

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

VARIABILIDAD POBLACIONAL DE *Teratosphaeria gauchensis* EN URUGUAY

por

Tomás DALLA RIZZA AISHEMBERG

Lucía VILLAGRÁN TRUJILLO

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

MONTEVIDEO

URUGUAY

2016

Tesis aprobada por:

Director:

---

Dr. Guillermo Pérez

---

Dr. Ing. Agr. Carlos Pérez

---

Dr. Ing. Agr. Sandra Alaniz

Fecha:

4 de abril de 2016

Autor:

---

Tomás Dalla Rizza

---

Lucía Villagrán

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia y mi novia, que me acompañaron a lo largo de toda la carrera. A mis amigos, Santi y Puche, que fueron mi grupo de estudio en todos los años de facultad.

Tomás

A mi familia que me apoyó en todos mis años de carrera y a mis compañeras de estudio: Emily, Vale, Vicky, Marti y Ale.

Lucía

Agradecemos también a Guillermo Pérez por guiarnos y mantener el entusiasmo a lo largo del estudio. A Lorena, Juan Carlos, Natalia y Leonardo por auxiliarnos en todo momento a lo largo de la tesis. A INIA Tacuarembó, CEBIOF y CUT por permitirnos acceder a sus instalaciones y realizar esta tesis. A Carlos Pérez, Julio Laffite y UPM por ayudarnos en la colecta de las muestras.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
1.1. FORESTACIÓN EN URUGUAY.....	1
1.2. OBJETIVOS.....	4
1.2.1. <u>Objetivo general</u> .....	4
1.2.2. <u>Objetivos específicos</u> .....	4
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	5
2.1. CANCROS.....	5
2.1.1. <u>Cancros en plantas leñosas</u> .....	5
2.2. ENFERMEDADES QUE PRODUCEN CANCROS EN <i>EUCALYPTUS</i> .....	6
2.2.1. <u>Cancro por <i>Cryphonectria</i></u> .....	6
2.2.2. <u>Enfermedad rosada</u> .....	7
2.2.3. <u>Cancro por <i>Botryosphaeria</i></u> .....	8
2.2.4. <u>Cancro por <i>Inocutis</i></u> .....	9
2.2.5. <u>Cancro por <i>Coniothyrium</i></u> .....	10
2.3. <i>TERATOSPHAERIA GAUCHENSIS</i> .....	11
2.4. IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD EN URUGUAY.....	12
2.5. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	14
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	15
3.1. MUESTREO Y AISLAMIENTO DEL AGENTE CAUSAL.....	15
3.2. CULTIVO Y AISLAMIENTO DE PUNTA DE HIFA.....	16
3.3. EXTRACCIÓN DE ADN.....	17
3.4. PCR, AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES.....	17
3.5. INOCULACIÓN ARTIFICIAL DEL PATÓGENO EN PLANTINES DE <i>EUCALYPTUS</i> .....	19
4. <u>RESULTADOS</u> .....	21

4.1.	PRESENTACIÓN DE RESULTADOS DE LABORATORIO.....	21
4.1.1.	<u>Muestreo y aislamiento de <i>Teratosphaeria gauchensis</i></u> .....	21
4.1.2.	<u>Análisis poblacional de <i>Teratosphaeria gauchensis</i></u> .....	25
4.1.2.1.	Diversidad génica .....	25
4.1.2.2.	Diversidad genotípica .....	27
4.2.	PRESENTACIÓN DE RESULTADOS DE INVERNÁCULOS ...	29
5.	<u>DISCUSIÓN</u> .....	30
6.	<u>CONCLUSIONES</u> .....	32
7.	<u>RESUMEN</u> .....	33
8.	<u>SUMMARY</u> .....	34
9.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	35
10.	<u>ANEXOS</u> .....	39

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Ubicación geográfica de las plantaciones prospectadas.....	15
2. Mezcla de reactivos en reacciones de PCR.....	18
3. Temperatura de “annealing” y concentración de MgCl <sub>2</sub> ajustada, tinción utilizada y tamaño de banda esperado de los cinco pares de “primers” de <i>Teratosphaeria gauchensis</i> puestos a punto.....	19
4. Aislados multiespóricos obtenidos de muestras de <i>Eucalyptus</i> spp. colectadas del departamento de Paysandú (n=72)* .....	22
5. Aislados multiespóricos obtenidos de muestras de <i>Eucalyptus</i> spp. colectadas del departamento de Tacuarembó (n=44)* .....	22
6. Aislados multiespóricos de la colección del Laboratorio Forestal-PDU Forestal provenientes de Canelones (n=25)* .....	23
7. Aislados punta de hifa y sus correspondientes cultivos multiespóricos (n=59).....	24
8. Aislados genotipados utilizando cinco microsatélites (n=50).....	25
9. Tamaños de banda obtenidos para los distintos microsatélites y su tamaño esperado según bibliografía.....	26
10. Resultados del estudio de la diversidad génica de las poblaciones de <i>T. gauchensis</i> .....	27
11. Ocurrencia de haplotipos por población.....	28
12. Diversidad genotípica de la población de <i>T. gauchensis</i> (n=22).....	29
Figura No.	
1. Distribución geográfica de <i>Teratosphaeria gauchensis</i> y <i>T. zuluensis</i> .....	12

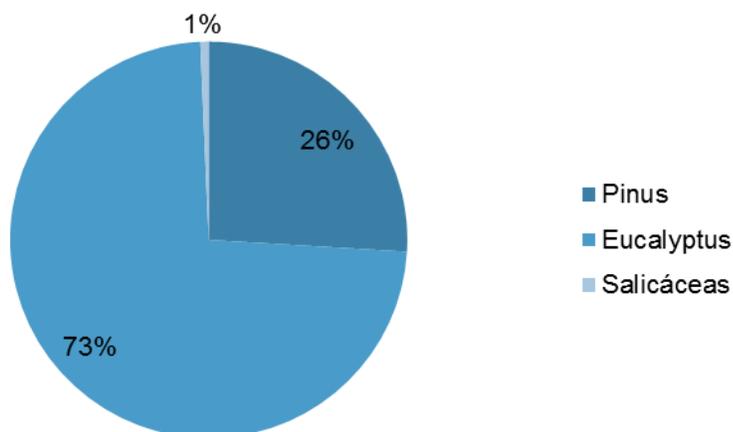
Gráfica No.

1. Proporción de géneros de la matriz forestal en Uruguay.....	1
2. Área acumulada de plantaciones forestales y reporte de nuevas enfermedades.....	3
3. Uso industrial de la madera de no coníferas en Uruguay.....	13

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. FORESTACIÓN EN URUGUAY

La introducción de *Eucalyptus* spp. data en Uruguay desde el año 1853 con la introducción del género por parte de Tomkinson, desde Australia, centro de origen, sin tener un fin explícitamente comercial. A partir del año 1950 se comienza a desarrollar el cultivo de *Eucalyptus* como estrategia específica para la protección de ganado a través de montes de abrigo. Desde esa fecha en adelante, la producción de *Eucalyptus* en el país logró asentarse y crecer de forma casi exponencial, debido principalmente a las características maderables que presenta la misma y su adaptabilidad o plasticidad con respecto al clima (Vassallo et al., 2011). Las plantaciones de *Eucalyptus*, actualmente abarcan un gran porcentaje dentro de la matriz forestal, ocupando aproximadamente, según datos de la Dirección Forestal para el año 2012, un 73% del total de la producción forestal del país, acompañado por un 26% con plantaciones de Pinos (*Pinus*) y de forma marginal un 1% ocupado por Álamos (*Salicaceae*), los cuales carecen de importancia productiva en el presente (MGAP. DGF, 2012, Gráfica 1)



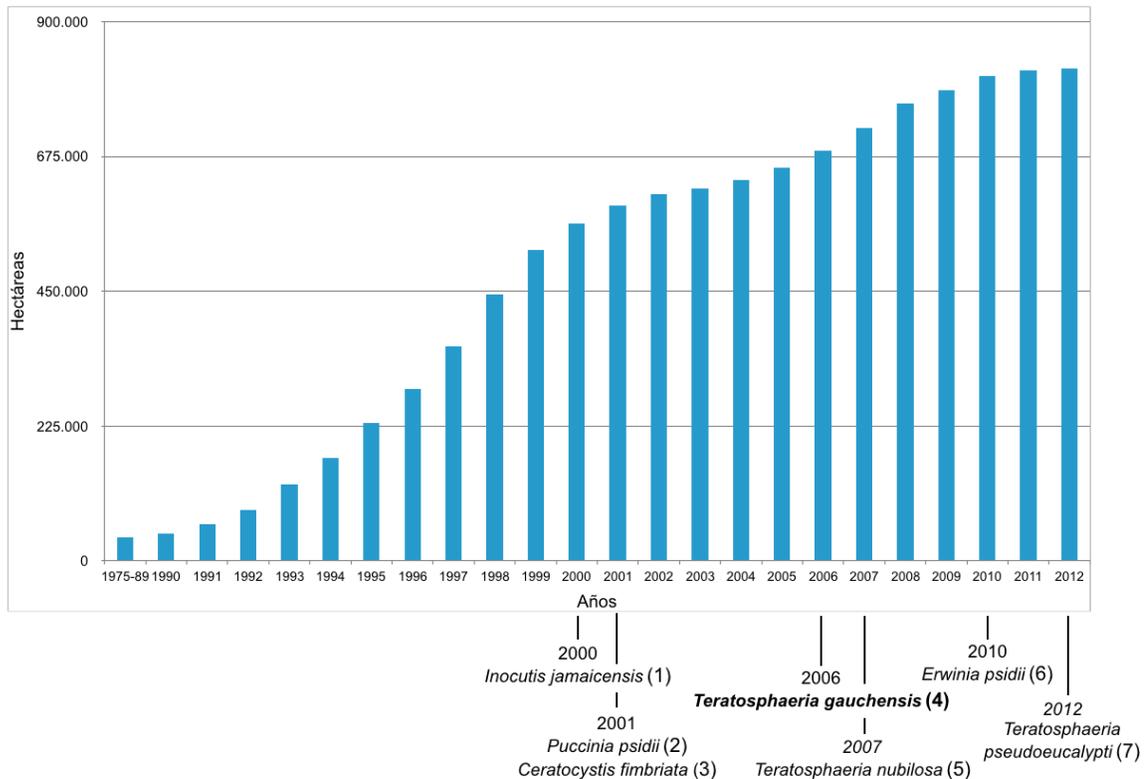
Gráfica 1. Proporción de géneros de la matriz forestal en Uruguay.  
Fuente: MGAP. DGF (2012).

Existen varios factores, tanto políticos, como ventajas comparativas, que permitieron crecer al sector forestal y consolidarlo como un rubro

importante dentro del sector agropecuario y a su vez, como un engranaje más del motor productivo del país. Entre estos factores se pueden destacar como los más importantes la ley No. 13.723 de 1968 y la ley No. 15.939 de 1987. La primera estableció los tipos de suelo en los que se promueve la actividad forestal, considerando las características edafológicas y la baja productividad para ser explotados con otros rubros. Por otra parte, la ley forestal de 1987 intentó promover la actividad en su fase primaria, a través de exoneraciones tributarias y líneas de crédito; ambas leyes permitieron y promovieron, entre otras, el ingreso de nuevos inversores, tanto nacionales como extranjeros (Vasallo et al., 2011). Las políticas llevadas a cabo en el rubro lograron captar grandes inversiones, logrando de esa manera, incrementar notoriamente la producción forestal en el país. A partir del año 1990, luego de la promulgación de la segunda ley forestal, No. 15.939, existió un incremento notorio de las plantaciones forestales en el Uruguay (Gráfica 2).

La entrada de especies exóticas (tales como *Eucalyptus* spp. y *Pinus* spp.) y su establecimiento en la región, trajo aparejado la aparición de enfermedades sobre estas especies. Existen dos hipótesis que explican el motivo de dicho fenómeno (Stukenbrok y McDonald, 2008). La primera, denominada “nuevos encuentros”, supone que los patógenos en la flora nativa son capaces de infectar a las especies forestales exóticas, tales como *Eucalyptus* spp. A modo de ejemplo se puede mencionar a *Puccinia psidii*, agente causal de la roya del *Eucalyptus*, el cual fue reportado en Brasil en 1884 en *Psidium guayava* afectando posteriormente plantaciones de *Eucalyptus grandis* en 1973 (Ferreira, citado por Tommerup et al., 2003). La segunda hipótesis, denominada “re-encuentros”, se refiere a cuando los patógenos exóticos de especies forestales exóticas son introducidos a nuevos ambientes luego de un período de tiempo que el hospedero estuvo libre del patógeno; tal es el caso de *Teratosphaeria nubilosa*, nativo de Australia y descrito en ese país en el año 1891 que fue posteriormente introducido en Uruguay en el año 2007 (Pérez et al., 2009).

Las plantaciones forestales en Uruguay desde 1975 a 2012 han aumentado en área (Gráfica 2), nuestra tesis trata sobre *Teratosphaeria gauchensis*, una enfermedad que por lo pronto solo se ha visto asociada a *Eucalyptus* spp. (Cortinas et al., 2011b). El incremento masivo de la producción forestal ha conllevado a la aparición de nuevos reportes de enfermedades que afectan a *Eucalyptus* spp (Gráfica 2).



Gráfica 2. Área acumulada de plantaciones forestales y reporte de nuevas enfermedades. Fuente: MGAP. DGF (2012), 1. Martínez et al. (2002), 2. Telechea et al. (2003), 3. Barnes et al. (2003), 4. Cortinas et al. (2006), 5. Pérez et al. (2009), 6. Coutinho et al. (2010), 7. Soria et al. (2014).

Según Burgess y Wingfield, citados por Ramos (2011), en los bosques naturales los patógenos y sus hospedantes han co-evolucionado a lo largo de los años y se encuentran en cierto equilibrio. Estos ecosistemas se caracterizan por una elevada diversidad genética y etaria de la flora arbórea, lo que minimiza el riesgo de la ocurrencia de epifitias. En cambio, en las plantaciones comerciales se buscan árboles de alto rendimiento y buena calidad. Estas plantaciones se hallan expuestas a factores abióticos y bióticos con un gran potencial de daño dado por la alta homogeneidad genética de sus componentes, lo que lleva a una alta presión de selección de sus enemigos naturales. De esta manera se puede inferir que el aumento masivo de las plantaciones forestales en Uruguay a partir de los años 90, en conjunto con el tipo de plantación (monocultivo, clonal), generaron un aumento en el tamaño

poblacional de los patógenos debido al incremento del sustrato colonizable disponible. De esa manera aumenta considerablemente la probabilidad de ocurrencia de las epifitias sobre el cultivo de *Eucalyptus* spp.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo general

- Describir la variabilidad poblacional de *T. gauchensis* en Uruguay.
- Conocer la susceptibilidad de diferentes genotipos de *Eucalyptus* spp. a este patógeno mediante ensayos de inoculación artificial.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Generar una colección de cepas puras de *T. gauchensis* mediante aislamiento a partir de muestras con síntomas colectadas en plantaciones comerciales de *Eucalyptus* spp. en Uruguay
- Genotipar la colección de cepas mediante marcadores moleculares microsatélites.
- Realizar ensayos de inoculación artificial de diferentes cepas de *T. gauchensis* sobre diferentes genotipos de *Eucalyptus* spp.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. CANCROS

Según Agrios (1995), cancro es una lesión necrótica, generalmente con depresión de los tejidos, en tallos, ramas o ramillas de plantas. Los cancros pueden ser provocados tanto por bacterias como por hongos, aunque en mayor medida son causados por estos últimos.

#### 2.1.1. Cancros en plantas leñosas

Los cancros en plantas leñosas constituyen lesiones necróticas de la corteza y cambium, de tamaño y forma variables, pudiendo afectar ramas o el tronco principal. Los cancros pueden clasificarse en anuales o perennes, es decir, aquellos que atacan solo una vez al cambium del árbol y provocan una sola herida, o los que año tras año vuelven a afectar la zona de cambium en la misma posición de la primer herida. El daño causado por cancros perennes es usualmente mayor y puede afectar casi la totalidad del fuste o rama afectada (Old et al., 2003).

Los árboles producen una serie de respuestas químicas de defensa, tales como polifenoles, fitoalexinas, o estructurales, como suberización rápida frente a los ataques de los patógenos. Estos mecanismos de resistencia pueden ser inducidas por el patógeno y sirven a la planta para defenderse del ataque (Balmelli et al., 2004.). Según Old y Davison, citados por Balmelli et al. (2004), en condiciones de crecimiento ideales para el hospedero, estos mecanismos pueden ser suficientes para restringir o limitar la infección. Sin embargo, en condiciones de estrés, por ejemplo, déficit hídrico, deficiencias nutricionales o mala calidad de sitio, los mecanismos de defensa pueden resultar menos eficientes, dando una mayor incidencia o severidad de la enfermedad, esto se explica porque predisponen a la planta, aumentando la susceptibilidad al ataque de los patógenos (Balmelli et al., 2004).

Según Balmelli et al. (2004), diversos géneros de hongos han sido reportados como agentes causales de cancros en *Eucalyptus* en Uruguay. Algunos actúan como patógenos de importancia, mientras otros actúan como oportunistas y sólo se constituyen en un riesgo cuando están asociados a la ocurrencia de condiciones de estrés para la planta. A continuación se presenta

una revisión bibliográfica que incluye las principales enfermedades que producen canchros en *Eucalyptus* spp.

## 2.2. ENFERMEDADES QUE PRODUCEN CANCROS EN *EUCALYPTUS*

Según Old et al. (2003), las principales enfermedades que producen canchros en *Eucalyptus* spp. pueden agruparse en cuatro categorías: cancro por *Cryphonectria*, enfermedad rosada (Pink disease), cancro por *Botryosphaeria* y cancro por *Coniothyrium*. En Uruguay además se ha reportado la presencia de cancro por *Inocutis*. A continuación se presenta una breve descripción de las mismas y se profundiza en la enfermedad cancro por *Coniothyrium* por tratarse del objeto de estudio de esta tesis.

### 2.2.1. Cancro por *Cryphonectria*

Esta enfermedad es causada por múltiples agentes pertenecientes al género *Crysoporthe* (Gryzenout et al., 2004). Entre ellos Old et al. (2003), mencionan a *Crysoporthe cubensis* y *Crysoporthe gyrosa*.

Los síntomas asociados a *C. cubensis* incluyen canchros basales que pueden extenderse a lo largo del tallo. En ramas jóvenes puede producir marchitamiento y muerte. La etapa más susceptible para el huésped es en los dos a tres primeros años de crecimiento. Árboles que han sobrevivido las primeras infecciones, producen en la zona de ataque exudados de quino. En estas zonas se desarrollan las estructuras sexuales y asexuales del agente causal, incluyendo peritecios y picnidios respectivamente (Old et al., 2003). Según Van Zyl y Wingfield, Van Heerden y Wingfield, citados por Old et al. (2003) dentro de la especie *Eucalyptus* los más susceptibles al ataque de *C. cubensis* son los ejemplares de *Eucalyptus saligna* y *E. grandis*.

Por otra parte *C. gyrosa*, es un patógeno secundario, el cual ataca a árboles predispuestos, estresados. Genera canchros en el tallo pero no logran matar a su hospedero siendo menos agresivo que *C. cubensis*. Las infecciones de ambos agentes causales de cancro se llevan a cabo a través de heridas ya antes establecidas. Roturas en la base de la planta debido al rápido crecimiento de algunas especies de *Eucalyptus* son entradas comunes para estos patógenos (Old et al., 2003). Hasta el momento no hay reportes de esta enfermedad en Uruguay.

### 2.2.2. Enfermedad rosada

El agente causal de esta enfermedad es un hongo Homobasidiomycete dentro de la familia *Corticaceae* denominado *Erythricium salmonicolor* (Roux y Coetzee, 2005). Es un hongo polífago que puede desarrollar enfermedad en un amplio rango de hospederos; entre los más importantes se encuentran especies del género *Eucalyptus* y *Acacia*.

Según Old et al. (2003), es un hongo que ataca a cualquier edad de la planta y puede desarrollar diferentes tipos de estructuras sobre las ramas y corteza dependiendo del estadio de desarrollo de la enfermedad. Según Seth et al., citados por Old et al. (2003), el hongo es un patógeno primario el cual es capaz de invadir tejido sano provocando infección sobre el mismo.

Old et al. (2003), describen la sintomatología que presenta dicha enfermedad; la misma comienza con la denominada “tela de araña” debido al crecimiento acelerado de micelio blanco sobre la superficie del tallo. Una vez infectado, invade el cambium y la corteza, observándose pequeños canchales debajo de esta última. Una vez desarrolladas estas manifestaciones patológicas, se observan agregados rosados o pústulas de micelio estéril sobre los canchales. Los agregados rosados corresponden al himenio del agente causal y es el signo más característico de la enfermedad, por eso se le adjudica el nombre de “enfermedad rosada”. *Eucalyptus* y *Acacias* responden a la infección con el crecimiento de yemas epicórmicas cercanas a los canchales.

Hasta el momento no existe reporte de dicha enfermedad en Uruguay. Old et al. (2003) hace referencia que dicha enfermedad posee un óptimo desarrollo en zonas con régimen de precipitaciones muy altas y niebla persistente; tal vez sea por este motivo que no se encuentra en Uruguay.

### 2.2.3. Cancro por *Botryosphaeria*

Más de 2000 hongos pertenecen a la familia Bothryosphaeriaceae, incluyendo estados teleomorfos y anamorfos donde *Diplodia*, *Botryosphaeria*, *Fusicoccum*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* y *Sphaeropsis* contienen a la mayoría de las especies (Slippers y Wingfield, 2007). La enfermedad cancro por *Botryosphaeria* es provocada por múltiples agentes causales. En Uruguay se encontraron seis especies involucradas en el desarrollo de la misma; estas son: *Botryosphaeria dothidea*, *Neofossicoccum eucalyptorum*, el complejo *Neofossicoccum parvum-N. ribis* (Pérez et al., 2010).

Las enfermedades causadas por *Botryosphaeriaceae* están casi exclusivamente asociadas a algún tipo de estrés (Pérez et al., 2010). Según Crist y Schoeneweiss, citados por Old et al. (2003), los árboles que crecen y se desarrollan en zonas y ambientes desfavorables, tales como, suelos de baja fertilidad o climas en la cual la especie arbórea no esté adaptada, son más susceptibles al cancro por *Botryosphaeria*. A modo de ejemplo, árboles que se desarrollan en alta densidad, especialmente aquellos que quedan suprimidos en el dosel, son también más propensos al ataque de dichos agentes causales. También pueden estar asociados a malos manejos silviculturales, por ejemplo podas que generan heridas con limitada cicatrización que predisponen al árbol al ataque del patógeno. El estrés por sequía es el factor ambiental predisponente más asociado a esta enfermedad (Slippers y Wingfield, 2007).

Cabe destacar lo enunciado por Smith et al., citados por Old et al. (2003), estos hongos son capaces de infectar tejido sano y permanecer como endófitos en el mismo. Cuando las características ambientales son adversas para el hospedero (situación de estrés), el patógeno comienza a manifestarse con su sintomatología característica, la cual consiste en canchros pronunciados sobre el fuste y ramas. Los canchros producidos por esta familia de hongos se clasifican como perennes. El tejido cambial afectado por el hongo se mantiene bajo ataque permanente a lo largo de los años por el mismo hongo produciendo, en casos muy severos, la quebradura del fuste a partir de la zona donde se encuentra el cancro (Slippers y Wingfield, 2007).

Se ha demostrado que algunos agentes causales del cancro por *Botryosphaeria* aislados de tejidos de mirtáceas nativas de Uruguay son capaces de infectar a *Eucalyptus* spp (Pérez et al., 2010), tal es el caso de *L. pseudotheobromae* y el complejo de especies *N. parvum-N. ribis*. Por otra parte

Pérez et al., citados por Pérez et al. (2010), logran determinar que *N. eucalyptorum* es capaz de infectar Mirtáceas nativas de Uruguay y que existe patogenicidad cruzada con plantaciones de *Eucalyptus* spp.

#### 2.2.4. Cancro por *Inocutis*

El agente causal de la enfermedad cancro por *Inocutis* se denomina *Inocutis jamaicensis*, un hongo de la división Basidiomycota, Orden Hymenochaetales (Martínez et al., 2014). Martínez et al., citados por Pérez et al. (2008), advierten que *Inocutis jamaicensis* fue reportado por primera vez en Uruguay en plantaciones comerciales de *Eucalyptus globulus* en el año 2000.

Según Bettucci et al., Schwarze y Baum, citados por Lupo et al. (2009), el xilema dañado de los arboles constituye la entrada más eficaz para la infección del patógeno, existiendo cierta variabilidad en la capacidad de infección con respecto a las especies hospederas. Las fructificaciones que se producen luego de la infección del patógeno sobre las lesiones de hospederos primarios, generan una gran cantidad de esporas que son transportadas por el viento o corrientes de aire, pudiendo invadir lesiones con duramen expuesto de otras plantas (Martínez et al., 2014).

Según Bettucci et al., Martínez et al., citados por Lupo et al. (2009), se ha demostrado que el agente causal de la enfermedad provoca podredumbre de tronco en *E. globulus*. La característica de esta enfermedad es la “podredumbre blanca”, denominado de tal forma debido que en el proceso de descomposición de la madera, el hongo se nutre principalmente de la lignina de las células de la zona infectada, dejando básicamente celulosa en los tejidos remanentes, logrando de esa manera decolorar la madera hacia un color más blanquecino. Como consecuencia de la enfermedad, los árboles se vuelven inestables y pueden quebrarse a la altura de la lesión por la acción de vientos fuertes. Por otra parte, la podredumbre disminuye el peso de la madera y en general se pierde la troza basal y media del árbol (Martínez et al., 2014).

Según Martínez et al. (2014) es de importancia principalmente en *Eucalyptus globulus* y en menor medida en *E. grandis*, *E. maidenii* y *E. tereticornis*.

### 2.2.5. Cancro por *Coniothyrium*

Esta enfermedad es generada por dos agentes causales, *Teratosphaeria gauchensis* y *T. zuluensis* (Cortinas et al., 2006). Estos patógenos se ubican en la subdivisión *Ascomycota*, clase *Coelomycete*. La taxonomía de estos hongos ha sido muy discutida y desde su descripción por Wingfield et al. (1996) han sido transferidos de género en varias oportunidades (Cortinas et al., 2006). Según Wingfield et al., citados por Cortinas et al. (2006), la enfermedad es observada por primera vez en plantaciones de *Eucalyptus grandis*, en Kwa-Zulu Natal provincia de Sudáfrica, en el año 1988. El fenotipo de la enfermedad se describió como pequeñas manchas necróticas, aisladas entre sí, en ramas jóvenes ubicadas en la copa de los árboles. Con el tiempo las lesiones se extienden formando canchros mayores, provocando en casos severos, la muerte de las ramas o de todo el árbol. La planta responde con la generación de brotes epicórmicos. Además de *E. grandis*, Ciesla et al., citados por Ramos (2011), advierten que otras especies de eucalipto pueden ser afectadas por estos patógenos, como son *E. camaldulensis*, *E. urophylla*, *E. tereticornis* y *E. nitens*.

A diferencia de los canchros producidos por *Botryosphaeria* spp., los canchros causados por *T. gauchensis* y *T. zuluensis* son de carácter anual. Los síntomas característicos de la enfermedad conocida como cancro por *Coniothyrium* son lesiones necróticas en tejido verde de tallo o ramas, que se deben a lesiones en el cambium. Al cabo de un tiempo, la lesión termina concluyendo en un cancro; el mismo es distintivo de la enfermedad. Se observan canchros con forma de “ojo de gato” debido a dos rajaduras laterales en la lesión que provocan el levantamiento de la epidermis en la zona central del mismo, simulando el iris del ojo de un felino. Según Old et al., Nichols, citados por Ramos (2011), en casos severos se observa deformación del fuste, brotación epicórmica y la muerte de árboles provocado por esta enfermedad.

Los canchros producidos en los tejidos jóvenes son recubiertos por un “callus” formado por el huésped, neutralizando la infección, los que con el tiempo son incluidos dentro de la madera del mismo. Esto resulta en canchros de carácter anual. A su vez, como mecanismo de defensa, en la zona donde se encuentra el cancro, se producen bolsas de quino (Cortinas et al., citados por Ramos, 2011). Como resultado, puede ocurrir que un árbol no tenga daño visual externo, pero que, en el interior de su fuste, se encuentra con bolsas de

quino y por lo tanto madera de baja calidad. Esto dificulta entre otras, el procesamiento de la madera con destino a producción de pulpa de celulosa. Por otro lado, según Balmelli et al. (2004), el efecto más importante de la enfermedad se da en infecciones severas, en las cuales la corteza se adhiere a la madera dificultando el descortezado del fuste.

Estudios realizados en Uruguay advierten que se ha encontrado el agente causal del cancro por *Coniothyrium* también en hojas (Pérez et al., 2009). En concordancia, en Portugal se lo ha encontrado en tallos y hojas de *E. globulus* en las regiones de Algarve, Alto Alentejo y Bajo Alentejo, entre otras (Silva et al., 2014). Como esta enfermedad todavía no se ha encontrado en Australia, lugar de origen de los *Eucalyptus*, se hipotetiza que el patógeno tiene como huésped principal otra planta, potencialmente una o más Mirtáceas (Cortinas, 2011a).

### 2.3. *TERATOSPHAERIA GAUCHENSIS*

El agente causal del cancro por *Coniothyrium* observado en Uruguay ha sido determinado como *Teratosphaeria gauchensis* (Cortinas et al., 2011b). La nomenclatura de este organismo fue cambiando a lo largo de la historia en la medida que se realizaron nuevos estudios taxonómicos. En un principio fue descrito bajo el género de *Colletogloeopsis* por Cortinas et al. (2006). Posteriormente Andjic et al. (2007) lo ubicaron en el género *Kirramyces* debido a su estrecha relación filogenética con otros patógenos de eucalipto clasificados en este género. En forma paralela al trabajo de Andjic et al. (2007), Crous et al. (2007) concluyeron que había evolucionado dentro de la familia de las *Teratosphaeriaceae* y señalaron que correspondía usar el nombre genérico *Readeriella*, el más antiguo para este género. Recientemente, Cortinas (2011a) en su tesis de doctorado sugiere el nombre *Teratosphaeria gauchensis* a pesar de que su estado perfecto o sexual aún no ha sido hallado en la naturaleza (Ramos 2011, Silva et al. 2014). Por este motivo son sinónimos nomenclaturales de *Teratosphaeria gauchensis*, *Colletogloeopsis gauchensis* (Cortinas et al., 2006), *Kirramyces gauchensis* (Andjic et al., 2007) y *Readeriella gauchensis* (Crous et al., 2007).

*Teratosphaeria gauchensis* es morfológicamente indistinguible de *T. zuluensis* y provoca los mismos síntomas en sus hospederos. La única forma actual para distinguir entre estas especies es mediante estudios de secuencias de ADN, como los realizados por Cortinas et al. (2006). *Teratosphaeria*

*gauchensis* fue encontrado y caracterizado en Uruguay en el año 2006 (Cortinas et al., 2006) causando canchros anuales y posteriormente causando manchas foliares en hojas de *E. maidenii* y *E. tereticornis* en el año 2009 (Pérez et al., 2009). La distribución geográfica de *T. gauchensis* conocida hasta el momento incluye Argentina, Etiopia, Hawaii, Portugal, Uganda y Uruguay (Figura 1). Por otra parte, *T. zuluensis* se ha reportado en China, Malawi, México, Sudáfrica, Tailandia, Uganda, Vietnam y Zambia. El único país donde se han reportado ambos agentes causales del Daño por *Coniothyrium* es en Uganda (Figura 1).

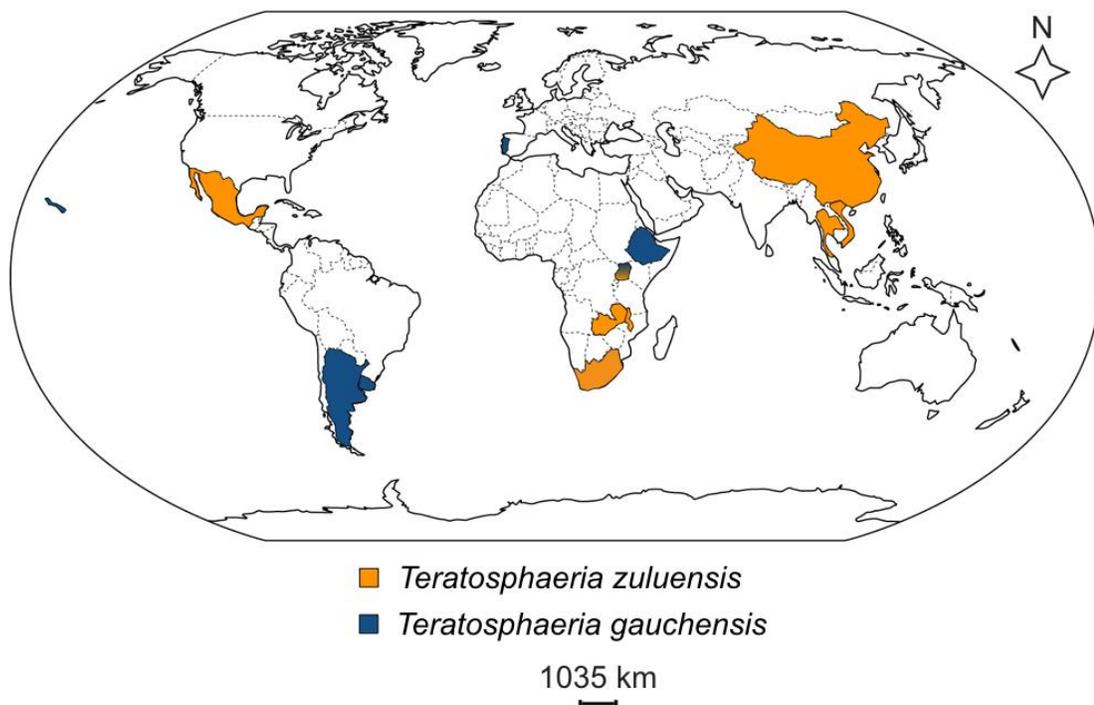
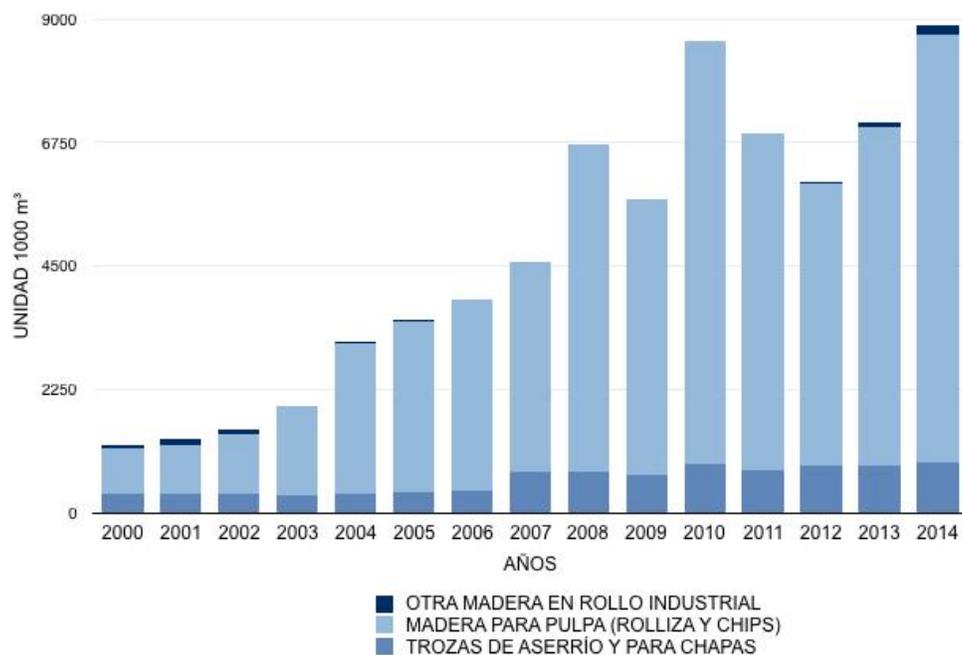


Figura 1. Distribución geográfica de *Teratosphaeria gauchensis* y *T. zuluensis*

#### 2.4. IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD EN URUGUAY

Como fue expuesto en la introducción del estudio, Uruguay presenta una clara predisposición hacia la producción de *Eucalyptus* spp. logrando cubrir un 73% aproximadamente de la matriz forestal implantada (MGAP. DGF, 2012). Sin embargo, el producto obtenido a través de las plantaciones puede ser muy variado. Entre ellos se destaca, la producción de pulpa de celulosa (en zonas

francas), la producción de madera para chapas y productos de uso estructural, y por último, pero no menos importante, producción de madera en rollo industrial. El notorio crecimiento de madera con fin para pulpa, se presenta con un 83% aproximadamente de la producción total (MGAP. DGF, 2014, Gráfica 3).



Gráfica 3. Uso industrial de la madera de no coníferas en Uruguay. Fuente: MGAP. DGF (2014).

Considerando la producción de *Eucalyptus* con destino a pulpa, sería propicio observar qué impacto produce la enfermedad cancro por *Coniothyrium* en dicha área productiva. Según Balmelli et al. (2004), si bien la madera de los individuos afectados puede presentar pequeñas bolsas de quino debido al ataque de *T. gauchensis*, las mismas no afectarían considerablemente el volumen de madera de la producción de pulpa de celulosa. Probablemente el efecto más importante de la enfermedad se da en infecciones severas, en las cuales la corteza se adhiere a la madera dificultando el descortezado. Cabe

destacar que en Uruguay, hoy en día las empresas dedicadas al rubro de producción de pulpa poseen materiales mejorados genéticamente que incluyen cierta resistencia al ataque de *T. gauchensis*. Por estos motivos esta enfermedad no ha representado pérdidas de importancia en la producción de madera con destino a pulpa.

Por otra parte, en la producción de madera sólida y para chapas, la enfermedad adquiere mayor importancia porque afecta la estética de la misma. Al tratarse de un cancro anual que ataca la zona cambial, provoca una lesión que luego genera una bolsa de quino. Si bien el cancro ocurre solo en una estación de crecimiento en el ciclo de vida del individuo, a lo largo de los veinte años que dura la rotación de la plantación, el patógeno es capaz de atacar recurrentemente el mismo árbol en múltiples sitios, originando en la madera múltiples bolsas de quino. Las múltiples bolsas de quino cuando la madera es aserrada o debobinada se observan como múltiples manchas discretas en tablas y tableros. Estas manchas hacen disminuir sensiblemente el valor comercial de los productos por motivos estéticos.

Según McDonald y Linde (2002), es substancial realizar trabajos de investigación que centren la atención en la variabilidad poblacional de los patógenos. Si bien los materiales genéticos utilizados hoy en día, por partes de las empresas forestales, presentan cierta resistencia a la enfermedad en cuestión, esto no implica inmunidad hacia el patógeno; a medida que la población presente mayor variabilidad poblacional es más probable que puedan romper las barreras de resistencia genética de los hospederos. *Teratosphaeria gauchensis*, presenta una gran variabilidad poblacional (Cortinas et al., 2011b). Su estudio es pertinente ya que, debido a su alta variabilidad poblacional, podría implicar una fractura en la resistencia lograda en los materiales genéticos utilizados a nivel nacional ya que nuevos genotipos patogénicos son esperables de surgir con el tiempo (McDonald y Linde, 2002).

## 2.5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- *Teratosphaeria gauchensis* presenta variabilidad poblacional.
- Las distintas cepas difieren en su agresividad frente a los distintos genotipos de *Eucalyptus* spp.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MUESTREO Y AISLAMIENTO DEL AGENTE CAUSAL

Ramas con síntomas característicos del cancro por *Coniothyrium* fueron recolectadas en plantaciones de *Eucalyptus grandis*, *E. dunnii*, *E. camaldulensis* y *E. tereticornis* ubicadas en los departamentos de Paysandú y Tacuarembó; a su vez se contó con cepas de *T. gauchensis* pertenecientes al Laboratorio Forestal-PDU Forestal colectadas sobre *E. globulus* en INIA Las Brujas, Canelones (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ubicación geográfica de las plantaciones prospectadas

Departamento	Coordenadas	Especies
Canelones	34°40'16.37" S 56°20'28.42" W	<i>Euclayptus globulus</i>
Paysandú	31°54'16.33" S 57°47'01.65" W	
	31°55'09.75" S 57°45'51.23" W	<i>Eucalyptus grandis</i> <i>E. camaldulensis</i>
	31°54'18.32" S 57°45'38.99" W	<i>E. tereticornis</i> <i>E. dunnii</i>
	31°54'49.87" S 57°51'31.70" W	
Tacuarembó	31°41'55.80" S 55°54'51.51" W	<i>Eucalyptus grandis</i>

La metodología utilizada para aislar al patógeno consistió en coleccionar muestras de ramas y ramillas que presentaron síntomas característicos de la enfermedad. Estas muestras se mantuvieron durante 24 a 48 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente para favorecer la fructificación del agente causal. En el centro de los canchros se observaron con lupa los picnidios (cuerpo fructífero asexual), los cuales exudan en forma de cirros a las esporas de origen asexual llamados conidios. Para el aislamiento del agente causal se siguió el siguiente flujo de trabajo (Anexos, Figura 2). Se comenzó por transferir grupos de conidios con aguja estéril a medio de cultivo MEA (agar-malta 2%). Los conidios fueron distribuidos en estrías para lograr un mayor esparcimiento de

los mismos y evitar el sobrecrecimiento de potenciales contaminantes. Esta operación se realizó bajo lupa estereoscópica. Las placas fueron incubadas a 24 °C durante una semana aproximadamente hasta observar el crecimiento de las colonias. Solamente se retuvieron los cultivos cuyas morfología de la colonia fueran coincidentes con la morfología de *T. gauchensis*; es decir colonias de coloración (“Value”) 3 y el matiz (“Hue”) 2,5GY (verde oliva) del sistema de clasificación de colores de Munsell, de margen irregular con borde definido y de micelio compacto (Ramos, 2011).

### 3.2. CULTIVO Y AISLAMIENTO DE PUNTA DE HIFA

Con el objetivo de generar una colección de aislados puros que presentaran un único individuo fúngico se realizó el siguiente flujo de trabajo (Anexos, Figura 2). Las colonias de *T. gauchensis* obtenidas a partir de un grupo de conidios fueron repicadas de forma estriada a nuevo medio MEA para obtener cultivos libre de contaminantes. Como las colonias crecidas en MEA presentaron un micelio muy compacto, las mismas fueron nuevamente repicadas a agar-agua (2%) para obtener un micelio más esparcido con mayor separación entre hifas individuales. De esta forma se obtiene una colonia más dispersa, lo que permite realizar un tercer repique a MEA tomando solo puntas de hifa con aguja estéril visualizadas en lupa estereoscópica. Se sembraron 3 puntas de hifa por colonia en medios de cultivos MEA. Se incubó una semana y por último se transfirió una única colonia para análisis posteriores. Estas cepas fueron incorporadas como cepas de colección del PDU Forestal del Centro Universitario de Tacuarembó.

### 3.3. EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se realizó raspando la superficie de las colonias de *T. gauchensis*, crecidas en MEA durante 2-4 semanas a 24°C. El micelio raspado fue colocado en tubos eppendorf de 2 ml y congelados durante un día en freezer a -20°C. Una vez congelados se procedió a moler la muestra utilizando pequeños morteros plásticos del tamaño de los tubos. Se utilizó como “buffer” CTAB2X. Los alcoholes empleados en este proceso fueron: Cloroformo-isoamílico 24:1 e isopropanol. Se utilizó Proteinasa K como desnaturizador de las proteínas, utilizando el método empleado por el Centro de Bioservicios Forestales (Anexos, Esquema 1).

### 3.4. PCR, AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES

Se amplificaron mediante PCR (“Polymerase Chain Reaction”) 10 *loci* conteniendo microsatélites. Para ello se utilizaron diez pares de “primers”, marcados con fluorescencia y nombrados Kg1, Kg2, Kg3, Kg4, Kg5, Kg6, Kg7, Kg8, Kg9 y Kg10, desarrollados por Cortinas et al. (2008). Los mismos fueron puestos “a punto” variando su temperatura de “annealing” en las condiciones de termociclado y la concentración de MgCl<sub>2</sub> en la reacción de PCR.

Las reacciones de PCR se realizaron en tubos eppendorf de 200 µL (microlitros) conteniendo en su interior: “Buffer”, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, “primer reverse”, “primer forward”, Taq, ADN de *T. gauchensis* y por último agua hasta totalizar un volumen de reacción de 20 µL (Cuadro 2).

Cuadro 2. Mezcla de reactivos en reacciones de PCR

Volumen de reactivos ( $\mu$ l)	Concentración final de $MgCl_2$ ( $\mu$ M)		
	[2,0]	[2,5]	[3,5]
H <sub>2</sub> O	14,6	14,2	13,4
Buffer 10x	2	2	2
MgCl <sub>2</sub>	1,6	2	2,8
dNTPs	0,4	0,4	0,4
Primer F	0,08	0,08	0,08
Primer R	0,08	0,08	0,08
Taq Polimerasa	0,2	0,2	0,2
ADN muestra	1	1	1

Los productos de PCR se visualizaron en geles de Agarosa al 2%, teñidos con coloración “GelRed”® (Biotium) y visualizados bajo luz ultravioleta. De los diez pares de “primers” utilizados, se logró obtener producto de amplificación en cinco de ellos. Los microsatélites amplificados fueron Kg1, Kg2, Kg3, Kg8 y Kg9. No se lograron poner “a punto” los microsatélites Kg 4, Kg5, Kg6, Kg7 y Kg10. Se decidió utilizar para esta tesis cinco microsatélites: Kg1, Kg2, Kg3, Kg8 y Kg 9 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Temperatura de “annealing” y concentración de MgCl<sub>2</sub> ajustada, tinción utilizada y tamaño de banda esperado de los cinco pares de “primers” de *Teratosphaeria gauchensis* puestos a punto

Locus	Ta (°C)	MgCl <sub>2</sub> (μl)	Tinción	Tamaño esperado (pb)*
Kg 1	59	3,5	FAM	290-327
Kg 2	59	2	FAM	148-183
Kg 3	59	2,5	FAM	211-266
Kg 8	59	2,5	FAM	134-150
Kg 9	59	2,5	TAMRA	89-98

\*Cortinas et al. (2008).

Para la lectura del tamaño de los productos de amplificación de PCR (alelos) se utilizó el servicio de la empresa Macrogen. Para ello se realizó una mezcla de 5 μl del producto final de la reacción de PCR para cada microsatélite, a excepción de los microsatélites Kg3 y Kg9 que fueron amplificados de manera conjunta. No se realizaron diluciones.

Los resultados aportados por la empresa Macrogen fueron visualizados en la plataforma Peak Scanner v1.0. A partir de los alelos de los cinco *loci* analizados se construyó una matriz poblacional. Se utilizaron los *softwares* GenAlex para describir la diversidad génica, y GenClone para describir la diversidad genotípica. Como índices de diversidad génica se utilizó la Heterocigosidad (Nei, 1973) y para la diversidad genotípica se utilizó “G” que se calcula como,  $G=1/(\sum p_i^2)$ , siendo “pi” las frecuencias de los genotipos diferentes en la población (Stoddart y Taylor, 1988).

### 3.5. INOCULACIÓN ARTIFICIAL DEL PATÓGENO EN PLANTINES DE *EUCALYPTUS*

Previo a la realización de esta tesis se plantaron bajo invernáculo en el Centro Bioservicios Forestales (CEBIOF) plantines de *Eucalyptus* spp. de origen clonal. En el momento de realizar el experimento contaban con 4 meses de edad y 0,6 cm de diámetro promedio en el tallo principal. Se contó con 6 genotipos distintos de *Eucalyptus* spp. incluyendo *Eucalyptus grandis* puros e

híbridos, *E. grandis x camaldulensis*, *E. grandis x urophylla*, *E. grandis x tereticornis* y dos genotipos catalogados como híbridos con otras especies no identificadas. Estos genotipos fueron identificados arbitrariamente del 1 al 6.

Las cepas de *T. gauchensis* utilizadas para inocular los plantines de *Eucalyptus* procedieron de una colección previa, colectados en Canelones, Uruguay. Se procedió a realizar el trabajo con tres cepas de *T. gauchensis* identificadas como LB 32, LB 35 y LB 36.

Tres cepas de *T. gauchensis* fueron inoculadas en seis genotipos de eucalipto, a su vez para cada genotipo se realizó un testigo sin inocular. El diseño experimental buscado fue de cinco bloques completos al azar sin repeticiones. No se pudieron completar ya que faltó un tratamiento testigo en los bloques 3 y 4 y tres testigos en el bloque 5 (Anexos, cuadro 13). La disposición de los plantines en el invernáculo fue realizada en forma aleatoria. Para ello a cada plantín se le adjudicó un número inicial y luego se obtuvo una secuencia de números aleatorios utilizando el software Excel (Microsoft)<sup>®</sup>. Ese orden fue utilizado para ubicar cada plantín dentro del bloque.

Para la inoculación artificial se utilizó un “sacabocado” de 5mm de diámetro para realizar una herida en el tallo principal del plantín. De esa forma, se dejó al descubierto el cambium del mismo. Una vez realizada la herida, se procedió a colocar un disco de MEA (agar-malta) proveniente del borde de la colonia de la cepa del hongo a testar. Para evitar la deshidratación del hongo, se cubrió la herida junto al patógeno con algodón humedecido envolvió con cinta de polietileno. Como testigo se colocó un disco de MEA estéril sobre la herida. Los plantines se ubicaron en un invernáculo, el cual contaba con riego mediante aspersores durante 77 días sin control de temperatura ni fotoperíodo, a modo de incubación para que se manifestara la enfermedad.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS DE LABORATORIO

#### 4.1.1. Muestreo y aislamiento de *Teratosphaeria gauchensis*

El flujo de trabajo (Anexos, Figura 2), se dio de manera tal que, aislados de *T. gauchensis* por distintos motivos, contaminación, subdesarrollo de micelio, entre otros, no lograron culminar el proceso, el cual consistía en la obtención de ADN de colonias punta de hifa. Los Cuadros 4, 5 y 6 muestran los aislados obtenidos de *T. gauchensis* para los diferentes departamentos de Uruguay y a su vez, se encuentran resaltados aquellos que lograron aislarse a colonias punta de hifa para luego realizar el genotipado de los mismos.

Cabe destacar que los aislados obtenidos en Paysandú (Cuadro 4) son obtenidos de ramas de especies diferentes de *Eucalyptus*. Los aislados nombrados del 1 al 4 corresponden a aislados obtenidos de ramas de *E. grandis*. Los nombrados con el número 5 corresponden a una cortina rompe vientos de eucaliptos colorados. Los nombrados con el número 6, corresponden a *E. dunnii*; Los aislados obtenidos del departamento de Tacuarembó (Cuadro 5) corresponden a ramas afectadas de *E. grandis*; por último la colección de aislados del Laboratorio Forestal-PDU Forestal fueron colectados sobre *E. globulus* (Cuadro 6).

Cuadro 4. Aislados multiespóricos obtenidos de muestras de *Eucalyptus* spp. colectadas del departamento de Paysandú (n=72)\*

Paysandú								
Aislados Multiespóricos (MEA)								
1.1.1	<b>3.5</b>	<b>4.2.1</b>	4.11.3	<b>4.18</b>	5.3	5.9	5.17	6.4
1.1.2	<b>3.5.4</b>	<b>4.2.3</b>	<b>4.12.2</b>	4.20	5.4	5.10	5.18	6.5
1.1.3	<b>3.5.5</b>	<b>4.3.2</b>	<b>4.13.1</b>	4.21	5.5	5.11	<b>5.19.1</b>	6.6
1.1.4	<b>3.6.5</b>	<b>4.4</b>	4.13.2	4.22	5.6.1	5.12	5.20	6.7.1
2.1.1	<b>3.9</b>	<b>4.5.3</b>	<b>4.13.4</b>	<b>4.24</b>	5.6.2	5.13	5.21	6.7.2
2.1.2	<b>3.11</b>	<b>4.10</b>	<b>4.14.1</b>	5.1.1	5.7.1	<b>5.14.1</b>	6.1	6.8.1
	<b>3.2</b>	<b>3.12</b>	4.11.1	4.14.2	5.1.2	5.7.2	5.15	6.2
	<b>3.4</b>	<b>4.1.1</b>	<b>4.11.2</b>	<b>4.15.2</b>	<b>5.2.1</b>	5.8	5.16	6.3
							6.8.3	

(\*) En negrita se muestran aquellos aislados que lograron continuar el proceso para caracterización genotípica.

Cuadro 5. Aislados multiespóricos obtenidos de muestras de *Eucalyptus* spp. colectadas del departamento de Tacuarembó (n=44)\*

Tacuarembó										
Aislados Multiespóricos (MEA)										
1.1	2.3	4.1	5.3	<b>6.2</b>	7.1	8.1	10.1	<b>11.2</b>	<b>11.7</b>	12.2
1.2	2.4	4.2	5.4	6.4	7.2	8.2	10.2	11.3	<b>11.7</b>	<b>13</b>
2.1	3.1	<b>5.1</b>	<b>6.1</b>	6.5	7.3	9.1	<b>10.3</b>	11.4	<b>11.8</b>	<b>14.1</b>
2.2	3.2	<b>5.2</b>	<b>6.2</b>	<b>6.6</b>	7.4	9.2	<b>11.1</b>	11.5	12.1	14.2

(\*) En negrita se muestran aquellos aislados que lograron continuar el proceso para caracterización genotípica.

Cuadro 6. Aislados multiespóricos de la colección del Laboratorio Forestal-PDU Forestal provenientes de Canelones (n=25)\*

Canelones						
Aislados Multiespóricos (MEA)						
13	24	<b>32</b>	<b>36</b>	<b>23</b>	<b>31</b>	<b>11</b>
<b>14</b>	26	<b>35</b>	<b>17</b>	<b>25</b>	<b>34</b>	
15	<b>27</b>	38	<b>18</b>	<b>28</b>	<b>37</b>	
<b>21</b>	<b>30</b>	39	19	<b>29</b>	<b>40</b>	

(\*) En negrita se muestran aquellos aislados que lograron continuar el proceso para caracterización genotípica.

Cuadro 7. Aislados punta de hifa y sus correspondientes cultivos multiespóricos (n=59)

Paysandú		Canelones		Tacuarembó	
Punta de hifa	Multiespórico	Punta de hifa	Multiespórico	Punta de hifa	Multiespórico
TL 1	3.2	TLB 1	LB 25	TJ 1	J 18
TL 2	3.9	TLB 2	LB 23	TJ 2	J 11.1
TL 3	4.15.2	TLB 3	LB 11	TJ 3	J 11.7
TL 4	4.1.1	TLB 4	LB 18	TJ 4	J 11.7
TL 5	4.12.2	TLB 5	LB 17	TJ 5	J 6.6
TL 6	4.2.1	TLB 6	LB 31	TJ 6	J 6.1
TL 7	4.2.1.1	TLB 7	LB 32	TJ 7	J 11.8
TL 8	3.5.5	TLB 8	LB 37	TJ 8	J 5.1
TL 9	5.19.1	TLB 9	LB 35	TJ 9	J 14.1
TL 10	5.14.1	TLB 10	LB 27	TJ 10	J 5.2
TL 11	5.2.1	TLB 11	LB 21	TJ 11	J 10.3
TL 12	3.12	TLB 12	LB 34	TJ 12	J 11.2
TL 13	4.14.1	TLB 13	LB 14	TJ 13	J 6.6
TL 14	4.3.2	TLB 14	LB 40	TJ 14	J 6.2
TL 15	3.4	TLB 15	LB 29		
TL 16	4.4	TLB 16	LB 36		
TL 17	4.10	TLB 17	LB 30		
TL 18	4.13.4	TLB 18	LB 28		
TL 19	3.5.4				
TL 20	3.11				
TL 21	4.11.2				
TL 22	4.18				
TL 23	4.5.3				
TL 24	3.6.5				
TL 25	3.5				
TL 26	4.2.3				
TL 27	4.24				

Los aislados utilizados para realizar el genotipado de la población uruguaya se presentan en el Cuadro 8. Se encuentran resaltados aquellos aislados donde fue posible obtener todos los alelos de cada uno de los cinco *loci* (n=22).

Cuadro 8. Aislados genotipados utilizando cinco microsatélites (n=50)

Canelones (n=14)	<b>TLB 2</b>	TLB 3	<b>TLB 4</b>	<b>TLB 6</b>	TLB 8	TLB 9	<b>TLB 11</b>	TLB 12	<b>TLB 13</b>
	<b>TLB 14</b>	TLB 15	TLB 16	TLB 17	TLB 18				
Paysandú (n=23)	TL 1	<b>TL 2</b>	<b>TL 3</b>	TL 4	TL 5	TL 6	TL 8	<b>TL 9</b>	<b>TL 10</b>
	TL 11	TL 12	<b>TL 13</b>	<b>TL 15</b>	TL 16	TL 17	TL 18	<b>TL 20</b>	<b>TL 21</b>
	TL 22	TL 23	TL 24	TL 25	TL 26	TL 27			
Tacurembó (n=13)	TJ 1	<b>TJ 3</b>	<b>TJ 4</b>	<b>TJ 5</b>	<b>TJ 6</b>	<b>TJ 7</b>	<b>TJ 8</b>	<b>TJ 9</b>	TJ 10
	TJ 11	<b>TJ 12</b>	TJ 13	<b>TJ 14</b>					

(\*) Se encuentran resaltados aquellos aislados donde fue posible obtener todos los alelos de cada uno de los cinco *loci* (n=22).

#### 4.1.2. Análisis poblacional de *Teratosphaeria gauchensis*

Se caracterizaron un total de 50 aislados, 14 de Canelones (TLB), 23 de Paysandú (TL) y 13 de Tacuarembó (TJ) utilizando cinco microsatélites (Cuadro 8). En 22 aislados se logró determinar todos los alelos de cada *loci* y en los restantes 28 hubo uno o más alelos que no pudieron ser determinados. Por este motivo la diversidad génica se describió para el conjunto de 50 aislados y la diversidad genotípica para el subconjunto de 22 aislados, los cuales contaban con datos para todos los alelos de cada *locus*.

##### 4.1.2.1. Diversidad génica

Los microsatélites que se utilizaron para el estudio poblacional de *T. gauchensis* generaron tamaños de banda que no se correspondieron con las esperadas según la bibliografía en tres de los cinco *loci* estudiados (Cuadro 9). Los *loci* Kg 1, Kg 2 y Kg 3 presentaron tres alelos cada uno. En cambio el *locus* Kg 8 se caracterizó como monoalélico y el Kg 9 con dos alelos (Cuadro 10). Sólo se encontró un alelo privado en la población de Canelones en el *locus* Kg 3 (Cuadro 10). Se obtuvo como resultado una diversidad génica (H) de cada población de 0.466, 0.351 y 0.390 para los departamentos de Canelones,

Paysandú y Tacuarembó respectivamente. Los resultados de heterocigosidad son comparables y por lo tanto es posible resumir que las poblaciones estudiadas presentan un índice de diversidad génica de 0.402.

Cuadro 9. Tamaños de banda obtenidos para los distintos microsátélites y su tamaño esperado según bibliografía

Locus	Tamaño esperado (pb)*	Tamaño obtenido (pb)
Kg 1	290-327	107-148
Kg 2	148-183	180-222
Kg 3	211-266	213-274
Kg 8	134-150	148
Kg 9	89-98	90-98

\*Cortinas et al. (2008).

Cuadro 10. Resultados del estudio de la diversidad génica de las poblaciones de *T. gauchensis*

Locus	Alelo	Canelones	Paysandú	Tacuarembó
Kg1	107	0,357	0,105	0,167
	112	0,214	0,105	0,250
	148	0,429	0,789	0,853
Kg2	180	0,364	0,214	0,125
	201	0,364	0,643	0,500
	222	0,273	0,143	0,375
Kg3	213	0,600	0,429	0,462
	272	0,100	-	-
	274	0,300	0,571	0,538
Kg8	148	1	1	1
Kg9	90	0,545	0,471	0,583
	98	0,455	0,529	0,417
N		14	23	13
No. de alelos		12	11	11
No. de alelos únicos		1	0	0
Diversidad génica de la población (H)		0,466	0,351	0,390
Diversidad génica de la población global			0,402	

#### 4.1.2.2. Diversidad genotípica

La diversidad genotípica estuvo representada por 11 haplotipos diferentes en el subconjunto de 22 aislados analizados. De ellos seis haplotipos *multilocus* diferentes fueron observados en la población de Canelones, tres para la de Paysandú y seis para la población de Tacuarembó (Cuadro 11). Hubieron algunos haplotipos que se presentaron en dos poblaciones; los haplotipos 4 y 10 estuvieron presentes en Tacuarembó y Paysandú, el 11 en Tacuarembó y Canelones y el 6 en Paysandú y Canelones (Cuadro 11).

Cuadro 11. Ocurrencia de haplotipos por población

Haplotipo	Canelones (n=6)	Paysandú (n=8)	Tacuarembó (n=8)	Total (n=22)
1	TLB 4			1
2			TJ 3 TJ 4	2
3	TLB 6			1
4		TL 20 TL 3 TL 13 TL 15 TL 2	TJ 12	6
5	TLB 14			1
6	TLB 2	TL 10 TL 9		3
7			TJ 5	1
8	TLB 11			1
9			TJ 14	1
10		TL 21	TJ 9 TJ 6	3
11	TLB 13		TJ 4	2

Se obtuvo un máximo de diversidad genotípica ( $\hat{G}\%$ ) de 32.36% lo que indica una diversidad genotípica considerable dentro de la población uruguaya estudiada (Cuadro 12).

Cuadro 12. Diversidad genotípica de la población de *T. gauchensis* (n=22)

	Canelones	Paysandú	Tacuarembó
N	13	23	14
No. de alelos	12	11	11
No. de alelos únicos	1	0	0
H	0,466	0,351	0,390
No. de haplotipos	6	3	6
<i>multilocus</i>			
G		7,12	
Ĝ%		32,36	

#### 4.2. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS DE INVERNÁCULOS

El experimento de inoculación artificial sobre los plantines de *Eucalyptus* spp, dio como resultado la ausencia de síntomas de la enfermedad. Se observó un callo de cicatrización de iguales características en plantines testigos como en los inoculados con *T. gauchensis* (Anexos, Figuras 3, 4, 5, 6, 7 y 8).

## 5. DISCUSIÓN

*Teratosphaeria gauchensis* es el agente causal del cancro por *Coniothyrium*. Su primer reporte en Uruguay fue en el año 2006 (Cortinas et al., 2006) sobre *Eucalyptus grandis*. Van Zyl et al., citados por Cortinas et al. (2006), enuncian que se ha encontrado el patógeno en *E. camaldulensis*. Posteriormente Pérez et al. (2009) reportaron la aparición de *T. gauchensis* en Uruguay causando manchas foliares en hojas de *E. maidenii* y *E. tereticornis*. En concordancia con lo anterior en el presente estudio, se logró aislar al patógeno tanto de *E. grandis* como en eucaliptos colorados (*E. camaldulensis*, *E. tereticornis* o híbridos entre ambos). A pesar de haber intentado aislar el patógeno a partir de canchros de *E. dunnii* no se pudieron obtener cultivos puros del mismo.

Cortinas et al. (2008) diseñaron microsátélites para *T. gauchensis* y describieron rangos de alelos para cada *loci* en las poblaciones de este hongo en Uruguay y Argentina. De los cinco microsátélites utilizados en este estudio, dos de ellos (Kg1 y Kg2) mostraron rangos de alelos muy distintos a los reportados previamente por estos autores. Este resultado sorprendente ocasionó problemas a la hora de la lectura de los fragmentos de amplificación por PCR marcados con fluorescencia ya que se solaparon rangos de alelos de los *loci* Kg2 (180-222) y Kg3 (213-274) marcados con el mismo fluoróforo y el rango de Kg1 (107-148) estuvo muy próximo al rango de Kg9 (90-98). Por este motivo se recomienda modificar los fluoróforos de estos “primers” en estudios futuros teniendo en cuenta los alelos aquí encontrados.

Estudios realizados por Cortinas et al. (2011b) mostraron que *T. gauchensis* presenta una gran diversidad génica ( $H=0.43$ ). En el presente estudio se observó una diversidad génica ( $H$ ) de 0.402 para la población total analizada. En concordancia con Cortinas et al. (2011b), la alta variabilidad poblacional que presenta *T. gauchensis* en Uruguay, hace suponer, que la especie podría ser nativa. Al introducir *Eucalyptus* spp. en Uruguay, y utilizarlo como cultivo comercial (plantaciones homogéneas, de una misma especie y/o mismo clon) podría haber generado una presión de selección de gran importancia, permitiendo el salto del patógeno de especies nativas a la especie introducida. Citando a Cortinas et al. (2011b), la alta diversidad génica que presenta *T. gauchensis* es comparable con patógenos nativos.

Para el estudio de la diversidad genotípica, se contó con una cantidad de aislados relativamente pequeña (22 aislados). Los resultados muestran, en concordancia con Cortinas et al. (2011b), que existe un gran nivel de diversidad genotípica (50%). En el estudio realizado se obtuvo una diversidad genotípica de 32.36%. Los genotipos más frecuentes fueron los del haplotipo 4. Se encontraron tanto en Paysandú como en Tacuarembó, existiendo predominancia en el primer departamento. El modo de reproducción de *T. gauchensis* observado en este trabajo y coincidente con la bibliografía (Cortinas et al., 2011b), fue exclusivamente asexual. La alta diversidad genotípica, 11 haplotipos en 22 aislados analizados, hace suponer que el patógeno debe estar reproduciéndose tanto asexual como sexualmente.

Se utilizaron 50 aislados de tres Departamentos, de los cuales en 22 fue posible obtener todos los *loci*. Si bien es un número reducido, logra cumplir los objetivos de esta tesis; no obstante sería importante seguir investigando y ampliar el muestreo, ya que, es esperable mayor cantidad de haplotipos y más alelos.

En el presente trabajo no se pudieron reproducir los síntomas de la enfermedad en inoculaciones artificiales utilizando la misma técnica de inoculación realizada por Ramos (2011). Se proponen dos hipótesis que podrían explicar estas diferencias: La primera, supone la utilización de genotipos de *Eucalyptus* ya resistentes a la infección de *Teratosphaeria gauchensis* y una segunda hipótesis sugiere que el método de inoculación no fue el apropiado o existió mala praxis por parte de los operarios. Para testar las mismas estudios futuros deberían incluir genotipos de conocida susceptibilidad y repetir los protocolos de inoculación artificial.

## 6. CONCLUSIONES

*Teratosphaeria gauchensis* es un patógeno que presenta variabilidad poblacional, en concordancia con la bibliografía consultada. La tesis en cuestión corrobora lo ya publicado por otros autores, encontrando una gran diversidad genotípica (32.36%). A su vez, pone en manifiesto la probable recombinación alélica mediante la reproducción sexual en la naturaleza por parte del patógeno. Su gran variabilidad genética podría generar la ruptura de la resistencia obtenida en los genotipos clonales de *Eucalyptus* spp. que se utilizan hoy en día las empresas forestales en Uruguay.

Si bien no se obtuvieron resultados en la inoculación artificial del patógeno sobre los plantines de *Eucalyptus* spp. sería interesante continuar con estudios de la misma índole sobre el patógeno en cuestión, ya que conocer cepas con mayor virulencia sobre *Eucalyptus* permitiría seguir mejorando genéticamente a los mismos y poder evitar o disminuir posibles epifitias de la enfermedad en Uruguay.

## 7. RESUMEN

La forestación en Uruguay comienza a desarrollarse como rubro importante a partir del año 1950. El cultivo de especies forestales exóticas (tales como *Eucalyptus* spp. y *Pinus* spp.) y su establecimiento en la región, trajo aparejado la aparición de enfermedades sobre estas especies. *Teratosphaeria gauchensis* es una de ellas y fue reportada en el año 2006 atacando especies de *Eucalyptus* spp. principalmente sobre *E. grandis* causando la enfermedad denominada “Daño por *Coniothyrium*”. El objetivo de esta tesis fue describir la variabilidad poblacional de *T. gauchensis* en Uruguay y conocer la susceptibilidad de diversos genotipos de *Eucalyptus* spp. mediante ensayos de inoculación artificial. Los resultados mostraron una gran diversidad genética dentro de la población de *T. gauchensis*, lo cual aporta evidencias que sugieren en primer instancia, la existencia de reproducción sexual en la naturaleza a pesar de que solo se conoce su fase asexual; y la posibilidad de tratarse de un hongo nativo el cual “saltó” de mirtáceas autóctonas a mirtáceas exóticas tal como *Eucalyptus* spp. No se logró reproducir los síntomas en los ensayos de inoculación artificial por lo que sería propicio volver a realizar los mismos utilizando genotipos de conocida susceptibilidad.

Palabras clave: Forestación; Protección vegetal; Fitopatología; Eucalyptus; Genética poblacional; Micología.

## 8. SUMMARY

Forestry begins to develop as an important industry in Uruguay in 1950. The plantation of exotic species (such as *Eucalyptus* spp. and *Pinus* spp.) and their establishment in the region brought with them new pests and diseases. *Teratosphaeria gauchensis* is one of these new diseases; it was first reported in 2006 and it colonizes *Eucalyptus* spp. mainly *E. grandis* causing the disease known as “*Coniothyrium* stem canker”. The objective of this thesis was to prospect, collect and describe the *T. gauchensis* population diversity in Uruguay and to carry out artificial inoculation tests in *Eucalyptus* spp. genotypes. The results show a great genetic diversity within the *T. gauchensis* population, which evidences the existence of sexual reproduction in nature, even though only their asexual phase is known and the possibility of being a native fungus that have had a host “jump” from native Myrtaceae to exotic ones such as *Eucalyptus* spp. Disease symptoms were not recuperated from artificial inoculation tests, so it would be necessary to remake them using *a priori* susceptible genotypes.

Keywords: Forestry; Plat Pathology; Forest protection; *Eucalyptus*; Population genetics; Mycology.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

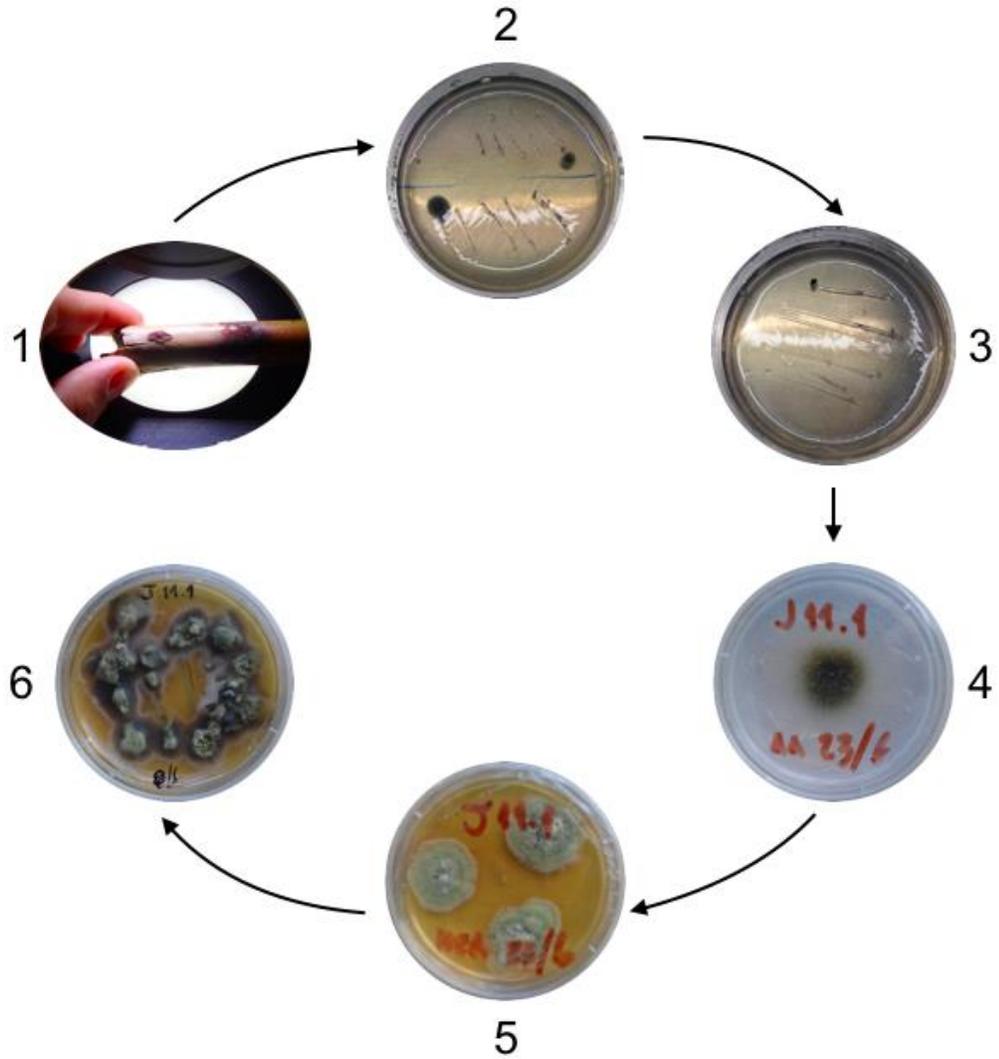
1. Agrios, G. 1995. Fitopatología. 16<sup>a</sup>. ed. s.l., Uteha/Noriega. 838 p.
2. Balmelli, G.; Marroni, V.; Altier, N.; García, R. 2004. Potencial del mejoramiento genético para el manejo de enfermedades en *Eucalyptus globulus*. Montevideo, INIA. 42 p. (Serie Técnica no. 143).
3. Barnes, I.; Roux, J.; Wingfield, B. D.; O' Neill, M.; Wingfield, M. J. 2003. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay. Australasian Plant Pathology. 32 (3): 361-366.
4. Chen, S. F.; Barnes, I.; Chungu, D.; Roux, J.; Wingfield, M. J.; Xie, Y. J.; Zhou, X. D. 2011. High population diversity and increasing importance of the Eucalyptus stem canker pathogen, *Teratosphaeria zuluensis*, in South China. Australasian Plant Pathology. 40 (4): 407-415.
5. Cortinas, M. N.; Crous, P. W.; Wingfield, B. D.; Wingfield, M. J. 2006. Multi-gene phylogenies and phenotypic characters distinguish two species within the *Colletogloeopsis zuluensis* complex associated with *Eucalyptus* stem cankers. Studies in Mycology. 55: 133-146.
6. \_\_\_\_\_; Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. 2008. Microsatellite markers for the *Eucalyptus* stem canker fungal pathogen *Kirramyces gauchensis*. Molecular Ecology Resources. 8: 590-592.
7. \_\_\_\_\_.2011a. Taxonomy and population genetics of *Teratosphaeria* causing stem cankers on Eucalyptus trees. Tesis PhD. Pretoria, South Africa. University of Pretoria. 225 p.
8. \_\_\_\_\_; Barnes, I.; Wingfield, B. D.; Wingfield, M. J. 2011b. Unexpected genetic diversity revealed in the *Eucalyptus* canker pathogen *Teratosphaeria gauchensis*. Australasian Plant Pathology. 40 (5): 497-503.
9. Coutinho, T. A.; Brady, C. L.; van der Vaart, M.; Venter, S. N.; Telechea, N.; Rolfo, M.; Pérez, C.; Wingfield, M. J. 2010. A new shoot and

- stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. Australasian Plant Pathology. 40 (1): 55-60.
10. Gryzenhout, M.; Myburg, H.; van der Merwe, N. A.; Wingfield, B. D.; Wingfield, M. J. 2004. *Chrysosporthe* a new genus to accommodate a *Cryphonectria cubensis*. Studies in Mycology. 50: 119-142.
  11. Lupo, S.; Pérez, A.; Martínez, S.; Simeto, S.; Rivas, F.; Betucci, L. 2009. In vitro characterization of *Inocutis jamaicensis* and experimental inoculation of *Eucalyptus globulus* standing trees. Forest Pathology. 39 (5): 293-303.
  12. Marraro Acuña, F.; Garran, S. M. 2004. Detección de *Kirramyces epicoccoides*, *Puccinia psidii* y *Coniothyrium zuluense* agentes causales de enfermedades en *Eucalyptus* spp . en la zona de Concordia, Entre Ríos, Argentina. INTA. 33 (3): 135-148.
  13. Martínez, S.; Lupo, S.; Betucci, L. 2002. *Inonotus splitbergeri* a stem pathogen of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. Fitopatologia Brasileira. 27 (4): 420.
  14. \_\_\_\_\_.;\_\_\_\_\_.;\_\_\_\_\_. 2014. Podredumbre de árboles en pie. INIA. Reconocimiento a Campo de Plagas y Enfermedades Forestales. no. 41. 2 p.
  15. MGAP. DGF (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección General Forestal, UY). 2012. Superficie forestal bajo proyecto. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado ago. 2015. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,dgf,dgf-recursos-forestal,O,es,0,>.
  16. \_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_. 2014. Extracción – Producción – Consumo. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado oct. 2015. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,dgf,dgf-extraccion-produccion-consumo,O,es,0,>.
  17. Old, K. M.; Wingfield, M. J.; Yuan, Z. Q. 2003. A manual of diseases of eucalypts in South-East Asia. Bogor, Indonesia, Center for International Forestry Research. 97 p.

18. Pérez, C. A.; Wingfield, M. J.; Altier, N. A.; Blanchette, R.A. 2009. *Mycosphaerellaceae* and *Teratosphaeriaceae* associated with *Eucalyptus* leaf diseases and stem cankers in Uruguay. *Forest Pathology*. 39 (5): 349-360.
19. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; Slippers, B.; Altier, N. A.; Blanchette, R. A. 2010. Endophytic and canker-associated *Botryosphaeriaceae* occurring on non-native *Eucalyptus* and native *Myrtaceae* trees in Uruguay. *Fungal Diversity*. 41 (1): 53-69.
20. Pérez, G.; Lupo, S.; Betucci, L. 2008. Polymorphisms of the ITS region of *Inocutis jamaicensis* associated with *Eucalyptus globulus*, *Vitis vinifera* and native plants in Uruguay. *Sydowia*. 60 (2): 267- 275.
21. \_\_\_\_\_.; Hunter, G. C.; Slippers, B.; Pérez, C.; Wingfield, B. D.; Wingfield, M. J. 2009. *Teratosphaeria (Mycosphaerella) nubilosa*, the causal agent of *Mycosphaerella* leaf disease (MLD), recently introduced into Uruguay. *Plant Pathology*. 125 (1): 109-118.
22. Ramos, S. O. 2011. Morfología, crecimiento vegetativo y patogenicidad de *Kirramyces gauchensis* aislado de *Eucalyptus*. Tesis Msc. Balcarce, Argentina. UNmdP. Facultad de Ciencias Agrarias. 51 p.
23. Roux, J.; Coetzee, M. P. A. 2005. First report of pink disease on native trees in South Africa and phylogenetic placement of *Erythricium salmonicolor* in the *Homobasidiomycetes*. *Plant Disease*. 89 (11): 1158-1163.
24. Silva, M. R. C.; Diogo, E.; Bragança, H; Machado, H.; Phillips, A. J. L. 2014. *Teratosphaeria gauchensis* associated with trunk, stem and foliar lesions of *Eucalyptus globulus* in Portugal. *Forest Pathology*. 45 (3): 224-234.
25. Slippers, B.; Wingfield, M. J. 2007. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants; diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*. 21 (2-3): 90-106.
26. Soria, S.; Alonso, R.; Betucci, L.; Lupo, S. 2014. First report of *Teratosphaeria pseudoecalypti* in Uruguay. *Australasian Plant Disease Notes*. 9: 146.

27. Stoddart, J.; Taylor, J. 1988. Genotypic diversity; estimation and prediction in samples. *Genetics*. 118: 705-711.
28. Telechea, N.; Rolfo, M.; Coutinho, T. A.; Wingfield, M. J. 2003. *Puccinia psidii* on *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *Plant Pathology*. 52 (3): 427.
29. Tommerup, I. C.; Alfenas, A. C.; Old, K. M. 2003. Guava rust in Brazil; a threat to *Eucalyptus* and other Myrtaceae. *New Zealand Journal of Forestry Science*. 33 (3): 420-428.
30. Vassallo, M; Bruno, Y.; Carriquiry, M. R.; Courdin, V.; Durán, V.; García, F.; Hernández, A.; Rodríguez, N.; Tamosiunas, M. 2011. Dinámica y competencia intrasectorial en el Agro; Uruguay 2000-2010. Montevideo, Facultad de Agronomía. 170 p.
31. Wingfield, M. J.; Crous, P. W.; Coutinho, T. A. 1996. A serious canker disease of *Eucalyptus* in South Africa caused by a new species of *Coniothyrium*. *Mycopathologia*. 136 (3): 139-145.

10. ANEXOS



1. Extracción de picnidios
2. Colonias multiespóricas (MEA)
3. Primer repique (MEA)
4. Segundo repique (AA)
5. Tercer repique (MEA)
6. Colonia punta de hifa (MEA)

Figura 2. Flujo de trabajo para aislamiento de *Teratosphaeria gauchensis* *in vitro*

Cuadro 13. Diseño de experimento en invernáculo.

<b>B L O C O 1</b>	Clon A/1/32	<b>B L O C O 2</b>	Clon A/2/32	<b>B L O C O 3</b>	Clon A/3/32	<b>B L O C O 4</b>	Clon A/4/32	<b>B L O C O 5</b>	Clon A/5/32
	Clon A/1/35		Clon A/2/35		Clon A/3/35		Clon A/4/35		Clon A/5/35
	Clon A/1/36		Clon A/2/36		Clon A/3/36		Clon A/4/36		Clon A/5/36
	T Clon A/1		T Clon A/2		Clon B/3/32		Clon B/4/32		Clon B/5/32
	Clon B/1/32		Clon B/2/32		Clon B/3/35		Clon B/4/35		Clon B/5/35
	Clon B/1/35		Clon B/2/35		Clon B/3/36		Clon B/4/36		Clon B/5/36
	Clon B/1/36		Clon B/2/36		T Clon B/3		T Clon B/4		T Clon B/5
	T Clon B/1		T Clon B/2		Clon C/3/32		Clon C/4/32		Clon C/5/32
	Clon C/1/32		Clon C/2/32		Clon C/3/35		Clon C/4/35		Clon C/5/35
	Clon C/1/35		Clon C/2/35		Clon C/3/36		Clon C/4/36		Clon C/5/36
	Clon C/1/36		Clon C/2/36		T Clon C/3		T Clon C/4		T Clon C/5
	T Clon C/1		T Clon C/2		Clon D/3/32		Clon D/4/32		Clon D/5/32
	Clon D/1/32		Clon D/2/32		Clon D/3/35		Clon D/4/35		Clon D/5/35
	Clon D/1/35		Clon D/2/35		Clon D/3/36		Clon D/4/36		Clon D/5/36
	Clon D/1/36		Clon D/2/36		T Clon D/3		T Clon D/4		T Clon D/5
	T Clon D/1		T Clon D/2		Clon E/3/32		Clon E/4/32		Clon E/5/32
	Clon E/1/32		Clon E/2/32		Clon E/3/35		Clon E/4/35		Clon E/5/35
	Clon E/1/35		Clon E/2/35		Clon E/3/36		Clon E/4/36		Clon E/5/36
	Clon E/1/36		Clon E/2/36		T Clon E/3		T Clon E/4		Clon F/5/32
	T Clon E/1		T Clon E/2		Clon F/3/32		Clon F/4/32		Clon F/5/35
Clon F/1/32	Clon F/2/32	Clon F/3/35	Clon F/4/35	Clon F/5/36					
Clon F/1/35	Clon F/2/35	Clon F/3/36	Clon F/4/36						
Clon F/1/36	Clon F/2/36	T Clon F/3	T Clon F/4						
T Clon F/1	T Clon F/2								

## Esquema 1. Protocolo de extracción de ADN

- 1) Raspar el micelio aéreo de la cepa pura del medio de cultivo, colocarlo en un "Eppendorf" de 2 mL, y almacenar rápidamente en hielo.
- 2) Almacenar las muestras en "freezer" a -20°C para su posterior uso.
- 3) Encender el baño a 65°C y dejarlo calentando mientras continuamos con la extracción.
- 4) Agregar 700 µL de Buffer CTAB 2X y desintegrar el micelio con mortero dentro del tubo "Eppendorf"
- 5) Llevar al baño por media hora, y finalizado el proceso bajarlo a 37°C.
- 6) Agregar 600 µL de CIA 24:1, mezclar durante 3 minutos a 20 Hz en vórtex, y centrifugar a 14000 RPM durante 5 minutos.
- 7) Pasar la fase superior a un "Eppendorf" de 1,5 mL previamente rotulado.
- 8) Agregar 25 µL de proteinasa K y llevar al baño por media hora a 37 °C.
- 9) Volver a agregar 600 µL de cloroformo isoamílico 24:1, mezclar por inversión, y centrifugar a 14000 RPM durante 5 minutos.
- 10) Pasar la fase superior a un nuevo "Eppendorf" rotulado previamente.
- 11) Agregar 2/3 de Isopropanol frío e incubar a -20°C durante un mínimo de 2 horas.
- 12) Sacar las muestras del congelador y centrifugar nuevamente a 14000 RPM durante 5 minutos.
- 13) Descartar el Isopropanol y quedarse con el *pellet*.
- 14) Lavar el *pellet* con 1 mL de etanol 70%, centrifugar a 14000 RPM, luego eliminar el etanol y quedarse con el "pellet". Siempre tener cuidado de no eliminar el *pellet*, si el mismo está adherido al fondo del tubo se puede tirar la solución directamente, de lo contrario sacar con pipeta cuidando de no llevarlo con el líquido
- 15) Secar el *pellet* en estufa a 65 °C, resuspender en 100 µL de ARNasa e incubar por 30 minutos a 65 °C en el baño.
- 16) Finalizado el proceso guardar las muestras de ADN en el "freezer", para su posterior análisis.



Figura 3. Resultado de inoculación asistida sobre genotipo 1. Izquierda a derecha: Testigo, Inoc. LB 32, LB 35, Inoc. LB 36. Foto tomada a 77 dpi.



Figura 4. Resultado de inoculación asistida sobre genotipo 2. Izquierda a derecha: Testigo, Inoc. LB 32, Inoc. LB 35, Inoc. LB 36. Foto tomada a 77 dpi.



Figura 5. Resultado de inoculación asistida sobre genotipo 3. Izquierda a derecha: Testigo, Inoc. LB 32, Inoc. LB 35, Inoc. LB 36. Foto tomada a 77 dpi.



Figura 6. Resultado de inoculación asistida sobre genotipo 4. Izquierda a derecha: Testigo, Inoc. LB 32, Inoc. LB 35, Inoc. LB 36. Foto tomada a 77 dpi.



Figura 7. Resultado de inoculación asistida sobre genotipo 5. Izquierda a derecha: Testigo, Inoc. LB 32, Inoc. LB 35, Inoc. LB 36. Foto tomada a 77 dpi.



Figura 8. Resultado de inoculación asistida sobre genotipo 6. Izquierda a derecha: Testigo, Inoc. LB 32, Inoc. LB 35, Inoc. LB 36. Foto tomada a 77 dpi.