

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE *Teratosphaeria pseudoecalypti* Y
EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA EN *Eucalyptus* spp. DE
INTERÉS PARA EL SECTOR AGROFORESTAL DEL URUGUAY**

por

Nazaret RAMIREZ BERRUTTI

**TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de *Magister* en Ciencias
Agrarias Opción Ciencias
Vegetales**

**PAYSANDÚ
URUGUAY
Noviembre 2017**

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Dr. Gustavo Balmelli, Dra. Elisa Silvera y MSc. Sofía Simeto, el 22 de noviembre del 2017.

Autora: Ing. Agr. Nazaret Ramirez Berrutti

Director: Dr. Carlos A. Pérez.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi abuelo Tomás, quien me enseñó la importancia de la educación en la vida de una persona; a mi madre María, quien me brindó la posibilidad de estudiar; a mi tío Ismael, quien me incentivó a transitar el camino de investigación; y a Lelael, quien nunca permitió que desistiera.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Agronomía, de la Universidad de la República, por brindarme la oportunidad de una educación de posgrado de alto nivel académico reconocido mundialmente.

A mi tutor Carlos A. Pérez, quien supo guiarme académicamente tratando de que fortaleciera mis habilidades en el camino de la integración de nuevos conocimientos, como también de la búsqueda de la mejora continua.

A todos los docentes y compañeros que me transmitieron sus conocimientos y vivencias de investigación, enriqueciendo de esta manera mi formación como investigadora.

A las instituciones que apoyaron este trabajo, a partir de capital financiero como humano, quienes sin su apoyo no hubiera sido posible la investigación.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	IV
RESUMEN	VII
SUMMARY	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>CARACTERIZACIÓN DE <i>Teratosphaeria pseudoecalypti</i> AGENTE CAUSAL DE LA MANCHA AMARILLA DEL EUCALIPTO EN URUGUAY</u> ...8	
Resumen.....	9
Summary.....	10
INTRODUCCIÓN	11
MATERIALES Y MÉTODOS	13
<i>Caracterización fenotípica de la colección de T. pseudoecalypti</i>	13
<i>Caracterización genética de la colección de T. pseudoecalypti</i> -	
<i>Extracción de ADN</i>	14
<i>Amplificación por PCR</i>	15
<i>Secuenciación y análisis filogenético</i>	16
<i>Secuenciación del genoma de T. pseudoecalypti</i>	23
<i>Diseño de cebadores</i>	23
RESULTADOS	25
<i>Caracterización fenotípica de la colección de T. pseudoecalypti</i>	25
<i>Caracterización genética de la colección de T. pseudoecalypti</i>	29
DISCUSIÓN	32
AGRADECIMIENTOS	35
BIBLIOGRAFÍA	35

3. <u>RESISTENCIA GENÉTICA A <i>Teratosphaeria pseudoecalypti</i> EN GERMOPLASMAS DE <i>Eucalyptus</i> DE INTERÉS PARA URUGUAY</u>	39
Resumen	40
Summary	41
INTRODUCCIÓN	42
MATERIALES Y MÉTODOS	43
<i>Ensayos de campo</i>	43
<i>Desarrollo de una escala diagramática de severidad</i>	46
<i>Ajuste de un método de inoculación artificial</i>	46
<i>Producción de inóculo</i>	47
<i>Técnica de inoculación artificial</i>	48
<i>Mecanismo de penetración de <i>T. pseudoecalypti</i> en la hoja</i>	49
RESULTADOS	49
<i>Ensayos a campo</i>	49
<i>Producción de inóculo</i>	58
<i>Técnica de inoculación artificial</i>	58
<i>Método de inoculación ajustado para <i>T. pseudoecalypti</i></i>	59
<i>Mecanismo de penetración de <i>T. pseudoecalypti</i></i>	61
DISCUSIÓN	61
AGRADECIMIENTOS	64
BIBLIOGRAFÍA	65
4. <u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	69
5. <u>BIBLIOGRAFÍA GENERAL</u>	70

RESUMEN

En los últimos años se ha observado que al menos ocho especies de *Eucalyptus* están siendo afectadas por la mancha amarilla del eucalipto, causada por *Teratosphaeria pseudoecalypti*. Este estudio tiene como principal objetivo la caracterización de la población de *T. pseudoecalypti* en Uruguay y la búsqueda de resistencia en germoplasmas de interés. El trabajo se basa en: i) la caracterización de una colección de 217 cepas, generada a partir de colectas a nivel nacional; ii) en la evaluación del comportamiento sanitario de 16 germoplasmas en tres localidades del país, y iii) en el ajuste de un protocolo de inoculación artificial para este patógeno. Los resultados indican que la población del patógeno en Uruguay está constituida por un único haplotipo, correspondiendo al haplotipo KE8 de *T. pseudoecalypti*, reportado en Queensland (Australia) en el año 2010. Se evidencia un tipo de apareamiento heterotálico, donde la totalidad de la población analizada sólo presentó al alelo MAT1-1. A su vez, los ensayos de campo indicaron que *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* y *E. globulus* presentaron la mayor susceptibilidad, aunque dentro de estas especies se observaron individuos con buen comportamiento, sugiriendo que es posible la selección por resistencia. Los resultados de la inoculación artificial indican que, si bien es posible reproducir la enfermedad, la principal limitante encontrada es la dificultad para multiplicar el inóculo, lo cual requiere mayor investigación. Este trabajo es el primer estudio poblacional del patógeno con cinco marcadores moleculares realizado fuera del centro de origen del patógeno, así como también representa la primera caracterización del locus MAT para esta especie. A su vez, aporta valiosa información respecto a la variabilidad en la resistencia entre y dentro de las principales especies de *Eucalyptus*, de interés nacional.

Palabras clave: Mancha amarilla, genética de poblaciones, patología forestal

SUMMARY

Genetic characterization of *Teratosphaeria pseudoeucalypti* and screening for resistance of *Eucalyptus* spp. of interest for the agro-forestry industry in Uruguay

During the last years at least eight *Eucalyptus* species are being severely affected by Teratosphaeria Leaf Blight (TLB), caused by *Teratosphaeria pseudoeucalypti*. The aims of this study were to: i) characterize the population structure of *T. pseudoeucalypti* in Uruguay, ii) perform a screening for genetic resistance in germplasm of interest, and iii) adjust an artificial inoculation protocol. The investigation was based on a culture collection of 217 strains from the whole country. Sixteen germplasms were tested for resistance in field experiments located in three different regions. Finally, a protocol of artificial inoculation was adjusted for this pathogen. Our results indicate that only one haplotype of *T. pseudoeucalypti* is present in Uruguay, corresponding to haplotype KE8 reported in Queensland (Australia) in 2010. There is a strong evidence that this pathogen is heterothallic, and only mating type MAT1-1 was found in Uruguay. *Eucalyptus camaldulensis*, *E. tereticornis* and *E. globulus* are the most susceptible species, with great resistance variability intra-species, thus, selection for resistance is a promissory alternative to minimize the impact of this disease. Although it was feasible to reproduce the disease with artificial inoculation, the main limiting factor was the inoculum production, which needs further investigation. This is the first population study of this pathogen based on five molecular markers, performed outside of the center of origin. It represents, also the first genetic characterization exploring the mating type of this species. The high variability observed on the genetic resistance inter- and intra-species represent a key information to minimize the impact of this disease on *Eucalyptus* plantations in Uruguay.

Keywords: Teratosphaeria leaf blotch, population genetic, forest pathology

1. INTRODUCCIÓN

Los eucaliptos son árboles austro-malayos, pertenecientes a la familia Myrtaceae, con una extensión natural desde los 7° N a 43° 39' S de latitud. La gran mayoría de las especies son endémicas del continente australiano e islas adyacentes, pero también se encuentran en Papúa Nueva Guinea e islas del oriente de Indonesia. Muchas de las plantaciones exóticas de eucalipto ubicadas en países tropicales y subtropicales, proceden de especies del norte de Taree, de la mayor parte de New South Wales, de todo Queensland y de la mayor parte de Western Australia, pero la mayoría proviene del cinturón ininterrumpido de terreno que se extiende desde el Cabo York en Queensland hasta el extremo austral del continente en Victoria. Estas procedencias otorgan alto potencial de producción y adaptación a periodos de sequía, debido a que tienen origen en la llamada “zona de lluvias de verano”, área que recibe la mayor precipitación pero también la mayor evapotranspiración; la zona se divide en cuatro áreas: tres a lo largo de la costa norte-noreste de Taree y New South Wales con una precipitación promedio anual superior a 1200 mm y una en Queensland, cerca de Cairns con una precipitación promedio anual superior a 2500 mm (Bush, 2011).

Uruguay es uno de los 58 países cultivadores de eucalipto en el mundo (Bush, 2011), al presentar condiciones propicias para el desempeño y adaptación de dicho género. Situado en la costa este de América del Sur, entre los 30° y 35° S de latitud, en zona subtropical templada; con una precipitación acumulada anual de 1200 y 1600 mm, mínimos valores registrados en el suroeste y máximos en el noreste del país; una temperatura media anual de 17,7 °C, variando desde 19,8 °C en la zona noroeste hasta unos 16,6 °C en la costa sur del país; una temperatura máxima en los meses de enero y febrero con promedio nacional de 22,6 °C; una temperatura mínima en los meses de junio y julio con promedio nacional de 12,9 °C; el promedio de la humedad relativa del aire sobre el país,

presenta una variación espacial creciente del noroeste al sureste con valor medio anual entre 70 y 78% (Castaño, Giménez, Ceroni, Furest y Aunchayna, 2011).

A partir de la década de los años 60, Uruguay comienza a desarrollar el rubro forestal al visualizarse como una actividad viable, con potencial dinamizador del medio rural y de la economía del país (Soust, 2012). La superficie bajo plantación de eucalipto tuvo un incremento constante en el tiempo, pasando de 15.000 ha en 1979 (Soust, 2012) a 726.000 ha en 2013 (DIEA, 2015). El *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *globulus*, seguido de *E. camaldulensis* Dehnh. y *E. tereticornis* Sm. fueron las especies pioneras, plantadas por primera vez a partir de semilla de origen desconocido, con el propósito de proporcionar protección contra el viento, sombra y refugio para el ganado, como también para la obtención de madera para poste y leña (Bush, 2011); actualmente las especies que predominan son el *E. globulus* (309.088 ha), *E. grandis* Hill. ex Maiden (250.569 ha) y *E. dunnii* Maiden (81.365 ha) (DIEA, 2016).

En los últimos 20 años, las plantaciones de eucaliptos han ido incrementado exponencialmente en el tiempo. Durante los primeros años de este desarrollo, al ser especies introducidas, pudieron crecer en ausencia de sus enemigos naturales, que habían quedado en su lugar de origen (Australia), esto permitió que los mismos pudieran expresar su potencial genético con altas tasas de crecimiento y productividad. La globalización, el comercio mundial y principalmente el movimiento de germoplasma para la instalación de plantaciones de eucalipto en todo el mundo, ha favorecido el movimiento de plagas y enfermedades del eucalipto, en muchos casos resultando en las invasiones biológicas (Philibert et al., 2011) y en el reencuentro del eucalipto con algunos de sus enemigos naturales (Wingfield et al., 2008), los cuales luego de establecerse en el nuevo ecosistema pueden ser una amenaza de extinción para otras Myrtaceae (Wingfield, Brouckhoff, Wingfield y Slippers, 2015).

Un típico ejemplo de este tipo de reencuentro es el caso de *Teratosphaeria nubilosa*, hongo causal de la llamada mancha foliar por *Mycosphaerella*, patógeno descrito por primera vez en Victoria (Australia) ocasionando severos daños en plantaciones de eucalipto (Cooke, 1891). Este patógeno afecta principalmente al *E. globulus* y *E. nitens* Deane & Maiden (Hunter, Roux, Wingfield, Crous y Wingfield, 2004; Crous, Braun y Groenewald, 2007). La excelente aptitud de *E. globulus* para producción de madera para pulpa de celulosa la transformó en una de las especies de mayor adopción a nivel global, con su introducción en distintos países, siendo el *E. globulus* ssp. *globulus* la especie, de mayor distribución (FAO, 2001). Sin embargo, esta especie de *Eucalyptus* es una de las que presenta mayor susceptibilidad a *T. nubilosa*, y en general la introducción de este patógeno a regiones donde el *E. globulus* presentaba muy buena adaptación y productividad, ha puesto en jaque su viabilidad. El impacto de las manchas foliares causadas por este patógeno es tan severo en *E. globulus* que en la mayoría de los sitios el reencuentro patógeno-hospedero ha llevado al abandono de esta especie debido a la escasa resistencia genética, lo cual limita el manejo de este patógeno (Hunter et al., 2008; Pérez, Slippers, Wingfield, Hunter y Wingfield, 2010). El desarrollo de técnicas moleculares para el análisis de la estructura genética de poblaciones, ha permitido estudiar el movimiento global y por ende la identificación de rutas de introducción del patógeno a distintos países. Claro ejemplo es el estudio de *T. nubilosa* con marcadores microsatélites, que evidenció que el patógeno es originario de Australia y fue introducido en África, luego España, Portugal, Uruguay y Brasil (Hunter et al., 2008; Pérez et al., 2010; Wingfield et al., 2015).

Los marcadores moleculares se han convertido en una potente herramienta para estudiar la estructura genética de poblaciones: permiten determinar centros de origen (Zhou et al., 2007) y vías de introducción de los patógenos (Brown y Hovmoller, 2002). Esta información es de gran importancia para programas de reducción de riesgos, como la

implementación de cuarentena y detección temprana de enfermedades emergentes y nuevas invasiones biológicas (Wingfield et al., 2013), incluso permitiendo identificar la etapa en la cual se encuentra la invasión (transporte, llegada, establecimiento y expansión de la población) (Lockwood, Cassey y Blackburn, 2005). En términos generales, las invasiones biológicas comienzan con un “efecto fundador”, donde un número reducido de individuos de la población original lleva una fracción de la diversidad genética (Ficetola, Bonin y Miaud, 2008) representando una pequeña muestra de la diversidad de su población. Una vez en el nuevo ecosistema, el patógeno sufre presión de selección natural, dada principalmente por la interacción de la población del patógeno con los hospederos disponibles y el ambiente (Suárez y Tsutsui, 2008). Sobre esta base, el análisis de la estructura genética permite estimar en qué etapa del proceso de invasión se encuentra la población en estudio.

Un nuevo caso de movimiento accidental de patógenos forestales ha ocurrido recientemente. Se trata del patógeno foliar *Teratosphaeria pseudoeucaalypti*, agente causal del llamado tizón de la hoja por *Teratosphaeria* (TLB por su sigla en inglés); de taxonomía Fungi, Ascomycota, Dothideomycetes, Capnodiales, Teratosphaeriaceae. Este patógeno fue reportado por primera vez en la provincia de Queensland, Australia, en el año 2010, causando severos daños en plantaciones de *Eucalyptus* sp. e híbridos de *E. grandis* x *E. camaldulensis*, pasando a ser la principal amenaza de las plantaciones de eucalipto de esa región (Andjic et al., 2010). La especie fue caracterizada genéticamente mediante un estudio de polimorfismo en nucleótidos simples (SNP's por su sigla en inglés) a partir de cuatro regiones génicas: Internal transcribed spacer 2 (ITS2), beta tubulina 2 (β t-2), factor de elongación (EF1- α) y ATP sintasa (ATP6); a partir de un análisis filogenético con método de máxima parsimonia. El análisis multigénico basado en las cuatro regiones permitieron identificar cinco haplotipos: KE8, KE9, KE10, KE11 y KE12, presentes en norte-centro y sur de Queensland (Australia) (Andjic et al., 2010). Recientemente, se reportó la

presencia de este patógeno en Sudamérica, siendo la primera detección de este patógeno fuera de Australia. Coincidentemente en el 2014 fue reportado simultáneamente en Argentina, Brasil y Uruguay. En Argentina se reportó en plantaciones de híbridos de *E. camaldulensis* x *E. grandis* (Ramos y Pérez, 2014); en Brasil, en plantaciones de *E. globulus*, *E. urophylla* Blake x *E. globulus*, *E. nitens* x *E. globulus* (De Souza et al., 2014) y en Uruguay, en plantaciones de *E. globulus* y *E. maidenii* Muell. (Soria, Alonso, Bettucci y Lupo, 2014). En el caso de Uruguay, se ha observado también en *E. botryoides*, *E. camaldulensis*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. macarthurii* Deane & Maiden, *E. tereticornis*, e híbridos *E. tereticornis* x *E. camaldulensis*, *E. grandis* x *E. camaldulensis*, *E. grandis* x *E. globulus* (Simeto, Balmelli y Torres, 2013).

Tanto en *E. camaldulensis* como en *E. tereticornis*, conocidas como eucalipto colorado, el patógeno tiene la habilidad de defoliar tanto follaje juvenil como adulto, causando una severa disminución del área foliar fotosintéticamente activa. Luego de la defoliación, el árbol rebrota y ocurre la re-infección de los rebrotes. La sucesión de estos dos eventos agota eventualmente las reservas de los árboles, resultando en muchos casos en la muerte de los mismos, como ha sido documentado a nivel nacional (Arbuet, Codina y García, 2016)

Esta enfermedad representa una seria amenaza para la totalidad del sector agropecuario, al afectar todas las áreas de producción y en todo su ciclo de rotación, comprometiendo la supervivencia de los montes de abrigo y sombra, las cortinas rompe - viento y las plantaciones comerciales con fines de producción de madera de sólida. Por otra parte, están las características del sistema de producción forestal (cultivo extensivo, perenne y de relativamente baja inversión por hectárea), propician que la resistencia genética durable sea la principal medida de manejo frente a este patógeno (Balmelli et al., 2014). Estudios realizados por Balmelli et al. (2014) indican la existencia de variabilidad en el comportamiento entre *E. camaldulensis* y *E. tereticornis*, como también dentro *E. tereticornis*, ante *T. pseudoeucalypti*,

por lo que la caracterización de la estructura genética del patógeno constituye una herramienta fundamental para evaluar el comportamiento sanitario de distintas especies e identificar individuos resistentes.

En este sentido, el objetivo general de este trabajo fue realizar estudios respecto al organismo causal, tendientes a generar la información y metodología necesaria para asistir a programas de mejoramiento genético por resistencia a éste patógeno y así minimizar su impacto en el desarrollo económico y la sustentabilidad del sector agroforestal del país. Como objetivos específicos se planteó: i) caracterizar la estructura genética y fenotípica de la población del patógeno; ii) caracterizar el comportamiento de las principales especies forestales del género *Eucalyptus* frente a esta enfermedad; y iii) desarrollar un método de inoculación artificial para el patógeno. Para los objetivos i) y iii) se trabajó con una colección de *T. pseudoeucalypti* perteneciente al Laboratorio de Fitopatología de la EEMAC, Facultad de Agronomía, generada a partir de colectas a nivel nacional (Arbuet et al., 2016).

Se realizó una caracterización morfológica de las cepas que forman parte de dicha colección, según morfología y color de la colonia, forma y dimensiones de las esporas y número de septos. A su vez, se realizó una caracterización molecular mediante un análisis multigenético en base a la amplificación de cuatro regiones génicas: ITS2, β t-2, EF1- α y ATP6. Las secuencias de estas regiones se alinearon y compararon con la base de datos de GenBank para luego realizar un análisis filogenético mediante *maximum verosimilitud* para determinar la relación genética de los aislados en estudio con especies filogenéticamente cercanas. Posteriormente se secuenció el genoma del patógeno a partir de dos cepas de la colección de *T. pseudoeucalypti*. A continuación, se ubicó la región genómica *mating type* 1-1 (MAT1-1), se desarrollaron cebadores específicos para esta región y se estudió su presencia y frecuencia en la población. Esta información es de gran importancia para contribuir a estudios de prevención y manejo de este patógeno. Para cumplir con el segundo objetivo se instalaron tres ensayos a

campo, ubicados en Paysandú, Tacuarembó y Florida, donde se evaluó el comportamiento sanitario de 16 materiales, de origen clonal y seminal, de *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* y *E. maidenii*.

Para el desarrollo de un método de inoculación artificial se realizaron ajustes para la producción de inóculo del patógeno, mediante la valoración de la formación de fructificaciones en diferentes medios de cultivo y se ensayaron distintas técnicas de multiplicación para obtener un protocolo ajustado.

Las hipótesis a probar fueron:

- i) La población del patógeno es clonal, un único haplotipo presente en la población, debido a que se trata de una introducción simple y reciente.
- ii) Existen diferencias en la resistencia entre especies y dentro de las especies, que permite explorar el mejoramiento genético por resistencia.
- iii) Es posible realizar la inoculación artificial del patógeno para caracterizar la resistencia del germoplasma.

La estructura central de este trabajo consiste en dos artículos científicos. El primer artículo se titula "Caracterización de *Teratosphaeria pseudoecalypti* agente causal de la mancha amarilla del eucalipto en Uruguay", el cual representa el primer estudio molecular de la estructura genética del patógeno, realizado fuera de Australia. El segundo artículo se titula "Resistencia genética a *Teratosphaeria pseudoecalypti* en germoplasmas de *Eucalyptus* de interés para Uruguay", el cual aporta información y metodología necesaria para futuros programas de mejoramiento genético. Se proyecta remitir ambos artículos en la revista Agrocencia Uruguay, para su publicación.

2. CARACTERIZACIÓN DE *Teratosphaeria pseudoeucalypti* AGENTE CAUSAL DE LA MANCHA AMARILLA DEL EUCALIPTO EN URUGUAY *

Ramirez Nazaret*¹; Simeto Sofía²; Balmelli Gustavo²; Bentancur Oscar³; Wingfield Michael⁴,
Duong Tuan⁴ y Pérez Carlos A¹

¹Departamento Protección Vegetal, EEMAC, Facultad de Agronomía, UdelaR, Paysandú, Uruguay

²Programa Forestal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Tacuarembó, Uruguay.

³Departamento Biométrica, Estadística y Computación, EEMAC, Facultad de Agronomía, UdelaR, Paysandú, Uruguay

⁴Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, University of Pretoria, Pretoria, Sudáfrica.

msc.nazaret@gmail.com

*Artículo escrito bajo el formato de la revista Agrocienza Uruguay.

Resumen

Caracterización de *Teratosphaeria pseudoecalypti* agente causal de la mancha amarilla del eucalipto en Uruguay

En Uruguay, *Teratosphaeria pseudoecalypti*, agente causal de la mancha amarilla del eucalipto, se encuentra causando severo impacto en plantaciones de eucalipto colorado. La resistencia genética es la principal medida de manejo de enfermedades forestales, sin embargo, el éxito de la misma depende, en buena medida, de la estructura genética del patógeno. El objetivo del presente estudio fue caracterizar la población de *T. pseudoecalypti*, presente en Uruguay a partir de una colección de 217 cepas, provenientes de una prospección realizada a nivel nacional. La misma fue caracterizada morfológicamente encontrándose diferencias morfológicas entre cepas. A su vez, se realizó la secuenciación del genoma de dos cepas de la colección lo que permitió estudiar el locus mating type (MAT). Se encontró únicamente el alelo MAT1-1, indicando una población heterotálica. Por otro lado, una sub-muestra de la colección fue caracterizada genéticamente mediante el estudio de polimorfismo en nucleótidos simples (SNP's), a través de cuatro regiones genómicas. Este análisis reveló que la población de *T. pseudoecalypti* presente en Uruguay pertenece al haplotipo KE8 reportado en Queensland (Australia) en el año 2010. Este trabajo representa el primer estudio poblacional del patógeno reportado fuera de Australia aportando información para asistir a programas de mejoramiento por resistencia genética. A su vez, remarca la necesidad de enfatizar las regulaciones cuarentenarias para evitar la llegada de un nuevo haplotipo que aporte variabilidad a la población.

Palabras claves: invasión biológica, *T. pseudoecalypti*, diversidad poblacional, mating type

Summary

Characterization of *Teratosphaeria pseudoecalypti* causal agent of Teratosphaeria leaf blight of eucalypt in Uruguay

In Uruguay, *Teratosphaeria pseudoecalypti*, the causal agent of Teratosphaeria leaf blight, is causing a severe damage on red gum eucalypts plantations. Genetic resistance is the desirable management of forest diseases, however, success depends greatly on the genetic population of the pathogens. The aim of this study was to characterize the population genetic of *T. pseudoecalypti* in Uruguay. This study was based in a culture collection of 217 strains, isolated from red gum eucalypt plantations countrywide distributed. Strains were characterized by morphology and using molecular markers. The complete genome of two strains was sequenced, and mating type regions were analyzed. Only MAT1-1 was found in all analyzed strains, suggesting a heterothallic microorganism with only one mating type represented in Uruguay, with asexual reproduction. On the other hand, the sub-sample of the collection was genetically characterized based on SNP's of four genomic regions. Only one haplotype of *T. pseudoecalypti* is present in Uruguay, corresponding to haplotype KE8 reported in Queensland (Australia) in 2010. This is the first population study of this important pathogen outside of Australia and the information generated in this work will assist breeding programs for genetic resistance, against this pathogen. In addition, the results of this study highlight the importance of reinforcing quarantine regulation to avoid the arrival of a new genotype that could contribute with genetic variation to the current population.

Key words: biological invasion, *T. pseudoecalypti*, population diversity, mating type

INTRODUCCIÓN

En Uruguay, tras la aprobación de la segunda ley forestal N° 15939, en el año 1987, el rubro forestal tuvo un incremento exponencial en la superficie cultivada. Actualmente las plantaciones de eucalipto ocupan una superficie total de 724.167 ha (DIEA, 2016). Esta expansión ha resultado en un gran movimiento de germoplasma para la instalación de dichas plantaciones, con un concomitante aumento en la probabilidad de ocurrencia de invasiones biológicas (Philibert et al., 2011) y del reencuentro de plagas y patógenos con sus hospederos (Wingfield et al., 2008).

Un típico ejemplo de esto fue lo sucedido con *Teratosphaeria nubilosa*, agente causal de la mancha foliar por *Mycosphaerella*, patógeno del eucalipto, reportado por primera vez en Australia ocasionando severos daños en plantaciones de *Eucalyptus globulus* (Doidge, Bottomley, Plank y Pauer, 1953). Este patógeno, originario de Australia fue diseminado hacia África, España, Portugal, Uruguay y Brasil (Wingfield, Brockerhoff, Wingfield y Slippers, 2015).

La utilización de marcadores moleculares, en la evaluación de la diversidad genética de las poblaciones de patógenos, ha permitido determinar los centros de origen (Zhou et al., 2007) y las vías de introducción de los patógenos (Brown y Hovmoller, 2002). Esta información es de gran importancia para programas de reducción de riesgos, como la implementación de cuarentena y la detección temprana de nuevas invasiones biológicas (Wingfield et al., 2013), identificando la etapa en la cual se encuentra la invasión (diseminación, llegada, establecimiento y expansión de la población) (Lockwood, Cassey y Blackburn, 2005). En general las invasiones biológicas comienzan con un “efecto fundador”, donde un número reducido de individuos de la población original lleva una fracción de la diversidad genética (Ficetola, Bonin y Miaud, 2008) representando una pequeña muestra de la diversidad de su población de origen (Suárez y Tsutsui, 2008).

Recientemente se ha reportado la presencia de *Teratosphaeria pseudoecalypti* en Uruguay (Soria, Alonso, Bettucci y Lupo, 2014), lo cual representa un nuevo caso de reencuentro patógeno-hospedero en el sistema forestal uruguayo. Este patógeno es el agente causal del tizón foliar por *Teratosphaeria* (TLB por su sigla en inglés), reportado por primera vez en el año 2010, causando severos daños en plantaciones de *Eucalyptus* sp. e híbridos de

E. grandis x *E. camaldulensis*, en Queensland, Australia, pasando a ser la principal amenaza de las plantaciones de eucalipto en dicha región (Andjic et al., 2010). Inicialmente, este patógeno fue confundido con *Teratosphaeria eucalypti*, pero ciertas inconsistencias en el rango de hospederos, el daño observado y en los síntomas, sugirieron que se trataba de una nueva especie. Luego de estudios multigénicos, se confirmó que se trata de un nuevo taxón, nombrado *Teratosphaeria pseudoecalypti* (Andjic et al., 2010). La especie fue caracterizada genéticamente mediante un estudio de polimorfismo en nucleótidos simples (SNP's por su sigla en inglés), basados en las regiones génicas ITS2, β t-2, EF1- α , y ATP6. Este análisis multigénico permitió identificar la presencia de cinco haplotipos del patógeno: KE8, KE9, KE10, KE11 y KE12 (Andjic et al., 2010).

En el año 2014 se reportó la presencia de este patógeno en Sudamérica, siendo el primer reporte de este patógeno fuera de Australia. En el mismo año fue reportado en Brasil, en plantaciones de *E. globulus*, *E. urophylla* x *E. globulus* y *E. nitens* x *E. globulus* (De Souza et al., 2014); en Argentina, afectando plantaciones de *E. camaldulensis* x *E. grandis* (Ramos y Pérez, 2014); y en Uruguay, en plantaciones de *E. globulus*, *E. maidenii* (Soria et al., 2014). En Uruguay, esta enfermedad es conocida como la mancha amarilla del eucalipto, debido a la coloración de los tejidos al inicio de desarrollo del síntoma en *E. globulus* (Soria et al., 2014). La misma está presente en todo el territorio nacional ocasionando severos daños en cortinas de eucalipto colorados (*E. camaldulensis* y *E. tereticornis*) (Arbuet, Codina y García, 2016). La capacidad que presenta el patógeno de infectar y defoliar tanto follaje juvenil como adulto lleva a un ciclo donde la brotación de las ramas y la re-infección de los rebrotes agotan las reservas de los árboles, por lo que la reiteración de estos procesos es la principal causa de mortandad de eucaliptos colorados a nivel nacional. La característica de esta enfermedad de afectar al follaje juvenil y adulto, a lo largo de la rotación, sugieren que la resistencia genética durable podría ser la principal herramienta de manejo para minimizar su impacto. En este sentido Balmelli et al. (2014) encontraron variabilidad en el comportamiento sanitario de distintas procedencias de *E. camaldulensis* y *E. tereticornis* frente a esta enfermedad. Sin embargo, se desconoce la estructura genética de la población del patógeno, información fundamental para aplicar en un programa de mejoramiento por resistencia genética durable.

En este sentido, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la estructura poblacional del patógeno, y así asistir a programas de mejoramiento genético por resistencia frente a esta

enfermedad. Para esto, se determinó la estructura genética y fenotípica de la población de *T. pseudoeucaalypti* en base a una colección de cepas del Laboratorio de Fitopatología de la EEMAC, Facultad de Agronomía, generada a partir de colectas a nivel nacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización fenotípica de la colección de T. pseudoeucaalypti

La colección de estudio estuvo compuesta por 217 cepas de *Teratosphaeria pseudoeucaalypti*, colectadas desde plantaciones de eucalipto colorado distribuidas en todo el país (Arbuet et al., 2016). Con el fin de asegurar el trabajo a partir de una colección de cepas monospóricas, de cada cepa se tomó un picnidio y se lo colocó en un eppendorf de 1.5 mL con 1 mL de agua estéril para generar una suspensión de esporas. Luego de 10 min en agitación en Vortex, se tomaron alícuotas de 200 μ L y se sembraron en placas de Petri de 90 mm con medio de cultivo MEA 2% (Malt Extract, Difco, Paris; Agar Bacteriological, Oxoid, Inglaterra), utilizando un ansa de Drigalsky con el fin de favorecer la separación de las esporas sobre la placa. Posteriormente se incubaron en oscuridad a 25 °C, por 30 días para luego repicar una de estas colonias en una nueva placa de Petri con MEA 2%, incubada en oscuridad por 60 días.

Al cabo de los 60 días, las colonias fueron fotografiadas en ambos lados (anverso y reverso) y descritas en cuanto a margen, elevación, desarrollo y color. La coloración de la colonia se definió utilizando la carta de color Munsell Soil (Gretag Macbeth, revisada en 2000), de acuerdo a Andjic et al. (2010).

Las cepas fueron agrupadas en base a la morfología de la colonia. De cada grupo se eligieron al azar al menos tres cepas, contemplando diferentes sitios de colecta y hospederos, de forma de aumentar la probabilidad de captar variabilidad. De cada una de estas cepas se tomó un picnidio para describir las dimensiones de un total de 100 conidios, considerando largo, ancho y número de septos, análisis realizado bajo microscopio óptico (40x), con el software de análisis de imágenes ScopePhoto 3.0 (ScopeTek, China), con el criterio de medir hasta la mitad del límite del conidio, y considerando la parte más ancha del mismo como el ancho a medir.

Para analizar la variabilidad morfológica de la colonia, se tomó un picnidio y se procedió a la siembra de una suspensión de esporas obtenida a partir del mismo como describió anteriormente. Con el fin de comprobar si un mismo picnidio puede producir distintos tipos morfológicos de colonias, de cada colonia fenotípicamente distinta se tomaron dos picnidios (uno del centro y otro del borde) y se procedió a realizar siembra de suspensión de esporas como se mencionó arriba.

Caracterización genética de la colección de *T. pseudoecalypti* - Extracción de ADN

De las 217 cepas de la colección de estudio, se seleccionó una submuestra de 51 cepas, considerando el sitio de colecta, especie del hospedero, severidad de daño en la plantación colectada y morfología de colonia (Figura 1). Se extrajo el ADN genómico mediante el protocolo CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) (Doyle y Doyle, 1987).

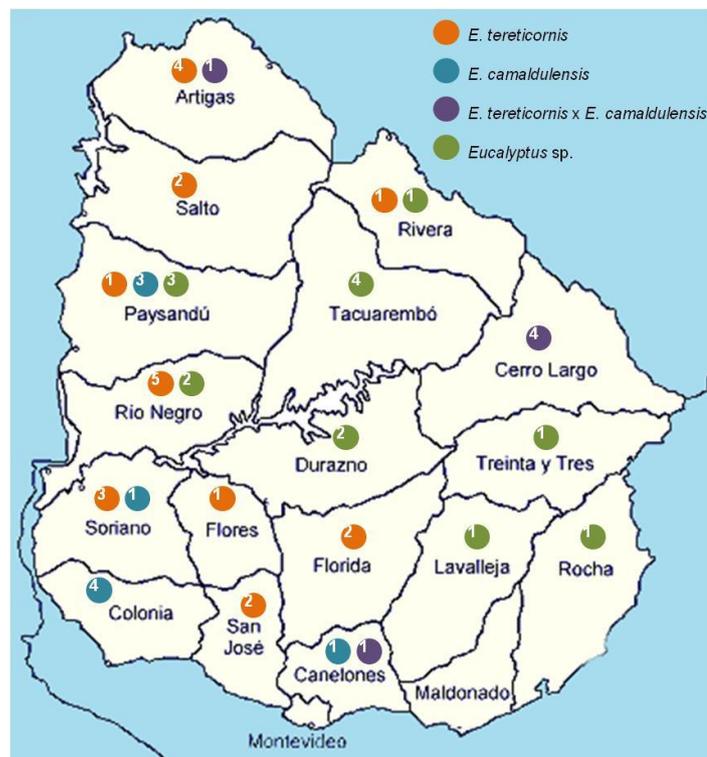


Figura 1. Ubicación de las plantaciones de donde fueron obtenidas las cepas de la colección incluidas en este estudio. Desglosado según especie y número de cepas de cada hospedero.

Amplificación por PCR

Para realizar la caracterización genética en base al estudio de polimorfismo de nucleótidos simples se utilizó la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para amplificar cuatro regiones génicas. Así se amplificó la región del espaciador transcripto interno (ITS2), beta tubulina (β t-2), factor de elongación (EF1- α), y ATP sintasa (ATP6), utilizando los pares de cebadores probados por Andjic et al. (2010): ITS-3 e ITS-4 (Gardes y Bruns, 1993), β t-2a y β t-2b (Glass y Donaldson, 1995), EF1-728F y EF1-986R (Carbone y Kohn, 1999); y ATP6-r y ATP6-f (Este estudio), respectivamente (Cuadro 1). El master mix de la solución para PCR se hizo para 25 μ L: 16,4 μ L de agua MiliQ, 2,5 μ L de dNTPs (2 mM), 2,5 μ L de Taq buffer (10x), 1,5 μ L de MgCl₂ (25 mM), 0,5 μ L del cebador forward (10 μ M), 0,5 μ L del cebador reverse (10 μ M), 0,1 μ L de Taq ADN Polimerase (5 U/ μ L), 1 μ L de ADN de la muestra. En algunos casos en que la amplificación falló se ajustó la concentración de magnesio (MgCl₂) a 4 μ L.

Cuadro 1. Cebadores, amplicón y temperatura de annealing de los cebadores utilizados en este estudio para la amplificación de las regiones génicas de *T. pseudoeucalypti*.

Gen	Cebador	Secuencia (5' - 3')	Amplicón (pb)	T. alineamiento (°C)	Referencia
ITS2	ITS-3	GTATCGATGAAGAACGCAGC	350	55	Gardes y Bruns (1993)
	ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
β t-2	β t-2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	400	45	Glass y Donaldson (1995)
	β t-2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC			
EF1- α	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	300	45	Carbone y Kohn (1999)
	EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC			
ATP6	ATP6-r	ACCTGAGCTTGAATAAACGCT	500	57	Este estudio
	ATP6-f	TCGCAGGTTACTTGATCTTAAC			
MAT1-1	MAT1-1 F	ACCTATGGATGGCGATCAGG	500	55	Este estudio
	MAT1-1 R	GGTCGAAGCTGATGTCCAAC			

Las condiciones de PCR para las regiones ITS2, β t-2, EF1- α y ATP6 fueron de 7 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 45 °C y 2 min a 72 °C, finalizando con 10 min a 72 °C; teniendo en cuenta la temperatura de alineamiento que para β t-2 y EF1- α es de 45 °C, para ITS2 es 55 °C y para ATP6 es de 57 °C.

El producto de PCR fue corroborado mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega Corporation, Madison, USA) al 1 %, teñido con Goodview® (Fermentas International Inc., Canadá) a una concentración de 5 μ L/100 mL, con un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, ready to use, Fermentas International Inc., Canadá) para determinar tamaño del amplicón. El gel fue revelado bajo lámpara UV (Benchtop 2UV transiluminator UVP, USA).

Secuenciación y análisis filogenético

Una vez confirmado el amplicón, el producto de PCR fue enviado al servicio de secuenciación de Macrogen (www.macrogen.com, Corea del Sur, verificado 11-10-2017). Las secuencias recibidas fueron editadas manualmente utilizando el software Chromas versión 2.6 y comparadas con la base de datos de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, verificado 28-11-2017) mediante búsqueda BLAST. Una vez que se contó con las secuencias editadas, para cada gen se creó una base de datos en el programa MEGA 7.1 (Sudhir, Glen y Koichiro, 2016), incluyendo la secuencia de los cinco haplotipos de *T. pseudoecalypti*, como también las secuencias reportadas en GenBank de Brasil y Uruguay; los siete haplotipos de *T. eucalypti* y 25 secuencias de 16 especies cercanas filogenéticamente (Cuadro 2). La selección de secuencias se realizó a partir de una búsqueda bibliográfica de especies de *Teratosphaeria* descritas, y que tuvieran secuenciadas las regiones ITS2, β t-2, y EF1- α . La totalidad de las secuencias fueron alineadas en MAFFT versión online (Kazunori, Yamadak y Kazutaka, 2016) para cada gen, y editadas en BioEdit (Hall, 2011). Una vez que se completó la base de datos de cada gen, se procedió a la concatenación de los mismos utilizando el programa Strawberry-perl-5.24.1.1 (<https://perl.org>). Mediante el software PAUP 4.0 (Swofford, 2002) se analizó el índice de congruencia para saber si los genes podían ser concatenados y posteriormente se realizó el análisis por máxima verosimilitud (ML) en MEGA 7.1, con un modelo de sustitución de nucleótidos Kimura 2-parámetros. Posteriormente se

realizó análisis bayesiano en MrBayes (Ronquist et al., 2012). El mejor modelo de sustitución de bases fue seleccionado en el programa jModelTest (Darriba, Taboada, Doallo y Posada, 2012) para cada gen por separado como también para la base de datos de genes concatenados, teniendo en cuenta las frecuencias y las tasas de variación (invariantes y gamma), posteriormente se realizó la selección del modelo mediante Akaike Information Criterion (AIC). Una vez que se contó con la información de jModelTest, las secuencias fueron analizadas para obtener la mejor probabilidad bayesiana posterior que respaldarse las relaciones filogenéticas entre las mismas.

Debido a que no fue posible incluir la región génica del ATP6 en el análisis concatenado, se realizó un análisis de polimorfismo de nucleótidos simples, incluyendo las cuatro regiones para poder determinar el haplotipo de las cepas en estudio.

Cuadro 2. Hospedero y localidad de las secuencias de *Teratosphaeria* spp. consideradas en este estudio, incluyendo números de acceso de GenBank para las regiones génicas ITS2, β t-2, EF1- α y ATP6.

Especie	N° aislado	Haplotipo	Hospedero	Localidad	Colector	N° accesión GenBank			
						ITS2	β t-2	EF1- α	ATP6
<i>Teratosphaeria blakelyi</i>	CBS 120089		<i>E. blakelyi</i>	New South Wales, Australia	B.A. Summerell	KF901565	KF902988	KF903288	*
<i>T. complicate</i>	CPC 14535		<i>E. miniata</i> leaf litter	Northern Territory, Australia	B.A. Summerell	KF901781	KF902989	KF903290	*
<i>T. corymbiae</i>	CBS 124988		<i>Corymbia henryi</i>	New South Wales, Australia	A.J. Carnegie	KF901569	KF902992	KF903293	*
<i>T. destructans</i>	CMW 19922		<i>E. urophylla</i>	Goungdong, China	TI Burgess	KT972280	KT972312	KT972344	*
<i>T. destructans</i>	CMW 44957		<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Zululand, South África	*	KT343569	KT343563	KT343575	*
<i>T. destructans</i>	DRF 1168		<i>E. grandis</i>	Aek Nauli, Sumatra, Indonesia	MJ Wingfield	KT972278	KT972310	KT972342	*
<i>T. destructans</i>	DRF 1169		<i>E. grandis</i>	Sumatra, Indonesia	MJ Wingfield	KT972279	KT972311	KT972343	*
<i>T. eucalypti</i>	CMW 19453	KE1	<i>E. nitens</i>	Settlement Rd, New Zealand	M Dick	FJ793234	EU101529	EU101585	EU101472
<i>T. eucalypti</i>	MUCC 635	KE2	<i>E. nitens</i>	Roses Tier, TAS, Australia	T Wardlaw	FJ793250	EU101557	EU101614	EU101501
<i>T. eucalypti</i>	CMW 19456	KE3	<i>E. nitens</i>	Douthetts, New Zealand	M Dick	FJ793236	EU101531	EU101587	EU101474
<i>T. eucalypti</i>	CMW 19455	KE4	<i>E. nitens</i>	Coxs, New Zealand	M Dick	FJ793260	EU101571	EU101628	EU101515
<i>T. eucalypti</i>	MUCC 626	KE5	<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	Kyogle, N-NSW, Australia	AJ Carnegie	FJ793241	EU101546	EU101602	EU101489
<i>T. eucalypti</i>	MUCC 630	KE6	<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	Kyogle, N-NSW, Australia	AJ Carnegie	FJ793245	EU101550	EU101606	EU101493

Especie	N° aislado	Haplotipo	Hospedero	Localidad	Colector	N° accesión GenBank			
						ITS2	βt-2	EF1-α	ATP6
<i>T. eucalypti</i>	MUCC 631	KE7	<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	Kyogle, N-NSW, Australia	AJ Carnegie	FJ793258	EU101569	EU101626	EU101513
<i>T. hortaea</i>	CBS 124156		<i>E. camaldulensis</i>	Madagascar	M.J. Wingfield	KF901674	KF903014	KF903316	*
<i>T. molleriana</i>	CBS 117926		<i>E. globulus</i>	Australia	*	KF901766	KF903029	KF903332	*
<i>T. molleriana</i>	CBS 117927		<i>E. globulus</i>	Australia, Tasmania	*	KF901767	KF903030	KF903333	*
<i>T. novaehollandiae</i>	AQISWA 201404		<i>E. victrix</i>	Pilbara, WA, Australia	G Hardy	KT972290	KT972322	KT972354	*
<i>T. novaehollandiae</i>	AQISWA 201513		<i>Eucalyptus</i> sp.	Derby, WA, Australia	MJ Wingfield	KT972291	KT972323	KT972355	*
<i>T. novaehollandiae</i>	AQISWA 201514		<i>Eucalyptus</i> sp.	Derby, WA, Australia	MJ Wingfield	KT972292	KT972324	KT972356	*
<i>T. novaehollandiae</i>	BRIP 59488		<i>E. camaldulensis</i>	NT, Australia	V Andjic	KT972283	KT972315	KT972347	*
<i>T. novaehollandiae</i>	BRIP 59490		<i>E. camaldulensis</i>	NT, Australia	V Andjic	KT972285	KT972317	KT972349	*
<i>T. nubilosa</i>	CPC 11879		<i>Eucalyptus</i> sp.	Portugal	A.J.L. Phillips	KF901694	KF903034	KF903337	
<i>T. pseudoecalypti</i>	CMW 50017		<i>E. tereticornis</i>	Soriano, Uruguay	Pérez C.	*	*	*	*
<i>T. pseudoecalypti</i>	CMW 50297		<i>E. camaldulensis</i>	Canelones, Uruguay	Simeto S., Balmelli G.	*	*	*	*
<i>T. pseudoecalypti</i>	CMW 50309		<i>Eucalyptus</i> hybrid	Tacuarembó, Uruguay	Simeto S., Balmelli G.	*	*	*	*
<i>T. pseudoecalypti</i>	CMW 50099		<i>Eucalyptus</i> sp.	Durazno, Uruguay	Simeto S., Balmelli G.	*	*	*	*
<i>T. pseudoecalypti</i>	CMW 50113		Híbrido y <i>E. tereticornis</i>	Cerro Largo, Uruguay	Simeto S., Balmelli G.	*	*	*	*

Especie	N° aislado	Haplotipo	Hospedero	Localidad	Colector	N° accesión GenBank			
						ITS2	βt-2	EF1-α	ATP6
<i>T. pseudoecalypti</i>	CMW 50033		<i>E. camaldulensis</i>	Paysandú, Uruguay	Pérez C.	*	*	*	*
<i>T. pseudoecalypti</i>	CMW 50292		<i>E. camaldulensis</i>	Paysandú, Uruguay	Pérez C.	*	*	*	*
<i>T. pseudoecalypti</i>	FI 2292		<i>E. maidenii</i>	Retamosa, Uruguay	*	KJ361457	KJ425483	KJ466066	*
<i>T. pseudoecalypti</i>	FI 2293		<i>E. maidenii</i>	Retamosa, Uruguay	*	KJ361458	KJ466060	KJ466065	*
<i>T. pseudoecalypti</i>	FI 2294		<i>E. maidenii</i>	Retamosa, Uruguay	*	KJ361459	KJ466061	KJ466067	*
<i>T. pseudoecalypti</i>	FI 2295		<i>E. globulus</i>	Retamosa, Uruguay	*	KJ361460	KJ466062	KJ466068	*
<i>T. pseudoecalypti</i>	FI 2296		<i>E. globulus</i>	Retamosa, Uruguay	*	KJ361461	KJ466063	KJ466069	*
<i>T. pseudoecalypti</i>	FI 2298		<i>E. globulus</i>	Retamosa, Uruguay	*	KJ361463	KJ466064	KJ466070	*
<i>T. pseudoecalypti</i>	MUCC 598	KE8**	<i>E. grandis</i> x <i>E. camaldulensis</i>	Harrisville, S-QLD, Australia	AJ Carnegie	FJ793215	EU101536	EU101592	EU101479
<i>T. pseudoecalypti</i>	MUCC 610	KE9	<i>E. grandis</i> x <i>E. camaldulensis</i>	Miriam Vale, C-QLD, Australia	G. Pegg	FJ793221	EU101543	EU101599	EU101486
<i>T. pseudoecalypti</i>	MUCC 704	KE10**	<i>Eucalyptus</i> sp.	FNQ, Australia	TI Burgess	FJ793229	EU101554	EU101611	EU101498
<i>T. pseudoecalypti</i>	MUCC 705	KE11	<i>Eucalyptus</i> sp.	FNQ, Australia	TI Burgess	FJ793214	FJ793210	FJ793206	FJ811974
<i>T. pseudoecalypti</i>	MUCC 615	KE12**	<i>Eucalyptus</i> sp.	Davies Creek, FNQ, Australia	TI Burgess	FJ793231	EU101556	EU101613	EU101500
<i>T. pseudoecalypti</i>	LPF 0521		<i>E. urophylla</i> x <i>E. globulus</i>	Cristal, RS, Brasil	*	KF986716	KF986721	KF986726	*
<i>T. pseudoecalypti</i>	LPF 0522		<i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i>	Cristal, RS, Brasil	*	KF986717	KF986722	KF986727	*

Especie	Nº aislado	Haplotipo	Hospedero	Localidad	Colector	Nº accesión GenBank			
						ITS2	βt-2	EF1-α	ATP6
<i>T. pseudoeucahypti</i>	LPF 0523		<i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i>	Cristal, RS, Brasil	*	KF986718	KF986723	KF986728	*
<i>T. pseudoeucahypti</i>	LPF 0524		<i>E. urophylla</i> x <i>E. globulus</i>	Cristal, RS, Brasil	*	KF986719	KF986724	KF986729	*
<i>T. pseudoeucahypti</i>	LPF 606		<i>E. globulus</i>	Cristal, RS, Brasil	*	KF986720	KF986725	KF986730	*
<i>T. pseudonubilosa</i>	CPC 13831		<i>E. globulus</i>	Australia	I.W. Smith	KF901594	KF903047	KF903350	*
<i>T. suttonii</i>	CBS 119973		<i>E. pellita</i>	Vietnam	T.I. Burgess	KF901784	KF903055	KF903359	*
<i>T. suttonii</i>	CMW 5348		<i>Eucalyptus</i> sp.	Indonesia	MJ Wingfield	AF309621	DQ240117	DQ240170	*
<i>T. tiwana</i>	BRIP 63493		<i>E. urophylla</i> híbrido	Tiwi Island, Australia	TI Burgess	KT972304	KT972336	KT972368	*
<i>T. tiwiana</i>	AQISWA 201501		<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Tiwi Island, Australia	TI Burgess	KT972298	KT972329	KT972361	*
<i>T. toledana</i>	CBS 113313		<i>Eucalyptus</i> sp.	España	P.W. Crous & G. Bills	KF901734	KF903058	KF903361	*
<i>T. verrucosa</i>	CPC 12949		<i>Eucalyptus</i> sp.	South África	P.W. Crous	KF901768	KF903061	KF903364	*
<i>T. viscidus</i>	CBS 121156		<i>E. grandis</i>	Mareeba, Australia	TI Burgess	EF031471	EF031483	EF031495	*
<i>T. viscidus</i>	CBS 121157		<i>E. grandis</i>	Mareeba, Australia	TI Burgess	EF031472	EF031484	EF031496	*
<i>T. zuluensis</i>	CBS 120301		<i>E. grandis</i>	South África	M.J. Wingfield	KF901735	KF903064	KF903368	*
<i>T. zuluensis</i>	CBS 120302		<i>E. grandis</i>	South África	M.J. Wingfield	KF901736	KF903065	KF903369	*

AQISWA=Biosecurity Australia Fungal Culture Collection, Perth, Western Australia, Australia; BRIP=Biosecurity Queensland Plant Pathology Herbarium, Brisbane, Queensland, Australia; CBS=Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands; CMW=Tree Pathology Co-operative Program, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, University of Pretoria, South Africa; CPC: Collection Pedro Crous, housed at CBS; FI=Facultad de Ingeniería- Facultad de Ciencias, Laboratorio de Micología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; LPF=Laboratory of Forest Pathology, Universidad de Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil; MUCC=Murdoch University Culture Collection, Perth, Western Australia.

** El N° de accesión de los distintos genes se presentan correctamente, considerando errores observados en GenBank.

Secuenciación del genoma de T. pseudoecalypti

Para la secuenciación del genoma se eligieron dos cepas de la colección, teniendo en cuenta que provinieran de dos especies distintas de eucalipto colorado, y de diferentes localidades. La cepa CMW 50276 fue obtenida de una cortina de *E. camaldulensis* en el departamento de Soriano y la CMW 50075 de una cortina de *Eucalyptus sp.* en el departamento de Durazno. El genoma de estas dos cepas fue secuenciado en Macrogen mediante la técnica Illumina MiSeq. Una vez obtenida la base de datos con todas las secuencias parciales, se controló la calidad media de las bases de cada contigs mediante FastQC (Andrews, 2010), y se procedió a ordenar los contigs para formar los scaffolds y así reconstruir la secuencia original, utilizando CLC Genomics Workbench 9.5.3 (www.qiagenbioinformatics.com/). Una vez obtenidas las secuencias de los dos genomas editadas, ambas fueron alineadas y comparadas mediante el programa CLC.

Diseño de cebadores

A partir del genoma de *T. pseudoecalypti* se diseñaron los cebadores para la región genómica que determina el tipo de apareamiento del patógeno. Mediante NCBI online se identificaron las secuencias correspondientes a los alelos MAT1-1 y MAT1-2 del género *Mycosphaerella*. Éstas secuencias fueron alineadas con el genoma completo utilizando CLC para así visualizar los contigs en el genoma. En Softberry FGENESH versión online (Solovyev, Kosarev, Seledsov y Vorobyev, 2006) se eligió el organismo *Mycosphaerella* y luego se cargó la secuencia en formato fasta del gen para realizar la búsqueda del mismo en el genoma y predecir la presencia de exones e intrones en dicha secuencia. La secuencia mRNA se alineó junto a la secuencia del gen en MEGA 7.1 donde se determinó la ubicación de los intrones y exones. Mediante el software PRIMER3 (versión online), se diseñaron los cebadores para el gen, poniendo como requisito que presenten un tamaño de 400 a 700 pb. Las opciones de pares de cebadores se alinearon junto a la secuencia del gen en MEGA 7.1 para visualizar que no estuvieran en la sección intrón (región variable del ADN) y sí en el exón (región conservada del ADN). Con este criterio se eligió el mejor par de cebadores.

Con estos cebadores, se realizó una PCR para amplificar dicho marcador en toda la muestra de aislados (Cuadro 1). El master mix de la solución para PCR se hizo para 25 μ L:

17,3 µL de agua MiliQ, 2 µL de dNTPs (2 mM), 2,5 µL de Taq buffer (10x), 1 µL del cebador forward (10µM), 1 µL del cebador reverse (10µM), 0,2 µL de Taq ADN Polimerase (5U/µL), 1 µL de ADN de la muestra. Las condiciones de PCR fueron: 3 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, 45 s a 72 °C, finalizando con 4 minutos a 72 °C, y mantenimiento final a 10 °C.

Dado que el análisis de los genes MAT puede arrojar resultados de presencia o ausencia del gen, se utilizó como positivo al gen β t-2, para verificar funcionalidad del PCR. El producto de PCR fue corroborado mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega Corporation, Madison, USA) al 1 %, teñido con Goodview® (Fermentas International Inc., Canadá) a una concentración de 5 µL/ 100mL; con un marcador de peso molecular para determinar tamaño del amplicón (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, ready to use, Fermentas International Inc., Canadá). El gel fue visualizado bajo lámpara UV (Benchtop 2UV transiluminator UVP, USA).

Por otro lado, se diseñaron los cebadores para el gen ATP6. Utilizando CLC Genomics Workbench 9.5.3 (www.qiagenbioinformatics.com/) se alineó el genoma completo con la secuencia tipo del gen. Una vez ubicada la región genómica, la secuencia fue convertida a formato fasta, la cual se cargó al software PRIMER3 (versión online), y se diseñaron los cebadores, estableciendo como requisito que presenten un tamaño de 400 a 700 pb. Las opciones de pares de cebadores se alinearon junto a la secuencia del gen en MEGA 7.1 para visualizar su ubicación teniendo en cuenta que considerara los nucleótidos polimórficos del gen que determinan a los haplotipos KE11 y KE12 de *T. pseudoeucalypti*. Con este criterio se eligió el mejor par de cebadores.

Con estos cebadores, se realizó una PCR para amplificar dicho marcador en toda la muestra de aislados (Cuadro 1). El master mix de la solución para PCR se hizo para 25 µL: 17,3 µL de agua MiliQ, 2 µL de dNTPs (2 mM), 2,5 µL de Taq buffer (10x), 1 µL del cebador forward (10µM), 1 µL del cebador reverse (10µM), 0,2 µL de Taq ADN Polimerase (5U/µL), 1 µL de ADN de la muestra. Las condiciones de PCR fueron: 5 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 57 °C, 1 min a 72 °C, finalizando con 10 minutos a 72 °C, y mantenimiento final a 10 °C.

El producto de PCR fue corroborado mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega Corporation, Madison, USA) al 1 %, teñido con Goodview® (Fermentas

International Inc., Canadá) a una concentración de 5 µL/ 100mL; con un marcador de peso molecular para determinar tamaño del amplicón (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, ready to use, Fermentas International Inc., Canadá). El gel fue visualizado bajo lámpara UV (Benchtop 2UV transiluminator UVP, USA).

RESULTADOS

Caracterización fenotípica de la colección de T. pseudoecalypti

El agrupamiento de las cepas por morfología de colonias resultó en siete grupos morfológicos que se diferenciaron por el color anverso y reverso (Figura 2). Sin embargo, el resto de las características fueron similares para todas ellas, i.e. colonias con margen irregular, lobulado; elevación umbonada, de interior hueco; y de pobre desarrollo. Los grupos se codificaron arbitrariamente de la A a la G (Cuadro 3).

Los conidios presentaron un largo promedio de 26,8 a 37,4 µm, y un ancho de 2,5 a 3,0 µm, variable según grupo morfológico (Cuadro 3) pero estadísticamente iguales (Figuras 3 y 4).

A su vez, en todos los grupos se observaron conidios aseptados y hasta con dos septos (Figura 5 y 6).

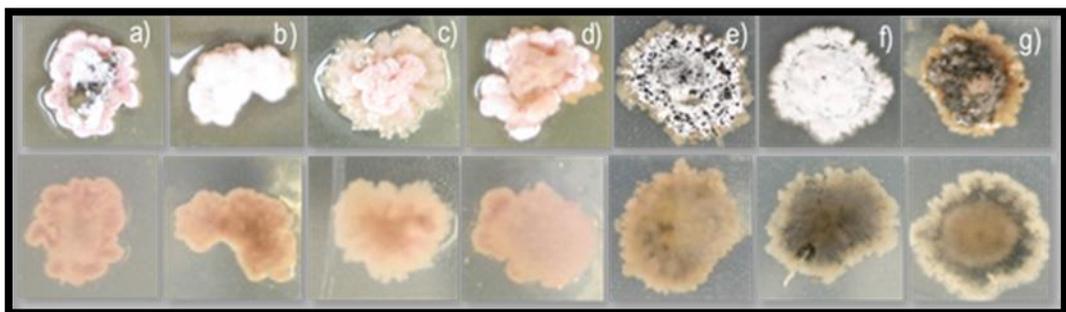


Figura 2. Morfología de colonias representativas de cada uno de los siete grupos morfológicos que incluyen a las 217 cepas de *T. pseudoecalypti* analizadas. En la imagen superior se observa la morfología en el anverso y en la imagen inferior el reverso. Cada letra identifica al grupo al cual representan.

Cuadro 3. Características de los siete grupos morfológicos de *T. pseudoecalypti* en medio de cultivo de extracto agar malta al 2%.

Grupos morfológicos de <i>Teratosphaeria pseudoecalypti</i>							
	A	B	C	D	E	F	G
Colonia							
Color anverso (de afuera hacia dentro)	8/5PB, 10R8/ 8/5PB, 5Y5/1	8/5PB	2.5YR8/3	8/5PB, 2.5YR8/4	8/5G, 5/5G	8/10B	10YR7/5, 10YR3/2
Color reverso (de afuera hacia dentro)	5YR8/3	2.5YR8/4	2.5YR8/4	2.5YR8/3	7.5YR8/3, 10R7/4, 7.5YR7/3	7.5YR8/2, 10YR5/1, 7.5YR7/3	10YR7/4
Margen	irregular, a veces lobulado						
Elevación	umbonada pobre						
Desarrollo							
Conidio (promedio de 100 conidios por grupo morfológico)							
Rango de largo (µm)	21,4 - 66,8	14,0 - 62,9	22,3 - 46,2	11,8 - 38,7	23,8 - 57,1	19,4 - 47,3	26,9 - 54,1
\bar{x} largo (µm)	26,8	32,9	33,0	25,4	37,3	33,8	37,3
\bar{x} ancho (µm)	2,7	2,7	2,8	2,6	2,5	2,8	3,0
Número de septos	0-2	0-2	0-2	0-2	0-2	0-2	0-2

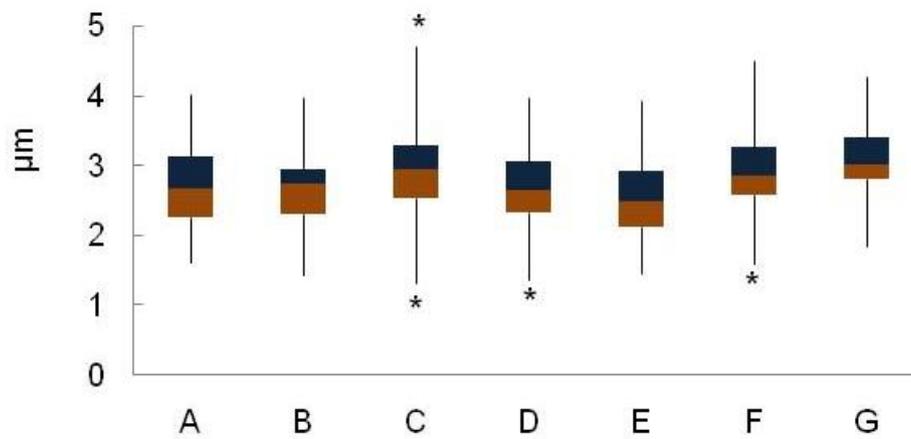


Figura 3. Distribución del ancho de conidios, de los 100 conidios medidos en cada grupo morfológico, mediante gráfico de caja. Los valores atípicos se muestran con asterisco (*).

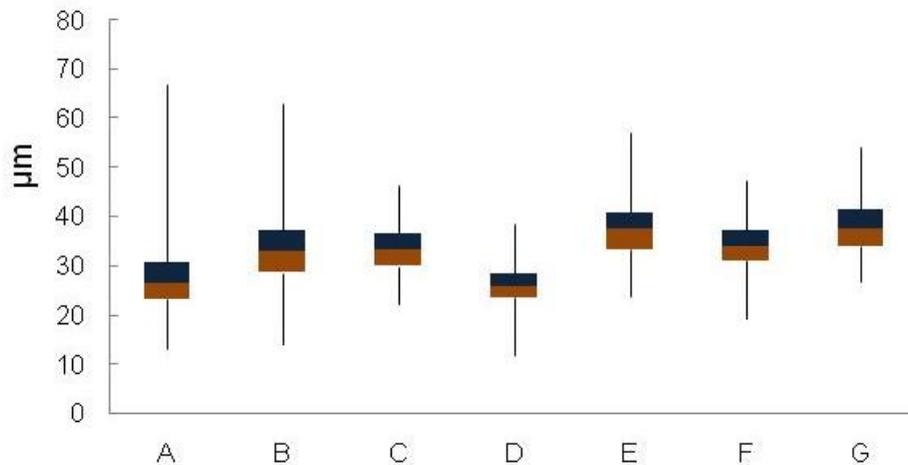


Figura 4. Distribución del largo de conidios, de los 100 conidios medidos en cada grupo morfológico, mediante gráfico de caja.

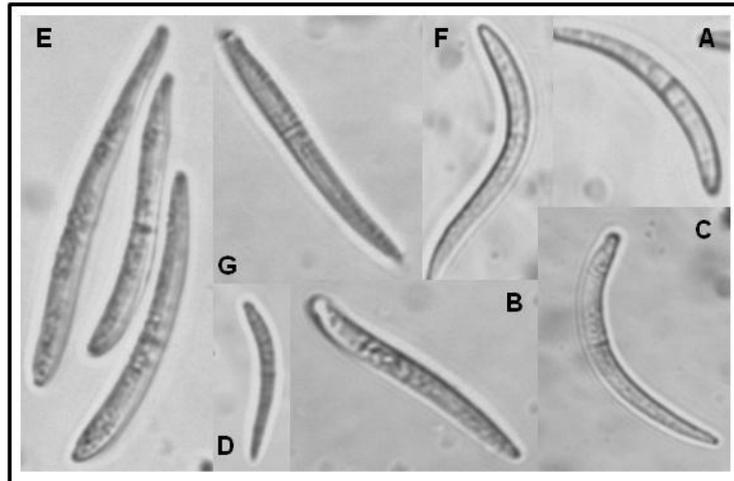


Figura 5. Conidios representativos de cada uno de los siete grupos morfológicos que incluyen a las 217 cepas de *T. pseudoecalypti* analizadas. Cada letra identifica al grupo al cual representan.

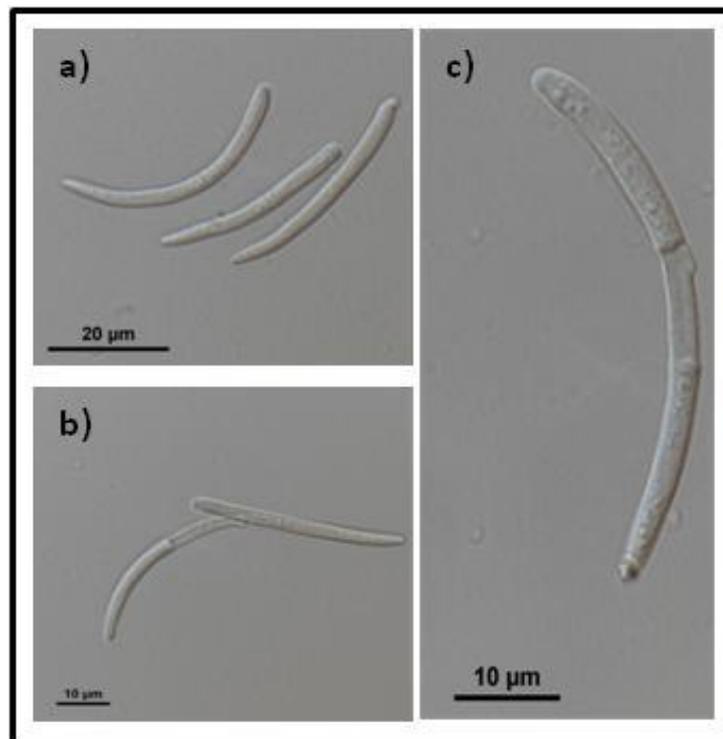


Figura 6. Conidio aseptado (a), con un septo (b) y dos septos (c).

La siembra de suspensión de conidios a partir de un mismo picnidio, resultó en colonias con diferencias morfológicas que se mantuvieron en el tiempo acompañando el crecimiento micelial (Figura 7).

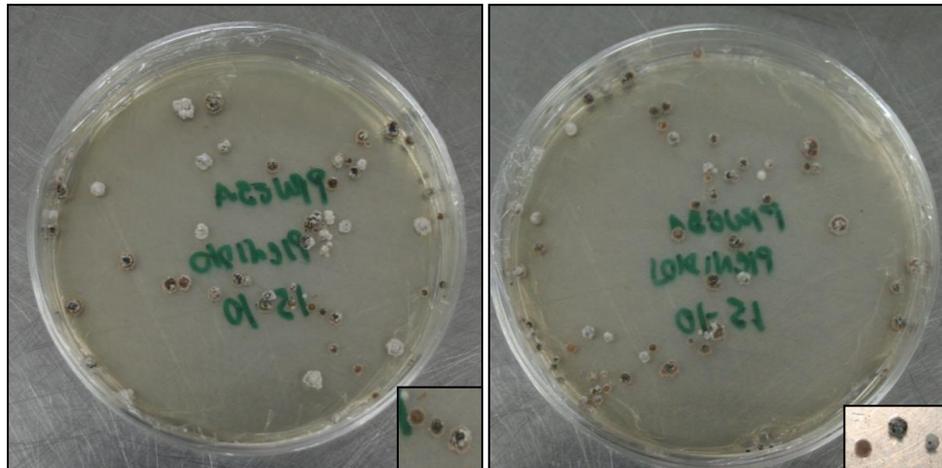


Figura 7. Colonias con diferencias morfológicas obtenidas a partir de una suspensión de esporas de un único picnidio.

Caracterización genética de la colección de T. pseudoeucaalypti

El test de congruencia de la concatenación de las cuatro regiones genómicas resultó en un $ILD < 0,05$, indicando que las cuatro regiones no pueden ser combinadas. Luego de probar distintas combinaciones se determinó que la región ATP6 no era congruente con el resto de las regiones y, por lo tanto, no podía ser incluida en la concatenación. Debido a esto el análisis filogenético, se realizó con los datos de la concatenación de las regiones ITS2, β t-2 y EF-1 α . Todos los aislados analizados presentaron secuencias idénticas entre sí, para todas las regiones, agrupándose en un único clado como *T. pseudoeucaalypti* (Figura 8). A su vez, el análisis de polimorfismo de nucleótidos simples incluyendo la secuencia del gen ATP6 indica que se trata de un único haplotipo. Dicho haplotipo se separa de los haplotipos KE9 y KE10 por los nucleótidos polimórficos en las secuencias de los genes β t-2 e ITS2 y de los haplotipos KE11 y KE12 por la secuencia del gen ATP6, siendo idéntico al haplotipo KE8, descrito por Andjic et al. (2010) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Posición de los nucleótidos polimórficos, parsimoniosamente informativos, de las secuencias alineadas de las cuatro regiones génicas, y la secuencia tipo de los aislados de Uruguay; para los cinco haplotipos descritos en Australia para *Teratosphaeria pseudoecalypti*.

Haplotipo	EF-1 α				β -tubulin						ATP-6		ITS-2			
	31	34	52	143	73	91	93	98	201	209	236	236	295	146	193	249
KE8	T	C	T	T	C	G	A	G	C	A	T	G	A	T	G	T
KE9	T	C	T	T	C	G	A	A	C	A	T	G	A	T	G	T
KE10	T	C	T	T	C	G	A	G	C	A	T	G	A	C	T	T
KE11	T	C	T	T	C	G	A	G	C	A	T	T	A	T	G	T
KE12	T	C	T	T	C	G	A	G	C	A	T	G	T	T	G	T
Aislados UY	T	C	T	T	C	G	A	G	C	A	T	G	A	T	G	T

El análisis del genoma de dos cepas rindió dos secuencias originales de aproximadamente 28 Mb, no encontrándose evidencia de variación genética entre ambos genomas e indicando que ambas cepas analizadas corresponden a clones.

El análisis del genoma permitió identificar la presencia de MAT1-1, no encontrándose evidencias del MAT1-2. Posteriormente se diseñó un par de cebadores para amplificar el MAT1-1 de *T. pseudoecalypti* que genera un amplicón de 500 bases. El análisis de la submuestra de 51 cepas de la colección de Uruguay indicó que la totalidad de las cepas presentan el gen MAT1-1 (Figura 9).

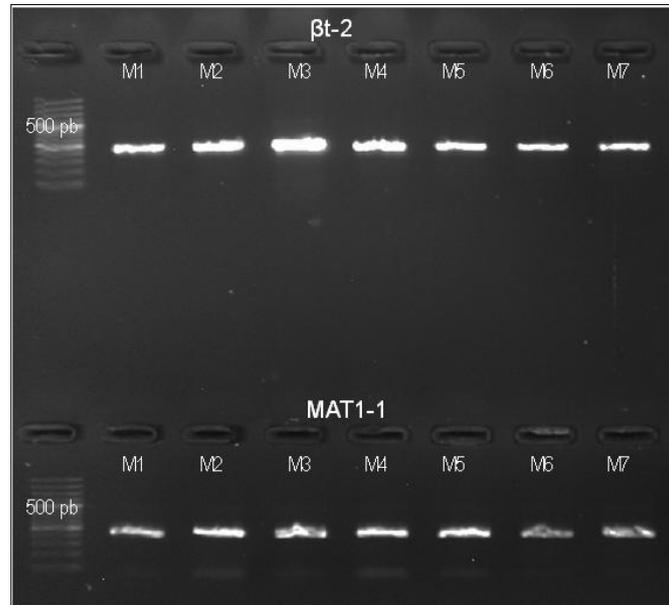


Figura 9. Visualización del amplicón obtenido para β t-2, en la parte superior (400 pb) y en la parte inferior MAT1-1 (500 pb) de algunas de las cepas analizadas de la colección de *T. pseudoecalypti*.

DISCUSIÓN

Los resultados aquí obtenidos permiten concluir que la colección de *T. pseudoecalypti* colectada de diferentes localidades de Uruguay y sobre distintos hospederos, corresponde a un único haplotipo, coincidiendo con el haplotipo KE8 de *Teratosphaeria pseudoecalypti* reportando en Queensland (Australia) (Andjic et al., 2010), evidenciando que probablemente se trate de un único evento de introducción del patógeno al país, o de numerosos eventos de introducción de un mismo haplotipo.

Los aislados de *T. pseudoecalypti* estudiados aquí, fueron obtenidos en plantaciones ubicadas en 17 de los 19 departamentos presentes en el país, con niveles de severidad variables, provenientes de *E. tereticornis*, *E. camaldulensis*, híbridos de éstos y *Eucalyptus* spp. (Arbuet et al., 2016). La colección de 217 cepas, evidencia la existencia de diferencias morfológicas entre cepas, sin embargo, estas diferencias fenotípicas no estuvieron asociadas a diferencias genéticas. Las características morfológicas observadas concuerdan con lo observado por Andjic et al. (2010), quien reporta que los aislados provenientes de Queensland presentaron lento crecimiento, escasa fructificación, margen irregular a veces

lobulado y de coloración diferente a los aislados de otras localidades. A su vez, observó que dependiendo el medio de cultivo la coloración del micelio varía. En lo que respecta a los conidios, la pigmentación hialina, dimensiones de largo y ancho y números de septos, concuerdan a lo reportado para la región centro y sur de Queensland, donde se encuentran los haplotipos KE8 y KE9 (conidios aseptados y hasta con dos septos, de 31,5 a 37,5 μm de largo y un ancho de 2 a 3 μm en condiciones *in vitro*).

La variabilidad en longitud de conidios, visto en los diferentes grupos morfológicos, fue también observada por Andjic et al. (2010) para la especie *T. eucalypti* (especie filogenéticamente más cercana a *T. pseudoecalypti*), donde el tamaño dependió del nivel de maduración de los cuerpos fructíferos al momento de la colecta. Estos autores también observaron que los conidios provenientes de picnidios crecidos en medio de cultivo eran más pequeños que los extraído desde material vegetal.

El análisis filogenético realizado a partir de la combinación de tres regiones genómicas (ITS2, $\beta\text{t-2}$ y EF1- α), y el análisis de polimorfismo de nucleótidos simples basado en las cuatro regiones genómicas (incluyendo ATP6), revela que toda la colección de estudio se agrupa en un mismo clado. En la filogenia resultante de la concatenación, el clado de *T. pseudoecalypti* se separa del de *T. eucalypti*, con altos valores de bootstrap y de probabilidad bayesiana posterior, con idéntica topología que los árboles obtenidos del análisis de los genes por separado. El análisis de SNP's revela que la población de estudio es genéticamente homogénea y corresponde al haplotipo KE8 de *T. pseudoecalypti*.

Estos resultados sugieren que se trata de la ocurrencia de un efecto fundador (Wingfield et al., 2015) en Uruguay, explicado por la homogeneidad de la población, representada en un único haplotipo presente en una colección generada por colectas provenientes de todo el territorio nacional. La presencia de un único haplotipo sugiere la ocurrencia de una única introducción del patógeno a Uruguay (más probable), o numerosas introducciones de un mismo haplotipo (menos probable).

El hecho de que la población sea genéticamente homogénea otorga ventajas al momento de manejar a la enfermedad mediante mejoramiento genético, ya que el comportamiento sanitario de los distintos germoplasmas frente a este patógeno es resultado de la resistencia genética y no de la variabilidad en la agresividad de la población del

patógeno. A su vez, remarca la necesidad de extremar esfuerzos para evitar la ocurrencia de nuevas introducciones que pudieran introducir variabilidad genética a la población.

En ascomycetes, la reproducción sexual está predominantemente gobernada por la compatibilidad sexual, la cual está determinada por el locus MAT donde se encuentran los alelos MAT1-1 y MAT1-2, presentes como alelos alternos (Turgeon y Yoder, 2000). De esta manera los hongos con apareamiento heterotálico requieren de otro individuo genéticamente compatible para que ocurra la reproducción sexual, a diferencia del homotalismo donde el mismo individuo es capaz de completar exitosamente el ciclo sexual, como por ejemplo *Mycosphaerella fijiensis* y *T. nubilosa* (Pérez, Slippers, Wingfield, Hunter y Wingfield, 2010). Aunque también puede ocurrir homotalismo secundario, como ocurre en algunos ascomycetes como *Neurospora tetrasperma* (Merino, Nelson, Jacobson y Natvig, 1996). En este caso, para algunos hongos heterotálicos bipolares, el proceso de la formación de las esporas actúa un mecanismo por el que dos núcleos de tipo de apareamiento opuesto, pasan al interior de cada espora. Al germinar ésta, se produce un talo con núcleos complementarios comportándose como homotálico. Los resultados aquí obtenidos indican que la totalidad de la población analizada presenta al gen MAT1-1, mientras que el gen MAT1-2 no fue encontrado en el genoma, resultando en una relación entre los genes MAT1-1 y MAT1-2 de 1:0, indicando heterotalismo. Por consiguiente, este estudio sugiere la ausencia de individuos genéticamente compatibles para que se lleve a cabo la reproducción sexual.

La confirmación de una población homogénea del patógeno, representada por un único haplotipo y la ausencia de reproducción sexual, otorgan una estabilidad en la genética poblacional que remarca la importancia de reforzar el control del movimiento del germoplasma que proceda de lugares con una población heterogénea, como lo es Australia. Dada la aparente facilidad de diseminación de este patógeno, presente en toda la región (Argentina, Brasil y Uruguay) y la falta de barreras físicas que limiten su diseminación en la región, es fundamental conocer la estructura poblacional de este patógeno a nivel región y de confirmarse la ocurrencia de un único haplotipo, en la misma, es clave redoblar las barreras cuarentenarias y limitar el movimiento de germoplasma con un enfoque regional.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de la República (UdelaR), a la Agencia de Investigación e Innovación (ANII), al Instituto de Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y a Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI) de la Universidad de Pretoria; como también a todos los investigadores que aportaron sus conocimientos.

BIBLIOGRAFÍA

- Andjic, V., Pegg, G.S., Carnegie, A.J., Callister, A., StJ Hardy, G.E. y Burgess, T.I.** (2010). *Teratosphaeria pseudoecalypti*, new cryptic species responsible for leaf blight of *Eucalyptus* in subtropical and tropical Australia. *Plant Pathology*, 59, 900-912.
- Andrews, S.** (2010). *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. Recuperado de <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Arbuet, E., Codina, M. y García, R.** (2016). *Prospección de la mancha amarilla del eucalipto (causada por Teratosphaeria pseudoecalypti) en plantaciones de eucalipto colorado*. (Tesis de grado inédita). Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.
- Balmelli, G., Resquín, F., Simeto, S., Torres-Dini, D., Núñez, P., Rodríguez, F. y González, G.** (2014). Variabilidad genética en susceptibilidad a *Teratosphaeria pseudoecalypti* en eucaliptos colorados. *Serie Técnica INIA*, 213, 8-91.
- Brown, J. y Hovmoller, M.** (2002). Aerial Dispersal of Pathogens on the Global and Continental Scales and Its Impact on Plant Disease. *Science*, 297, 537-541.
- Carbone, I. y Kohn, L.M.** (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Micología*, 91(3), 553-556.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. y Posada, D.** (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772.
- De Souza, T., Costa, A., Da Silva, L., Maciel, H., Borges, N. y Couto, A.** (2014). *Teratosphaeria pseudoecalypti* on eucalyptus in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 39 (5), 407-412.

- DIEA (Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias).** (2016). *Anuario estadístico agropecuario 2016*. Recuperado de <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016>
- Doidge, E., Bottomley, A., Plank, J. y Pauer, G.** (1953). A revised list of plant diseases in South Africa. Union of South Africa, Department of Agriculture. *Science Bulletin*, 346, 1-122.
- Doyle, J.J. y Doyle, J.L.** (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19,11-15.
- Ficetola, G., Bonin, A. y Miaud, C.** (2008). Population genetics reveals origin and number of founders in a biological invasion. *Molecular Ecology*, 17, 773- 782.
- Gardes, M. y Bruns, T.D.** (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113-118.
- Glass, N.L. y Donaldson, G.C.** (1995). Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1323-1330.
- Hall, T.A.** (2011). BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*, 2(1), 60-61.
- Kazunori, D., Yamadak, T. y Kazutaka, K.** (2016). Application of the MAFFT sequence alignment program to large data reexamination of the usefulness of chained guide trees. *Bioinformatics*, 32, 3246-3251.
- Lockwood, J.L., Cassey, P. y Blackburn, T.** (2005). The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Ecology and Evolution*, 20 (5), 223-228.
- Merino, S.T., Nelson, M.A., Jacobson, D.J. y Natvig, D.O.** (1996). Pseudohomothallism and evolution of the mating-type chromosome in *Neurospora tetrasperma*. *Genetics*, 143, 789-799.
- Pérez, G., Slippers, B., Wingfield, B., Hunter, G. y Wingfield, M.** (2010). Micro- and macrospatial scale analyses illustrates mixed mating strategies and extensive geneflow in populations of an invasive haploid pathogen. *Molecular Ecology*, 19, 1801- 1813.

- Philibert, A., Desprez-Loustau, M., Fabre, B., Frey, P., Halkett, F., Husson, C., ... y Makowski, D.** (2011). Predicting invasion success of forest pathogenic fungi from species traits. *Journal of Applied Ecology*, 48, 1381-1390.
- Ramos, S.O. y Pérez, C.A.** (2014). First report of *Teratosphaeria pseudoecalypti* on *Eucalyptus Hybrids in Argentina*. Recuperado de <http://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-10-14-1087-PDN>.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, S., Höhna, S., ... y Huelsenbeck, J.P.** (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systems Biology*, 61(3), 539–542.
- Solovyev, V., Kosarev, P., Seledsov, I. y Vorobyev, D.** (2006). Anotación automática de genes eucarióticos, pseudogenes y promotores. *Genome Biology*, 1, 101-102.
- Soria, S., Alonso, R., Bettucci, L. y Lupo, S.** (2014). First report of *Teratosphaeria pseudoecalypti* in Uruguay. *Australasian Plant Disease*, 9, 146.
- Suárez, A. y Tsutsui, N.** (2008). The evolutionary consequences of biological invasions. *Molecular Ecology*, 17, 351-360.
- Sudhir, K., Glen, S. y Koichiro, T.** (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874.
- Swofford, D.L.** (2002). PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/271205405_PAUP_Phylogenetic_Analysis_Using_Parsimony_and_Other_Methods_Version_40b10
- Turgeon, B.G. y Yoder, O.C.** (2000). Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 31, 1-5.
- Wingfield, M.J., Slippers, B., Hurley, B.P., Coutinho, T.A., Wingfield, D.B. y Roux, J.** (2008). Eucalypt pests and diseases: growing threats to plantation productivity. *Southern Forests*, 70, 139-144.
- Wingfield, M.J., Roux, J., Slippers, B., Hurley, B.P., Garnas, J., Myburg, A. y Wingfield, D.B.** (2013). Established and new technologies reduce increasing pest and pathogen threats to Eucalypt plantations. *Forest Ecology and Management*, 301, 35-42.
- Wingfield, M.J., Brockerhoff, E.G., Wingfield, B.D. y Slippers, B.** (2015). Planted forest health: The need for a global strategy. *Forest Health*, 349, 832-836.

Zhou, X., Burgess, T., De Beer, Z., Lieutier, F., Yart, A., Kier, K., ... y Wingfield, M. (2007).
Blackwell Publishing Ltd High intercontinental migration rates and population admixture
in the sapstain fungus *Ophiostoma ips*. *Molecular Ecology*, 16, 89-99.

3. RESISTENCIA GENÉTICA A *Teratosphaeria pseudoecalypti* EN GERMOPLOSMAS DE *Eucalyptus* DE INTERÉS PARA URUGUAY*

Ramirez Nazaret*¹; Simeto Sofía²; Balmelli Gustavo²; Bentancur Oscar³; Wingfield Michael⁴ y
Pérez Carlos A¹

¹Departamento Protección Vegetal, EEMAC, Facultad de Agronomía, UdelaR, Paysandú, Uruguay

²Programa Forestal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Tacuarembó, Uruguay.

³Departamento Biométrica, Estadística y Computación, EEMAC, Facultad de Agronomía, UdelaR, Paysandú, Uruguay

⁴Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, University of Pretoria, Pretoria, Sudáfrica.

msc.nazaret@gmail.com

*Artículo escrito bajo el formato de la revista Agrocienza Uruguay.

Resumen

Resistencia genética a *Teratosphaeria pseudoecalypti* en germoplasmas de *Eucalyptus* de interés para Uruguay.

En Uruguay, las plantaciones de *Eucalyptus* han tenido un continuo incremento de problemas sanitarios, ocasionados principalmente por hongos fitopatógenos. Este es el caso de la mancha amarilla del eucalipto, causada por el patógeno foliar *Teratosphaeria pseudoecalypti*, que afecta al menos ocho especies de *Eucalyptus* y puede ocasionar la muerte de individuos adultos a causa de reiterados procesos de defoliación. Al tratarse de especies perennes, la resistencia genética durable es la principal medida de manejo a desarrollar frente a las enfermedades. En este marco, el presente trabajo tuvo por objetivo caracterizar el comportamiento sanitario de seis especies de interés para el sector agroforestal, incluyendo 16 germoplasmas de *Eucalyptus* evaluados en tres ensayos de campo en los departamentos de Tacuarembó, Paysandú y Florida. Los resultados indican que hay variabilidad en la resistencia entre y dentro de especies, lo cual confirma que es posible la selección por resistencia. A su vez, se ajustó un protocolo de inoculación artificial para *T. pseudoecalypti* logrando generar esporulación *in vitro* del patógeno y reproducir la enfermedad. El ajuste de un protocolo de inoculación artificial representa a su vez una gran herramienta para asistir a los programas de mejoramiento. Se deben continuar estudios respecto a la multiplicación del inóculo, principal limitante encontrada para este patógeno.

Palabras clave: mancha amarilla del eucalipto, defoliación, resistencia genética durable, esporulación *in vitro*.

Summary

Genetic resistance to *Teratosphaeria pseudoeucalypti* in germplasm of *Eucalyptus* of interest to Uruguay

The area planted with *Eucalyptus* in Uruguay has significantly increase during the last decades and with this, primarily caused by pathogenic fungi. An example of this *Teratosphaeria* leaf blight (TLB), caused by *Teratosphaeria pseudoeucalypti*, which affects at least eight *Eucalyptus* species, and causes mortality of adult trees due to a repeated process of infections and defoliations. Genetic resistance is the preferred alternative to manage forest diseases, since perennial species are exposed to several infection processes over the production cycle, allowing to have long term sustainability. Thus, this study aimed to characterize the genetic resistance of six *Eucalyptus* species, based on 16 germplasms distributed in three field experiments located in Tacuarembó, Paysandú and Florida. Significant differences in crown damage was observed among species and among germplasms of the same species, suggesting that selection for resistance is a feasible option to minimize the impact of this disease. A method for inoculum production and a protocol for artificial inoculation for *T. pseudoeucalypti* was adjusted. However, the main limiting factor is the inoculum production, which needs further investigation. These results suggest that variability in genetic resistance is present and can minimize the impact of TLB to the forestry industry. The protocol of artificial inoculation represents a great tool to assist breeding programs to characterize the genetic resistance of germplasm of interest under controlled conditions.

Key words: *Teratosphaeria* leaf blight (TLB, defoliation, durable genetic resistance, in vitro sporulation

INTRODUCCIÓN

A partir de la década de los años 60, el rubro forestal comenzó a desarrollarse en Uruguay como una actividad viable, con potencial dinamizador del medio rural y de la economía del país (Soust, 2012). El sector ganadero incorporó los montes de abrigo y sombra a su sistema de producción, la mayoría compuestos por eucalipto colorado, principalmente de *E. camaldulensis* y *E. tereticornis*. Estas especies no solo presentan madera con buena resistencia mecánica y buena flexibilidad, ofreciéndole al productor rural material para artículos rurales como postes y durmientes (Mantero, 1995; Bush, 2011); sino que también son utilizadas como combustible para uso industrial y doméstico, y como principales componentes del arbolado urbano (Balmelli y Resquin, 2006).

En Uruguay, la superficie plantada con eucalipto tuvo un incremento constante en el tiempo, pasando de 15.000 ha en 1979 (Soust, 2012) a 726.000 ha en 2013 (DIEA, 2015). Actualmente el área plantada con *Eucalyptus* está compuesta principalmente por *Eucalyptus globulus* (309.088 ha), *E. grandis* (250.569 ha) y *E. dunnii* (81.365 ha), entre otros (85.301 ha) (DIEA, 2016).

El éxito del desarrollo forestal con especies exóticas puede ser atribuido a la ausencia de daño ocasionado por sus enemigos naturales, los cuales fueron dejados atrás en su centro de origen. Sin embargo, el movimiento de germoplasma, principalmente para la instalación de plantaciones de eucalipto en todo el mundo, ha resultado en el movimiento accidental de sus enemigos naturales, favoreciendo el reencuentro con sus hospederos (Wingfield, Brockerhoff, Wingfield y Slippers, 2015) y en muchos casos conduciendo a la ocurrencia de nuevas invasiones biológicas (Philibert et al., 2011). Un claro ejemplo de esto es el caso de *Teratosphaeria nubilosa*, agente causal de la mancha foliar por *Mycosphaerella*, que fue descrita por primera vez en Victoria (Australia), ocasionando severos daños en plantaciones de eucalipto (Cooke, 1891). Posteriormente, este patógeno condujo al cambio de especies en Sudáfrica (Lundquist y Purnell 1987) y en Tasmania (Australia) (Mohammed et al., 2003) donde se reemplazó el *E. globulus* por *E. nitens* como forma de mitigar los daños ocasionados por el patógeno (Hunter, Crous, Carnegie, Burgess y Wingfield, 2011). En Uruguay, *T. nubilosa* fue detectada por primera vez en el 2007, causando severos daños en *E. globulus* (Pérez et al., 2009) y al igual que lo ocurrido en otros países, ha llevado al casi total abandono de esta especie y su reemplazo por *E. dunnii* y *E. grandis* (Balmelli et al., 2014a).

Recientemente se ha reportado en Uruguay la presencia de *Teratosphaeria pseudoecalypti*, agente causal de la mancha foliar conocida como “mancha amarilla del eucalipto”. Este patógeno fue descrito en el 2010, causando severos daños en plantaciones de híbridos de *E. grandis* x *E. camaldulensis*, en Queensland (Australia) pasando a ser la principal amenaza de las plantaciones de eucalipto de esa región (Andjic et al., 2010). Posteriormente, en forma casi simultánea fue reportado en Argentina, en plantaciones de *E. camaldulensis* x *E. grandis* (Ramos y Pérez, 2014); en Brasil, en plantaciones de *E. globulus*, *E. urophylla* x *E. globulus* y *E. nitens* x *E. globulus* (De Souza et al., 2014); y en Uruguay, en plantaciones de *E. globulus* y *E. maidenii* (Soria, Alonso, Bettucci y Lupo, 2014). Sin embargo, el mayor impacto en Uruguay ha sido observado en plantaciones de eucalipto colorado, i.e. *E. camaldulensis* y *E. tereticornis* (Simeto, Balmelli, Pérez y Torres-Dini, 2014).

La presencia de *T. pseudoecalypti* representa una seria amenaza para la totalidad del sector agropecuario, ya que afecta todas las áreas de producción durante la totalidad del ciclo de rotación, comprometiendo la supervivencia de los montes de abrigo y sombra, las cortinas rompe - viento y las plantaciones comerciales con fines de producción de madera sólida. Debido al reciente arribo del patógeno a la región, se desconoce el comportamiento de las distintas especies de eucalipto plantadas en el país frente al patógeno y la posibilidad de manejar esta enfermedad mediante la resistencia genética. Estudios realizados por Balmelli et al. (2014b) indican la existencia de variabilidad en el comportamiento de distintos germoplasmas de *E. camaldulensis* y *E. tereticornis* ante *T. pseudoecalypti*, sin embargo, se desconoce la variabilidad de la resistencia de otras especies de eucalipto de interés industrial.

En este marco, el objetivo principal de este estudio fue determinar la variabilidad en la resistencia entre distintas especies de *Eucalyptus* y dentro de las mismas, como forma de manejo de esta enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos de campo

Se instaló una red de tres ensayos de campo ubicados en establecimientos comerciales en los departamentos de Florida, Tacuarembó y Paysandú, buscando representar tres regiones de importancia forestal y distribuidas de tal manera que cubrieran

todo el país. Se evaluaron seis especies de *Eucalyptus*, elegidas por su importancia a nivel nacional, con distintos genotipos dentro de cada especie, totalizando 16 germoplasmas: cinco de origen clonal y once seminal pertenecientes a las especies *E. camaldulensis*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis*, *E. maidenii* y *E. tereticornis* (Cuadro 1).

Cada ensayo constó de un diseño experimental de bloques completos al azar, con cuatro repeticiones, con una unidad experimental de ocho árboles (dos surcos de cuatro plantas); marco de plantación de 2 m x 4 m. Se fertilizó la plantación con 100 g. planta⁻¹ de 18-46-0 (N-P-K). Los ensayos se plantaron en octubre del 2015 y las evaluaciones se realizaron a los seis y doce meses de instalados los ensayos (otoño y primavera, respectivamente). Para cada árbol se determinó altura del individuo, incidencia de mancha amarilla (mediante estimación visual del porcentaje promedio de hojas afectadas por árbol) y severidad de la enfermedad (porcentaje promedio del área foliar afectada). Posteriormente, se estimó el índice de daño de copa, utilizando la fórmula propuesta por Balmelli (2009), modificada a partir de la original (Stone, Matsuki y Carnegie, 2003): $IDC = Defoliación + ((1 - Defoliación/100) \times (Incidencia \text{ de Necrosis} \times Severidad \text{ de Necrosis}) / 100)$.

Cuadro 1. Germoplasmas evaluados en cada localidad, según forma de propagación.

Especie	Germoplasma	Forma de propagación	Florida	Paysandú	Tacuarembó
<i>E. dunnii</i>	1	Clonal	x	x	x
	2	Semilla	x	x	x
	3	Clonal	x	x	x
<i>E. grandis</i>	1		x	x	x
	2	Clonal	x		
	3		x	x	x
	4	Semilla	x	x	x
<i>E. globulus</i>	1		x	x	x
	2	Semilla	x	x	x
<i>E. maidenii</i>	1		x	x	x
	2	Semilla	x	x	x
<i>E. tereticornis</i>	1		x	x	x
	2	Semilla	x	x	x
	3		x	x	x
<i>E. camaldulensis</i>	1		x		x
	2	Semilla	x	x	

El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa R studio versión R i386 3.3.1 (R Core Team, 2017), previa verificación del cumplimiento de los supuestos de normalidad, independencia y homogeneidad de varianza. Cuando se rechazó la hipótesis, se realizó separación de medias mediante el Test de Tukey con un nivel de significancia de 0,05.

Los datos climáticos utilizados para el análisis se obtuvieron de las estaciones meteorológicas de INIA Tacuarembó, INIA Las Brujas y de la Estación Experimental Dr. Mario A. Cassinoni, para el período que comprendió la evaluación de campo, octubre 2015 a octubre 2016.

Desarrollo de una escala diagramática de severidad

La escala diagramática es una herramienta de evaluación de la enfermedad, que permite estimar el porcentaje de tejido afectado por determinada enfermedad. Este parámetro es de gran utilidad para los técnicos de campo, al permitir uniformizar la estimación de la enfermedad.

De los ensayos antes mencionados, se colectaron hojas de árboles de *E. tereticornis* de 12 meses de edad con distinto porcentaje de severidad de la enfermedad, las cuales fueron llevadas al laboratorio para su análisis. Una vez en el laboratorio, las hojas fueron escaneadas en forma individual mediante un escáner Canon MP190 y posteriormente las imágenes fueron analizadas con el programa informático de análisis digital de imágenes, Assess 2.0 (Lamari, 2008), calculando el área afectada por la enfermedad. Luego de analizada cada imagen, se seleccionaron aquellas imágenes que permitieran generar una escala que contemple el rango de severidad observado a campo considerando manchas cloróticas y necróticas.

Ajuste de un método de inoculación artificial

El método de inoculación artificial consiste en asegurar el encuentro del patógeno con el hospedero en un ambiente predisponente para la enfermedad, lo cual constituye una herramienta fundamental para los programas de mejoramiento genético por resistencia. Por lo

tanto, el ajuste de un método de inoculación artificial, requiere de la generación de inóculo del patógeno, y de la identificación de las condiciones ambientales que favorecen a la infección.

Producción de inóculo

Se eligió al azar una cepa de *T. pseudoeucahypti* perteneciente a la colección del Laboratorio de Fitopatología de la EEMAC, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. La cepa en estudio CMW 50031, se sembró en placa de Petri de 55 mm con medio de cultivo MEA al 2%, y se la incubó a 25 °C en oscuridad por 60 días para favorecer la esporulación. Posteriormente se colectaron tres picnidios y se los colocó, cada uno de ellos, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 1000 µL de agua estéril, luego de 10 minutos en agitación en Vortex, se tomaron alícuotas de 200 µL, que fueron dispensadas en placas de Petri de 90 mm con tres medios de cultivo de distinta composición, previamente evaluados por Andjic et al. (2010): MEA 2% (Malt Extract, Difco, Paris; Agar Bacteriological, Oxoid, Inglaterra), PDA (Potato Dextrose Agar, Oxoid, Inglaterra) y OMA (Avena; Agar Bacteriological, Oxoid, Inglaterra). Se realizaron 5 repeticiones por medio de cultivo, para luego evaluar cual medio favoreció el crecimiento micelial y la aparición de cuerpos fructíferos del hongo, en el menor tiempo. Las placas se incubaron a 25 °C en oscuridad por 60 días.

Luego de seleccionado el medio de cultivo, se evaluaron tres técnicas de multiplicación del inóculo: i) producción de colonias a partir de una suspensión de esporas, ii) múltiple repique en placa y iii) crecimiento en medio de cultivo líquido.

Para la suspensión de esporas se tomó una cepa en activo crecimiento, de la cual se extrajo un picnidio que se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 1000 µL de agua estéril, luego de 10 minutos en agitación en Vortex, se tomaron alícuotas de 200 µL, que fueron dispensadas en placas de Petri de 90 mm con medio de cultivo MEA 2%. Posteriormente las placas fueron incubadas en oscuridad a 25 °C, por 60 días para luego observar las colonias producidas.

La técnica de múltiple repique consistió en diseñar una cuadrícula de 1 cm x 1 cm en placa de Petri de 90 mm, donde en cada cuadrado se realizó un repique a partir de puntas de hifas de la misma cepa con que se realizó la técnica anterior. Esta técnica implica el crecimiento simultáneo de al menos 63 colonias por placa.

Para la técnica de medio líquido, se tomó la misma cepa de la técnica anterior, se la colocó en un Erlenmeyer graduado con 200 mL de agua estéril, se agitó por una hora en un shaker de agitación orbital para favorecer la liberación de conidios desde los picnidios. La suspensión de esporas se colocó en otro Erlenmeyer graduado con 200 mL de un medio de cultivo líquido, el cual se preparó con la receta de 20 g de sacarosa y 20 g de levadura para 1 L de agua, manteniendo esterilidad. Posteriormente fue incubado a temperatura ambiente (aprox. 21 °C) y luz ambiental, en un agitador orbital a 100 rpm, por 5 días.

Técnica de inoculación artificial

Para la inoculación se preparó una suspensión de esporas obtenida a partir cinco colonias en activo crecimiento con visibles picnidios. Las mismas fueron colocadas en un Erlenmeyer graduado con 30 mL de agua estéril y 20 µL de Tween-20. El Erlenmeyer fue llevado a un agitador orbital con 100 rpm durante 1 h, a temperatura ambiente, con el objetivo de favorecer la liberación de los conidios. Posteriormente, se procedió al centrifugado por 1 min a 10.000 rpm, para luego extraer el sobrenadante donde se encontraban los conidios. De la suspensión, se tomó una alícuota de 100 µL, y de esta 10 µL para contabilizar en cámara de Neubauer Bright-line y bajo microscopio óptico (aumento 40x), el número de conidios por mL.

Se tomó a su vez otra alícuota de 200 µL que fue dispensada sobre una placa de Petri de 90 mm con medio de cultivo MEA 2% y la cual se incubó a 25 °C en oscuridad por 60 días, para luego evaluar la calidad de la suspensión de esporas mediante la constatación de que las esporas eran viables (posterior desarrollo de colonias) y la ausencia de contaminantes.

La suspensión de esporas, se colocó en un micro-aspersor de 25 mL. Se tomaron cinco plantines de *E. camaldulensis* de aproximadamente 3 meses de edad que habían recibido una poda de saneamiento 24 h antes de la inoculación. Los plantines fueron colocados en un ambiente iluminado, de alta humedad y temperatura media de aproximadamente 25 °C, se regaron las macetas, se mojaron las hojas y se los colocó dentro de una bolsa plástica a fin de favorecer la apertura estomática. Luego de 24 h del acondicionamiento, en cada plantín se seleccionaron 4 hojas sanas, sin evidencias de infecciones. Las mismas fueron desinfectadas superficialmente con alcohol 70 % utilizando

un algodón estéril. Las hojas fueron numeradas y luego inoculadas mediante la aspersión de la suspensión de esporas, en ambos lados de la hoja hasta punto de goteo. Posteriormente se cubrió al plantín con una bolsa plástica y fue mantenido a 25 °C. Transcurrido 3 días de la inoculación, se realizó una evaluación diaria para determinar el momento de aparición de síntomas de manchas por *T. pseudoecalypti*. Una vez visualizadas las manchas, se determinó la resistencia/susceptibilidad del material, teniendo en cuenta el promedio de severidad de las hojas inoculadas.

Mecanismo de penetración de T. pseudoecalypti en la hoja

Para determinar el mecanismo de penetración del hongo a la planta, se realizó la decoloración de hojas que presentaban mancha foliar reciente, para luego teñirlas y visualizar el ingreso del patógeno, técnica adaptada de Alfenas y Goncalves (2007). Para esto se tomó un plantín de *E. camaldulensis* de 5 meses con mancha foliar, con infección foliar ocurrida en el sombráculo. Se extrajeron las hojas para luego recortar la zona con mancha. Estos trozos se colocaron en una solución de etanol al 95 % y ácido acético glacial en una proporción de 3:1, por 24 h. Posteriormente se los colocó sobre una hoja de papel a efectos de escurrir la solución y se los sumergió en una solución con ácido láctico, glicerol y agua estéril en una proporción de 1:1:1, durante 3 minutos. Por último, se los sumergió en una solución con azul de tripano (colorante azoico) que permitió diferenciar el tubo germinativo del patógeno ingresando por el estoma de la hoja.

RESULTADOS

Ensayos de campo

Los tres ensayos instalados tuvieron presencia de mancha amarilla, a los 6 y 12 meses post-plantación, siendo la incidencia media general para todos los ensayos del 9 % y 18 % a los 6 y 12 meses, respectivamente.

La mayor incidencia fue observada en la localidad de Tacuarembó para la especie de *E. camaldulensis*, alcanzando un promedio de 45 % a los 6 meses (otoño) y 56 % a los 12 meses (primavera) (Cuadro 2).

Por su parte la mayor severidad fue observada en la localidad de Paysandú en *E. globulus* alcanzando un promedio de 34 %. A su vez, se observaron individuos sanos, sin síntomas, en las seis especies evaluadas para las tres localidades (Cuadro 3).

Por otro lado, existió efecto significativo del genotipo dentro de cada especie, pudiendo observarse variabilidad tanto en incidencia como en severidad, a los 6 meses (Figura 1) y 12 meses (Figura 2).

Para el IDC, mediante el análisis por contrastes ortogonales se pudo determinar que a los 12 meses *E. camaldulensis* no difirió de *E. tereticornis*, *E. grandis* no difirió de *E. maidenii* y *E. maidenii* no difirió de *E. dunnii*, mientras que el resto de las comparaciones de pares tuvieron diferencias significativas en todos los casos (Cuadro 4).

Los mayores IDC fueron observados en la localidad de Tacuarembó para la especie *E. camaldulensis*, alcanzando un valor de 9 % a los 6 meses y 45 % a los 12 meses, particularmente en ésta localidad se registró daño de copa en todas las especies sin excepción (Cuadro 5), dado principalmente por la defoliación registrada a los 12 meses para todas las especies (Cuadro 6). También se observó variación en el IDC dentro de una misma especie, siendo de 0 a 81 % para *E. globulus*, de 0 a 71 % para *E. camaldulensis*, y de 0 a 60 % para *E. tereticornis* (Cuadro 7).

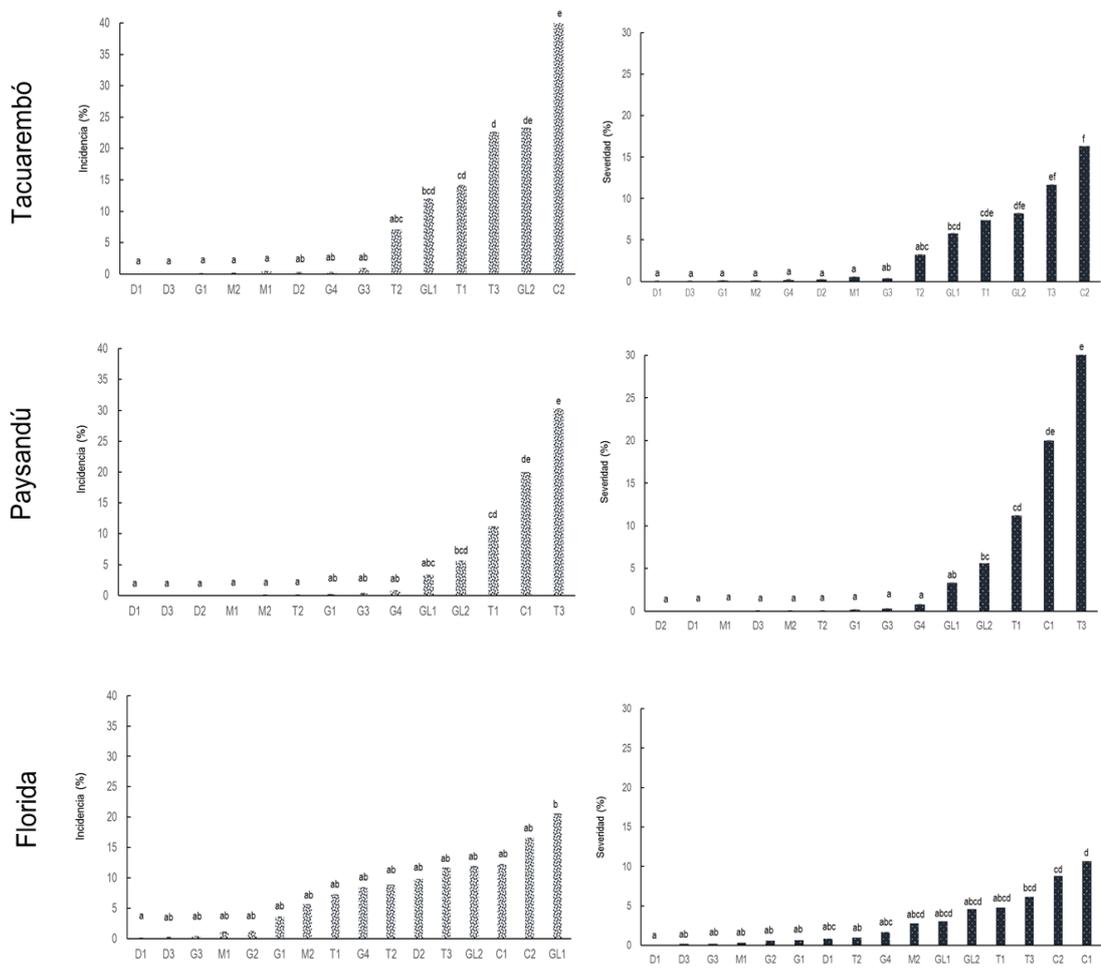
A los 6 meses el IDC se vio afectado significativamente por la variable incidencia ($p < 0,0001$) y a los 12 meses la incidencia como de la severidad ($p < 0,0001$) lo afectan por igual.

Cuadro 2. Incidencia media observada para las seis especies, a los 6 y 12 meses, en las tres localidades evaluadas.

Especie	Incidencia media (%) - 6 meses			Incidencia media (%) - 12 meses		
	Florida	Paysandú	Tacuarembó	Florida	Paysandú	Tacuarembó
<i>E. camaldulensis</i>	15	30	42	1	35	56
<i>E. tereticornis</i>	9	21	15	1	14	30
<i>E. globulus</i>	16	10	18	1	21	7
<i>E. grandis</i>	3	1	0	0	0	2
<i>E. maidenii</i>	3	0	0	0	17	16
<i>E. dunnii</i>	3	0	0	0	2	0

Cuadro 3. Severidad media observada para las seis especies, a los 6 y 12 meses, en las tres localidades evaluadas.

Especie	Severidad media (%) - 6 meses			Severidad media (%) - 12 meses		
	Florida	Paysandú	Tacuarembó	Florida	Paysandú	Tacuarembó
<i>E. camaldulensis</i>	10	20	16	1	22	23
<i>E. tereticornis</i>	4	14	7	1	10	11
<i>E. globulus</i>	3	5	7	1	34	14
<i>E. grandis</i>	1	0	0	0	0	3
<i>E. maidenii</i>	1	0	0	0	21	15
<i>E. dunnii</i>	0	0	0	0	0	1



gura 1. Incidencia y severidad promedio, a los 6 meses, en las tres localidades, según genotipo (*E. camaldulensis*=C2-C1, *E. tereticornis*=T3-T1-T2, *E. globulus*=GL2-GL1, *E. grandis*=G4-G3-G1-G2, *E. maidenii*=M2-M1 y *E. dunnii*=D1-D2-D3). Medias sin ninguna letra en común son estadísticamente diferentes ($p=0,05$) según test de Tukey. Considerándose que C1 no se encuentra en Paysandú, C2 no se encuentra en Tacuarembó y G2 no se encuentra en Paysandú y Tacuarembó.

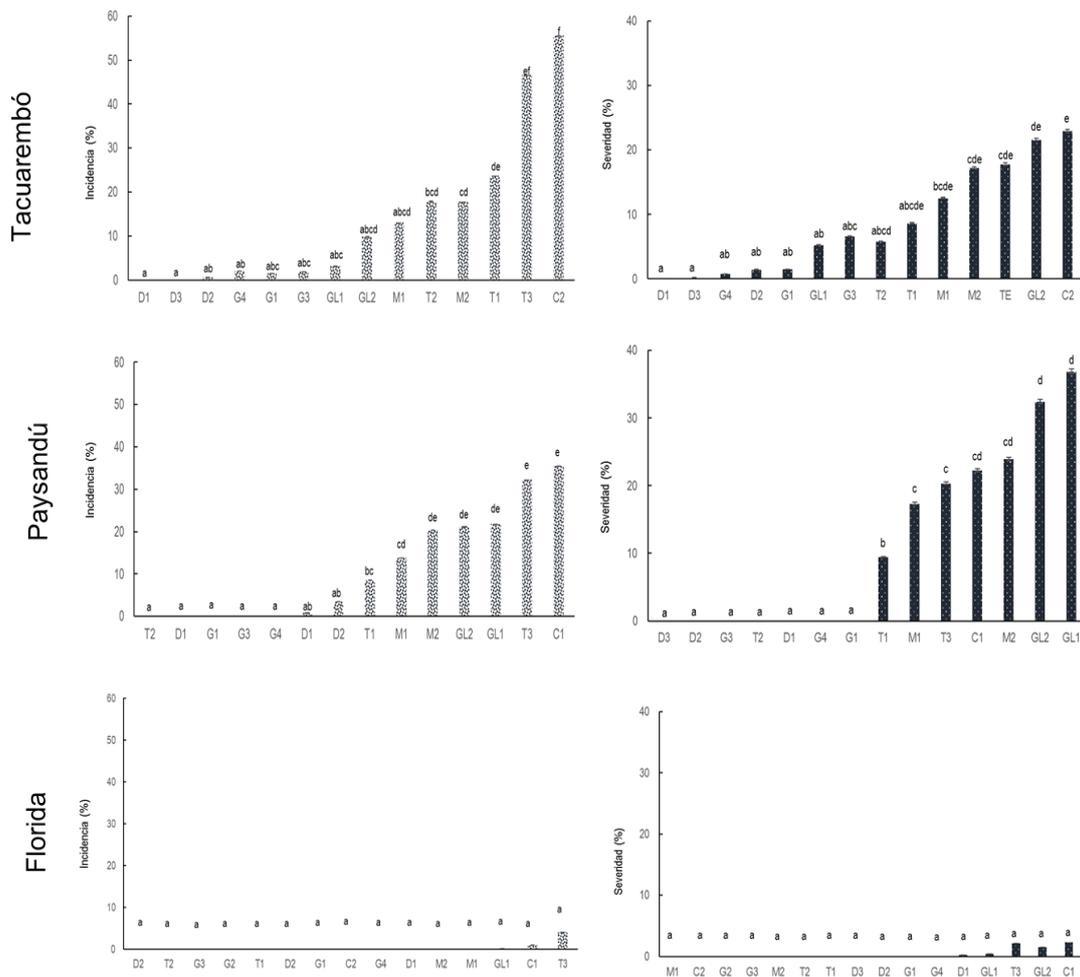


Figura 2. Incidencia y severidad promedio, a los 12 meses, en las tres localidades, según genotipo (*E. camaldulensis*=C2-C1, *E. tereticornis*=T3-T1-T2, *E. globulus*=GL2-GL1, *E. grandis*=G4-G3-G1-G2, *E. maidenii*=M2-M1 y *E. dunnii*=D1-D2-D3). Medias sin ninguna letra en común son estadísticamente diferentes ($p=0,05$) según test de Tukey. Considerándose que C1 no se encuentra en Paysandú, C2 no se encuentra en Tacuarembó y G2 no se encuentra en Paysandú y Tacuarembó.

Cuadro 4. Matriz de contraste de medias para el IDC, comparación de las seis especies evaluadas en las tres localidades a los 12 meses de instalados los ensayos (primavera).

	<i>E. camaldulensis</i>	<i>E. tereticornis</i>	<i>E. globulus</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. maidenii</i>	<i>E. dunnii</i>
<i>E. camaldulensis</i>		0.4664	0.0010	0.0197	<.0001	<.0001
<i>E. tereticornis</i>			<.0001	0.0361	0.0025	<.0001
<i>E. globulus</i>				<.0001	<.0001	<.0001
<i>E. grandis</i>					0.1751	0.0018
<i>E. maidenii</i>						0.1230
<i>E. dunnii</i>						

Cuadro 5. IDC medio observado para las seis especies, a los 6 y 12 meses, en las tres localidades evaluadas.

Especie	IDC (%) media - 6 meses			IDC (%) media - 12 meses		
	Florida	Paysandú	Tacuarembó	Florida	Paysandú	Tacuarembó
<i>E. camaldulensis</i>	3	7	9	2	18	45
<i>E. tereticornis</i>	1	6	3	3	12	29
<i>E. globulus</i>	2	1	3	3	31	30
<i>E. grandis</i>	0	0	0	7	9	21
<i>E. maidenii</i>	0	0	0	1	5	16
<i>E. dunnii</i>	0	0	0	3	2	16

Cuadro 6. Defoliación media observada para las seis especies, a los 6 y 12 meses, en las tres localidades evaluadas.

Especie	Defoliación (%) media - 6 meses			Defoliación (%) media - 12 meses		
	Florida	Paysandú	Tacuarembó	Florida	Paysandú	Tacuarembó
<i>E. camaldulensis</i>	0	0	0	2	10	36
<i>E. tereticornis</i>	0	0	0	3	9	25
<i>E. globulus</i>	0	0	0	3	25	29
<i>E. grandis</i>	0	0	0	7	9	21
<i>E. maidenii</i>	0	0	0	1	1	13
<i>E. dunnii</i>	0	0	0	3	2	16

Cuadro 7. Rango de IDC, observado para las seis especies, a los 6 y 12 meses, en las tres localidades evaluadas.

Especie	Rango de IDC (%) - 6 meses			Rango de IDC (%) - 12 meses		
	Florida	Paysandú	Tacuarembó	Florida	Paysandú	Tacuarembó
<i>E. camaldulensis</i>	0 a 20	0 a 20	0 a 42	0 a 20	0 a 45	0 a 71
<i>E. tereticornis</i>	0 a 10	0 a 48	0 a 35	0 a 25	0 a 40	0 a 68
<i>E. globulus</i>	0 a 20	0 a 8	0 a 51	0 a 25	0 a 81	0 a 60
<i>E. grandis</i>	0 a 3	0 a 3	0	0 a 30	0 a 40	0 a 60
<i>E. maidenii</i>	0 a 3	0	0 a 1	0 a 10	0 a 20	0 a 42
<i>E. dunnii</i>	0 a 2	0	0	0 a 40	0 a 15	0 a 50

A su vez, se observa que los genotipos de todas las especies presentan similar comportamiento sanitario en las tres localidades evaluadas. Para explicar este efecto localidad, se analiza la temperatura y precipitación de cada una de estas, no observándose diferencias entre localidades en cuanto a la temperatura (Figura 3), pero sí con respecto a las precipitaciones, donde Tacuarembó tuvo 414 mm más de lluvias en los primeros 12 meses que Paysandú, que fue la localidad con menor precipitación total (815 mm) (Figura 4).

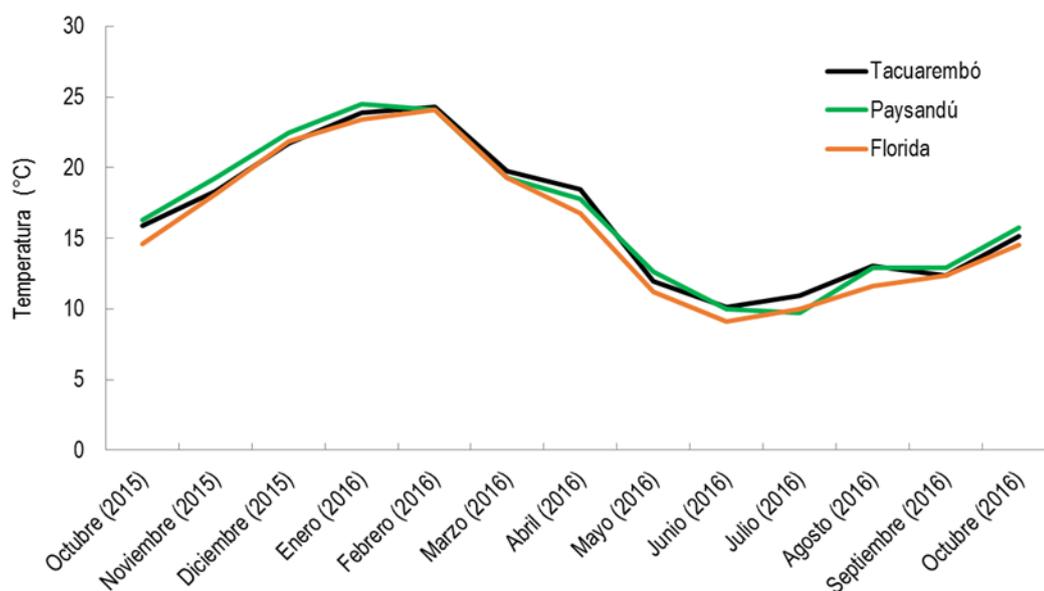


Figura 3. Temperatura media promedio mensual durante el período de evaluación (octubre 2015-octubre 2016), para las tres localidades.

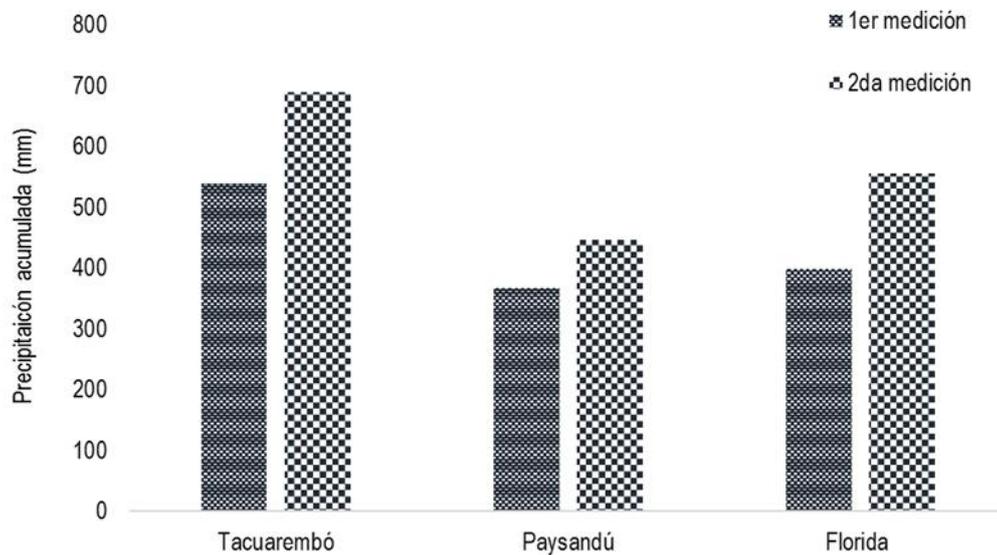


Figura 4. Precipitación acumulada a la primera evaluación (octubre 2015-abril 2016) y a la segunda evaluación (octubre 2015-octubre 2016) para las tres localidades.

Para la elaboración de la escala de severidad de manchas se consideró un límite superior, correspondiente a la máxima severidad observada en hojas que forman parte de la copa del árbol (90 %), teniendo en cuenta tanto tejido clorótico como necrosado; y niveles intermedios decrecientes cada 5 %. La escala elaborada se presenta en valores enteros (Figura 5).

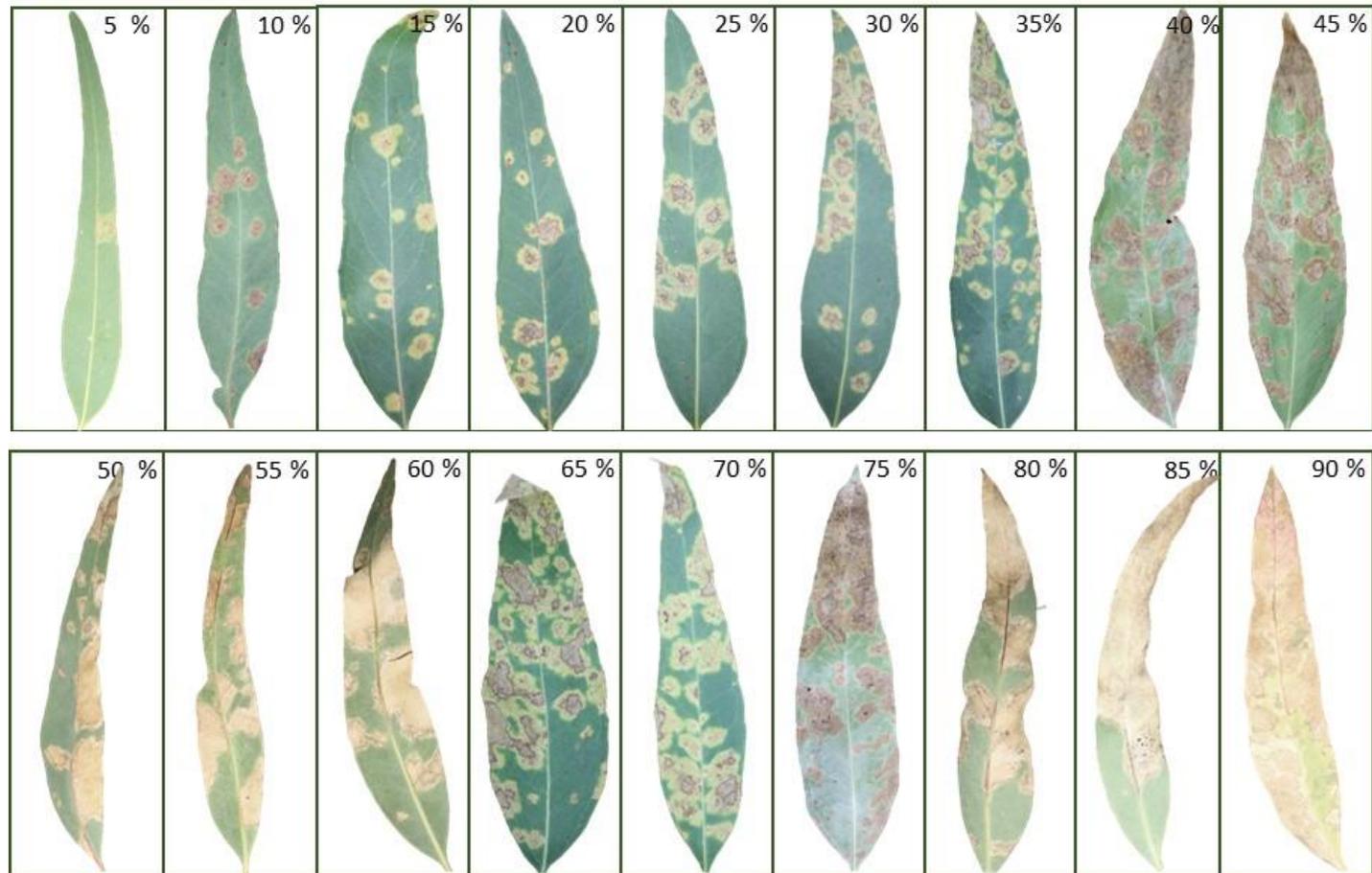


Figura 5. Escala diagramática utilizando hojas de *E. tereticornis* de 12 meses de edad. Se considera tanto tejido clorótico como necrosado y niveles intermedios decrecientes cada 5 %.

Producción de inóculo

En cuanto a los medios de cultivo, el medio MEA 2% fue el medio que permitió la visualización de cuerpos fructíferos en el menor tiempo. El medio PDA fue el que favoreció un rápido crecimiento micelial, pero con menor presencia de cuerpos fructíferos, mientras que en el medio OMA no se logró crecimiento del hongo.

En cuanto a la técnica de multiplicación, la que permitió reducir el tiempo de espera para mayor/mejor desarrollo micelial y obtención de estructuras de propagación (conidios) fue el múltiple repique, en comparación con la suspensión de esporas que presentó pocas colonias por placa, y al medio de cultivo líquido donde no se observó crecimiento micelial ni producción de conidios (Figura 6).

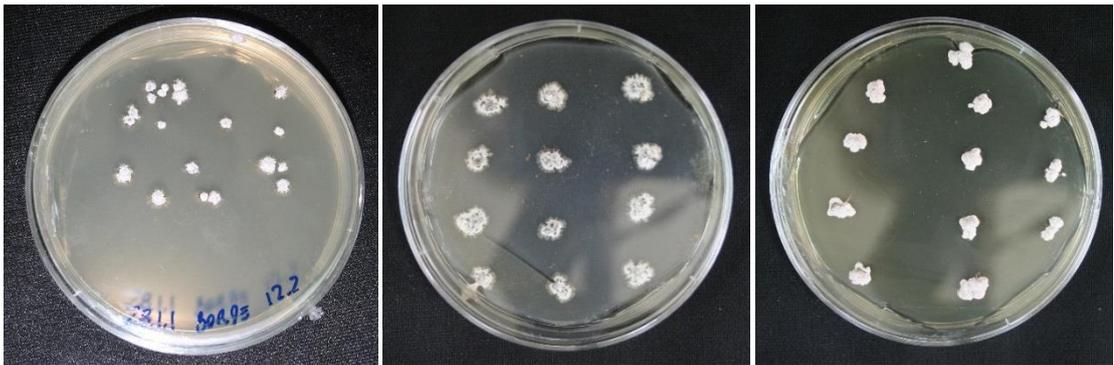


Figura 6. Multiplicación de inóculo de *T. pseudoeucalypti* con distintas técnicas y medios de cultivo: a) suspensión de esporas en medio MEA 2%, b) múltiple repique en medio MEA 2%, c) múltiple repique en medio PDA.

Técnica de inoculación artificial

A partir de la suspensión de esporas obtenida de cinco colonias en activo crecimiento y con visibles picnidios, se alcanzó una concentración máxima de conidios del $0,72 \times 10^3$ conidios/ml. Esta concentración de esporas permitió reproducir la enfermedad, observándose los primeros síntomas a los 25 días post-inoculación (Figura 7).



Figura 7. Inoculación en plantín de *E. camaldulensis*. a) plantín de *E. camaldulensis* de aproximadamente 3 meses de edad, b) enumeración de hojas a ser inoculadas, c) inoculación por medio de aspersion, d) cubrimiento del plantín con una bolsa plástica.

Método de inoculación ajustado para T. pseudoecalypti

En base a la experiencia adquirida y a los resultados obtenidos se recomienda el siguiente protocolo para la inoculación de *T. pseudoecalypti*:

- 1- Aislar los plantines a ser inoculados del potencial inóculo existente en el ambiente al menos 3 semanas previas a la inoculación, para asegurar que los plantines no estén infectados.
- 2- Realizar una poda de saneamiento de cada plantín a inocular con el fin de eliminar hojas con daño biótico o mecánico que puedan alterar los resultados.
- 3- 24 h antes de realizar la inoculación, tomar los plantines y colocarlos en un ambiente iluminado, de alta humedad y temperatura media de 25 °C para que se aclimaten al microclima que favorece la ocurrencia de la enfermedad. Regar la maceta hasta anegamiento y humedecer las hojas, a fin de favorecer la apertura estomática y por ende la infección.

- 4- Repicar la cepa de *T. pseudoeucalypti* a inocular desde una colonia en activo crecimiento y en lo posible con pocos subcultivos en el tiempo. Multiplicar el inóculo mediante la técnica del múltiple repique en medio de cultivo MEA 2%.
- 5- En un Erlenmeyer graduado (de 200 mL de capacidad), colocar 20 mL de agua desionizada estéril, 20 μ l de Tween-20 y todas las colonias crecidas en una placa de las generadas en el punto anterior.
- 6- Agitar el Erlenmeyer en un agitador orbital, a 100 rpm durante 1 h y a temperatura ambiente (21 °C) para que los picnidios se desprendan y los conidios sean liberados a la suspensión, centrifugar por 60 s a 10.000 rpm, para luego extraer el sobrenadante donde se encuentran los conidios.
- 7- Determinar la concentración de conidios de la suspensión. Tomar una alícuota de 100 μ l y de ésta 10 μ l, y mediante conteo en cámara de Neubauer bajo microscopio óptico (aumento 40x), confirmar una concentración de al menos $0,7 \times 10^3$ conidios/mL.
- 8- Tomar 200 μ l y diseminarlos en una placa de Petri de 90 mm, con el fin de comprobar la calidad de la suspensión de esporas, respecto a la viabilidad y pureza del inóculo. Posteriormente incubar esta placa a 25 °C en oscuridad por 30 días.
- 9- Con alcohol 70 % y utilizando algodón estéril, limpiar la superficie foliar del material a ser inoculado, con el fin de desinfectar el área de inoculación.
- 10- Mediante un aspersor, aplicar la suspensión de esporas sobre las hojas (ambas caras), a fin de inducir la ocurrencia de síntomas sobre las hojas inoculadas.
- 11- Cubrir la planta con una bolsa plástica, a fin de mantener la humedad, y mantener el ambiente con una temperatura aproximada a los 25 °C.
- 12- A partir de los 3 días, luego de la inoculación, revisar las plantas diariamente hasta visualizar síntomas; una vez que se observen manchas cloróticas, cuantificar la severidad en la hoja inoculada, teniendo en cuenta la escala diagramática desarrollada con este fin (Figura 5). Considerando: material con aparente resistencia, aquel que presenta hojas con un promedio de severidad inferior al 5 %; material con susceptibilidad media aquel que presenta hojas con un promedio de severidad entre 5 y 50 %; y material muy susceptible aquel que presenta hojas con un promedio de severidad mayor a 50 %.
- 13- Una vez culminada la evaluación, incinerar todo material vegetal inoculado, para evitar la diseminación del patógeno.

Mecanismo de penetración de T. pseudoeucalypti

El análisis del mecanismo de penetración, en hojas con infecciones recientes, permitió visualizar el tubo germinativo del conidio penetrando a través del estoma, no visualizándose infecciones directamente a través de la cutícula (Figura 8).



Figura 8. Penetración del tubo germinativo de *T. pseudoeucalypti* a través de un estoma (marcado con el círculo) en hoja de *E. camaldulensis*.

DISCUSIÓN

Este estudio permitió comparar la resistencia genética de distintas especies de *Eucalyptus* de interés industrial frente a *T. pseudoeucalypti*, patógeno que posee una gran capacidad de daño y que fue recientemente detectado en América (De Souza et al., 2014; Ramos y Pérez, 2014; Soria et al., 2014; Arbuét, Codina y García, 2016). Los resultados aquí obtenidos confirman diferencias significativas en la resistencia de distintas especies de *Eucalyptus* frente a la mancha amarilla, así como también variabilidad entre genotipos de una misma especie.

Esta información es un insumo fundamental para los programas de mejoramiento genético por resistencia. A su vez, la presencia de variabilidad en la resistencia entre genotipos de una misma especie permite cuantificar el efecto del manejo de esta enfermedad mediante resistencia genética. Estos resultados indican que es posible seleccionar genotipos resistentes que minimicen el impacto de la enfermedad. Este estudio representa el primer trabajo en cuantificar el nivel de daño foliar de *T. pseudoeucalypti* para seis especies de

importancia forestal. En este sentido, *E. camaldulensis* y *E. tereticornis* fueron las especies en las que se observaron los niveles de daño más altos, seguido de *E. globulus*, mientras que *E. maidenii* y *E. dunnii*, si bien presentaron síntomas, mostraron un mejor comportamiento. Por su parte *E. grandis* presentó un comportamiento intermedio y con variabilidad entre materiales evaluados.

El hecho de que el índice de daño de copa ocasionado por *T. pseudoeucaalypti*, presente un rango entre árboles de 0 a 71 % para *E. camaldulensis*, de 0 a 60 % para *E. tereticornis* y de 0 a 81 % para *E. globulus*, indica una elevada variabilidad entre y dentro de los germoplasmas de las especies más susceptibles. Esto confirma lo concluido por Balmelli et al. (2014b), quienes observaron diferencias en susceptibilidad entre *E. camaldulensis* y *E. tereticornis* frente a la mancha amarilla del eucalipto, como también variabilidad dentro de *E. tereticornis* e híbridos de *E. tereticornis* x *E. camaldulensis*.

El comportamiento observado de *E. globulus* coincide con lo observado por De Souza et al. (2014) en Brasil, quienes describieron severas infecciones en plantaciones *E. globulus*, *E. urophylla* x *E. globulus* y *E. nitens* x *E. globulus*, considerando al *E. globulus* como la especie más susceptible. Los resultados aquí obtenidos indican que *E. globulus* presentó un importante IDC, individuos con mayor nivel de daño que *E. camaldulensis* y *E. tereticornis*, y con altos niveles de infección. Esto confirma la amenaza que representa esta nueva introducción a la región, teniendo en cuenta el amplio rango de hospederos.

Por otro lado, estos resultados, indican la posibilidad de realizar selección de germoplasma por resistencia a la enfermedad. Según Balmelli et al. (2014a), la limitada variabilidad en el comportamiento sanitario de *E. globulus* frente a *T. nubilosa*, ha sido una de las principales limitantes en los programas de mejoramiento genético por resistencia a esta enfermedad. Afortunadamente, los resultados aquí obtenidos indican que para la mancha amarilla esta situación es distinta ya que existen diferencias significativas entre la susceptibilidad de los distintos germoplasmas de *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* y *E. globulus* evaluados, permitiendo en este caso explotar la herramienta de mejoramiento genético por resistencia.

Las manchas foliares que ocasionan reiterados eventos de defoliación en los individuos afectados, causan mayor daño que eventos de defoliación aislados (Pinkard et al., 2006). Es sabido que los eucaliptos presentan estrategias de respuesta frente al ataque de un patógeno

como el rejuvenecimiento de las hojas viejas no dañadas (Forrester, Collopy, Beadle, Warren y Baker 2012) o el retraso de la senescencia de éstas (Pinkard y Beadle 1998), entre otras. Considerando estos mecanismos de defensa, podría estimarse que *T. pseudoeucalypti* representa una mayor amenaza para la agroindustria forestal que *T. nubilosa*, por la capacidad la mancha amarilla de afectar la hoja juvenil y adulta (Andjic et al., 2010; Arbuet et al., 2016) en eventos sucesivos de defoliación que contrarrestan todas las posibilidades de recuperación del árbol. Adicionalmente, la amenaza provocada por este patógeno toma especial relevancia al considerar debido el amplio rango de hospederos afectado *E. botryoides*, *E. camaldulensis*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis*, *E. macarthurii*, *E. maidenii*, *E. tereticornis*, e híbridos de *E. tereticornis* x *E. camaldulensis*, *E. grandis* x *E. camaldulensis* y *E. grandis* x *E. globulus* (Simeto, Balmelli y Torres, 2013). Los países con plantaciones de las especies aquí caracterizadas como altamente susceptibles deberían redoblar el esfuerzo por evitar la llegada de este patógeno. Por ejemplo, *E. camaldulensis* es plantado en Italia, Israel, Turquía, Portugal (Ugalde y Pérez, 2001), India, Nepal, Pakistán y China (Zacharin, 1978). *E. tereticornis* es plantado en India, Nepal, Pakistán, China y Hong Kong (Zacharin, 1978), mientras que *E. globulus* es plantado en Argentina, Brasil meridional, Chile, Ecuador, Colombia, Bolivia, Perú, España, Portugal, India, Grecia, Italia, Rhodesia, Congo, Kenia, Etiopía y Marruecos (Orme, 1983).

La presencia de la enfermedad en las tres localidades evaluadas (Florida, Paysandú y Tacuarembó) era esperable confirmando lo descrito por (Arbuet et al., 2016). quienes observaron que la enfermedad estaba presente en todo el país. A su vez, los distintos niveles de enfermedad observados en las tres localidades, podrían estar explicados por dos factores: i) la diferente presión de inóculo generado por los niveles de severidad de la enfermedad mencionados por Arbuet et al. (2016), y donde de acuerdo al mapa nacional mencionado en dicho trabajo, la severidad de mancha amarilla en las plantaciones de eucalipto colorado son mayores en las proximidades del experimento de Tacuarembó, seguido de Paysandú y finalmente Florida, y ii) la existencia de distintas condiciones ambientales que favorecen la diseminación e infección del patógeno, como por ejemplo el régimen hídrico. De acuerdo a los registros climáticos, las precipitaciones en Tacuarembó fueron mayores que en el resto de las localidades. Este efecto sitio, favorecido por el factor clima entre otros, también fue observado para *T. nubilosa* en plantaciones de *E. globulus*, donde observó que el régimen de

precipitación genera un ambiente predisponente para la infección del patógeno (Alonso, Soria, Lupo, Bettucci y Pérez, 2013).

Los niveles de enfermedad observados concuerdan con Andjic et al. (2010), quienes observaron que el patógeno se distribuye dentro de un límite de clima subtropical a tropical, y cuando la presión de inóculo fue alta, la mayoría de las especies de *Eucalyptus* y sus híbridos, fueron severamente afectados.

El desarrollo de un protocolo de inoculación que logra reproducir la enfermedad en condiciones controladas representa un gran insumo para los programas de mejoramiento genético por resistencia. Este tipo de herramienta resulta de gran ayuda a la hora de caracterizar el comportamiento sanitario de germoplasma (Simeto, Balmelli, Altier, Dini y Bennadji, 2007). La metodología de inoculación artificial permite asegurar el encuentro del patógeno con el hospedero en un ambiente predisponente para la enfermedad, acelerando la obtención de resultados: susceptibilidad / resistencia. Si bien se logró producir enfermedad en condiciones controladas, este trabajo deja expuesto la dificultad en producir volumen y concentración que sea reproducible para apoyar programas de mejoramiento genético de gran escala.

A nivel mundial, existe una tendencia al incremento de la superficie bajo forestación con *Eucalyptus*, así como también una dependencia al uso de determinadas especies forestales debido a sus propiedades industriales y al buen desempeño en los ambientes de interés. Los resultados obtenidos en este trabajo dejan de manifiesto que la mancha amarilla del eucalipto representa una seria amenaza para todos esos países que utilizan las especies de *Eucalyptus* susceptibles a *T. pseudoecalypti*.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de la República (UdelaR), a la Agencia de Investigación e Innovación (ANII), al Instituto de Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y a Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI) de la Universidad de Pretoria; como también a todos los investigadores que aportaron sus conocimientos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfenas, A.C. y Gonçalves, R.** (2007). *Métodos em Fitopatologia*. Viçosa, Brasil: UFV.
- Alonso, R., Soria, S., Lupo, S., Bettucci, L. y Pérez, C.** (2013). Alternativas de manejo de enfermedades foliares en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus*. *Serie Técnica INIA*, 209, 39-44.
- Andjic, V., Pegg, G.S., Carnegie, A.J., Callister, A., StJ Hardya, G.E. y Burgess, T.I.** (2010). *Teratosphaeria pseudoeucalypti*, new cryptic species responsible for leaf blight of *Eucalyptus* in subtropical and tropical Australia. *Plant Pathology*, 59, 900-912.
- Arbuet, E., Codina, M. y García, R.** (2016). *Prospección de la mancha amarilla del eucalipto (causada por Teratosphaeria pseudoeucalypti) en plantaciones de eucalipto colorado*. (Tesis de grado inédita). Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.
- Balmelli, G. y Resquin, F.** (2006). Eucaliptos colorados: una alternativa para la diversificación colectiva. *Serie Técnica INIA*, 159, 8-91.
- Balmelli, G.** (2009). *Impacto de Mycosphaerella en Uruguay y variabilidad genética para resistencia a la enfermedad en Eucalyptus globulus y Eucalyptus maidenii*. (Tesis de doctorado inédita). Universidad de Valladolid, España.
- Balmelli, G., Resquín, F., Simeto, S., Torres-Dini, D., Núñez, P., Rodríguez, F. y González, G.** (2014b). Variabilidad genética en susceptibilidad a *Teratosphaeria pseudoeucalypti* en eucaliptos colorados. *Serie Técnica INIA*, 213, 8-91.
- Balmelli, G., Simeto, S., Torres-Dini, D., Castillo, A., Altier, N., Núñez, P., ... y Diez, J.J.** (2014a). Efecto de *Teratosphaeria nubilosa* sobre el crecimiento *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus maidenii* al año de iniciada de infección. *Serie Técnica INIA*, 213, 73-84.
- Bush, D.** (2011). *Eucalypts for Planting: Trends in Testing and Utilization*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-ac459e.pdf>.
- Cooke, M.C.** (1891). Australian fungi. *Grevillea*, 19, 60 – 2.
- De Souza, T., Costa, A., Da Silva, L., Maciel, H., Borges, N. y Couto, A.** (2014). *Teratosphaeria pseudoeucalypti* on eucalyptus in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 39 (5), 407-412.

- DIEA (Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias).** (2015). *Anuario estadístico agropecuario 2015*. Recuperado de <http://www2.mgap.gub.uy/DieaAnterior/Anuario2015/DIEA-Anuario2015-01web.pdf>
- DIEA (Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias).** (2016). *Anuario estadístico agropecuario 2016*. Recuperado de <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016>
- Forrester, D.I., Collopy, J.J., Beadle, C.L., Warren, C.R. y Baker, T.G.** (2012). Effect of thinning, pruning and nitrogen fertiliser application on transpiration, photosynthesis and water-use efficiency in a young *Eucalyptus nitens* plantation. *Forest Ecology and Management*, 266, 286-300.
- Hunter, G.C., Crous, P.W., Carnegie, A.J., Burgess, T.I. y Wingfield, M.J.** (2011). Mycosphaerella and Teratosphaeria diseases of *Eucalyptus*; easily confused and with serious consequences. *Fungal Diversity*, 50, 145–166.
- Lamari, L.** (2008). Image Analysis Software for Plant Disease Quantification. ASSESS 2.0. Minnesota: *The American Phytopathological Society*. 125p.
- Lundquist, J.E. y Purnell, R.C.** (1987). Effects of Mycosphaerella leaf spot on growth of *Eucalyptus nitens*. *Plant Disease*, 71: 1025–1029.
- Mantero, C.** (1995). *Actitud de uso de la Madera de los Eucaliptos colorados para carpintería de Obras*. Recuperado de <http://www.fagro.edu.uy/~forestal/cursos/tecmadera/COLORADO.doc>
- Mohammed, C., Wardlaw, T., Smith, A., Pinkard, E., Battaglia, M., Glen, M., ... y Vaillancourt, R.** (2003). Mycosphaerella leaf diseases of temperate eucalypts around the southern pacific rim. *Forestry Science*, 33, 362–372.
- Orme, R.K.** (1983). *Eucalyptus globulus provenances*. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/006/l1807e/L1807E04.htm>
- Pérez, G., Hunter, G.C., Slippers, B., Pérez, C.A., Wingfield, B.D. y Wingfield, M.J.** (2009). Teratosphaeria (Mycosphaerella) nubilosa, the causal agent of Mycosphaerella leaf disease (MLD), recently introduced into Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, 125, 109–118.

- Philibert, A., Desprez-Loustau, M., Fabre, B., Frey, P., Halkett, F., Husson, C., ... y Makowski, D.** (2011). Predicting invasion success of forest pathogenic fungi from species traits. *Journal of Applied Ecology*, 48, 1381-1390.
- Pinkard, E.A. y Beadle, C.L.** (1998). Aboveground biomass partitioning and crown architecture of *Eucalyptus nitens* following green pruning. *Canadian Journal of Forest Research*, 28, 1419-1428.
- Pinkard, E.A., Baillie, C.C., Patel, V., Paterson, S., Battaglia, M., Smethurst, P.J., ... y Stone, C.** (2006). Growth responses of *Eucalyptus globulus* Labill. to nitrogen application and severity, pattern and frequency of artificial defoliation. *Forest Ecology and Management*, 229, 378-387.
- Ramos, S.O. y Pérez, C.A.** (2014). First report of *Teratosphaeria pseudoecalypti* on *Eucalyptus* Hybrids in Argentina. Recuperado de <http://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-10-14-1087-PDN>.
- Simeto, S., Balmelli, G., Altier, N., Dini, B. y Bennadji, Z.** (2007). Desarrollo de protocolos de inoculación artificial para la caracterización sanitaria de *Eucalyptus globulus*. *Serie técnica*, 169, 1-31.
- Simeto, S., Balmelli, G. y Torres, D.** (2013). Mancha amarilla del eucalipto. Reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales. *Serie Técnica INIA*, 34, 1-2.
- Simeto, S., Balmelli, G., Pérez, C. y Torres-Dini, D.** (2014). Mancha amarilla del eucalipto. *Serie Técnica INIA*, 34,1-2.
- Soria, S., Alonso, R., Bettucci, L. y Lupo, S.** (2014). First report of *Teratosphaeria pseudoecalypti* in Uruguay. *Australasian Plant Disease*, 9, 146.
- Soust, P.** (2012). A 25 años de la aprobación de la ley 15.939 (Ley Forestal). Recuperado de <http://www.mgap.gub.uy/opypublicaciones/ANUARIOS/Anuario2012/material/pdf/14.pdf>
- Stone, C., Matsuki, M. y Carnegie, A.** (2003). *Pest and disease assessment in young eucalypt plantations: field manual for using the Crown Damage Index*. (Eds.). Parsons, M, National Forest Inventory, Bureau of Rural Sciences, Canberra.
- Ugalde, L. y Pérez, O.** (2001). Mean annual volume increment of selected industrial forest plantation species. *Forest Plantations Thematic Papers*, 27p.

Wingfield, M.J., Brockerhoff, E.G., Wingfield, B.D. y Slippers, B. (2015). Planted forest health: The need for a global strategy. *Forest Health*, 349, 832-836.

Zacharin, R.F. (1978). *Emigrant Eucalypts: Gum Trees as Exotics*. Melbourne: Melbourne University Press.

4. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos aquí, en una primera instancia permiten conocer la estructura de genética de *T. pseudoeucaalypti* en Uruguay, información de gran aporte global debido a su recientemente reporte en América del Sur, y a que su detección en esta región representa su primera detección fuera de Australia.

La estructura genética homogénea, representada por un único haplotipo, coincide con un probable único evento de introducción o un efecto fundador, que representa una enorme ventaja desde el punto de vista del manejo por resistencia genética.

Los resultados obtenidos sobre el tipo de apareamiento de la especie, y la presencia de sólo el MAT1-1 en Uruguay, permiten visualizar una población homogénea, con reproducción asexual, y con baja probabilidad de generación de variantes que pudieran otorgar cambios en la agresividad del patógeno. Esto remarca la necesidad de redoblar esfuerzos para evitar la ocurrencia de nuevas introducciones que pudieran aportar variabilidad a la población de este patógeno.

La resistencia genética es una alternativa de gran potencial para el manejo de esta enfermedad, de acuerdo a los resultados obtenidos en ensayos de campo, existiendo gran diferencia entre especies, pero también una gran variabilidad entre genotipos de una misma especie. Estos resultados son de gran aporte a nivel nacional para poder promover el uso de genotipos de buen comportamiento aún con especies, que como tal, presentan alta susceptibilidad (i.e. *E. camaldulensis* y *E. tereticornis*).

Por último, se ajustó un protocolo de inoculación artificial que podrá asistir a los programas de mejoramiento por resistencia, otorgando la ventaja de asegurar la ocurrencia de condiciones ambientales favorables para la infección, y poder caracterizar a los materiales con un uso eficiente del tiempo y del espacio.

5. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Andjic, V., Pegg, G.S., Carnegie, A.J., Callister, A., StJ Hardy, G.E. y Burgess, T.I.** (2010). *Teratosphaeria pseudoecalypti*, new cryptic species responsible for leaf blight of *Eucalyptus* in subtropical and tropical Australia. *Plant Pathology*, 59, 900-912.
- Arbuet, E., Codina, M. y García, R.** (2016). *Prospección de la mancha amarilla del eucalipto (causada por Teratosphaeria pseudoecalypti) en plantaciones de eucalipto colorado*. (Tesis de grado inédita). Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.
- Balmelli, G., Resquín, F., Simeto, S., Torres-Dini, D., Núñez, P., Rodríguez, F. y González, G.** (2014). Variabilidad genética en susceptibilidad a *Teratosphaeria pseudoecalypti* en eucaliptos colorados. *Serie Técnica INIA*, 213, 8-91.
- Brown, J. y Hovmoller, M.** (2002). Aerial Dispersal of Pathogens on the Global and Continental Scales and Its Impact on Plant Disease. *Science*, 297, 537-541.
- Bush, D.** (2011). *Eucalypts for Planting: Trends in Testing and Utilization*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-ac459e.pdf>.
- Castaño, J., Giménez, A., Ceroni, M., Furest, J. y Aunchayna, R.** (2011). Caracterización agroclimática de Uruguay 1980-2009. *Serie Técnica INIA*, 193, 1-34.
- Cooke, M.C.** (1891). Australian fungi. *Grevillea*, 19, 60 – 2.
- Crous, P.W., Braun, U. y Groenewald, J.Z.** (2007). Mycosphaerella is polyphyletic. *Studies in Mycology*, 58, 1-32.
- De Souza, T., Costa, A., Da Silva, L., Maciel, H., Borges, N. y Couto, A.** (2014). *Teratosphaeria pseudoecalypti* on eucalyptus in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 39 (5), 407-412.
- DIEA (Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias).** (2015). *Anuario estadístico agropecuario 2015*. Recuperado de

<http://www2.mgap.gub.uy/DieaAnterior/Anuario2015/DIEA-Anuario2015-01web.pdf>

- DIEA (Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias).** (2016). *Anuario estadístico agropecuario 2016*. Recuperado de <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación).** (2001). *Global forest resources assessment 2000*. Main report. FAO, Rome: FAO.
- Ficetola, G., Bonin, A. y Miaud, C.** (2008). Population genetics reveals origin and number of founders in a biological invasion. *Molecular Ecology*, 17, 773- 782.
- Hunter, G.C., Roux, J., Wingfield, B.D., Crous, P.W. y Wingfield, M.J.** (2004). *Mycosphaerella* species causing leaf disease in South African Eucalyptus plantations. *Mycological Research*, 108 (6), 672-681.
- Hunter, G.C., Van der Merwe, N.A., Bruggess, T.I., Carnegie, A.J., Wingfield, B.D., Crous, P.W. y Wingfield, M.J.** (2008). Global movement and population biology of *Mycosphaerella nubilosa* infecting leaves of cold-tolerant *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. *Plant Pathology*, 57, 235–242.
- Lockwood, J.L., Cassey, P. y Blackburn, T.** (2005). The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Ecology and Evolution*, 20 (5), 223-228.
- Pérez, G., Slippers, B., Wingfield, B., Hunter, G. y Wingfield, M.** (2010). Micro- and macroscale analyses illustrates mixed mating strategies and extensive gene flow in populations of an invasive haploid pathogen. *Molecular Ecology*, 19, 1801- 1813.
- Philibert, A., Desprez-Loustau, M., Fabre, B., Frey, P., Halkett, F., Husson, C., ... y Makowski, D.** (2011). Predicting invasion success of forest pathogenic fungi from species traits. *Journal of Applied Ecology*, 48, 1381-1390.

- Ramos, S.O. y Pérez, C.A.** (2014). *First report of Teratosphaeria pseudoecalypti on Eucalyptus Hybrids in Argentina*. Recuperado de <http://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-10-14-1087-PDN>.
- Simeto, S., Balmelli, G. y Torres, D.** (2013). Mancha amarilla del eucalipto. Reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales. *Serie Técnica INIA*, 34, 1-2.
- Soria, S., Alonso, R., Bettucci, L. y Lupo, S.** (2014). First report of *Teratosphaeria pseudoecalypti* in Uruguay. *Australasian Plant Disease*, 9, 146.
- Soust, P.** (2012). A 25 años de la aprobación de la ley 15.939 (Ley Forestal). Recuperado de <http://www.mgap.gub.uy/opypapublicaciones/ANUARIOS/Anuario2012/material/pdf/14.pdf>
- Suárez, A. y Tsutsui, N.** (2008). The evolutionary consequences of biological invasions. *Molecular Ecology*, 17, 351-360.
- Wingfield, M.J., Slippers, B., Hurley, B.P., Coutinho, T.A., Wingfield, D.B. y Roux, J.** (2008). Eucalypt pests and diseases: growing threats to plantation productivity. *Southern Forests*, 70, 139-144.
- Wingfield, M.J., Roux, J., Slippers, B., Hurley, B.P., Garnas, J., Myburg, A. y Wingfield, D.B.** (2013). Established and new technologies reduce increasing pest and pathogen threats to Eucalypt plantations. *Forest Ecology and Management*, 301, 35-42.
- Wingfield, M.J., Brockerhoff, E.G., Wingfield, B.D. y Slippers, B.** (2015). Planted forest health: The need for a global strategy. *Forest Health*, 349, 832-836.
- Zhou, X., Burgess, T., De Beer, Z., Lieutier, F., Yart, A., Kier, K., ... y Wingfield, M.** (2007). Blackwell Publishing Ltd High intercontinental migration rates and population admixture in the sapstain fungus *Ophiostoma ips*. *Molecular Ecology*, 16, 89-99.