (Barnard 1981, Barnard 1984, Crous et al. 1990). Este síntoma ha sido detectado en tallos y pecíolos de estacas y plantines jóvenes de *Eucalyptus grandis* en Sudáfrica (Barnard 1981, 1984, Crous et al. 1990, Gasparri 2013).

2.3.4.3 Anillamiento de tallo

Este síntoma es frecuentemente observado en la etapa de rustificación de plantines. Sharma et al. (1984) reportaron que cuando las plantaciones de eucalipto se encuentran en zonas de altas precipitaciones, el anillamiento se inicia en las ramas y brotes de árboles jóvenes, pero también se ha observado este síntoma en plantaciones comerciales adultas (Sharma et al. 1985, Crous et al. 1991). Según Barnard (1984), algunas especies de *Calonectria* que causan este tipo de síntoma afectan la planta desde los primeros diez centímetros por encima del nivel del suelo, extendiéndose a nudos y axilas en donde se insertan las hojas y provocando en algunos casos la restricción del flujo de savia en el floema de las plantas (Alfenas et al., 2004).

2.3.4.4 Manchas foliares

Las infecciones foliares causadas por *Calonectria* y *Nectricladiella* generalmente adquieren una tonalidad amarronada con una esporulación profusa en el tejido infectado (Rattan y Dhanda 1985, Mohanan y Sharma 1986, Ferreira 1989, Crous 2002). Bajo ciertas condiciones, estas infecciones pueden manifestarse inicialmente como pequeñas manchas circulares de coloración grisácea y de aproximadamente 5 mm de diámetro, que posteriormente adquieren mayor tamaño, coloración marrón y formas irregulares, cubriendo toda la superficie foliar (Alfenas et al., 2004). Estas infecciones pueden conducir a una necrosis importante o a una defoliación prematura si se trata de clones susceptibles (Alfenas 1986, Ferreira et al. 1995, Alfenas et al. 2004).

2.3.5 Descripción general de los signos de *Calonectria*, *Cylindrocladium*, *Nectricladiella* y *Cylindrocladium*

Los signos producidos por estos hongos se pueden observar sobre las lesiones en los tejidos de las plantas, consistiendo de una esporulación de color blanco brillante correspondiente a las estructuras asexuales en conidios y conidióforos de *Cylindrocladium* (Sharma et al. 1984, Rattan y Dhanda 1985, Alfenas et al. 2004). Menos frecuentemente, cuando las condiciones son favorables, se forman también estructuras globosas de color anaranjado a rojizo en los tejidos muertos, que corresponden a las estructuras sexuales del género *Calonectria* (Alfenas et al., 2004).

Para el caso de *Nectricladiella*, los peritecios resultan similares a los de *Calonectria*, diferenciándose en que en este último género las paredes son lisas, se fraccionan lateralmente y presentan setas (Schoch et al., 2000). Por su parte, *Cylindrocladiella* se distingue de *Cylindrocladium* por la simetría de

conidióforos, tamaño de conidios, y la ausencia de septos (Crous y Wingfield 1993, Schoch et al. 2000, Lombard et al. 2012).

2.3.6 Mecanismos de ingreso de *Calonectria* y *Cylindrocladium* en los hospederos

Calonectria puede penetrar en el hospedero de manera directa sin necesidad de aberturas naturales o lesiones. Esto es a través de mecanismos propios que consisten en la liberación de enzimas o ejerciendo presión mecánica sobre la superficie de los tejidos del hospedero (Alfenas et al., 2004). La alternativa a esta modalidad de ingreso del patógeno es por mecanismos indirectos utilizando aberturas naturales (estomas) o lesiones en los tejidos del hospedero (Bolland y Tierney 1985, Mohanan y Sharma 1986). Se ha reportado el ingreso de especies de *Cylindrocladium* a través de los estomas en el género *Eucalyptus* (Bolland y Tierney 1985, Mohanan y Sharma 1986).

2.3.7 Principales hospederos

Un importante número de las especies incluidas en los géneros *Calonectria* y *Nectricladiella* han sido identificadas como potenciales patógenos de diferentes cultivos en el mundo, tanto en aquellos que se reproducen vegetativamente, como en aquellos que lo hacen por semilla. Algunos autores reportaron a estos patógenos causando daño en varias especies leñosas, siendo los géneros *Eucalyptus*, *Pinus*, *Acacia* y *Corymbia* algunos de los más afectados (Lombard et al. 2011, Alfenas et al. 2013). Otros autores han citado al género *Cylindrocladium* como importante patógeno de cultivos agrícolas como soja, maní, papa, leguminosas e incluso algunas plantas ornamentales (Crous 2002, Lombard et al. 2010a).

Los primeros reportes que identificaron al género *Eucalyptus* como especie hospedera de *Calonectria* fueron registrados a finales del año 1960, específicamente con la especie *Cylindrocladium pteridis* causando importantes daños sobre ejemplares de *Eucalyptus cinerea* (Sobers, 1968). Posteriormente, en el año 1995 esta especie fue registrada en Brasil, generando defoliaciones severas en *Eucalyptus grandis* (Ferreira et al., 1995). Por último, en el año 2009 se identificó nuevamente a *Cy. pteridis* afectando plantaciones comerciales de *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. urophylla* y *E. saligna* (Alfenas et al., 2009). En el año 2015, el género *Eucalyptus* volvió a ser reportado como hospedero de especies de *Calonectria*, específicamente de *Calonectria ovata*, *Ca. candelabra* y *Ca. brassicae* causantes de damping-off en zonas de Brasil (Lombard et al., 2015).

2.3.8 Principales vías de dispersión y estructuras de resistencia de estos hongos

El control sobre los hongos que causan enfermedades en viveros, como es el caso del género *Calonectria*, debería ser implementado durante todas las etapas de crecimiento de las plantas, porque afectan a plántulas recién emergidas así como también a plantines desarrollados. Por otra parte, se debería aplicar diferentes prácticas de higiene en el vivero, eliminar fuentes de inóculo como estacas, agua y sustrato infectado, bandejas y tubetes contaminados para disminuir potenciales vías de diseminación del patógeno como semillas, agua y/o suelo contaminado (Arentz 1991, Ferreira y Muchovej 1991, Alfenas et al. 2004). Adicionalmente, se debería establecer un mayor espaciamiento entre plantas, mayor aireación y luminosidad y menor sombreado pues son prácticas que ayudan a regular la humedad del suelo y evitan la formación de un microambiente óptimo para las infecciones de agentes fitopatógenos (Alfenas et al., 2004).

Los microesclerotos son estructuras de resistencia del género *Calonectria* que sobreviven a una temperatura de alrededor de 25 °C y en presencia de agua (Roth et al. 1979, Sung et al. 1980, Taylor et al. 1981). Se ha reportado la supervivencia de estas estructuras en ausencia del hospedero por periodos de hasta 15 años en suelos con distintos grados de humedad, permaneciendo enterrados incluso a más de 66 cm bajo la superficie del suelo (Anderson 1918, Sobers y Littrell 1974, Almeida y Bolkan 1981, Alfenas et al. 2004).

La infección por *Calonectria* requiere la presencia de agua libre para la germinación de conidios, microesclerotos o ascosporas. Dicha agua procede de la acumulación de rocío, lluvia y/o gotas de riego que favorecen la dispersión de estructuras como los conidios por medio del salpicado (Arentz 1991, Ferreira y Muchovej 1991, Alfenas et al. 2004).

2.4 ESTRATEGIAS DE CONTROL

La investigación sobre estos hongos se enfoca hacia la generación de estrategias de control y medidas de manejo que disminuyan o eviten el daño sobre plantines de viveros y plantaciones comerciales de *Eucalyptus* spp., permitiendo así que los programas de plantación se efectúen en los tiempos estipulados (Brown y Ferreira 2002, Baldini et al. 2006).

2.4.1 Resistencia genética

Muchas de las particularidades registradas en los ejemplares de eucaliptos, surgen en respuesta a las variables presentes en su área natural de distribución, en donde existen distintos regímenes de incendios, lluvias, temperaturas, entre otros factores, que determinan procesos de selección natural diferentes dentro del género (Brussa, 1994). El estudio de esas particularidades ha resultado especialmente útil para indagar posibles resistencias frente a enfermedades, siendo el objetivo principal de ello la disminución de los posibles efectos negativos sobre este grupo de plantas (Fonseca et al., 2010).

Existe una tendencia generalizada por parte de las compañías forestales al establecimiento de plantaciones con genotipos superiores y homogéneos utilizando estacas obtenidas de jardines clonales y en muchos casos resistentes a enfermedades (Alfenas et al. 1988, Carvalho et al. 1989, Fonseca et al. 2010). Por otra parte, la ampliación de la base genética de las poblaciones de *Eucalyptus* por medio de la introgresión de genes de resistencia desde especies del mismo género u otros géneros como *Corymbia*, hacia ejemplares de *Eucalyptus* que no los poseen, permite la adquisición de resistencia frente a las enfermedades producidas por algunas especies de *Calonectria* (Fonseca et al. 2010, Grattapaglia et al. 2012).

La resistencia genética se obtiene a través de la selección de genotipos resistentes y ha sido marcada como la estrategia de control más efectiva para el control del género *Calonectria* (Alfenas et al. 2009, Fonseca et al. 2010). Para ello, es fundamental la correcta identificación de los agentes causales, pues es frecuente la asociación de variadas especies de *Calonectria* generando enfermedad sobre un mismo hospedero (Chen et al., 2011).

El conocimiento de la variabilidad de las poblaciones de hongos, incluido *Calonectria*, ha sido una herramienta clave para el diseño de programas de resistencia exitosos y ajustados a las necesidades productivas, pues el uso de material genético productivo pero sin ningún tipo de conocimiento previo acerca de su resistencia genética sumado al uso de técnicas silvícolas inadecuadas, pueden potenciar el desarrollo de enfermedades (Maclean et al. 1993, Bentley et al. 1994, Alfenas et al. 2011).

Por su parte, la susceptibilidad relativa de los genotipos de *Eucalyptus* frente a distintas especies de *Calonectria* ha sido registrada con anterioridad por distintos autores, siendo la especie, subgénero y procedencia de *Eucalyptus*, un factor determinante en el resultado final, reafirmandose esto con estudios posteriores que identifican procedencias de *Eucalyptus* spp. incluidas

las especies *E. grandis* y *E. grandis* x *E. urophylla* como causantes de podredumbre radicular y manchas foliares (Sharma y Mohanan 1992, Alfenas et al. 2004).

El daño por vuelco es otro de los síntomas asociado a algunas especies de *Cylindrocladium*, siendo *Cylindrocladium clavatum* y *Cylindrocladium scoparium* algunas de las especies que motivan este tipo de situaciones. El diseño de experimentos para perfeccionar los métodos de inoculación y determinar la virulencia de aislados de estas especies se ha convertido en una estrategia de importancia. No obstante, algunos autores como Ferreira (1989) no recomiendan el control por resistencia genética para el control de estas enfermedades en vivero obtenida a través de inoculaciones artificiales, debido a que existe un gran número de especies de *Calonectria* asociado a ese síntoma.

2.4.2 Medidas alternativas de control

A la fecha, existen otras medidas alternativas de control para *Calonectria* basadas en el uso de microorganismos antagonistas que resultan en la disminución del inóculo de los patógenos de viveros durante la etapa de producción de estacas (Kunieda de Alonso, 1997). Este tipo de estrategias han resultado muy efectivas, pues las condiciones requeridas para el desarrollo de raíces de las plantas favorecen considerablemente el crecimiento y el desarrollo de algunos de estos agentes de biocontrol (Kunieda de Alonso, 1997). Dentro de esta línea de control biológico, Bettiol et al. (1988) propusieron que se incluyan a los aislamientos obtenidos de *Bacillus* en *Eucalyptus grandis*, mientras Natarajan y Govindasamy (1990) sugieren el uso de algunos hongos ectomicorríticos. Según Gomes et al. (2001), Carvalho Filho (2008) el uso de aislados de *Trichoderma* para el control de mancha foliar por *Cylindrocladium scoparium* en *Eucalyptus urophylla* resultaría otra medida probable.

2.5 MÉTODOS DE INOCULACIÓN PARA EVALUAR RESISTENCIA GENÉTICA

El método de inoculación de *Calonectria* en *Eucalyptus* está asociado a la enfermedad que se quiere evaluar. Los estudios basados en la determinación del daño foliar por especies de *Calonectria* citan a la aspersion con suspensiones de conidios sobre la superficie adaxial y abaxial de las hojas, precisándose para ello una etapa de ajuste de la concentración para cuantificar la enfermedad (Blum y Dianese 1993, Crous 2002, Hirooka et al. 2008, Graça et al. 2009, Alfenas 2013).

Blum et al. (1994) propusieron tres métodos de inoculación para *Calonectria* spp en plantas de *Eucalyptus grandis* y *E. saligna*, utilizando en

todos los casos 2 mL de una suspensión de conidios. El primer método de inoculación consistió en la inyección de la suspensión del hongo en el cuello de las plantas de eucalipto, en el segundo método se aplicó la suspensión sobre el sustrato estéril de las macetas donde iban a ser trasplantados los eucaliptos y en el tercer método se sumergieron las raíces de las plantas en la suspensión por un periodo de 30 segundos y luego se las trasplantó a macetas con sustrato estéril, realizándose la evaluación de los resultados a los 4, 6, 8 y 10 días posteriores a la inoculación.

Por su parte Hirooka et al. (2008) recomendaron otra metodología de inoculación para *Cylindrocladium* en plantas de *Fragaria x ananassa* y *Heuchera*, basada en el trasplante de plantas sanas a macetas con suelo infectado compuesto por una mezcla de sustrato de vivero esterilizado y crecimiento de *Cylindrocladium* de un mes sobre grano de trigo y trasplante hacia macetas con sustrato estéril para las plantas testigo. La proporción entre el sustrato de vivero y el micelio del hongo creciendo sobre el medio fue de 5:1, evaluando los resultados a los cinco y ocho días posterior a la inoculación, observando el micelio blanco del hongo sobre las manchas necróticas de las hojas, pecíolos y en la base de los tallos cerca del nivel del sustrato, confirmándose la presencia de este hongo.

Algunos autores se han centrado en la determinación de una concentración óptima de conidios y micelio de *Cylindrocladium* para una inoculación eficiente. Reis y Chaves (1967), Rattan et al. (1983) definieron como concentración óptima aquella que no minimiza ni maximiza el daño de la enfermedad, reportando que las concentraciones en torno a los 2 a 3×10^5 conidios/mL serían las adecuadas para evaluar el daño por vuelco causado por *Cylindrocladium* en *Eucalyptus* spp, de lo contrario, concentraciones menores o superiores dificultan la expresión de la resistencia real. Por su parte, Blum et al. (1994) determinaron que aquellas suspensiones cuya concentración era del orden de 3×10^5 conidios/mL resultaban óptimas para describir específicamente el daño por vuelco causado por *Cylindrocladium clavatum* y *Cylindrocladium scoparium* e identificar distintos niveles de susceptibilidad de *Eucalyptus* spp. Ferreira (1989) reportó en un ensayo de resistencia genética que *E. grandis* era susceptible y *E. tereticornis* ligeramente susceptible a *Calonectria* spp, cuando eran inoculados con concentraciones del orden de 10^5 conidios/mL a los 30 o 40 días posteriores a su emergencia y observó que si la cantidad de hojas era superior a seis la expresión de la enfermedad se daba en un periodo mayor de tiempo (mayor a ocho días) y si las plantas eran muy jóvenes no se podía distinguir con facilidad la susceptibilidad.

En Uruguay no existen antecedentes respecto a la inoculación artificial de *Calonectria* en *Eucalyptus*, por lo cual el ajuste de un método de inoculación

óptimo resulta útil para explorar la resistencia genética del género *Eucalyptus* frente a las especies de *Calonectria* y *Nectriadiella* identificadas a la fecha.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN DE LOS ENSAYOS

El estudio se realizó en Facultad de Agronomía, en la Estación Experimental Mario Alberto Cassinoni (EEMAC). Laboratorio de Fitopatología, el cual está ubicado en Ruta Nacional No. 3, Km 363, paraje Cangüé, Departamento de Paysandú (32°22'49.56"S, 58° 03'11.73"W).

La actividad se subdividió en tres ensayos, acorde a los objetivos específicos planteados. Una primera etapa con énfasis en el ajuste del método de inoculación, una segunda cuyo objetivo fue caracterizar la agresividad de una colección de cepas de *Calonectria* y *Nectricadiella* de Facultad de Agronomía, específicamente de la Estación Experimental Mario Alberto Cassinoni (EEMAC). Laboratorio de Fitopatología. Y una tercera etapa centrada en la determinación de la resistencia de diferentes genotipos de clones comerciales de *E. grandis* y *E. dunnii* frente a las cepas más agresivas de estos patógenos.

3.2 AJUSTE DEL MÉTODO DE INOCULACIÓN

Se evaluaron dos métodos de inoculación: a) plantación sobre sustrato estéril inoculado con *Calonectria* y *Nectricladiella* b) Inyección de una suspensión de esporas en el cuello de la planta. Cada método fue evaluado con dos cepas de *Calonectria* provenientes de la colección de Facultad de Agronomía. EEMAC. Laboratorio de Fitopatología, correspondientes a *Ca. scoparia* (PG17) y a *Ca. pauciramosa* (PG100) más un testigo que consistió en agua estéril, conformando un experimento factorial completo de dos factores; el factor método de inoculación con dos niveles (inoculación al sustrato o inyección) y el factor cepa con tres niveles (testigo con agua estéril, cepa PG17 y cepa PG100), totalizando seis tratamientos. La unidad experimental fueron plantines individuales, con veinte repeticiones, utilizándose 120 plantas de un clon de *Eucalyptus dunnii* de conocida susceptibilidad dado los niveles de enfermedad observados en el vivero. Este mismo clon fue utilizado posteriormente en caracterización de la agresividad de la colección de cepas de *Calonectria* y *Cylindrocladiella* y en la caracterización de resistencia genética de clones de *Eucalyptus dunnii* y *Eucalyptus grandis* (correspondiendo al clon 6 en este último).

Cuadro No. 1. Resumen de los tratamientos evaluados combinando método de inoculación con la cepa del patógeno

| Tratamiento | Método de Inoculación | Cepa |
|-------------|-----------------------|------------------------|
| I | Al sustrato | PG17 |
| II | Al sustrato | PG100 |
| III | Al sustrato | Agua estéril (testigo) |
| IV | Inyección | PG17 |
| V | Inyección | PG100 |
| VI | Inyección | Agua estéril (testigo) |

3.2.1 Preparación del caldo de inóculo

Para cada una de las cepas, el hongo fue repicado en condiciones de asepsia, desde la colección, a una placa de Petri de 90 mm de diámetro conteniendo MEA 2 % (extracto de malta agar), e incubado a 25 °C por una semana. Luego de 7 días y con el hongo habiendo colonizado toda la superficie de la placa, se cortó el medio de cultivo en trozos de 1 cm², transfiriéndose dichos fragmentos a una licuadora previamente desinfectada con alcohol a concentración 70 % y añadiéndole 1 L de agua estéril. Posteriormente se licuó durante 30 segundos para obtener un caldo de concentración de micelio y esporas uniforme. Una vez obtenido el caldo, se lo filtró con una malla de lycra de forma de eliminar trozos de agar y buscando homogeneizar la concentración inóculo. Posteriormente, para el método de inoculación por inyección se distribuyó el caldo en tubos de ensayos sobre gradillas, en alícuotas de 2 mL por tubo para luego inyectar el volumen de cada tubo con jeringas en cada unidad experimental (Figura No. 1).



(a) preparación del caldo de inóculo homogeneizado en licuadora, (b) filtrado de caldo de inóculo, (c) distribución del caldo de inóculo en tubos de ensayo previo a la inoculación de plantines

Figura No. 1. Procedimiento de preparación de inóculo

3.2.2 Inoculación

En primer lugar, se dispusieron los plantines en macetas de 1 L con una mezcla 50:50 de compost: tierra. El sustrato de vivero correspondió a corteza de pino chipeada y compostada. Una vez realizada la mezcla y tras haber sido homogeneizada, la misma fue autoclavada por un período de 20 minutos a 121 °C a una presión de 2 atmósferas absolutas.

Para el caso de la inoculación al sustrato, se colocaron 5 cm de altura de la mezcla compost: tierra en cada maceta previo a la inoculación. Posterior a ello, se aplicaron 20 cc de caldo de inóculo de la cepa del hongo correspondiente sobre la superficie del sustrato, utilizando como instrumento de medida la graduación de un vaso de bohemia (Blum et al., 1994). Se buscó evitar la contaminación cruzada usando para ello materiales distintos y estériles para cada cepa. Para el caso del tratamiento testigo, la inoculación al sustrato se realizó aplicando 20 cc de agua estéril. Una vez finalizada la aplicación del inóculo, se trasplantaron los plantines de *Eucalyptus dunnii* con previo corte del extremo inferior del pan radicular, para generar heridas. Dicho corte se realizó con una tijera que fue desinfectada con alcohol 70% entre tratamientos. De esta forma los plantines con herida en los extremos de las raíces quedaron ubicados sobre la mezcla inoculada. Por último, se completó el llenado de las macetas con mezcla compost-tierra hasta dejar completamente cubierta la primera porción del tallo y las raíces de los plantines (Figura No. 2).

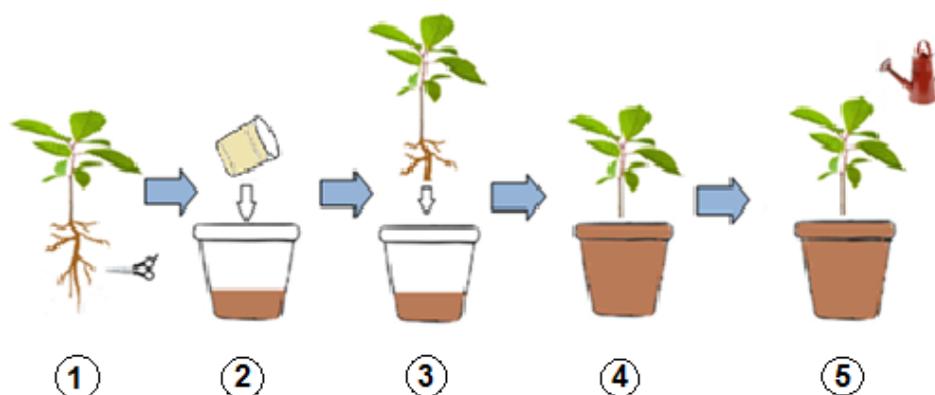


Figura No. 2. Procedimiento del método de inoculación al sustrato

Por su parte, para el método de inoculación por inyección se procedió a trasplantar directamente los plántulos de *Eucalyptus dunnii* desde los tubetes hacia cada una de las macetas y rellenarlas con la mezcla compost:tierra hasta cubrir por completo las raíces de los plántulos. Al momento de la inoculación, se desinfectó con alcohol 70% la superficie del tallo a 1 cm por encima del nivel del suelo, y se procedió a inyectar 2 cc de caldo de inóculo de cada cepa con una jeringa descartable y distinta de 2.5 cc (Blum et al., 1994). En las plantas del testigo se procedió de igual forma, pero sustituyendo la suspensión de inóculo por agua estéril (Figura No. 3).

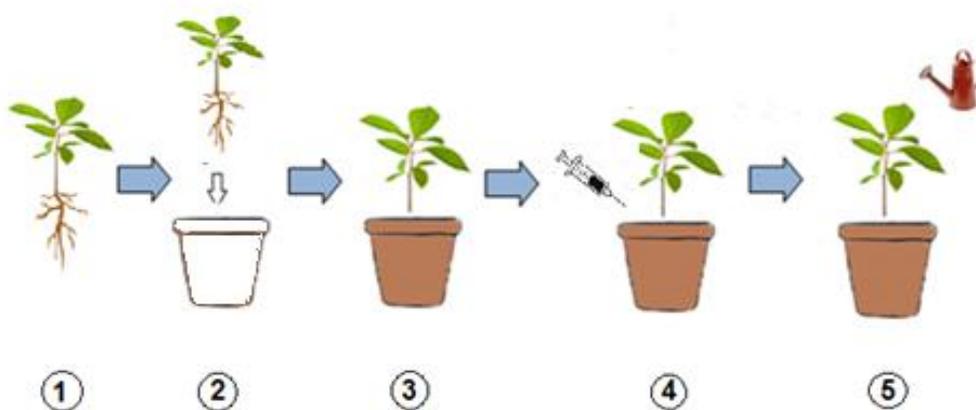


Figura No. 3. Procedimiento del método de inoculación por inyección de suspensión de esporas

Luego de realizada la inoculación, las plantas fueron mantenidas en invernáculo a una temperatura media de 25 °C y colocadas en tarrinas con una lámina de 5 cm de agua de manera de mantener la parte baja de las raíces en una situación similar a la de un anegamiento permanente con el objetivo de causarle estrés a las plantas, teniendo la salvedad que dentro de una misma tarrina se ubicaran los plantines inoculados con la misma cepa, de forma de evitar una posible contaminación (Figura No. 4).



Figura No. 4. Disposición de plantines en tarrinas bajo condiciones de invernáculo

3.2.3 Evaluación de resultados

A los 38, 69 y 87 días se determinó el porcentaje de plantas muertas. Las plantas que presentaron síntomas fueron desenterradas, sus raíces fueron lavadas con agua corriente, fotografiadas y llevadas al laboratorio para mayor análisis.

Una vez en el laboratorio, se cortó la primera región del tallo de esas plantas, para observar bajo lupa estereoscópica la manifestación de signos que confirmaran la presencia del patógeno, completando de esta forma los postulados de Koch. Aquellos trozos de tallo o raíz sin signo de esporulación evidente fueron incubados en cámara húmeda para favorecer su esporulación. Estas cámaras consistieron en bandejas plásticas, con una delgada capa de algodón en la base, cubierta por una hoja de papel absorbente, y humedecida con agua estéril, donde se dispuso el trozo vegetal en estudio, para su posterior incubación a una temperatura de 25 °C en estufa por un período de cinco a siete días.

Luego de la incubación, se observaron estos trozos bajo lupa estereoscópica, y cuando se observó esporulación, la identificación del patógeno se confirmó mediante morfología de esporas por observación al microscopio óptico a un aumento de 100X.

Posteriormente se realizó el análisis estadístico de los datos a través del sistema SAS (Statistical Analysis System), utilizando como procedimiento de análisis The GENMOD Procedure. La separación de medias de las variables evaluadas se hizo a través de Least Squares Means.

3.3 CARACTERIZACIÓN DE LA AGRESIVIDAD DE LA COLECCIÓN DE CEPAS DE *Calonectria* Y *Cylindrocladiella* DE FACULTAD DE AGRONOMÍA. EEMAC. LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA

Como se mencionó en el ajuste del método de inoculación, el objetivo fue probar dos métodos de inoculación, al sustrato y por inyección, resultando el primero más eficiente en la reproducción de la enfermedad, por lo que en este experimento se utilizó nuevamente el método de inoculación al sustrato, pero con la incorporación de arroz con el propósito de aumentar la viabilidad de inóculo en el sustrato. Se evaluó la agresividad de 19 cepas de *Calonectria* y *Nectriycladiella* en el mismo clon de *E. dunnii* utilizado en el ajuste del método de inoculación, mediante el método de inoculación con grano de arroz. La revisión bibliográfica realizada en base a otros hongos fitopatógenos en distintos cultivos motivó la adaptación de la técnica al sustrato con la incorporación de arroz para el crecimiento del hongo (Hirooka et al., 2008). Las unidades experimentales estuvieron representadas por los plantines y el diseño experimental constó de 20 tratamientos con 10 repeticiones cada uno, asignándole a 19 de ellos una cepa de hongo y el restante tratamiento fue testigo (arroz estéril, Cuadro No. 2). Todas las repeticiones de un mismo tratamiento se dispusieron agrupadas en bandejas independientes de manera de evitar contaminación cruzada entre tratamientos.

Cuadro No. 2. Cepas de la caracterización de la agresividad de la colección de *Calonectria* y *Cylindrocladiella*

| Cepa | Especie |
|-------|---------------------------------------|
| PG10 | <i>Cylindrocladiella lageniformis</i> |
| PG14 | <i>Calonectria sulawesiensis</i> |
| PG17 | <i>Ca. scoparia</i> |
| PG19 | <i>Ca. scoparia</i> |
| PG20 | <i>Ca. sulawesiensis</i> |
| PG25 | Complejo <i>Cy. camelliae</i> |
| PG52 | <i>Ca. humicola</i> |
| PG53 | <i>Ca. pauciramosa</i> |
| PG58 | <i>Ca. humicola</i> |
| PG62 | <i>Ca. seminaria</i> |
| PG66 | <i>Ca. seminaria</i> |
| PG91 | Complejo <i>Ca. cylindrospora</i> |
| PG92 | Complejo <i>Ca. cylindrospora</i> |
| PG100 | <i>Ca. pauciramosa</i> |
| PG112 | <i>Ca. sulawesiensis</i> |
| PG115 | <i>Ca. sulawesiensis</i> |
| PG116 | <i>Ca. sulawesiensis</i> |
| PG118 | <i>Ca. sulawesiensis</i> |
| PG119 | <i>Ca. sulawesiensis</i> |

3.3.1 Preparación del inóculo

El repique de cada una de las 19 cepas de *Calonectria* y *Nectricladiella* (Cuadro No. 2) se realizó desde una placa de Petri de 55 mm que contenía la cepa en medio de cultivo MEA al 2 % hacia una placa de Petri de 90 mm con el mismo medio de cultivo. El repique se realizó con un sacabocado y fue efectuada desde la periferia de las colonias en cada placa de Petri de 55 mm, donde el crecimiento del hongo estaba más activo y con porciones de micelio más nuevas. Posteriormente se colocaron las placas de Petri de 90 mm en estufa a una temperatura de 25 °C durante 7 días, para luego en condiciones de asepsia, cortar el contenido de dicha placa en trozos de aprox. 1 cm², vertiéndose así el contenido en una de las 19 bolsas plásticas preparadas con arroz húmedo autoclavado.

Por otro lado, se armaron 20 bolsas plásticas autoclavables, cada una con 200 g de arroz parboiled humedecido por una hora a razón de 720 mL de agua estéril por kg de arroz. Dichas bolsas fueron autoclavadas dos veces, por

períodos de 20 min. a 121 °C, y se las dejó enfriar a temperatura ambiente entre ambos ciclados. Posteriormente, en condiciones de asepsia se vertió el contenido de cada placa de Petri con la cepa correspondiente en las bolsas plásticas preparadas con arroz húmedo. Las bolsas fueron cerradas con cinta adhesiva para evitar contaminación y los trozos de medio con hongo fueron mezclados con el arroz e incubados por una semana a 25 °C. Luego de una semana, se procedió a mezclar nuevamente el contenido de la bolsa para favorecer el crecimiento miceliar y la homogénea colonización de los granos de arroz, incubándose dicho contenido por una semana más. Para el tratamiento testigo se aplicó arroz humedecido y autoclavado, pero no se inoculó con ninguna cepa (Figura No. 5).



(a) bolsas plásticas autoclavables con arroz humedecido; (b) placas de Petri con cultivo puro de cada cepa

Figura No. 5. Preparación de inóculo utilizando arroz como sustrato

3.3.2 Procedimiento de inoculación

Una vez realizada la mezcla compost: tierra y seguida la metodología de esterilización como en el ajuste del método de inoculación, se procedió a colocar 5 cm de mezcla compost: tierra en cada maceta y 10 g de arroz inoculado, a excepción del testigo en el que se colocó el arroz sin inocular (Figura No. 6). Posteriormente, se trasplantaron los plantines de *Eucalyptus dunnii*, con previo corte de las raíces para generar heridas, quedando en contacto con el arroz inoculado. Por último, se completó el llenado de las macetas con mezcla compost: tierra hasta dejar cubierta la primera porción del tallo y las raíces de los plantines (Figura No. 7).

Luego de realizada la inoculación, las plantas fueron colocadas en bandejas con 5 cm de agua de manera de mantener la parte baja de las raíces en una situación similar a la de un anegamiento permanente con el objetivo de causarle estrés a las plantas. Posterior a esto, las bandejas fueron colocadas

en cámara de incubación a una temperatura de 25.6 °C por un período de un mes (Figura No. 8).



Figura No. 6. Método de inoculación al sustrato con arroz, colocación del arroz posterior al llenado con 5 cm de la mezcla sustrato - tierra en macetas

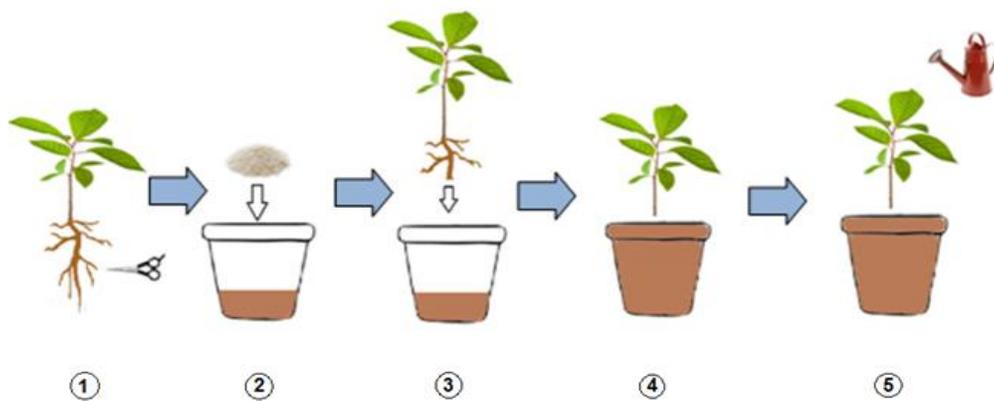


Figura No. 7. Procedimiento del método de inoculación con grano de arroz



Figura No. 8. Plantas dispuestas en bandejas con 5 cm de agua dentro de una cámara de incubación

3.3.3 Evaluación de resultados

Se determinó el porcentaje de plantas vivas y muertas en cada uno de los tratamientos a los 30 días post inoculación. Para ello, se registró cada una de las repeticiones de los distintos tratamientos con alguna evidencia de síntoma o signo de *Cylindrocladium* o *Cylindrocladiella* que hubieran conducido a la eventual muerte de los plantines (Figura No.9).

Se procedió retirando la mezcla compost: tierra de cada una de las macetas y separando los plantines. Posterior a esto, se colocaron las plantas vivas y muertas en bolsas de nylon por separado de cada uno de los tratamientos para ser lavadas y enjuagadas para fotografiarlas e incubarlas.

Por último, se seleccionaron las plantas muertas o con síntoma de infección radicular y se realizó un corte longitudinal de las raíces con bisturí (Figura No. 10) para ser incubadas en cámara húmeda en incubadora a 25°C (Figura No. 11) por un período de tiempo de una semana para favorecer el desarrollo de la esporulación.



Figura No. 9. Identificación de plantas muertas en la evaluación del ensayo



Figura No.10. Cortes longitudinales de raíz de plantas muertas para observar decoloración de tejidos internos



Figura No. 11. Cámaras húmedas en incubadora a 25 °C

Posterior a la incubación en cámaras húmedas, se procedió a observar el crecimiento de micelio y esporulación asexual de *Cylindrocladium* y *Cylindrocladiella* con lupa estereoscópica y microscopio óptico con aumento de 100X (Figura No. 12).



Figura No. 12. Fragmentos de tallos con signo de esporulación blanquecina posterior a su incubación en estufa

El análisis estadístico de los datos fue realizado a través del sistema SAS (Statistical Analysis System), utilizando como procedimiento de análisis The GENMOD Procedure. La separación de medias de las variables evaluadas se hizo a través de Least Squares Means.

3.4 CARACTERIZACIÓN DE RESISTENCIA GENÉTICA DE CLONES DE *E. dunnii* Y *E. grandis*

Para caracterizar la resistencia genética de distintos germoplasmas de eucalipto, se inocularon tres clones de *E. dunnii*, y tres clones de *E. grandis*. Cada clon fue inoculado con tres cepas, *Ca. seminaria* (PG66), *Ca. pauciramosa* (PG100) y *Ca. sulawesiensis* (PG119), seleccionada la cepa PG100 por su agresividad en el ajuste del método de inoculación, y las dos restantes por la agresividad mostrada en la caracterización de la agresividad de la colección de cepas de *Calonectria* y *Cylindrocladiella*, más un testigo inoculado con agua estéril. Los clones fueron codificados del 1 al 3 para *E. grandis*, y del 4 al 6 para *E. dunnii*, siendo el clon 6 idéntico al utilizado en los dos anteriores ensayos.

3.4.1. Inoculación

Primero, se realizó la mezcla de compost: tierra, de igual forma a la mencionada en los otros experimentos. La preparación de inóculo, el método de inoculación empleado (al sustrato con arroz) y el procedimiento de instalación

del ensayo, fue similar al detallado en la caracterización de la agresividad de la colección de cepas de *Calonectria* y *Cylindrocladiella*.

3.4.2. Evaluación y análisis de resultados

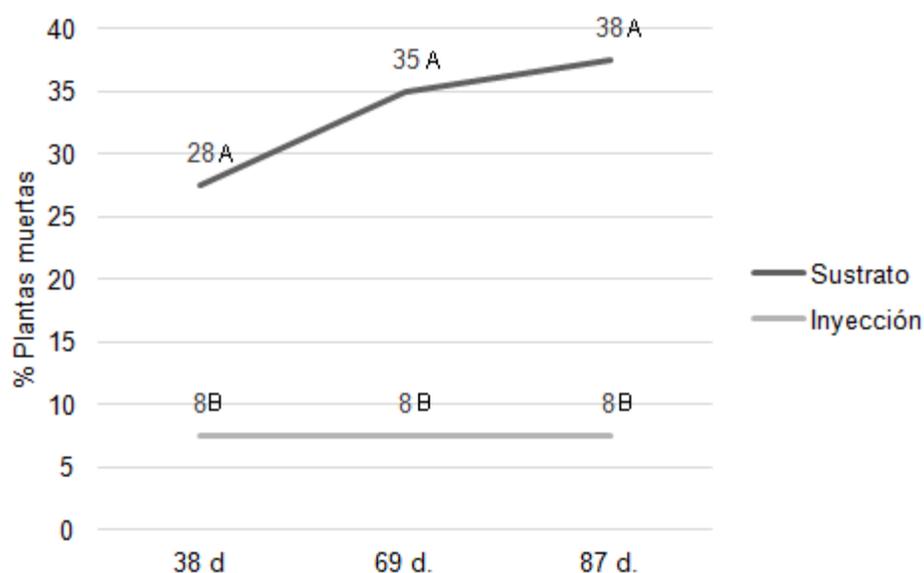
Se determinó el porcentaje de plantas vivas y muertas a los 30 días de la inoculación, para cada uno de los tratamientos producto de la combinación de una cepa y un clon. Se buscó identificar la presencia de síntomas o signos de *Cylindrocladium* o *Cylindrocladiella* dentro de las distintas unidades experimentales.

Posteriormente, se retiró la mezcla compost: tierra, y se extrajeron los plantines por separado de cada uno de los tratamientos, para ser lavados, fotografiados y observados bajo lupa estereoscópica y microscopio óptico. Las plantas muertas o con síntoma de podredumbre radicular fueron incubadas por una semana para favorecer el desarrollo de la esporulación.

4. RESULTADOS

4.1 EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE INOCULACIÓN

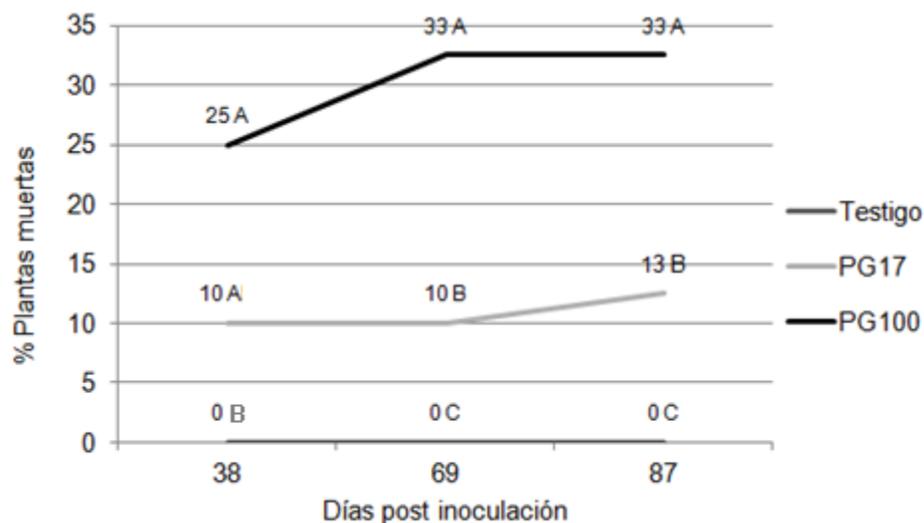
Se logró reproducir la enfermedad independientemente del método de inoculación utilizado, sin embargo, con el método de inoculación al sustrato se obtuvo un mayor nivel de la enfermedad en todas las fechas de evaluación, cuando se promedian las dos cepas dentro de cada método de inoculación (Figura No. 13).



Medias con distinta letra difieren estadísticamente entre sí (Least Squares Means, $\alpha = 0.05$)

Figura No. 13. Porcentaje de plantas muertas según método de inoculación (al sustrato o inyección) evaluadas a los 38, 69 y 87 días post inoculación, el método de inoculación difirió significativamente en cada una de las determinaciones realizadas

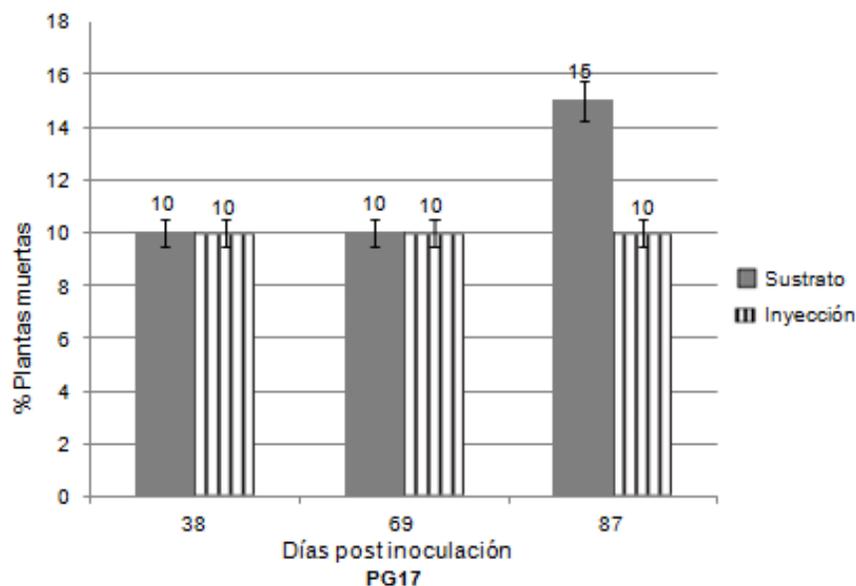
Las dos cepas evaluadas (PG100 y PG17) desarrollaron la enfermedad (medida en porcentaje de plantas muertas), sin embargo, PG100 mostró mayor porcentaje de plantas muertas que PG17 en la segunda y tercera fecha de evaluación (Figura No. 14).



Medias con distinta letra difieren estadísticamente entre sí para cada una de las fechas de evaluación (Least Squares Means $\alpha = 0.05$)

Figura No. 14. Porcentaje de plantas muertas según cepa, evaluadas a los 38, 69 y 87 días post inoculación, valores promedio de las cepas para los dos métodos de inoculación (sustrato e inyección)

En las Figuras No. 15 y No. 16 se muestra el efecto interacción cepa-método de inoculación para las tres fechas de evaluación.

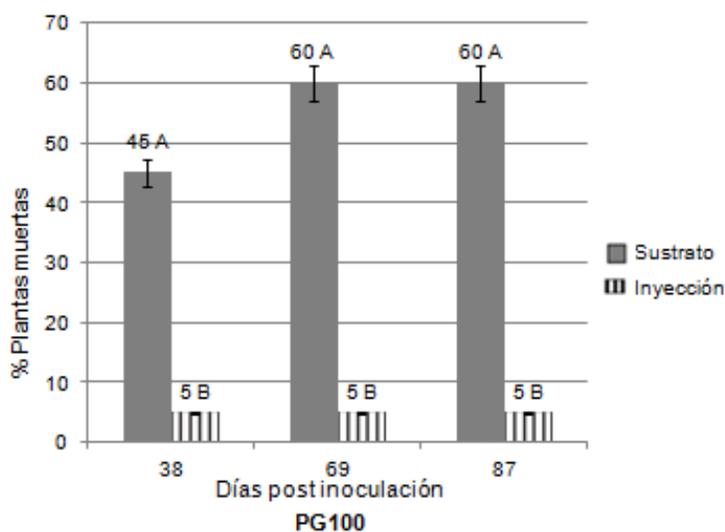


Least Squares Means, $\alpha = 0.05$
Las líneas indican el desvío estándar

Figura No. 15. Porcentaje de plantas muertas según método de inoculación para la cepa PG17 evaluadas a los 38, 69 y 87 días post inoculación, no existieron diferencias significativas en ninguna de las fechas evaluadas

No se identificaron diferencias significativas independientemente del método de inoculación, para la cepa PG17, en ninguna de las fechas evaluadas (Figura No. 15).

El método de inoculación al sustrato para la cepa PG100 presentó mayor porcentaje de plantas muertas que el método por inyección para las tres fechas de evaluación (Figura No. 16).



Medias con distinta letra difieren estadísticamente entre sí (Least Squares Means, $\alpha = 0.05$)
Las líneas indican el desvío estándar

Figura No. 16. Porcentaje de plantas muertas según método de inoculación para la cepa PG100 evaluadas a los 38, 69 y 87 días post inoculación

Las diferencias estadísticas encontradas fueron significativas entre el método de inoculación al sustrato y el método por inyección para la cepa PG100 en las tres fechas evaluadas.

Las porciones de plantas que presentaban signos del patógeno, fueron observadas bajo lupa estereoscópica y microscopio óptico evidenciándose la presencia de las esporas asexuales del hongo, reafirmando que la muerte de las plantas había sido provocada por este patógeno.

4.2 CARACTERIZACIÓN DE LA AGRESIVIDAD DE CEPAS DE LA COLECCIÓN FACULTAD DE AGRONOMÍA. EEMAC. LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA

Algunas de las cepas evaluadas mostraron ser altamente agresivas, causando hasta un 80% de mortandad de las plantas inoculadas. Por el contrario, la cepa PG10 de la especie *Cylindrocladiella lageniformis* no causó muerte de plantas, lo que podría indicar que no es patogénica (Cuadro No. 3).

Cuadro No. 3. Porcentaje de plantas muertas de un clon de conocida susceptibilidad según cepa inoculada, evaluadas a los 30 días

| Especie | Cepa | % Plantas muertas | Letras |
|---------------------------------------|-------|-------------------|--------|
| Complejo <i>Cy. camelliae</i> | PG25 | 80 | A |
| <i>Ca. sulawesiensis</i> | PG119 | 80 | A |
| <i>Ca. seminaria</i> | PG66 | 80 | A |
| <i>Ca. humícola</i> | PG58 | 80 | A |
| <i>Ca. sulawesiensis</i> | PG14 | 70 | AB |
| <i>Ca. pauciramosa</i> | PG53 | 70 | AB |
| <i>Ca. sulawesiensis</i> | PG20 | 60 | ABC |
| <i>Ca. seminaria</i> | PG62 | 60 | ABC |
| <i>Ca. scoparia</i> | PG17 | 60 | ABC |
| Complejo <i>Ca. cylindrospora</i> | PG91 | 50 | ABC |
| <i>Ca. sulawesiensis</i> | PG115 | 50 | ABC |
| <i>Ca. humícola</i> | PG52 | 50 | ABC |
| Complejo <i>Ca. cylindrospora</i> | PG92 | 40 | ABC |
| <i>Ca. sulawesiensis</i> | PG118 | 40 | ABC |
| <i>Ca. pauciramosa</i> | PG100 | 40 | ABC |
| <i>Ca. scoparia</i> | PG19 | 30 | BC |
| <i>Ca. sulawesiensis</i> | PG112 | 20 | C |
| <i>Ca. sulawesiensis</i> | PG116 | 20 | C |
| <i>Cylindrocladiella lageniformis</i> | PG10 | 0 | |

Valores con distinta letra difieren significativamente (Least Squares Means, $\alpha = 0.05$)

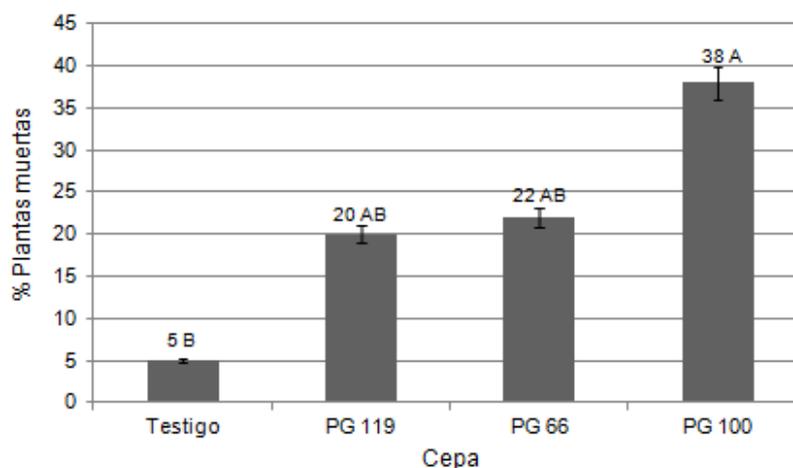
Se observaron diferencias significativas en la agresividad de las distintas cepas evaluadas, habiendo diferencias entre cepas de distintas especies, pero también entre cepas de una misma especie.

Por su parte, una cepa de *Ca. humicola* (PG58), una de *Ca. seminaria* (PG66), una de *Ca. sulawesiensis* (PG119) y una perteneciente al complejo *Cy. camelliae* (PG25) fueron significativamente más agresivas que dos cepas de *Ca. sulawesiensis* (PG112 y PG116), y que una perteneciente a *Ca. scoparia* (PG19).

Las porciones de plantas que presentaban signos del patógeno, fueron observadas bajo lupa estereoscópica y microscopio óptico evidenciándose la presencia de las esporas asexuales del hongo, reafirmando que la muerte de las plantas había sido provocada por este patógeno

4.3 CARACTERIZACIÓN DE RESISTENCIA GENÉTICA DE CLONES DE *Eucalyptus dunnii* Y *Eucalyptus grandis*

La cepa PG100 mostró un mayor porcentaje de plantas muertas respecto al tratamiento testigo, no existiendo diferencias significativas con respecto a las cepas PG66 y PG119 (Figura No. 17).

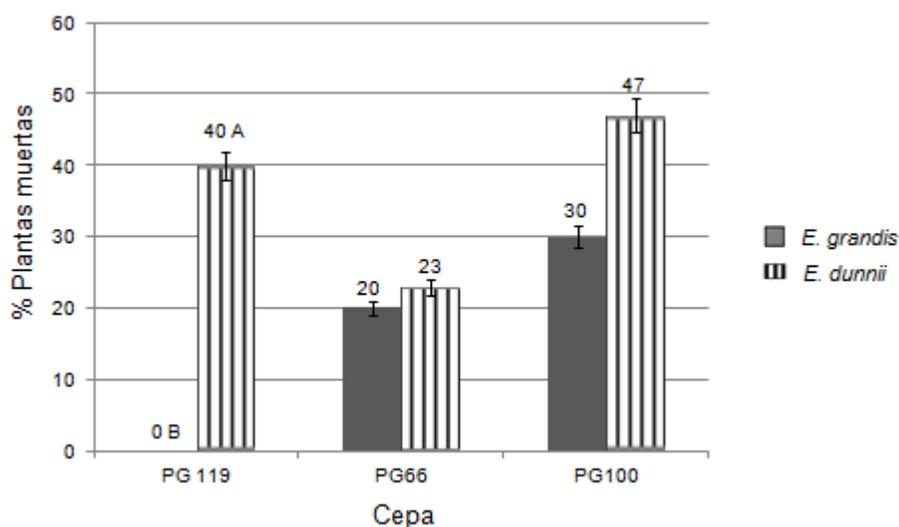


Medias con distinta letra difieren estadísticamente entre sí (Least Squares Means, $\alpha = 0.05$)
Las líneas indican el desvío estándar

Figura No. 17. Porcentaje de plantas muertas según cepa, promedio de los resultados obtenidos en todos los clones inoculados, evaluadas a los 30 días

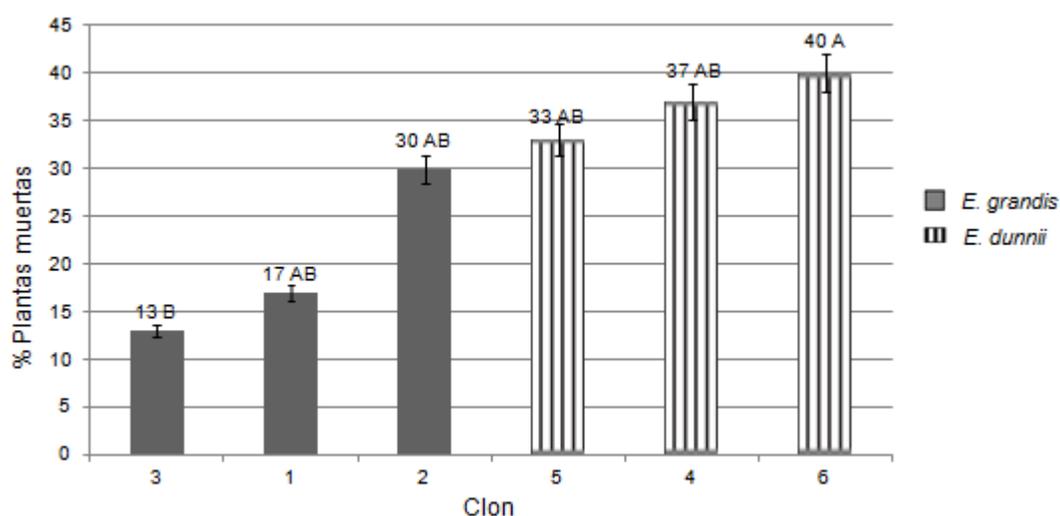
Las cepas PG100 y PG66 causaron muerte de plantas en ambas especies de *Eucalyptus*, mientras que la cepa PG119 sólo causó muerte de

plantas en *E. dunnii*, no causando enfermedad en *E. grandis*, evidenciando interacción cepa-especie. No hubo efecto significativo en el contraste de especies para la cepa PG66 y PG100, sin embargo, sí lo hubo para la cepa PG119 (Figura No. 18).



Least Squares Means, $\alpha = 0.1$
Las líneas indican el desvío estándar

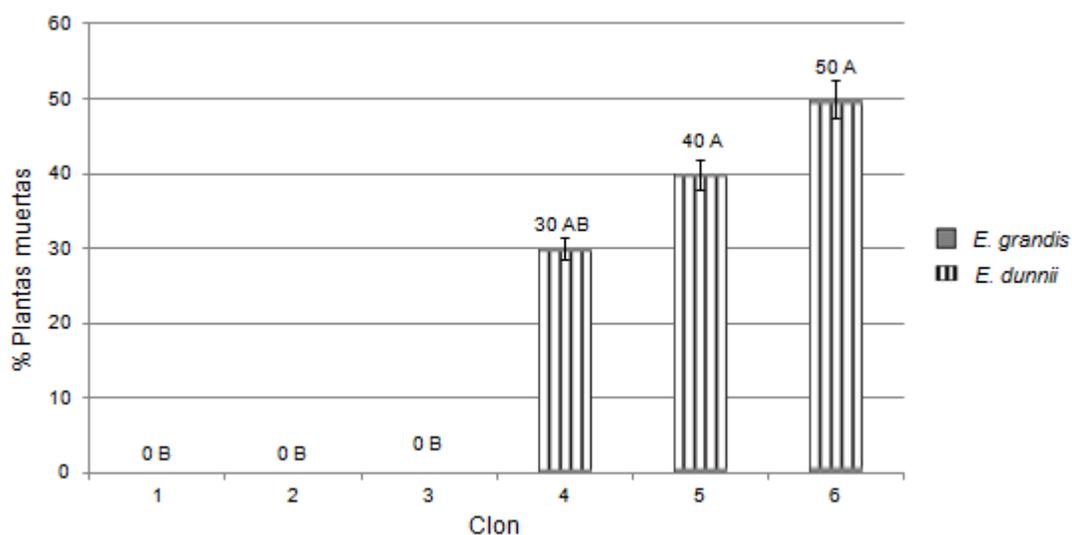
Figura No. 18. Porcentaje de plantas muertas según la cepa evaluada, en cada especie (*E. grandis* y *E. dunnii*). Valores promedio de los tres clones de cada especie



Least Squares Means, $\alpha = 0.05$
Las líneas indican el desvío estándar

Figura No. 19. Porcentaje de plantas muertas según clon de *E. grandis* (1, 2 y 3) y *E. dunnii* (4, 5 y 6), valores promedio de la inoculación con las tres cepas

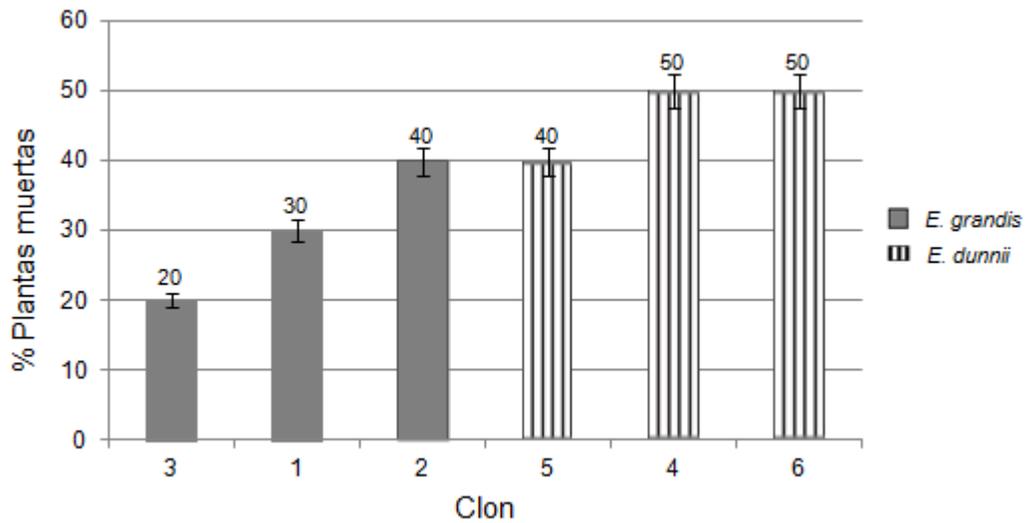
Hubo únicamente diferencias significativas entre el clon 6 y el clon 3, cuando los mismos son comparados en su comportamiento promedio frente a las cepas evaluadas (Figura No. 19). El clon 6 es uno de los que presentó mayor porcentaje de plantas muertas, confirmándose que es un clon de conocida susceptibilidad frente a *Calonectria* y *Nectricladiella* tal como se planteó en los anteriores ensayos.



Least Squares Means, $\alpha = 0.1$
Las líneas indican el desvío estándar

Figura No. 20. Porcentaje de plantas muertas según clon de *E. grandis* (1, 2 y 3) y *E. dunnii* (4, 5 y 6) para la cepa PG119

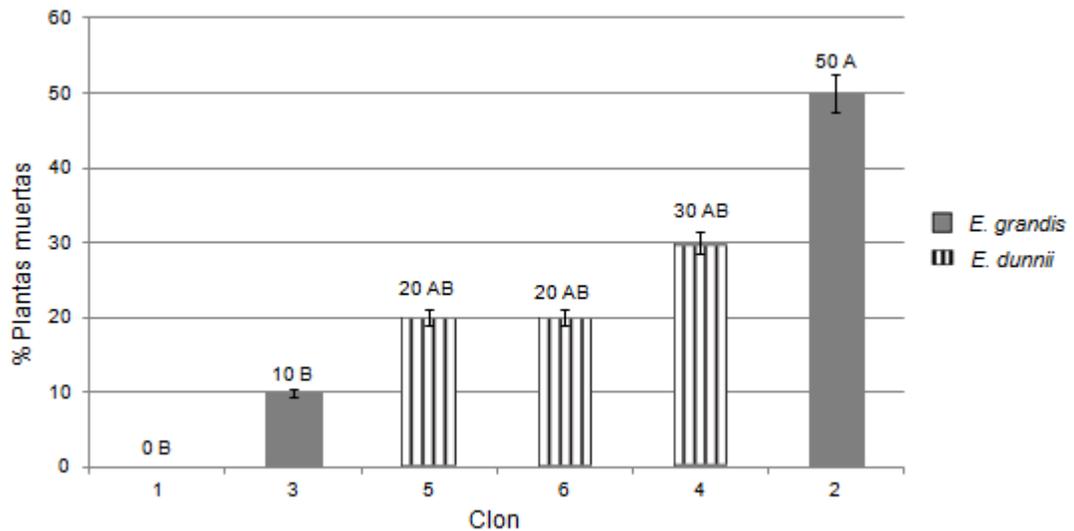
Hubo diferencias significativas entre el clon 6 respecto a todos los clones de *E. grandis*, y de igual forma se dio para el clon 5, no existiendo diferencias entre el clon 4 con estos clones de *E. grandis* para la cepa PG119 (Figura No. 20).



Least Squares Means, $\alpha = 0.1$
Las líneas indican el desvío estándar

Figura No. 21. Porcentaje de plantas muertas según clon de *E. grandis* (1, 2 y 3) y *E. dunni* (4, 5 y 6) para la cepa PG100, no hubo efecto significativo del clon

Con respecto a la cepa PG100, la totalidad de clones evaluados a los 30 días no difieren en el grado de resistencia (Figura No. 21).



Least Squares Means, $\alpha = 0.1$
Las líneas indican el desvío estándar

Figura No. 22. Porcentaje de plantas muertas según clon de *E. grandis* (1, 2 y 3) y *E. dunnii* (4, 5 y 6) para la cepa PG66

Hubo diferencias significativas entre el clon 1 y el 2 y entre éste último y el clon 3, frente a la cepa PG66, no existiendo diferencias entre el resto de los clones (Figura No. 22).

Las porciones de plantas que presentaban signos del patógeno, fueron observadas bajo lupa estereoscópica y microscopio óptico evidenciándose la presencia de las esporas asexuales del hongo, reafirmando que la muerte de las plantas había sido provocada por este patógeno (Figura No. 23).

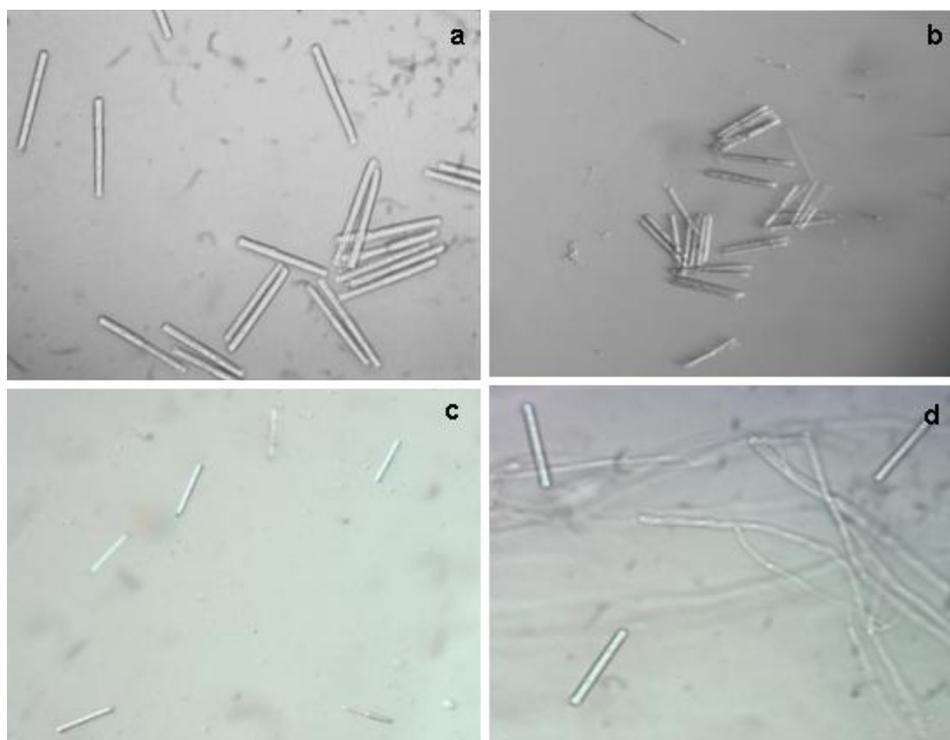


Figura No. 23. Observación de esporas asexuales (conidios) de *Cyindrocladium* al microscopio óptico a un aumento de 100X y 200X

5. DISCUSIÓN

Este estudio representa el primer trabajo a nivel nacional respecto a la validación de un método de inoculación para caracterizar la resistencia de plantines de eucalipto frente a la podredumbre radicular causada por *Calonectria* y *Nectricladiella* spp. En esta investigación se validaron métodos de inoculación citados en la literatura para esta enfermedad (Blum et al., 1994). En este sentido, el método de inoculación al sustrato resultó ser más eficiente reproduciendo la enfermedad que la inyección del hongo en la base del plantín, cuando son evaluadas los valores promedios de cada cepa en conjunto. A su vez el uso de grano de arroz como sustrato, tal como lo recomienda Hirooka et al. (2008), le otorgaría mayor estabilidad y viabilidad al hongo.

Con respecto a la interacción cepa-método de inoculación, no se identificaron diferencias significativas entre los métodos de inoculación para la cepa PG17 en ninguna de las fechas evaluadas, sin embargo, hubo diferencias significativas en el porcentaje de plantas muertas entre ambos métodos cuando fueron inoculados con la cepa PG100, para las tres fechas de evaluación.

Se comprobó que el proceso de la enfermedad depende en gran medida de la especie y de la cepa de *Calonectria*, coincidiendo con lo mencionado por Alfenas et al. (2009), siendo de gran importancia el conocimiento de la variabilidad de las poblaciones de estos hongos para el diseño de programas exitosos de mejoramiento por resistencia (Maclean et al. 1993, Bentley et al. 1994, Alfenas et al. 2011). De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, las cepas que resultaron en mayor mortandad de plantines para el clon de *E. dunnii* evaluado, pertenecen a las especies *Ca. seminaria*, *Ca. humicola*, *Ca. sulawesiensis* y una cepa del complejo *Cy. camelliae*.

Calonectria seminaria forma parte del complejo de especies de *Calonectria candelabra* que está compuesto por 16 especies encontradas mayormente en Sudamérica (Lombard et al. 2010b, Lombard et al. 2014). Castro (2015) reportó a *Ca. seminaria* causando muerte en plantines de viveros en Paysandú, Maldonado y Tacuarembó.

Calonectria humicola fue descrita por Lombard et al. (2010a) siendo reportada en plantines de *Eucalyptus* spp en Ecuador. Años más tarde, Gasparri (2013) la encontró y aisló de muestras de compost de viveros en Paysandú.

Ca sulawesiensis forma parte del complejo *Calonectria cylindrospora* junto con otras especies (Lombard et al., 2014). Gasparri (2013) la identificó en

plantines de vivero con síntomas, en algunas especies de *Eucalyptus* y en muestras de Brasil, mientras que Castro (2015) colectó muestras de esta especie en Tacuarembó.

El complejo de *Cy. camelliae* fue reportado originalmente por Boesew, citado por Farr y Rossman (2013) y hasta la fecha ha sido identificado como patógeno en *E. camaldulensis*, *E. grandis*, *E. nitens*, *E. tereticornis* y *E. urophylla* en Sudáfrica; en suelo en Australia, Brasil y Nueva Zelanda. Gasparri (2013) aisló una cepa asociada al complejo *Cy. camelliae* únicamente de compost, no encontrándose en plantines.

Por su parte, *Calonectria pauciramosa* ha sido reportada a nivel mundial en numerosas plantas hospederas inclusive en Uruguay. En África y Australia se considera uno de los patógenos dominantes de viveros, estando asociada a enfermedades tales como damping-off, tizón foliar y podredumbre de raíz y estacas (Lombard et al. 2010b, Gasparri 2013).

Por otro lado, *Cy. lageniformis*, fue reportada por primera vez en 1993 por Crous en Brasil, siendo también reportada en Sudáfrica en *Eucalyptus* spp. (Crous, 2002). Más tarde, Gasparri (2013) la aisló de muestras de compost, no encontrándola asociada a plantines en viveros en Paysandú.

En caracterización de la agresividad de cepas de *Calonectria*, las cepas PG66 y PG119 presentaron mayor porcentaje de plantas muertas (80 %) respecto a la cepa PG100 (40%) para el clon 6 de *E. dunnii*. Estos resultados no se repitieron en la caracterización de la agresividad de cepas, no encontrándose diferencias significativas entre estas cepas.

Por otro lado, la cepa PG17 tuvo un 60% de plantas muertas no presentando diferencias con las cepas más agresivas de este ensayo. Sin embargo, en el ajuste del método de inoculación, presentó solo 10% de plantas muertas, lo que puede sugerir que el método de inoculación con arroz es más eficiente en la reproducción de la enfermedad que el método al sustrato, o que se debería volver a repetir el ajuste del método de inoculación para observar si los resultados difieren o se mantienen respecto a los originales.

La cepa PG10 de *Cy. lageniformis* resultó no ser patogénica en *E. dunnii*. Esta cepa fue aislada de compost por Gasparri (2013), estos resultados estarían indicando que no representa una amenaza para esta especie. Sin embargo, se deberían realizar inoculaciones con otras cepas de esta especie para comprobar la patogenicidad de la especie y a su vez evaluar en otro germoplasma para verificar que no haya sido coincidencia de que los tres germoplasmas evaluados presentaban excelente resistencia a esta cepa.

En la caracterización de resistencia genética de clones de *E. dunnii* y *E. grandis*, cuando se evaluó el promedio de clones para todas las cepas, se evidenció una interacción cepa-especie y cepa-clon (en *E. grandis*), el conocimiento de esta interacción es muy importante en el diseño de programas de mejoramiento genético o en la evaluación de germoplasma, debido a que se deben evaluar varios genotipos de eucalipto y varias cepas del patógeno para obtener resultados acertados y coherentes respecto a lo que se evalúa. Por tal razón quizá, algunos autores como Ferreira (1989) no recomiendan el control por resistencia genética para el control de estas enfermedades en vivero obtenida a través de inoculaciones artificiales, debido a que existe un gran número de especies de *Calonectria* asociadas a la enfermedad.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre clones para la cepa PG100, lo que podría sugerir que esta cepa es patogénica tanto para *E. grandis* como para *E. dunnii*.

Los síntomas de la enfermedad observados correspondieron a los descritos por diferentes autores, consistiendo en podredumbre de raíz y lesiones en el tallo (Crous 2002, Alfenas et al. 2015, Lombard et al. 2015a). Los signos de *Cylindrocladium* que se observaron sobre los tejidos lesionados de las plantas, y bajo lupa estereoscópica y microscopio óptico coincidieron a los descritos por Sharma et al. (1984), Rattan y Dhanda (1985), Alfenas et al. (2004), consistiendo en una esporulación de color blanco brillante correspondiente a las estructuras asexuales en conidios y conidióforos del hongo.

El conocimiento de un método de inoculación artificial que sea eficaz para la reproducción de la enfermedad en condiciones controladas, representa un aporte significativo para los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, en este trabajo hubieron resultados no consistentes que podrían explicarse por haber ocurrido una falla en la preparación del inóculo. Por tal razón se debería volver a preparar el inóculo para aquellas cepas en donde no se obtuvieron resultados consistentes. Otro motivo pudo haber sido la insuficiente colonización del arroz como fuente de inóculo, pudiéndose comprobar esto en la observación de la coloración del arroz. Esto refleja la importancia de contar con un inóculo de buena calidad, que asegure posteriormente una buena colonización del mismo en la planta, y la reproducción de la enfermedad en los casos donde la cepa sea patogénica, y permitiendo obtener resultados acordes a los objetivos planteados.

En futuros experimentos se podría implementar la determinación de la concentración de inóculo adecuada para la reproducción de la enfermedad tal como lo recomiendan algunos autores que han centrado sus estudios en la

determinación de una concentración óptima de conidios y micelio de *Cylindrocladium* para una inoculación eficiente. Reis y Chaves (1967), Rattan et al. (1983) definieron como concentración óptima aquella que no minimiza ni maximiza el daño de la enfermedad, reportando que las concentraciones en torno a los 2 a 3×10^5 conidios/mL serían las adecuadas para evaluar el daño por manchas foliares causado por *Cylindrocladium* en *Eucalyptus* spp, de lo contrario, concentraciones menores o superiores dificultan la expresión de la resistencia real.

Por otro lado, Blum et al. (1994) determinaron que aquellas suspensiones cuya concentración era del orden de 3×10^5 conidios/mL resultaban óptimas para describir específicamente el daño por vuelco causado por *Cylindrocladium clavatum* y *Cylindrocladium scoparium* e identificar distintos niveles de susceptibilidad de *Eucalyptus* spp.

La patogenicidad de *Calonectria* y *Nectriadiella* en *Eucalyptus* ha sido comprobada por muchos autores en sus trabajos de investigación, como los mencionados en la revisión bibliográfica, comprobándose esto en el presente trabajo. La metodología aquí descrita puede ser utilizada para realizar inoculaciones de nuevas cepas que ingresen a la colección y así poder caracterizar su agresividad, como también para poder inocular otros germoplasmas y poder conocer la resistencia frente a distintas especies de este importante patógeno.

6. CONCLUSIONES

Se logró ajustar dos métodos de inoculación al sustrato, donde el método de inoculación con arroz resultó más eficaz en la reproducción de la enfermedad.

A excepción de *Cy. lageniformis*, todas las especies representadas en la colección analizada presentaron al menos una cepa con alta agresividad, observándose a su vez diferencias significativas en la agresividad de cepas dentro de una misma especie.

La susceptibilidad de los clones analizada en el contraste de especies de *E. grandis* y *E. dunnii* frente a las cepas PG66 y PG100 no presentó diferencias significativas. Sin embargo, estos clones de *E. dunnii* resultaron ser más susceptibles a los de *E. grandis* frente a la cepa PG119 (*Ca. sulawesiensis*).

En la evaluación de la totalidad los clones, el clon 6 de *E. dunnii* resultó ser el más afectado, presentando un 40% de plantas muertas, mientras que el clon 3 de *E. grandis* fue el menos afectado con un 13% existiendo entre dichos clones diferencias significativas.

En la caracterización de la resistencia genética de clones de *E. dunnii* y *E. grandis*, la presencia de interacciones cepa-especie resulta de importancia a la hora de generar un programa de mejoramiento genético, debido a que se debe evaluar el comportamiento de determinado genotipo de eucalipto frente a varias cepas para obtener resultados consistentes.

El clon 6 de *E. dunnii*, podría seguir siendo utilizado en futuras investigaciones relacionadas a *Calonectria*, como un clon de conocida susceptibilidad.

7. RESUMEN

El género *Calonectria* y *Nectricladiella* incluye a patógenos de gran importancia por los severos daños que causa en plantines de vivero y en plantaciones jóvenes de eucaliptos a campo. Actualmente existen trabajos que centraron sus objetivos en caracterizar y describir las especies presentes en Uruguay mediante el uso de técnicas moleculares, sin embargo no existe en el país información acerca de un método de inoculación de este patógeno en el género *Eucalyptus*, siendo esto uno de los objetivos de este estudio. A su vez se buscó caracterizar la agresividad de distintas cepas de *Calonectria* y *Nectricladiella* en clones de *Eucalyptus dunnii* y *Eucalyptus grandis*, y explorar la presencia de resistencia genética en estos clones. Para cumplir con estos objetivos se subdividió la actividad en tres etapas. Una primera etapa donde se probaron dos técnicas de inoculación, una al sustrato y otra por inyección, en un clon de *Eucalyptus dunnii* de conocida susceptibilidad. Una segunda etapa en la cual se evaluaron 19 cepas de la colección de *Calonectria* y *Nectricladiella* de la Estación Experimental Mario A. Cassinoni, Laboratorio de Fitopatología, en el mismo clon de *E. dunnii*, para determinar las tres más agresivas. Y por último, una tercera etapa en la que se inocularon las cepas que presentaron mayor porcentaje de plantas muertas en la caracterización de la agresividad (PG 66 y PG 119) y la cepa PG100 por su comportamiento en el ajuste del método de inoculación, en tres clones de *E. dunnii* y tres clones de *E. grandis*. Se obtuvo como resultado que el método de inoculación al sustrato con arroz fue el que más se adaptó a la reproducción de la enfermedad. Por otra parte, se pudo observar que en todas las especies representadas en la colección en estudio, hay cepas de alta agresividad, a excepción de *Cy. lageniformis* que no causó enfermedad en los plantines inoculados. El ajuste de un método de inoculación artificial que permita reproducir la enfermedad, representa un gran aporte para el manejo sanitario forestal y para los programas de mejoramiento genético por resistencia a esta enfermedad.

Palabras clave: *Cylindrocladium*; *Cylindrocladiella*; *Calonectria*; *Nectricladiella*; *Nectriaceae*; *Eucalyptus dunnii*; *Eucalyptus grandis*; Método de inoculación; Agresividad; Resistencia genética.

8. SUMMARY

The genus *Calonectria* and *Nectricladiella* includes pathogens of great importance because of the severe damage that causes in seedlings of nursery and in young plantations of *Eucalyptus*. Previous studies have characterized and described the *Calonectria* species present in Uruguay through the use of molecular techniques. However, there is no precedents in the country with regards to a method of inoculation of this pathogen in the genus *Eucalyptus*, this being one of the objectives of this study. In turn it was sought to characterize the aggressiveness of different strains of *Calonectria* and *Nectricladiella* in clones of *Eucalyptus dunnii* and *Eucalyptus grandis*, and to explore the presence of genetic resistance in these clones. In order to meet these objectives, the activity was subdivided into three steps. In the first step two inoculation techniques were tested, one to the substrate and one by injection of spore suspension in a clone of *Eucalyptus dunnii* of known susceptibility. A second step in which 19 strains of the collection of *Calonectria* and *Nectricladiella* of the laboratory of Pathology of the Experimental station Mario A. Cassinoni, were evaluated in the same clone of *E. dunnii*, to determine the three most aggressive ones. And finally, a third stage in which strains were inoculated that showed a higher percentage of dead plants in the characterization of aggression, in three clones of *E. dunnii* and three clones of *E. grandis*. It was obtained as a result that the method of inoculation to the substrate with rice was the most adapted to the reproduction of the disease. On the other hand, it was observed that in all the species represented in the collection under study, there are strains of high aggressiveness, except for *Cy. Lageniformis* that did not cause disease in the inoculated seedlings. The adjustment of an artificial inoculation method that allows to reproduce the disease, represents a great contribution for the forest sanitary management and for the programs of genetic improvement by resistance to this disease.

Keywords: *Cylindrocladium*; *Cylindrocladiella*; *Calonectria*; *Nectricladiella*; *Nectriaceae*; *Eucalyptus dunnii*; *Eucalyptus grandis*; Method of inoculation; Aggressiveness; Genetic resistance.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Alfenas, A. C. 1986. Fungos do genero *Cylindrocladium* como patógenos florestais no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. 11: 275-277.
2. _____.; Ferreira, F. A.; Barbosa, M. M.; Demuner, N. L.; Carvalho, A. O. 1988. Fungos associados e estacas de eucalipto para enraizamento. *Fitopatologia Brasileira*. 13: 149-157.
3. _____.; Zauza, E. A.; Mafia, R. G.; Assis, T. F. 2004. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa, UFV. 243 p.
4. _____.; _____.; _____.; _____. 2009. Clonagem e doenças do eucalipto. 2^a. ed. Viçosa, UFV. s.p.
5. _____.; Ferreira, M. A.; Alfenas, R. F. 2011. Impacts of emerging diseases and their control in the cultivation of *Eucalyptus*. *Phytopathology*. 2: 115-127.
6. _____. 2013. *Calonectria metrosideri*, a highly aggressive pathogen causing leaf blight, root rot, and wilt of *Metrosideros* spp. in Brazil. *Forest Pathology*. 43:257-265.
7. Alfenas, R. F.; Pereira, O. L.; Freitas, C. S.; Dita, M. A. D.; Alfenas, A. C. 2013. Mass spore production and inoculation of *Calonectria pteridis* on *Eucalyptus* spp. under different environmental conditions. *Tropical Plant Pathology*. 38: 406-413.
8. _____.; Lombard, L.; Pereira, O. L. 2015. Diversity and potential impact of *Calonectria* species in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Studies in Mycology*. 80: 89–130.
9. Almeida, O. C.; Bolkan, H. A. 1981. Ocorrência e distribuição do genero *Cylindrocladium*. *Fitopatologia Brasileira*. 6: 223-228.
10. Anderson, P. J. 1918. Rose canker and its control. Massachusetts Agricultural Experiment Station Bulletin. 183: 11–46.
11. Arentz, F. 1991. Forest nursery diseases in Papua New Guinea. In: Meeting of IUFRO Working Party (1st., 1991, Victoria, British Columbia, Canada). Disease and Insects in forest nurseries; proceedings. Victoria, s.e. pp. 97-99.

12. Baldini, A.; Carballo, R.; Telechea, N.; Porcile, J. 2006. Manual de campo. Plagas y enfermedades de eucaliptos y pinos en el Uruguay. (en línea). Montevideo, s.e. 167 p. Consultado 28 abr. 2017. Disponible en http://agris.fao.org/agris-search/search.do;jsessionid=F744EEC3B094D917998646623B5208CB?request_locale=ru&recordID=XF2006427777&query=&sourceQuery=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=¢erString=&enableField
13. Barnard, E. L. 1981. *Cylindrocladium scoparium* on *Eucalyptus* spp. *Phytopathology*. 71: 201-202.
14. _____. 1984. Occurrence, impact, and fungicidal control of girdling stem cankers caused by *Cylindrocladium scoparium* on *Eucalyptus*. *Plant Disease*. 68: 471-473.
15. Bensch, K. 2017. Fungal Databases Nomenclature & Species Banks. (en línea). Utrecht, MycoBank. s.p. Consultado 18 abr. 2017. Disponible en <http://www.mycobank.org/quicksearch.aspx>
16. Bentley, S.; Pegg, K. G.; Dale, J. L. 1994. Optimization of RAPD-PCR fingerprinting to analyse genetic variation within populations of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*. 142: 64-78.
17. Bettiol, W.; Auer, C. G.; Camargo, L. E. A.; Klimati, H. 1988. Control of leaf spot induced by *Cylindrocladium* on *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* with *Bacillus* spp. *Phytopathology*. 14: 210-218.
18. Blum, L. E. B.; Dianese, J. C. 1993. Susceptibility of different *Eucalyptus* genotypes to artificial leaf-inoculation with *Cylindrocladium scoparium* and *C. clavatum*. *Phytopathology*. 23: 276–280.
19. _____.; _____.; Ferreira, B. R. S. 1994. Padronização da metodologia para a avaliação da resistência de eucalipto ao tombamento e a mancha foliar causados por *Cylindrocladium*. *Fitopatologia Brasileira*. 19:11-16.
20. Boedijn, K. B.; Reitsma, J. 1950. Notes on the genus *Cylindrocladium*. *Reinwardtia*. 1: 51-60.

21. Boesewinkel, H. J. 1982. *Cylindrocladiella*, a new genus to accommodate *Cylindrocladium parvum* and other small-spored species of *Cylindrocladium*. Canadian Journal of Botany. 60: 2288-2294.
22. Bolland, L.; Tierney, B. J. 1985. Studies on leaf spot and shoot blight of *Eucalyptus* caused by *Cylindrocladium quinqueseptatum*. European Journal of Pathology. 15: 385-397.
23. Bolland, D. J.; Brooker, M. I. H.; Chippendale, G. M.; Hall, N.; Hilland, B. P. M.; Johnston, R. D.; Kleining, D. A.; Turner, J. D. 1987. Forest trees of Australia. Melbourne, CSIRO. Nelson. 4th. ed., 2nd. reimpr. 687 p.
24. Brown, B. N.; Ferreira, F. A. 2002. Disease during propagation of eucalypts. In: Keane, P. J.; Kile, G. A.; Podger, F. D.; Brown, B. N. eds. Diseases and pathogens of eucalypts. Melbourne, CSIRO. pp. 119-143.
25. Brussa, C. A. 1994. *Eucalyptus*; especies de cultivo más frecuente en Uruguay y regiones de clima templado. Montevideo, Hemisferio Sur. 314 p.
26. Carvalho, A. O.; Alfenas, A. C.; Demuner, N. L. 1989. Patogenicidade de fungos isolados de estacas de eucalipto para enraizamento em casa de vegetação. Fitopatologia Brasileira. 14: 222-224.
27. Carvalho Filho, M. 2008. *Trichoderma* spp. como agentes de controle de *Cylindrocladium scoparium* e como promotores de crescimento em mudas de eucalipto. 86f. Dissertação Mestrado em Fitopatologia. Brasília, Brasil. Universidade de Brasília. pp. 15-25.
28. Castro, P. 2015. Identificación de especies de *Calonectria* (*Cylindrocladium*) asociadas a la muerte de plantines de *Eucalyptus* en plantaciones comerciales. Tesina de grado Licenciatura en Bioquímica. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Ciencias. 25 p.
29. Crous, P. W.; Wingfield, M. J.; Koch, S. H. 1990. New and interesting records of South African fungi. Phytopathology 56: 583-586.
30. _____; Phillips, A. J. L.; Wingfield, M. J. 1991. The genera *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella* in South Africa, with special reference of forestry nurseries. Phytopathology. 157: 69-85.

31. _____.; _____.; _____. 1992. Effects of cultural conditions on vesicle and conidium morphology in species of *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella*. *Mycologia*. 84: 497-504..
32. _____.; Wingfield, M. J. 1993. A re-evaluation of *Cylindrocladiella*, and a comparison with morphologically similar genera. *Mycological Research*. 97: 433-448.
33. _____.; _____. 1994. A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphs of *Calonectria*. *Mycotaxon*. 51: 341-435
34. _____.; Peerally, A. 1996. *Gliocladiopsis* irregular sp. nov. and notes on *Cylindrocladium* *spathiphylli*. *Mycotaxon*. 58: 119-128.
35. _____.; Alfenas, A. C.; Junghans, T. G. 1998. Variability within *Calonectria ovate* and its anamorph *Cylindrocladium ovatum*. *Phytopathology*. 50: 1–13.
36. _____.; Kang, J. C. 2001. Phylogenetic of *Calonectria spathulata* and *Cylindrocladium leucothoes* based on morphology, and sequence data of the β -tubulin and ITS rRNA genes. *Mycoscience*. 42: 57-57.
37. _____. 2002. Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera. s.n.t. 294 p.
38. Chase, A. R. 1992. Influence of surface-disinfestation procedures and tissue storage on isolation of *Cylindrocladium* spp. from leatherleaf fern fronds. *Phytopathology*. 68: 514-516.
39. Chen, S. F.; Lombard, L.; Roux, J.; Xie, Y. J.; Wingfield, M. J; Zhou, X. D. 2011. Novel species of *Calonectria* associated with *Eucalyptus* leaf blight in Southeast China. *Phytopathology*. 26:1-12.
40. Doughty, R. W. 2000. *The Eucalyptus; a natural and commercial history of the gum tree*. Baltimore, The Johns Hopkins University. 321 p.
41. Farr, D. F.; Rossman, A. Y. 2013. Fungal databases. systematic mycology and microbiology laboratory. (en línea), Maryland, USDA. s.p. Consultado 14 oct. 2017. Disponible en <http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases>

42. Ferreira, F. A. 1989. Patologia florestal; principais doenças florestais no Brasil. Vicosá, MG, s.e. 570 p.
43. _____.; Muchovej, J. J. 1991. Disease of forest nurseries in Brazil. In: Meeting of IUFRO Working Party (1st., 1990, Victoria, British Columbia, Canada). Disease and Insects in forest nurseries; proceedings. Victoria, s.e. pp. 17-23.
44. _____.; Alfenas, A. C.; Moreira, A. M.; Demuner, N. L. 1995. Mancha de *Ca. pteridis* doença foliar de eucalipto em áreas tropicais brasileiras. Fitopatologia Brasileira. 20: 107-110.
45. Fonseca, S. M.; Resende, M. D. V.; Alfenas, A. C.; Guimaraes, L. M. S.; Assis, T. F.; Grattapaglia, D. 2010. Manual prático de melhoramento genético do eucalipto. Viçosa, UFV. 220 p.
46. Gasparri, P. 2013. Identificación molecular de especies de *Calonectria* (*Cylindrocladium*) y *Cylindrocladiella* presentes en viveros de eucalipto. Tesina para optar por el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas. Paysandú, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Ciencias. 25 p.
47. Golfari, L. 1985. Distribución regional y condiciones ecológicas de los eucaliptos cultivados en la Argentina; problemas inherentes. Buenos Aires, CIEF. 19 p. (Publicación técnica no. 1).
48. Gomes, N. S. B.; Grigolettijr, A.; Auer, C. G. 2001. Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. Boletim de Pesquisa Florestal. 43: 123-138.
49. Graça, R. N.; Alfenas, A. C.; Maffia, L. A. 2009. Factors influencing infection of eucalypts by *Cylindrocladium pteridis*. Phytopathology. 58: 971–981
50. Grattapaglia, D.; Vaillancourt, R. E.; Shepherd, M.; Thumma, B. R.; Foley, W.; Kulheim, C.; Potts, B.M.; Myburg, A. A. 2012. Progress in *Myrtaceae* genetics genomics. Phytopathology. 8: 463-508.
51. Graves, A. H. 1915. Root rot of coniferous seedlings. Phytopathology. 5: 213–217.

52. Hall, N.; Johnston, R. D.; Marryat, R. 1963. The natural occurrence of the eucalypts. Canberra, Forest Research Institute. 122 p. (Leaflet no. 65).
53. Hirooka, Y.; Takeuchi, J.; Horie, H.; Natsuaki, K. T. 2008. *Cylindrocladium* brown leaf spot on *Howea belmoreana* caused by *Calonectria ilicicola* (anamorph: *Cylindrocladium parasiticum*) in Japan. *Journal of General Plant Pathology*. 74: 66–70.
54. Hunter, B.; Barnett, H. 1978. Growth and sporulation of species and isolates of *Cylindrocladium* in culture. *Mycologia* 70: 614-635.
55. Jacobs, R. 1981. El *Eucalyptus* en la repoblación forestal. (en línea) Roma, FAO. pp. 1 – 50. Consultado dic. 2016. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/004/AC459S/AC459S00.htm>
56. Jayashree, M. C.; Nair, J. M.; Deo, A. D.; Ramaswamy, V. 1986. Relative susceptibility of various eucalypt provenances to *Cylindrocladium* blight. In: Sharma, J. K.; Nair C. T. S.; Kedharnath, S.; Kondas, S. eds. *Eucalyptus* in India; past, present and future. Kerala, Kerala Forest Research Institute. pp. 395-399.56. Kelly, S.; Chippendale, G. M.; Johnston, R. D. 1983. *Eucalyptus*. Victoria, s.e. 368 p.
57. Kelly, S.; Chippendale, G. M.; Johnston, R. D. 1983. *Eucalyptus*. Victoria, s.e. 368 p.
58. Kozlowski, T. T. 1969. Tree physiology and forest pests. *Journal of Forestry*. 67: 118-123.
59. Kunieda-de-Alonso, S. 1997. *Trichoderma longibrachiatum* and *T. inhamatum* as biocontrol agents of blight on *Eucalyptus* cutting PhD. Dissertation. Viçosa, Brazil. Universidade Federal de Viçosa. pp. 16-26.
60. Lombard, L.; Crous, P. W.; Wingfield, B. D.; Wingfield, M. J. 2010a. Phylogeny and systematics of the genus *Calonectria*. *Studies in Mycology*. 66: 31– 69.
61. _____; _____; _____. 2010b. Species concepts in *Calonectria* (*Cylindrocladium*). *Studies in Mycology*. 66: 15-30.

62. _____.; _____.; Wingfield, M. J. 2010c. Species concepts in *Calonectria* (*Cylindrocladium*). *Studies in Mycology*. 66: 1-14.
63. _____.; Polizzi, G.; Guarnaccia, V. 2011. *Calonectria* spp. causing leaf spot, crown and root rot of ornamental plants in Tunisia. *Persoonia*. 27:73–79.
64. _____.; Shivas, R. G.; To-anun, C.; Crous, P. W. 2012. Phylogeny and taxonomy of the genus *Cylindrocladiella*. *Studies in Mycology*. 11: 835-868.
65. _____.; Chen, S. F.; Mou, X.; Zhou, X. D.; Crous, P. W.; Wingfield, M. J. 2014. New species, hyper-diversity and potential importance of *Calonectria* spp. from *Eucalyptus* in South China. *Studies in Mycology*. 80: 151-188.
66. _____.; _____.; _____. 2015. New species, hyper-diversity and potential importance of *Calonectria* spp. from *Eucalyptus* in South China. *Studies in Mycology*. 80: 151–188.
67. Maclean, D. J.; Braithwaite, K. S.; Manners, J. M.; Irwin, J. A. G. 1993. How so we identify and classify fungal plant pathogens in the era of DNA analysis. *Phytopathology*. 10: 207-269.
68. MGAP. OPYPA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Oficina de Programación y Política Agropecuaria, UY). 2016. Cadena forestal; el desafío del crecimiento sostenible. (en línea). Anuario OPYPA 2016: 489-537. Consultado 18 abr. 2017. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-opypa>
69. Mohanan, C.; Sharma, J. K. 1985. *Cylindrocladium* causing seedling diseases of *Eucalyptus* in Kerala. *Phytopathology*. 84: 538-539.
70. _____.; _____. 1986. Epidemiology of *Cylindrocladium* diseases of *Eucalyptus*. In: Sharma, J. K.; Nair C. T. S.; Kedharnath, S.; Kondas, S. eds. *Eucalyptus* in India; past, present and future. Kerala, Kerala Forest Research Institute. pp. 388-394.
71. Morgan, A. P. 1892. Two new genera of *Hypomyces*. *Botanical Gazette*. 17: 190-192.

72. Natarajan, K.; Govindasamy, V. 1990. Trends in mycorrhizal research. In: The National Conference on Mycorrhiza (1st., 1990, Hisar, India). Proceedings. Hisar, s.e. pp. 137-140.
73. Peerally, A. 1991. The classification and phytopathology of *Cylindrocladium* species. *Mycotaxon*. 40: 366-367.
74. Potts, B. M.; Dungey, H. S. 2004. Interspecific hybridization of eucalypts; key issues for breeders and geneticists. *New Forests*. 27: 115–138.
75. Prakash, M. G.; Gurumunthi, K. 2010. Effects of type of explants and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 100:13-20.
76. Pryor, L. D. 1976. Biology of eucalypts. London, s.e. 82 p. (Studies in Biology no. 61).
77. _____. 1981. Australian endangered species; eucalypts. Sydney, Australian, National Parks and Wildlife Service. 139 p. (Studies in Biology, special publication no. 5).
78. Pulrolnik, K.; Reis, M. G. F.; Monte, M. A.; Fontan, I. C. I. 2005. Crescimento de plantas de clone de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) submetidas a diferentes tratamentos de desrama artificial, na regio do cerrado. *Revista Árvore*. 29: 495-505.
79. Rattan, G. S.; Dhanda, R. S.; Randhawa, H. S. 1983. Studies on *Cylindrocladium clavatum*. *Indian Forester*. 100: 562-565.
80. _____.; _____. 1985. Leaf blight and seedling diseases of eucalypt caused by *Cylindrocladium* spp. in Punjab. *Annals of Biology*. 1: 184-188.
81. Reis, M. S.; Chavez, G. M. 1967. Estudo de tombamento de mudas de eucalipto incitado por *Cylindrocladium scoparium* Margan. *Phytopathology*. 7: 1-46.
82. Rossman, A. Y. 1979. *Calonectria* and its type species. *Mycotaxon*. 8: 321-328.

83. _____. 1983. The phragmosporous species of *Nectria* and related genera. *Mycological Papers*. 150: 1-164.
84. _____.; Samuels, G. J.; Rogerson, C. T. 1999. Genera of *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae* and *Nectriaceae* (*Hypocreales*, *Ascomycetes*). *Studies in Mycology*. 42: 1–248.
85. Roth, D. A.; Griffin, G. J.; Graham, P. J. 1979. Low temperature induces decreased germinability of *Cylindrocladium microsclerotia*. *Canadian Journal of Microbiology*. 25: 157-162.
86. Scattolin, L.; Montecchio, L. 2007. First report of damping-off of common oak plantlets caused by *Cylindrocladiella parva* in Italy. *Plant Disease*. 91:771.
87. Schoch, C. L.; Crous, P. W.; Wingfield, M. J.; Wingfield, B. D. 2000. Phylogeny of *Calonectria* and selected hypocrealean genera with cylindrical macroconidia. *Studies in Mycology*. 45: 45-62.
88. _____.; _____.; _____.; _____. 2001. Phylogeny of based on comparisons of B-Tubulin DNA sequences. *Mycological Research*. 105: 1045-1052.
89. Sharma, J. K.; Mohanan, C.; Florence, E. J. M. 1984. Nursery disease of *Eucalyptus* in Kerala. *Forest Pathology*. 14: 77-89.
90. _____.; _____.; _____. 1985. Disease survey in nurseries and plantations of forest tree species grown in Kerala. Kerala Forest Research Institute. Research Report no. 36. s.p
91. _____.; _____. 1992. Relative susceptibility of *Eucalyptus* provenances to *Cylindrocladium* leaf blight in Kerala, India. *European Journal of Forest Pathology*. 22: 257-265.
92. Sobers, E. K. 1968. Morphology and host range of *Cylindrocladium pteridis*. *Phytopathology*. 58: 1265–1270.
93. _____.; Littrell, R. H. 1974. Pathogenicity of three species of *Cylindrocladium* to select hosts. *Phytopathology*. 58: 1017-1019.
94. Sung, J. M.; Park, J. H.; Lee, S. C.; Chung, B. K. 1980. The outbreak and propagule formation of black root rot caused by *Calonectria crotalariae* in Korea. *Phytopathology*. 19: 228-233.

95. Taylor, J. D.; Griffin, G. J.; Garren, K. H. 1981. Inoculum pattern, inoculums density disease incidence relationships and population fluctuations of *Cylindrocladium crotalariae* microsclerotia in peanut field soil. *Phytopathology*. 71: 1297-1302.
96. Torre, F.; Rodriguez, R.; Jorge, G.; Villar, B.; Otero, R. A.; Grimapettenati, J. G.; Gallego, P. P. 2014. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* using the vascular specific EgCCR as an alternative to the constitutive CaMV35S Promoter. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 117:77–84.
97. Uruguay XXI. Instituto de Promoción de Inversiones y Exportaciones de Bienes y Servicios. 2016. Informe del sector forestal en Uruguay. (en línea). Montevideo. pp. 1-35. Consultado oct. 2016. Disponible en <http://www.uruguayxxi.gub.uy/es/informe-sector-forestal/>
98. Van Coller, G. J.; Denman, S.; Groenewald, J. Z.; Lamprecht, S. C.; Crous, P. W. 2005. Characterisation and pathogenicity of *Cylindrocladiella* spp. associated with root and cutting rot symptoms of grapevines in nurseries. *Australasian Plant Pathology*. 34:489-498.

10. ANEXOS

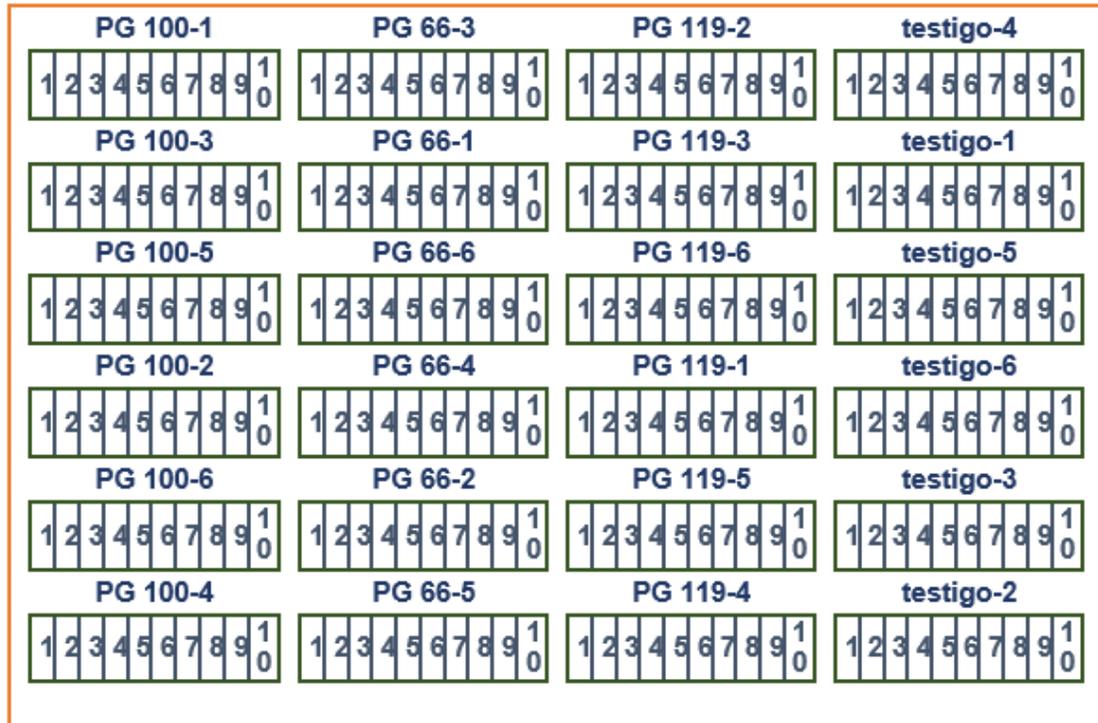
Anexo No. 1. Diseño experimental del ajuste del método de inoculación

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Tratamiento IV (cepa No. 17, "inyección") | | | | | | | | | | Tratamiento I (cepa No. 17, "al sustrato") | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| Tratamiento III (A. estéril, "al sustrato") | | | | | | | | | | Tratamiento II (cepa No. 100, "inyección") | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| Tratamiento VI (A. estéril, "al sustrato") | | | | | | | | | | Tratamiento V (cepa No. 100, "al sustrato") | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |

Anexo No. 2. Diseño experimental de la caracterización de la agresividad de la colección de cepas de *Calonectria* y *Cylindrocladiella* de la EEMAC. Laboratorio de Fitopatología

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| PG 10 | | | | | | | | | | PG 116 | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| PG 14 | | | | | | | | | | testigo | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| PG 58 | | | | | | | | | | PG 62 | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| PG 19 | | | | | | | | | | PG 91 | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| PG 66 | | | | | | | | | | PG 20 | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| PG 52 | | | | | | | | | | PG 92 | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| PG 25 | | | | | | | | | | PG 112 | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| PG 53 | | | | | | | | | | PG 118 | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| PG 100 | | | | | | | | | | PG 115 | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| | | | | | | | | | | PG 17 | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |

Anexo No. 3. Diseño experimental de la caracterización de la resistencia genética de clones de *Eucalyptus dunnii* y *Eucalyptus grandis*



Anexo No. 4. Análisis estadístico de los datos del ajuste del método de inoculación, a través del sistema SAS (Statistical Analysis System), se utilizó como procedimiento de análisis the GENMOD Procedure, la separación de medias de las variables evaluadas se hizo a través de least squares means

| Distribución | Binomial |
|-----------------------------|----------|
| Link funcion | Logit |
| Number of Observations Read | 120 |
| Number of Observations Used | 120 |
| Number of Events | 14 |
| Number of Trial | 120 |

| Días pos inoculación | Pr > z ($\alpha=0,05$) | Método de inoculación | |
|----------------------|----------------------------|-----------------------|-----------|
| | | Sustrato | Inyección |
| 38 | 0.0239 | A | B |
| 69 | 0.0041 | A | B |
| 87 | 0.0026 | A | B |

| Días pos inoculación | Cepa | Medias ($\alpha=0,05$) |
|----------------------|---------|--------------------------|
| | PG 100 | 0,2207 A |
| 38 | PG 17 | 0,07996 A |
| | Testigo | 1,05E-12B |

Contraste de cepas a los 38 días

| Cepa | Pr > z ($\alpha=0,05$) |
|----------------|----------------------------|
| PG 100-PG 17 | 0.0757 |
| PG 100-Testigo | <.0001 |
| PG 17 -Testigo | |

| Días pos inoculación | Cepa | Medias ($\alpha=0,05$) |
|----------------------|---------|--------------------------|
| | PG 100 | 0,2838 A |
| 69 | PG 17 | 0,06987 B |
| | Testigo | 9,26E-13 C |

Contraste de cepas a los 69 días

| Cepa | Pr > z ($\alpha=0,05$) |
|----------------|----------------------------|
| PG 100-PG 17 | 0.0129 |
| PG 100-Testigo | <.0001 |
| PG 17 -Testigo | |

| Días pos inoculación | Cepa | Medias ($\alpha=0,05$) |
|----------------------|---------|--------------------------|
| | PG 100 | 0,2806 A |
| 87 | PG 17 | 0,08744 B |
| | Testigo | 9,06E-13 C |

| Contraste de cepas a los 87 días | |
|----------------------------------|----------------------------|
| Cepa | Pr > z ($\alpha=0,05$) |
| PG 100-PG 17 | 0.0264 |
| PG 100-Testigo | <.0001 |
| PG 17-Testigo | |

Anexo No. 5. Análisis estadístico de los datos de la caracterización de la agresividad de la colección de cepas de *Calonectria* y *Cylindrocladiella* a través del sistema SAS (Statistical Analysis System), se utilizó como procedimiento de análisis the GENMOD procedure, la separación de medias de las variables evaluadas se hizo a través de least squares means

| Distribucion | Binomial |
|-----------------------------|----------|
| Link funcion | Logit |
| Number of Observations Read | 15 |
| Number of Observations Used | 15 |
| Number of Events | 83 |
| Number of Trial | 150 |

| Cepas | Medias ($\alpha= 0,05$) |
|--------|---------------------------|
| PG25 | 0.8 A |
| PG58 | 0.8 A |
| PG66 | 0.8 A |
| PG119 | 0.8 A |
| PG14 | 0.7 AB |
| PG53 | 0.7 AB |
| PG 17 | 0.6 ABC |
| PG20 | 0.6 ABC |
| PG62 | 0.6 ABC |
| PG52 | 0.5 ABC |
| PG91 | 0.5 ABC |
| PG115 | 0.5 ABC |
| PG92 | 0.4 ABC |
| PG 100 | 0.4 ABC |
| PG118 | 0.4 ABC |
| PG19 | 0.3 BC |
| PG112 | 0.2 C |
| PG116 | 0.2 C |
| PG10 | -- |

Anexo No. 6. Análisis estadístico de los datos de la caracterización de resistencia genética de clones de *E. dunnii* y *E. grandis*, a través del sistema SAS (Statistical Analysis System), se utilizó como procedimiento de análisis the GENMOD procedure, la separación de medias de las variables evaluadas se hizo a través de least squares means

| Distribucion | Binomial |
|-----------------------------|----------|
| Link funcion | Logit |
| Number of Observations Read | 24 |
| Number of Observations Used | 24 |
| Number of Events | 51 |
| Number of Trial | 240 |

| Cepa | Medias ($\alpha= 0,05$) |
|---------|---------------------------|
| PG 100 | 0,3736 A |
| PG 66 | 0,2027 AB |
| PG 119 | 0,1863 AB |
| Testigo | 0,04455 B |

PG 100

| Distribucion | Binomial |
|-----------------------------|----------|
| Link funcion | Logit |
| Number of Observations Read | 6 |
| Number Observation Used | 6 |
| Number of Events | 23 |
| Number of Trial | 60 |

| Clon | Medias ($\alpha= 0,1$) |
|------|--------------------------|
| 1 | 0,3 A |
| 2 | 0,4 A |
| 3 | 0,2 A |
| 4 | 0,5 A |
| 5 | 0,4 A |
| 6 | 0,5 A |

| Contraste | Pr > ChiSq ($\alpha= 0,1$) |
|---------------------------|------------------------------|
| clon 1+2+3 vs. clon 4+5+6 | 0,686 |

PG 119

| Distribucion | Binomial |
|-----------------------------|----------|
| Link funcion | Logit |
| Number of Observations Read | 6 |
| Number Observation Used | 6 |
| Number of Events | 12 |
| Number of Trial | 60 |

| Contraste | Pr > ChiSq ($\alpha= 0,1$) |
|---------------------------|------------------------------|
| clon 1+2+3 vs. clon 4+5+6 | <.0001 |

PG66

| Distribucion | Binomial |
|-----------------------------|----------|
| Link funcion | Logit |
| Number of Observations Read | 6 |
| Number Observation Used | 6 |
| Number of Events | 13 |
| Number of Trial | 60 |

| Contraste | Pr > ChiSq ($\alpha=0,1$) |
|---------------------------|-----------------------------|
| clon 1+2+3 vs. clon 4+5+6 | 0,1864 |