

**Variabilidad genética de *Puccinia psidii* en mirtáceas nativas e
introducidas en Uruguay**

Lic. Sofía Simeto Ferrari

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Opción Botánica

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Universidad de la República

Orientadora: Dra. Lina Bettucci

Coorientadora: Dra. Nora Altier

Uruguay 2015

Agradecimientos

Quiero agradecer al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria por la financiación del presente trabajo, enmarcado en el proyecto de investigación FO11 del Programa Nacional de Investigación en Producción Forestal, así como a las empresas UPM - Forestal Oriental, Weyerhaeuser, Forestal Atlántico Sur y Sierras Calmas por su apoyo logístico.

A mi tutora Lina Bettucci por sus revisiones, sugerencias y aportes pero sobre todo por su paciencia y cariño al momento de guiarme y acompañarme en este proceso. A Diego Torres y Natalia Nikichuk de quienes aprendí muchísimo y con quienes compartimos frustraciones y éxitos en el “universo de las técnicas moleculares”. A Carlos Pérez por su gran apoyo, sus consejos y sugerencias. A Nora Altier por su confianza, por el consejo certero y el aliento constante.

A mis compañeros del equipo de Protección Forestal: Gustavo Balmelli, Demian Gómez y Gonzalo Martínez por la revisión del manuscrito, por sus excelentes aportes y el buen ambiente de trabajo. A Paula González, Wilfredo González, Pablo Núñez y Federico Rodríguez por el constante y valiosísimo apoyo “tras bambalinas”. A Andrés Berrutti por su buen humor y su gran conocimiento de la flora autóctona de nuestro país, indispensable para las salidas de campo en monte nativo.

Agradezco también a todos aquellos que de una u otra forma me alentaron a terminar esta tesis y me ofrecieron su apoyo. Muchas gracias Roberto Scoz, Guillermo Pérez, Raquel Alonso, Sandra Lupo, Cintia Palladino, Gustavo Ferreira, Lorena Clara y Gustavo Brito.

A mis padres, por su aliento y apoyo, por ser ejemplos de superación y por haberme dado las herramientas y oportunidades que hacen que hoy pueda estar finalizando una tesis de Maestría en Biología.

Finalmente quiero agradecer muy especialmente a Ignacio Andreatta, mi gran compañero, por su paciencia infinita, por ser un gran padre y por alentarme siempre a “apuntar alto”. A Santiago y Federico, mis pequeños, por ser una fuente inagotable de felicidad.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Forestación en Uruguay y sanidad forestal	3
<i>Puccinia psidii</i>	4
Características generales.....	4
Infección y sintomatología.....	6
Impacto.....	9
Manejo de la enfermedad.....	9
Razas fisiológicas.....	10
Variabilidad genética.....	11
OBJETIVO GENERAL	14
Objetivo específico.....	14
Hipótesis	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Colecta y procesamiento de especímenes	15
Extracción de ADN	16
Análisis de diferentes regiones del ADN ribosómico.....	16
Análisis de la región ITS.....	17
Análisis de la región IGS1	21
Análisis de SSRs (Simple Sequence Repeats, microsatélites)	22
RESULTADOS.....	24
Colecta y procesamiento de especímenes	24
Análisis de diferentes regiones del ADN ribosómico.....	29
Análisis de la región ITS.....	30
Análisis de la región IGS1	35
Análisis de SSRs (Simple Sequence Repeats, microsatélites).....	40
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXO 1	54
ANEXO 2	55
ANEXO 3	56
ANEXO 4	57

RESUMEN

El sector forestal uruguayo ha tenido en los últimos 25 años un crecimiento muy importante a partir de políticas de incentivo en la década del 80, pasando de aproximadamente 100000 hectáreas a casi 990000 hectáreas plantadas. Hoy en día constituye uno de los tres rubros agroexportadores más importantes habiendo alcanzado hacia fines del 2015, aproximadamente 1230 millones de dólares en exportación de productos forestales. La instalación de especies forestales fuera de sus áreas de origen resulta normalmente en una separación de sus enemigos naturales, hecho que ha permitido el buen desarrollo de especies como *Pinus* y *Eucalyptus* en regiones en las que no son originarias. Sin embargo es esperable que esta separación no sea duradera y que con el transcurso del tiempo ocurra el ingreso accidental de plagas y enfermedades desde las áreas donde los árboles son nativos hacia los nuevos ambientes. En los últimos años se ha observado un aumento en la incidencia y severidad de los problemas sanitarios ya existentes, lo que representa una grave amenaza para el sector forestal debido a las pérdidas productivas que éstos provocan, tanto en volumen como en calidad de la madera. *Puccinia psidii*, el agente causal de la enfermedad conocida como “roya del eucalipto” es considerado originario de América del Sur y América Central y en la actualidad también se encuentra presente en países de América del Norte, Asia, Oceanía y África. Debido a su amplio rango de hospederos dentro de la familia de las mirtáceas y a su gran capacidad de dispersión, es considerada en varios países como una amenaza para las poblaciones de mirtáceas nativas e introducidas. Este patógeno infecta tejidos jóvenes y causa deformaciones, hipertrofia y necrosis de las porciones afectadas, pudiendo matar los ápices en caso de ataques severos. En *Eucalyptus* spp., esto conlleva la pérdida de dominancia apical y al desarrollo de un hábito arbustivo. A fines de 2009 y principios de 2010, el ataque de *P. psidii* sobre clones de *E. grandis* en la zona centro del país llevó a un importante retraso en el crecimiento en plantas de un año. Hoy en día, la susceptibilidad a la roya es motivo de descarte de clones para algunas empresas.

Existe una amplia variabilidad genética inter e intra específica en cuanto a la resistencia a la roya dentro del género *Eucalyptus*, la cual permite el control de la enfermedad a través de la plantación de especies, progenies o clones resistentes. Si bien hay evidencias de la existencia de razas fisiológicas y de variabilidad genética de *P. psidii* a nivel mundial, en Uruguay la población de *P. psidii* presente en mirtáceas nativas e introducidas no ha sido caracterizada en profundidad. La correcta caracterización de la población de *P. psidii* en nuestro país resulta imprescindible para el manejo de la enfermedad a través de la identificación y uso de genotipos de *Eucalyptus* resistentes a la misma. La presente tesis de maestría tiene por objetivo el análisis de la variabilidad de *P. psidii* en mirtáceas nativas e introducidas en Uruguay. Entre los años 2008 y 2013 se realizaron colectas de hojas infectadas por *P. psidii* en plantaciones jóvenes de eucaliptos y a partir de especímenes de

mirtáceas nativas e introducidas ubicadas en diferentes puntos del país. A partir de ADN extraído de pústulas individuales se analizó la variabilidad genética intraespecífica en base a dos regiones del gen que codifica para el ARN ribosómico (la región ITS y la región IGS1) y al análisis de microsatélites identificados para esta especie. Mediante el análisis de la región ITS se confirmó la identificación de la especie como *P. psidii*. Las secuencias de la región IGS1 generadas en este trabajo son las primeras reportadas para esta especie. Los resultados de los análisis de la región IGS1 y de los microsatélites muestran la existencia de variabilidad genética entre la población de *P. psidii* presente en *Eucalyptus* spp. y en otras mirtáceas nativas e introducidas. Esto podría evidenciar una asociación entre genotipos de *P. psidii* y las especies de hospederos. Por otra parte, los rangos alélicos obtenidos mediante el análisis de microsatélites difirieron de los reportados para cepas de *P. psidii* de Hawaii, Brasil y EEUU, por lo que se podría suponer que se trata de poblaciones genéticamente diferentes. A su vez, la población de *P. psidii* presente en *Eucalyptus* mostró bajos niveles de variabilidad genética, característica reportada también en otros estudios. Los resultados aquí obtenidos confirman la existencia de variabilidad genética en la población de *P. psidii* presente en diferentes hospederos en Uruguay.

INTRODUCCIÓN

Forestación en Uruguay y sanidad forestal

El sector forestal uruguayo ha tenido en los últimos 25 años un crecimiento muy importante a partir de políticas de incentivo en la década del 80, pasando de aproximadamente 100000 hectáreas a casi 990000 hectáreas plantadas bajo proyecto (DIEA, 2015). Principalmente orientada a la producción de pulpa de celulosa y madera aserrada, la industria forestal uruguaya constituye hoy en día uno de los tres rubros agroexportadores más importantes habiendo alcanzado en octubre de 2015 aproximadamente 1230 millones de dólares en exportación de productos forestales (Uruguay XXI, 2015). De la superficie forestada, el género *Eucalyptus* L'Hér. representa un 70% de la misma, siendo las especies más plantadas *Eucalyptus globulus* Labill., *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden y *Eucalyptus dunnii* Maiden (DIEA, 2015).

La instalación de especies forestales fuera de sus áreas de origen resulta en una separación de sus enemigos naturales (Keane *et al.*, 2000; Mitchell y Power, 2003; Jeffries y Lawton, 1984), hecho que ha permitido el buen desarrollo de especies como *Pinus* y *Eucalyptus* en regiones en las que no son originarias (Wingfield *et al.*, 2008). Sin embargo, es esperable que esta separación no sea duradera y que con el transcurso del tiempo ocurra el ingreso accidental de plagas y enfermedades desde las áreas donde los árboles son nativos hacia los nuevos ambientes. De esta manera, el incremento del área forestada en las últimas décadas ha propiciado la aparición de nuevos patógenos y plagas, de acuerdo a la tendencia observada también a nivel mundial en países con plantaciones comerciales de especies exóticas como *Eucalyptus* y *Pinus* L., donde el ingreso de nuevas plagas y enfermedades constituye una amenaza importante y creciente para el sector (Wingfield *et al.*, 2008).

A nivel nacional no solo se ha registrado la aparición de nuevas enfermedades sino también un aumento en la incidencia y severidad de las ya existentes, lo cual representa una grave amenaza para el sector forestal debido a las pérdidas productivas en cantidad y calidad de la madera (Alonso y Bettucci, 2009; Barnes *et al.*, 2003; Coutinho *et al.*, 2011; Lupo *et al.*, 2009; Martínez, 2006; Pérez, 2008; Pérez *et al.*, 2009a; Pérez *et al.*, 2009b; Telechea *et al.*, 2003). Los patógenos presentes en especies forestales exóticas han sido presumiblemente introducidos de forma accidental debido al movimiento de germoplasma (Old *et al.*, 2003; Wingfield *et al.*, 2008; Burgess y Wingfield, 2002). Sin embargo, las especies forestales introducidas se encuentran muchas veces instaladas en estrecha asociación con especies nativas y la uniformidad genética de las plantaciones puede propiciar el salto de patógenos nativos hacia los hospederos exóticos (Burgess *et al.*, 2007). En los últimos años se ha reportado un creciente número de casos de patógenos que han experimentado

un salto desde hospederos nativos a especies forestales introducidas (Coutinho *et al.*, 1998, 2011; Hodges y Ferreira, 1986; Pérez, 2006; Slippers *et al.*, 2005). En estos casos, las especies introducidas no han coevolucionado con los patógenos nativos, por lo que los mecanismos de defensa o reconocimiento de estos hospederos no son efectivos (Slippers *et al.*, 2005).

Puccinia psidii

Características generales

Puccinia psidii Winter, el agente causal de la enfermedad conocida como “roya del eucalipto”, es un Basidiomycete perteneciente al orden Pucciniales (= Uredinales). Este grupo de hongos cuenta con 8000 especies aproximadamente, entre las que se encuentran algunos de los patógenos causantes de las enfermedades más devastadoras en una amplia variedad de cultivos (Kirk *et al.*, 2001). Al igual que todas las royas, *P. psidii* es un biótrofo, un parásito obligado, es decir que se nutre a partir de un huésped vivo y sólo se desarrolla y reproduce en asociación con el mismo. Fue originalmente descrita por Winter (1884) en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.) en Brasil, donde también fue encontrada por primera vez sobre *Eucalyptus* en 1944 (Joffily, 1944). Se la considera originaria de América del Sur y América Central y en la actualidad se encuentra presente en las Américas (Brasil, Argentina, Colombia, Paraguay, Uruguay, Venezuela, Costa Rica, Panamá, Cuba, Dominica, República Dominicana, El Salvador, Guatemala, Jamaica, Puerto Rico, Trinidad y Tobago, México, Estados Unidos [Florida, California y Hawaii], en Asia (Japón y China), en Oceanía (Australia [reportada originalmente como *Uredo rangeli*], Indonesia y Nueva Caledonia) y en África (Sudáfrica) (Carnegie *et al.*, 2010; Coutinho *et al.*, 1998; Kawanishi *et al.*, 2009; Killgore *et al.*, 2005; McTaggart *et al.*, 2015; Perdomo-Sánchez, 2008; Roux *et al.*, 2013; Simpson *et al.*, 2006; Uchida *et al.*, 2006; Zhuang *et al.*, 2013). En Uruguay, fue encontrado por primera vez sobre *Psidium guajava* L. en 1955 (Koch de Brots y Boasso *et al.*, 1955). En 2003 fue reportada causando daños severos en una plantación de un año de *E. globulus* (Telechea *et al.*, 2003) y desde entonces ha sido observada a campo en diferentes ocasiones, sobre diferentes huéspedes y con diversos grados de incidencia y severidad (Balmelli *et al.*, 2004, 2009; Pérez, 2008).

Este patógeno es capaz de infectar un amplio rango de hospederos dentro de la familia Myrtaceae, abarcando un total de 56 géneros y 244 especies (Machado *et al.*, 2015a). En general no es común que una roya tenga un rango tan amplio de hospederos, si bien éstos se encuentran todos dentro de una misma familia. Las mirtáceas neotropicales que incluyen una o más especies susceptibles a *P. psidii* incluyen especies de los géneros *Acca* O. Berg., *Campomanesia* Ruiz & Pav., *Eugenia* L.,

Marlierea Cambess., *Myrcia* DC ex Guill., *Myrcianthes* O. Berg., *Myrciaria* O. Berg., *Pimenta* Lindl., *Myrrhinium* Shott y *Psidium* L. (Simpson *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2011). Los géneros no neotropicales para los que también se han reportado infecciones de *P. psidii* son: *Angophora* Cav., *Callistemon* R. Br., *Corymbia* Hill & Johnson, *Eucalyptus* L. Her, *Eugenia* L., *Heteropyxis* Harvey, *Kunzea* Rchb., *Melaleuca* L., *Metrosideros* Banks ex Gaertn., *Myrtus* L., *Syncarpia* Tenore, and *Syzygium* Br. ex Gaertn. (Simpson *et al.*, 2006). En general se ha observado que la susceptibilidad de las mirtáceas americanas, que han coexistido con *P. psidii* por largo tiempo, es generalmente baja; en cambio para las mirtáceas de Asia, Australia y el Pacífico la susceptibilidad es mucho mayor (Simpson *et al.*, 2006). Existen 24 especies dentro del género *Eucalyptus* reportadas como hospederos, todas ellas de importancia comercial para la forestación (Simpson *et al.*, 2006). Hasta hace poco, *P. psidii* era considerada la única roya capaz de infectar *Eucalyptus* (Coutinho *et al.*, 1998) pero recientemente Maier *et al.* (2015) reportaron una nueva especie de roya, *Phakospora myrtacearum* Maier, capaz de infectar eucaliptos en África. Esta nueva especie se distingue de *P. psidii* por su sintomatología, morfología de las uredosporas y por la distancia filogenética que las separa.

Las royas poseen un ciclo de vida complejo que puede abarcar hasta cinco estadios diferentes con distintos tipos de esporas (generalmente numerados del 0 al IV) y con diferente dotación cromosómica. En la naturaleza, no se han podido observar todos los estadios de *P. psidii* y existe cierto desacuerdo sobre la clasificación del ciclo. Dado que en el campo nunca se han observado ni espermogonios ni aecios, *P. psidii* es considerada por algunos autores como autoica y hemicíclica (Coutinho *et al.*, 1998; Glen *et al.*, 2007). Sin embargo, a partir de inoculaciones artificiales con basidiosporas se ha observado la presencia de aecios y aeciosporas en *Syzygium jambos* L. (Alston) (Figuereido *et al.*, 1984) y *Eucalyptus* (Ferreira, 1989), ambos indistinguibles morfológicamente del uredo y las uredosporas (Figuereido *et al.*, 1984). A su vez, la abundante producción de teliosporas y basidiosporas observada a campo (Ruiz *et al.*, 1989b; Pérez *et al.*, 2010) sugieren que *P. psidii* es una especie heteroica y macrocíclica con una fase aecídica en un huésped no determinado (Simpson *et al.*, 2006). Morin *et al.* (2014) intentaron esclarecer el ciclo de *P. psidii* basándose en inoculaciones de basidiosporas y examinando el desarrollo de la infección microscópicamente. Ante la ausencia de infección por parte de las basidiosporas, los autores concluyen que si bien cabe la posibilidad de que *P. psidii* sea heteroica con un huésped alternativo no conocido (en el que se desarrollaría el aecio), también es posible que las basidiosporas del hongo hayan perdido su habilidad para infectar. Para *P. psidii* a partir de la germinación de teliosporas se produce un basidio con 4 basidiosporas presumiblemente dicarióticas (Morin *et al.*, 2014).

Infección y sintomatología

Las condiciones ambientales favorables para la infección de *P. psidii* involucran factores tales como temperatura, humedad y fotoperíodo. Según Ruiz *et al.* (1989a) son necesarias un mínimo de 8 horas de oscuridad, temperatura entre 18°C y 25°C y una humedad relativa igual o superior al 90% (es imprescindible la presencia de agua libre sobre los tejidos). Estos factores también influyen en la incidencia y severidad de la infección (Tessman *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 1989a), así como sobre la producción de los diferentes tipos de esporas (Alfenas y Zauza, 2003; Ruiz *et al.*, 1989a; Ruiz *et al.*, 1989c). La dispersión de las esporas se da principalmente a través del viento, pero también a través de la lluvia e insectos. Las esporas son capaces de permanecer viables por mucho tiempo fuera de su hospedero y en el caso de la dispersión a grandes distancias éstas podrían viajar adheridas a semillas, material vegetal, embalaje e incluso ropa o equipaje (Grgurinovic *et al.*, 2006).

El proceso de infección comienza con la germinación de las uredosporas y la formación de un apresorio a partir del tubo germinativo. Posteriormente, una hifa de penetración atraviesa la epidermis y coloniza el mesófilo de la hoja. La entrada a través de estomas también ha sido observada pero en menor frecuencia (Glen *et al.*, 2007). Por último, se forma el haustorio, una estructura globosa en el interior de algunas células del hospedero y que tendrá funciones de nutrición, originada a partir de la célula madre del haustorio. La penetración se da tanto en hospederos susceptibles como resistentes pero en los genotipos resistentes la célula que aloja al haustorio y las células adyacentes experimentan una reacción de hipersensibilidad y colapsan (Glen *et al.*, 2007; Coutinho *et al.*, 1998). En el caso de *P. psidii* la infección a partir de basidiosporas rara vez ocurre en el campo (Ferreira, 1983).

En *Eucalyptus*, *P. psidii* infecta tejidos jóvenes afectando desde plantas de vivero hasta plantas de dos años en el campo, así como rebrotes de tocones. Las lesiones sobre los órganos afectados (hojas juveniles y pecíolos, brotes y yemas), comienzan como minúsculas puntuaciones, las cuales transcurridos un par de días se transforman en pústulas de uredosporas de color amarillo intenso. A partir de ese momento las pústulas aumentan de tamaño y se dan infecciones secundarias dentro de una misma planta, principalmente debido al rocío o a la lluvia. En material susceptible y bajo condiciones ambientales favorables para la enfermedad, los órganos tiernos de la planta son rápidamente colonizados por el hongo. En este estadio, la enfermedad presenta su síntoma más típico dado por la intensa esporulación amarilla en los órganos afectados (Figura 1). Según Ferreira (1989) la mayor esporulación se da en las hojas más jóvenes, ya que en hojas con aproximadamente un 50% de desarrollo se observa una menor intensidad de esporulación. La misma ocurre en ambas caras de la hoja aunque predominantemente en el envés, donde se produce

la unión de varias pústulas. En hojas con mayor desarrollo (50% - 80%) la incidencia de la enfermedad es aún menor. La convergencia de varias pústulas provoca deformaciones del limbo foliar, especialmente si se da cerca de la nervadura central. En materiales altamente susceptibles la enfermedad causa deformaciones, hipertrofia y necrosis de las porciones afectadas, pudiendo, en caso de ataques severos, matar los ápices con la consiguiente pérdida de dominancia apical y el desarrollo de un hábito arbustivo. Sobre hospederos resistentes, el patógeno induce una reacción de hipersensibilidad, expresada por pequeñas lesiones necróticas ("Hr") que generalmente no presentan esporulación (Junghans *et al.*, 2003).

En el campo, la esporulación amarilla comienza a desaparecer transcurridas unas dos semanas a partir de la manifestación de los síntomas, las pústulas se resecan y las porciones afectadas toman una textura rugosa y una coloración rojiza como reacción a la infección (Ferreira, 1989). Posteriormente, las plantas se recuperan produciendo una intensa brotación, aunque pueden ser atacadas nuevamente por la roya, dependiendo de las condiciones ambientales. Cuando éstas son favorables, la infección de los nuevos brotes se da rápidamente debido a la gran cantidad de inóculo existente en el campo, producto de infecciones anteriores. Tras varias reinfecciones las plantas presentan ápices resecos, zonas con hipertrofia (rugosas y rojizas), brotes deformados y una abundante brotación. Se ha observado que plantas jóvenes con 3 a 4 metros de altura no son infectadas por *P. psidii* (Zauza *et al.*, 2010). Este escape a la enfermedad podría deberse a cambios fisiológicos en la maduración de las plantas, al microclima en el que los nuevos brotes potencialmente susceptibles pueden desarrollarse o a una combinación de ambos factores. Zauza *et al.* (2010), luego de estudiar la incidencia de la enfermedad en un gradiente de altura, concluyen que dado que el progreso de la enfermedad es altamente dependiente de la humedad presente en la superficie foliar, las plantas por encima de los 3 metros tienden a escapar a la enfermedad debido a una menor concentración de uredosporas en el aire y a un menor número de horas con agua libre sobre la superficie foliar.



Figura 1. Infecciones de *Puccinia psidii* sobre (a) *Eucalyptus globulus*, (b y c) *E. grandis*; tallo de *E. grandis* afectado por *P. psidii* (d); follaje de *E. grandis* de 14 meses afectado por *P. psidii* (e); hábito arbustivo e impacto sobre el crecimiento (retraso) en árboles de *E. grandis* de 6 meses de edad, afectados por *P. psidii* (f y g).

Impacto

Desde el punto de vista productivo, la enfermedad puede tener efectos directos debidos a la reducción del crecimiento o a la muerte de la planta (en casos de mayor severidad) (Figura 1f y 1g) y efectos indirectos asociados al estrés provocado en la planta, lo cual la hace más susceptible a factores adversos abióticos y bióticos (Balmelli *et al.*, 2004). Debido a su gran capacidad de dispersión y a su amplio rango de hospedero, esta enfermedad es considerada de gran importancia ya que bajo condiciones favorables y sobre materiales susceptibles su severidad e incidencia pueden ser muy altas ocasionando importantes pérdidas económicas. También es causa de gran preocupación particularmente en Australia donde está afectando las poblaciones nativas de *Eucalyptus* (Pegg *et al.*, 2014).

En Brasil esta enfermedad constituye un problema serio, principalmente debido a la ocurrencia de condiciones favorables para la infección durante todo el año (Ferreira, 1989). A pesar de los avances en los estudios de la enfermedad en cuanto a etiología y epidemiología, control químico y resistencia genética, ésta continúa siendo una limitante para el cultivo de *Eucalyptus* en algunas regiones de Brasil. Takahashi (2002) estima que la pérdida de volumen de madera producida por *P. psidii* en plantas de *E. grandis* de 11 meses de edad varía entre aproximadamente 20% y 41% para algunas regiones del estado de San Pablo. A su vez, Masson (2009) determinó una pérdida de volumen de madera de aproximadamente 27% en plantas de *E. urophylla* x *E. grandis* a los 19 meses de edad. En Uruguay, hacia fines de 2001 y principios de 2002 se registraron ataques severos de *P. psidii* sobre plantas de *E. globulus* de un año de edad (Telechea *et al.*, 2003). Balmelli *et al.* (2004; 2009) también reportaron infección en plantas de *E. globulus* de 6 a 12 meses de edad. A fines de 2009 y principios de 2010, el ataque de *P. psidii* sobre clones de *E. grandis* en la zona centro del país llevó a un importante retraso en el crecimiento en plantas de un año. Las dos epidemias de roya que causaron gran preocupación en nuestro país (2001-2002 y 2009-2010) coincidieron con veranos y otoños lluviosos. A fines de noviembre 2012, se observó una importante infección de roya sobre plantaciones de *E. grandis* de un año en el departamento de Cerro Largo, también asociada a las abundantes lluvias de octubre (Simeto, sin publicar). Hoy en día, la susceptibilidad a la roya es motivo de descarte de clones para algunas empresas.

Manejo de la enfermedad

Existe una amplia variabilidad genética inter e intra específica en cuanto a la resistencia a la roya dentro del género *Eucalyptus* (Alfenas *et al.*, 2004; Coutinho *et al.*, 1998), la cual permite el control de la enfermedad a través de la plantación de especies, progenies o clones resistentes. Dicha selección se realiza principalmente a través de ensayos de campo o mediante inoculación artificial

del patógeno en condiciones controladas (Alfenas *et al.*, 2004). De esta forma, entre las especies resistentes a *P. psidii* se destacan *Corymbia citriodora* (Hook.) Hill & Johnson, *C. torelliana* (Muell.) Hill & Johnson, *E. camaldulensis* Dehnh., *E. microcorys* Muell., *E. pellita* Muell., *E. pilularis* Smith, *E. propinqua* Deane & Maiden, entre otras, y entre las más susceptibles *E. grandis* Hill ex Maiden, *E. phaeotricha* Blakely McKie, *E. cloeziana* Muell., *E. globulus* Labill. y *E. nitens* (Deane & Maiden) Maiden. A su vez, se han realizado importantes avances en el mapeo de genes de resistencia y en la identificación de marcadores asociados a la misma (Junghans *et al.*, 2003; Mamani *et al.*, 2010), lo que permitiría realizar selección asistida de material resistente.

Si bien existen trabajos que reportan gran eficiencia de diferentes fungicidas frente a *P. psidii* (Ferreira, 1989; Alfenas *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2011), el control químico de la enfermedad se restringe principalmente a viveros o a material de alto valor comercial en condiciones de campo (Alfenas *et al.*, 2004). Otra estrategia para controlar la enfermedad radica en evitar plantar en zonas de riesgo, es decir, donde se dan condiciones ambientales favorables para el desarrollo del patógeno, mediante la elaboración de mapas de riesgo (Masson, 2009; Takahashi, 2002).

Razas fisiológicas

Como sucede con otros patógenos, es esperable que la población de *P. psidii* posea variabilidad genética. Existen numerosos trabajos donde a través de inoculaciones artificiales con *P. psidii* se evidenció la existencia de variabilidad fisiológica en cuanto a la virulencia sobre diferentes hospederos (MacLachlan, 1938; Rayachherty *et al.*, 2001; Ferreira, 1983; Coelho *et al.*, 2001; Xavier, 2002; Aparecido, 2003). MacLachlan (1938) reportó que en inoculaciones cruzadas en Jamaica, dos cepas de *P. psidii* obtenidas de *Pimenta dioica* L. (Merr) y *S. jambos* fueron capaces de infectar a sus respectivos hospederos pero ninguna de ellas causó infección en *Ps. guajava*. A su vez, la cepa proveniente de *Pi. dioica* no esporuló sobre *S. jambos*. Sin embargo, en Florida (EEUU) cepas provenientes de *Pi. dioica* sí fueron capaces de infectar *S. jambos* (Marlatt y Kimbrough, 1979), si bien la intensidad de la infección fue menor y el tiempo de esporulación fue el doble. Posteriormente, Rayachhetry *et al.* (2001) no observaron infección en *S. jambos* tras someterlo a inoculaciones con cepas de *P. psidii* provenientes de *Melaleuca quinquenervia* Cav. (Blake) y *Pi. dioica*. En Brasil, Ferreira (1983) reportó que una cepa de *P. psidii* obtenida de *E. grandis* fue compatible con su hospedero original y con *S. jambos*, pero incompatible con *Ps. guajava*, mientras que cepas provenientes de dos variedades de *Ps. guajava* fueron compatibles con sus hospederos originales pero incompatibles con los hospederos antes mencionados. Coelho *et al.* (2001) determinaron tres grupos de especialización fisiológica (biotipos) a partir de inoculaciones cruzadas en *E. grandis*, *Ps. guajava* y *S. jambos* con cepas provenientes de *Eucalyptus* spp., *S. jambos*, *Ps.*

guajava y *Myrcia itambensis* Berg. El primer grupo es compatible con *E. grandis* y *S. jambos*, el segundo con *E. grandis* y *Ps. guajava* y el tercero sólo con *Ps. guajava*. En otro trabajo, Xavier *et al.* (2002) clasificaron 32 cepas de *P. psidii* provenientes de diferentes hospederos y regiones de Brasil en base a su virulencia, determinando tres razas de *P. psidii* diferentes. Aparecido *et al.* (2003) realizaron inoculaciones cruzadas con aislamientos de *P. psidii* de ocho hospederos diferentes (*S. jambos*, *Eucalyptus* spp., *Ps. guajava*, *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O.Berg. y *Eugenia cambuceae* Mattos) sobre cinco hospederos (*Corymbia citriodora*, *S. jambos*, *Ps. guajava*, *Eugenia* spp.). En base a la especificidad del hospedero, discriminaron cuatro biotipos diferentes.

En Uruguay, Pérez *et al.* (2011) realizaron ensayos de inoculación artificial con cepas de *P. psidii* provenientes de mirtáceas nativas (*Myrrhinium atroporpureum* var. *octandrum* Benth. y *Myrcianthes pungens* Berg.) sobre clones de *E. grandis*, *E. globulus* y plantas de *S. jambos*. Ambas cepas, provenientes de cada una de las referidas mirtáceas, infectaron la totalidad de los clones de *E. globulus*, mientras que una de ellas infectó tan solo algunos clones de *E. grandis* y la otra a ninguno. Ninguna de las cepas fue capaz de infectar *S. jambos*. Si bien se trata de resultados preliminares para Uruguay, éstos evidencian la existencia de variabilidad en cuanto a la respuesta a los aislamientos utilizados. La correcta caracterización de la población de *P. psidii* en Uruguay resulta imprescindible para el manejo de la enfermedad a través de la identificación y uso de genotipos de *Eucalyptus* resistentes a la misma.

Variabilidad genética

En las últimas décadas se ha avanzado considerablemente en el desarrollo de herramientas y tecnologías de biología molecular, las cuales han sido aplicadas en forma creciente al estudio de hongos fitopatógenos (Xu, 2006; Glen, 2006; Narayanasamy, 2011). En particular, el análisis de las secuencias de ADN que codifican para ARNs ha sido extensamente utilizado en el estudio de las relaciones taxonómicas y estudios genéticos en poblaciones de patógenos fúngicos (Bruns *et al.*, 1992; Hibbert, 1992). El ADN ribosómico de los hongos está dispuesto en tándems repetidos con varios cientos de copias por genoma. En los hongos filamentosos, las regiones del ADN ribosómico que codifican para las subunidades 18S (subunidad menor), 5.8S y 28S (subunidad mayor) se encuentran altamente conservadas, mientras que las regiones separadoras ITS (del inglés *Internal Transcribed Spacer*) e IGS (del inglés *Intergenic Spacer*), son no codificantes y son considerablemente más variables. La región ITS se encuentra dividida en dos: ITS1 e ITS2 y separan el ADN ribosómico de la subunidad menor, el 5,8S y los genes de la subunidad mayor, mientras que la región IGS separa la subunidad mayor de la subunidad menor 5S. Ambas regiones exhiben una alta variabilidad inter e intraespecífica, lo que las convierte en herramientas de gran

utilidad para estudios filogenéticos (Jurado *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2001; James *et al.*, 2001; Yli-Mattila *et al.*, 2004; Braithwaite *et al.*, 2009). En particular, la región IGS es considerada la región con mayor variabilidad en el ADN ribosómico y es utilizada frecuentemente cuando la variabilidad en la región del ITS no es suficiente para estudios intraespecíficos (Capote *et al.*, 2012).

Otra herramienta muy utilizada es el análisis de microsatélites. Los microsatélites, también conocidos como SSR (del inglés *Simple Sequence Repeats*) son secuencias de ADN constituidas por repeticiones de motivos de 1 a 6 nucleótidos. Estos tándems de nucleótidos pueden diferir en el número de repeticiones entre individuos y se ubican generalmente en regiones no codificantes (Capote *et al.*, 2012). El uso de cebadores que flanqueen estas regiones permite obtener productos de PCR de diferente longitud. Son multialélicos, codominantes y altamente polimórficos, características que los convierten en marcadores moleculares adecuados para estudios poblacionales (Capote *et al.*, 2012).

En lo que refiere a *P. psidii*, a partir de la incursión de este patógeno en diferentes países se han llevado a cabo diversos estudios sobre su variabilidad genética basados principalmente en las regiones ITS y microsatélites (Zhong *et al.*, 2008; Langrell *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2011; Graça, 2011; Graça *et al.*, 2013; Quercine *et al.*, 2014; Ross-Davis *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2015a y b; McTaggart *et al.*, 2015). Graça *et al.* (2013) analizaron la variabilidad genética de 148 cepas provenientes de *Eucalyptus* y mirtáceas nativas de Brasil y Uruguay para diez microsatélites polimórficos y evidenciaron que la estructura poblacional de *P. psidii* en Brasil estaría fuertemente influida por la especie de hospedero. Dichos autores determinaron que las cepas provenientes de diferentes hospederos son genéticamente distintas, reconociéndose al menos un genotipo multilocus o biotipo (definido en el artículo como grupo de individuos con genotipo similar) por especie de hospedero y podrían ser agrupadas en dos grandes clusters: uno asociado a *Eucalyptus* y otro asociado a *Ps. guajava*. Al estudiar en profundidad las poblaciones de roya de estos dos hospederos, Graça *et al.* (2013) evidenciaron que la fuente de origen de la roya en *Eucalyptus* en Brasil no podría haber sido un salto desde el hospedero nativo *Ps. guajava* como se pensaba anteriormente (se desconoce hasta ahora el origen del biotipo que infecta a las especies de *Eucalyptus* en Brasil). Asimismo postulan que la existencia de biotipos asociados a hospederos podría indicar que *P. psidii* está sufriendo una especiación influida por la especie de hospedero, resultando eventualmente en especies crípticas dentro de “un complejo de especies *P. psidii*”. Adicionalmente los autores constataron evidencias de reproducción asexual en las poblaciones estudiadas, por lo que postulan que éstas serían clonales para cada genotipo. Por otra parte, Ross-Davis *et al.* (2013 y 2014) analizaron la variabilidad genética de cepas provenientes de Australia, Brasil, Costa Rica, Jamaica, México, Paraguay, Puerto Rico, Uruguay y EEUU para seis

microsatélites polimórficos. Los resultados de estos trabajos confirmaron la existencia de diversos genotipos multilocus asociados a hospederos para las cepas provenientes de América del Sur y de un set de genotipos multilocus estrechamente relacionados entre sí y que difieren marcadamente de los genotipos sudamericanos, a partir de las cepas obtenidas de diferentes hospederos en los demás países. A su vez se identificaron 26 genotipos multilocus que se agrupan en 4 grandes clusters: (1) “Allspice” = colectas de *Pimenta dioica* de Jamaica, (2) “Pandemic” = colectas de diversos hospederos de Australia, el Caribe, México y EEUU, (3) “Eucalypt” = colectas de *Eucalyptus* spp. y *S. jambos* de Brasil, Paraguay y Uruguay, y (4) “Guava” = colectas de *Ps. guajava*, *Ps. guineense*, *Syzygium cumini*, *Myrciaria cauliflora*, *Eugenia uniflora* y *Myrrhinium atropurpureum* var *octandrum* de Brasil y Uruguay. La mayor diversidad genética se observó dentro del cluster “Guava” seguido del cluster “Pandemic”, el “Allspice” y por último el cluster “Eucalypt”. Más recientemente, Machado *et al.* (2015a) analizaron, a través del estudio de 6 microsatélites polimórficos 104 cepas de *P. psidii* provenientes de Australia, Nueva Caledonia, China y Hawaii. La variabilidad genética observada fue muy baja ya que se identificó un único genotipo multilocus para la mayoría de cepas de Australia y para todas las de Nueva Caledonia, Hawaii y China. Los autores de este trabajo postulan que la baja variabilidad genética entre las colectas de Australia es consistente con reproducción asexual debida a la introducción reciente de un único genotipo del patógeno y que los pocos alelos diferentes observados en algunos loci se deben a mutaciones puntuales y no a recombinación. En Uruguay, Pérez *et al.* (2011) realizaron un análisis filogenético basado en la región ITS de aislamientos de *P. psidii* provenientes de *E. grandis*, *E. globulus*, *M. atropurpureum* var. *octandrum*, *M. pungens* y *S. jambos*, el cual reveló mínimas variaciones (diferencias en una o dos bases) entre los mismos. Quercine *et al.* (2014) también encontraron polimorfismos a nivel de nucleótidos simples en su análisis de la región ITS para cepas provenientes de *Eucalyptus* spp., *Ps. guajava*, *M. cauliflora* y *S. jambos* en Brasil.

OBJETIVO GENERAL

Conocer la variabilidad genética de *Puccinia psidii* en mirtáceas nativas e introducidas en el Uruguay.

Objetivo específico

Determinar la existencia de diferentes genotipos de la población de *P. psidii* presente en especies de *Eucalyptus* y mirtáceas nativas en Uruguay.

Hipótesis

Existe variabilidad genética en la población de *P. psidii* presente en mirtáceas nativas e introducidas, en Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y procesamiento de especímenes

Entre los años 2008 y 2013 se realizaron colectas de hojas infectadas por *P. psidii* en plantaciones jóvenes de eucaliptos (menos de un año de edad) y a partir de especímenes de mirtáceas nativas e introducidas ubicadas en los departamentos de Maldonado, Rocha, Lavalleja, Florida, Durazno, Cerro Largo, Rivera, Tacuarembó y Paysandú (Figura 2). Las muestras fueron transportadas en bolsas plásticas debidamente rotuladas en conservadora y posteriormente fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento. Las pústulas fueron recortadas y colocadas en forma individual en tubos Eppendorf de 2 ml sin tapa cubierto de papel filtro. Tres de esos tubos se colocaron en un tubo Falcon de 50 ml debidamente rotulado, con aprox. 25 ml de su volumen ocupado con silicagel y un tapón de algodón para evitar la humedad. Los tubos Falcon con la colección de *P. psidii* se almacenaron en un freezer a -80°C. Entre las cepas de *P. psidii* utilizadas también se contó con esporada almacenada a -80°C del año 2006 y 2007, producto del proyecto PDT S/C/OP/35/05 INIA “Desarrollo de tests estándar de inoculación artificial para la caracterización sanitaria de germoplasma de *Eucalyptus globulus*”.

La morfología y dimensiones de las esporas se observó bajo microscopio óptico Nikon Labophot 2 a 1000 aumentos.

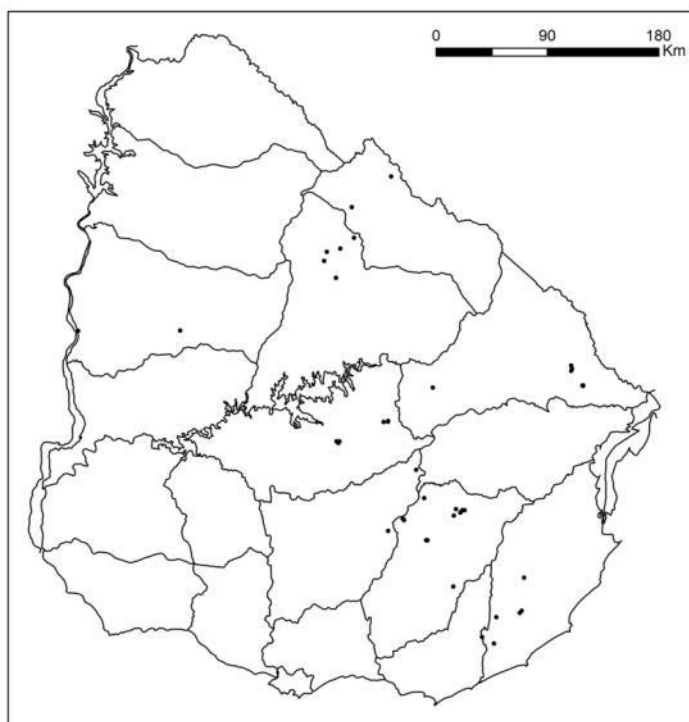


Figura 2. Mapa político de Uruguay donde se indican los puntos de colecta de *Puccinia psidii*, entre los años 2008 y 2013.

Extracción de ADN

Se extrajo ADN a partir de una pústula de *P. psidii* de cada una de las colectas (una colecta corresponde al material colectado en un ejemplar de mirtácea). Cada una de las muestras de hoja con pústulas de roya fue transferida a un tubo Eppendorff de 2 ml en presencia de tres esferas de borosilicato de 3 mm de diámetro (Sigma-Aldrich) esterilizadas y 25 mg de tierra de diatomeas (Sigma-Aldrich) y fue pulverizada por agitación en un homogenizador de tejidos TyssueLyser II (QIAGEN), a máxima potencia (30 Hz) durante 3 min. La extracción de ADN se realizó a partir de las muestras pulverizadas utilizando DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) según indicaciones del fabricante y también utilizando un protocolo de purificación estándar basado en el buffer CTAB (Torres-Dini y Nikichuk, 2011, sin publicar; Anexo 1).

Análisis de diferentes regiones del ADN ribosómico

Para la identificación de especie y el análisis de la variabilidad genética intraespecífica se analizaron dos regiones del gen que codifica para el ARNr: la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) y la región IGS1 (*Intergenic Spacer*).

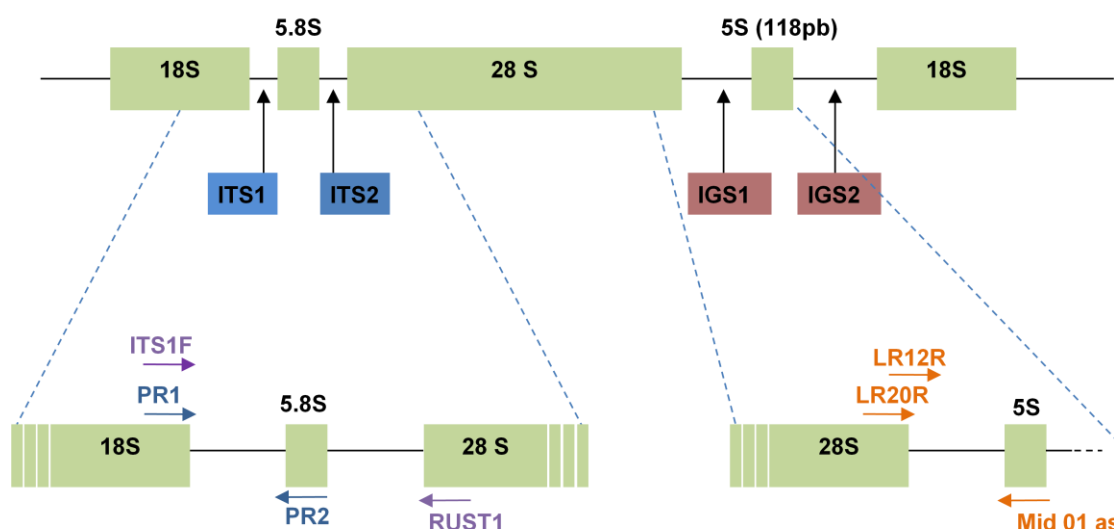


Figura 3. Esquema que representa la ubicación de la región ITS e IGS del ADN ribosómico y los cebadores utilizados.

Análisis de la región ITS

La región ITS del ADN ribosómico fue amplificada utilizando las siguientes combinaciones de cebadores ITS1F (5' CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 3') (Gardes y Bruns, 1993) y RUST1 (5' GCT TAC TGC CTT CCT CAA TC 3') (Kropp *et al.*, 1995) y los cebadores PR1 (5' AAA TCG TAA CAA GGT TTC CG 3') y PR2 (5' TAA GTT CAG CAG GTA GTC CC 3') (Langrell *et al.*, 2008) (Figura 3). En algunos casos, previo a las reacciones de PCR (en inglés: *Polymerase chain reaction*), el ADN genómico fue diluido 1:10 y 1:100 antes de ser utilizado. Las condiciones de la PCR y los programas de ciclado utilizados se detallan en el Anexo 2.

En todos los casos, los productos de la PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1,5% con colorante GelRed al 1% (Boitium Inc., EEUU) mediante la carga de 8 µl de cada producto de PCR mezclado previamente con 2 µl de buffer de carga BPB (con colorante azul de bromofenol). La cubeta de electroforesis se completó con buffer TBE 1X y la electroforesis se dejó correr con una carga de 110 volts durante 30 minutos. Para poder evaluar el tamaño de las bandas se cargaron 3 µl del marcador de peso molecular GeneRuler (100pb) (Fermentas, Life Sciences, Glen Burnie, MD, EEUU) en cada gel. Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron transferidos a un transiluminador donde fueron fotografiados mediante un equipo Gel Logic 112 Imaging System (Carestream Health Inc. EEUU). Los productos de PCR en los que se observó una banda con buena definición y acorde con el peso molecular esperado fueron secuenciados por ambos extremos mediante secuenciador automático ABI3730XL Applied Biosystems (servicio de secuenciación, Macrogen Inc., Seúl, Corea) con los mismos cebadores utilizados en las reacciones de PCR.

Las secuencias obtenidas con cada cebador fueron ensambladas y editadas manualmente mediante el programa ChromasPro 1.7.7 (Technelysium Pty. Ltd., Eden Prairie, MN, EEUU) en base a la inspección de los correspondientes cromatogramas. En algunos casos el ensamblaje no fue posible y se seleccionó la secuencia con cromatograma aceptable, obteniendo el reverso complementario en el caso que se tratase de la secuencia construida a partir del cebador *reverse*. Tanto para las secuencias consenso como para las otras, se descartaron los extremos de las mismas en los que la lectura de las bases no era confiable. Se realizó la comparación con secuencias disponibles en las bases de datos moleculares del NCBI GenBank (por su sigla en inglés, National Center for Biotechnology Information), mediante el software Blast, empleando el algoritmo BlastN. Se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas y de secuencias depositadas en el NCBI, correspondientes a la región ITS del ADN ribosómico de *P. psidii* y de otras especies de roya

pertenecientes a las familias Melampsoraceae, Phakopsoraceae y Pucciniaceae, a ser utilizadas como grupos externos en el análisis filogenético (Tabla 1). El alineamiento se realizó mediante el programa MAFFT versión 7.245 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>, Katoh *et al.*, 2005) utilizando los parámetros definidos por defecto.

Tabla 1. Lista de secuencias correspondientes a la región ITS del ADN ribosómico de *Puccinia psidii* y otras royas, descargadas desde GenBank para su análisis en el presente estudio.

ID #	Roya	Hospedero	País	Referencia
AB232547	<i>Puccinia hemerocallidis</i>	<i>Hemerocallis</i> spp.	---	Chatasiri <i>et al.</i> , 2006
AB470483	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Metrosideros polymorpha</i>	Japón	Kawanishi <i>et al.</i> , 2009
AJ421801	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eugenia uniflora</i>	Brasil	Langrell <i>et al.</i> , 2008
AJ421802	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Brasil	Langrell <i>et al.</i> , 2008
AJ421803	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus grandis</i> (híbrido)	Brasil	Langrell <i>et al.</i> , 2008
AJ535659	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Pimenta dioica</i>	EEUU, Florida	Langrell <i>et al.</i> , 2008
AJ535660	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	Brasil	Langrell <i>et al.</i> , 2008
AJ536601	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Psidium guajava</i>	Brasil	Langrell <i>et al.</i> , 2008
DQ234702	<i>Melampsora larici-populina</i>	<i>Populus</i> sp.		Yu <i>et al.</i> , 2006
EF210141	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Psidium guajava</i>	Brasil	Langrell <i>et al.</i> , 2008
EF490601	<i>Puccinia cygnorum</i>	<i>Kunzea ericifolia</i>	---	Langrell <i>et al.</i> , 2008
EF599767	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Metrosideros polymorpha</i>	EEUU, Hawaii	Zhong, 2008
EF599768	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Metrosideros polymorpha</i>	EEUU, Hawaii	Zhong, 2008
EU071045	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Melaleuca quinquevernia</i>	EEUU, Hawaii	Langrell <i>et al.</i> , 2008
EU071048	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Psidium guajava</i>	Brasil	Langrell <i>et al.</i> , 2008
EU436721	<i>Phakospora pachyrhizi</i>	<i>Glycine max</i>	---	Barnes <i>et al.</i> , 2009
EU711423	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Syzygium jambos</i>	Colombia	Roux <i>et al.</i> , 2013
HM448900	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Agonis flexuosa</i>	Australia	Roux <i>et al.</i> , 2013
JF960255	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Melaleuca quinquenervia</i>	EEUU, California	Zambino <i>et al.</i> , 2011
KC607876	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Rhodomyrtus tomentosa</i>	EEUU, Florida	Rayamajthi <i>et al.</i> , 2013
KF220289	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Myrtus comunis</i>	Sudáfrica	Roux <i>et al.</i> , 2013
KM282148	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	Brasil	Machado <i>et al.</i> , 2015
FJ710803 (UY1371)	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	Uruguay	Pérez <i>et al.</i> , 2011

ID #	Roya	Hospedero	País	Referencia
FJ710804 (UY1372)	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	Uruguay	Pérez et al., 2011
FJ710805 (UY1374)	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Uruguay	Pérez et al., 2011
FJ710806 (UY1375)	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Uruguay	Pérez et al., 2011
FJ710807 (UY1731)	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	Uruguay	Pérez et al., 2011
FJ710808 (UY1732)	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Syzygium jambos</i>	Uruguay	Pérez et al., 2011
EU348742 (UY217)	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	Uruguay	Pérez et al., 2011
EU439920 (UY220)	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Myrrhinium atropurpureum</i> var. <i>octandrum</i>	Uruguay	Pérez et al., 2011
EU439921 (UY221)	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Myrcianthes pungens</i>	Uruguay	Pérez et al., 2011
EU348743 (UY894)	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Uruguay	Pérez et al., 2011
EU348744 (UY895)	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Uruguay	Pérez et al., 2011

A partir del alineamiento de las secuencias se estudió la similitud entre las bases mediante el software BioEdit versión 7.2.5 (Hall, 1999), y en el caso de identificarse diferencias se revisó la base en cuestión, inspeccionando el correspondiente cromatograma para comprobar la veracidad de la misma y corrigiendo manualmente de ser necesario. Posteriormente, se realizó un análisis filogenético mediante el software PAUP versión 4.0a146 (Swofford, 2002) utilizando los métodos de Neighbor-joining y Máxima Parsimonia. Para el análisis de Neighbor-joining se seleccionó el modelo TVM+I por tener el mejor ajuste, utilizando el criterio de Akaike, AIC (Posada y Buckley, 2004), determinado mediante el programa ModelTest versión 3.7 (Posada y Crandall, 1998). Los gaps generados en el alineamiento de las secuencias fueron tratados como datos faltantes y todos los caracteres fueron considerados con igual peso. El análisis de Máxima Parsimonia se realizó utilizando una búsqueda heurística, obteniéndose el árbol inicial por adición secuencial (stepwise addition) al azar y el algoritmo de Bisección-reconexión de árboles (Tree-Bisection-Reconnection, TBR) para el intercambio de ramas (Branch-swapping). La robustez de los nodos de los árboles filogenéticos encontrados fue estimada usando Bootstrap (Hillis and Bull, 1993), con 1000 réplicas, en ambos casos.

Análisis de la región IGS1

La región IGS1 del ADN ribosómico fue amplificada utilizando las siguientes combinaciones de cebadores: LR12 (5' GAA CGC CTC TAA GTC AGA ATC C 3') (James *et al.*, 2001) y Mid 01as (5' GAA CAA ATC TGT CGA ACA AGG GC 3') (Torres-Dini y Nikichuk, 2013, sin publicar) y los cebadores LR20R (5' GTG AGA CAG GTT AGT TTT ACC CT 3') (James *et al.*, 2001) y Mid 01as. La ubicación de cada uno de los cebadores descritos se muestra en la representación esquemática de la Figura 3. Previo a las reacciones de PCR, el ADN genómico fue diluido 1:10 y 1:100 antes de ser utilizado. Las condiciones de la PCR y los programas de ciclado utilizados se detallan en el Anexo 3. La metodología para la visualización en geles de agarosa fue la misma que se utilizó para los productos de PCR de la amplificación de la región ITS del ADN ribosómico. Los productos de PCR en los que se observó una banda con buena definición y acorde con el peso molecular esperado fueron secuenciados por ambos extremos mediante secuenciador automático ABI3730XL Applied Biosystems (servicio de secuenciación, Macrogen Inc., Seúl, Corea) con los mismos cebadores utilizados en las reacciones de PCR. Se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas junto con dos secuencias correspondientes a la región IGS1 del ADN ribosómico de especies de roya pertenecientes al género *Puccinia*: *Puccinia kuehnii* (W. Krüger) E.J. Butler (NCBI – GenBank, n° de acceso FJ708578) y *Puccinia graminis* Pers., a través del proyecto de secuenciación del genoma

de *Puccinia graminis* (Puccinia Group Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). El alineamiento se realizó mediante el programa MAFFT versión 7.245, (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>, Katoh *et al.*, 2005), utilizando los parámetros definidos por defecto. A partir del alineamiento de las secuencias se estudió la similitud entre las bases mediante el software BioEdit versión 7.2.5 (Hall, 1999) y en el caso de identificarse diferencias se revisó la base en cuestión, inspeccionando el correspondiente cromatograma para comprobar la veracidad de la misma y corrigiendo manualmente de ser necesario. Posteriormente, se realizó un análisis filogenético mediante el software PAUP versión 4.0a146 (Swofford, 2002) utilizando los métodos de Neighbor-joining y Máxima Parsimonia. Para el análisis de Neighbor-joining se seleccionó el modelo TrN+I por tener el mejor ajuste, utilizando el criterio de Akaike, AIC (Posada y Buckley, 2004), determinado mediante el programa ModelTest versión 3.7 (Posada y Crandall, 1998). Para el tratamiento de los gaps generados en el alineamiento de las secuencias así como para el análisis de Máxima Parsimonia se procedió de igual manera que para el análisis de la región ITS del ADN ribosómico. La robustez de los nodos de los árboles filogenéticos encontrados fue estimada usando Bootstrap (Hillis and Bull, 1993), con 1000 réplicas, en ambos casos.

Análisis de SSRs (Simple Sequence Repeats, microsatélites)

Para el genotipado de ocho microsatélites de *P. psidii* se utilizaron los cebadores desarrollados por Zhong *et al.* (2008): PpSSR012, PpSSR022, PpSSR087, PpSSR102, PpSSR136, PpSSR161, PpSSR195, PpSSR208 (Tabla 2). Las condiciones de la PCR y los programas de ciclado utilizados se detallan en el Anexo 4. Todos los productos de PCR fueron enviados a un servicio externo de genotipificación mediante secuenciador automático (Macrogen Inc.). Los cebadores forward fueron marcados con los fluorocromos 6-FAM [™] y HEX [™]. Para estimar el tamaño de los fragmentos obtenidos se utilizó el software Geneious (Biomatters Ltd.).

Tabla 2. Secuencia de los cebadores desarrollados por Zhong *et al.* (2008) para los microsatélites de *Puccinia psidii*, utilizados en este trabajo.

Locus	# GenBank	Secuencia (5'-3')
<i>PpSSR012</i>	EF523501	F: TTCAATCCCCATAAGGCTTTC R: AAATCCTGAGTCTTCTTCCCC
<i>PpSSR022</i>	EF523504	F: TCCCTTCATGTCCTTTAGGCT R: CCCACTCTGTCAAGAGGAAAT
<i>PpSSR087</i>	EF523507	F: GGGAATGATGACGTCACGTTA R: CCAGACGAAGGGTAAGTCATT
<i>PpSSR102</i>	EF523508	F: GGCTTTGGGTGAGGTTTTTTT R: TCCCCTTCCTTCATCATTGA
<i>PpSSR136</i>	EF523509	F: CAGAACCATTTCTTACAAGAT R: CTCGTGAATGAACTCCATACA
<i>PpSSR161</i>	EF523511	F: TCGAGGGGTCTCAGTTTTCA R: GAGATCTATCGGACCAACGAA
<i>PpSSR195</i>	EF523513	F: TCACCGGTTATCCACTCATGT R: GACGAGGAAAGTGATGGTTT
<i>PpSSR208</i>	EF523514	F: CGATCATCCACAGGTTAGTA R: TAAGTGAATGGGCACTAGAGA

RESULTADOS

Colecta y procesamiento de especímenes

Se obtuvieron 51 cepas de *P. psidii* a partir de ocho especies de hospederos en nueve departamentos de Uruguay (Tablas 3 y 4). Las mirtáceas nativas en las que se observó infección por *P. psidii* estaban ubicadas bajo el dosel de monte nativo o de eucaliptos y en las cercanías de una corriente de agua, en un ambiente relativamente sombreado y con cierto grado de humedad ambiente. En las especies de *Eucalyptus*, *Ps. guajava* y *S. jambos* la infección se observó en hojas juveniles, pecíolos, brotes, yemas y frutos (en el caso de *Ps. guajava*) con uredos de color amarillo intenso de diferente magnitud, observados individualmente o coalesciendo, en ambas caras de las hojas, errumpentes y en general con abundante producción de uredosporas. Los uredos más viejos presentaban el aspecto de una mancha de color grisáceo a blanquecino. Particularmente en algunos ejemplares de *E. grandis* (en material muy susceptible a la enfermedad) se observaron además ápices resecos, zonas con hipertrofia, de aspecto rugoso y coloración rojiza, brotes deformados y una abundante brotación de la planta (Figura 4E). En el caso de las mirtáceas nativas, las infecciones se observaron siempre sobre plantines muy jóvenes y los uredos fueron similares a los observados en los demás hospederos en cuanto a coloración, pero más restringidos en tamaño (Figura 4A). En una de las colectas de *M. pungens*, algunas pústulas presentaban una coloración ocre (Figura 4A) y al examinarlas bajo microscopio óptico se comprobó que se trataba de telios compuestos por teliosporas (Figura 5). La morfología, coloración y tamaño de uredosporas y teliosporas coinciden con las descritas para *P. psidii* (Pérez, 2008; Roux *et al.*, 2013; McTaggart *et al.*, 2015): uredosporas unicelulares, amarillas, esféricas a obovoides, base truncada, equinuladas 18 - 25 μm ($\bar{x}$ =22 μm) 16 - 18 μm ($\bar{x}$ =17 μm); teliosporas cilíndricas a elipsoidales con ápice redondeado, color castaño claro, bicelulares y con presencia de pedicelo de 36 - 45 μm ($\bar{x}$ =41 μm) x 16 - 19 μm ($\bar{x}$ =18 μm).

Tabla 3. Especies de hospederos y departamentos de Uruguay en los que se colectaron muestras con *Puccinia psidii*.

Hospedero	Departamentos
<i>Eucalyptus dunnii</i>	Paysandú
<i>Eucalyptus globulus</i>	Rocha, Lavalleja, Florida, Maldonado, Tacuarembó
<i>Eucalyptus grandis</i>	Tacuarembó, Lavalleja, Durazno, Cerro Largo, Paysandú
<i>Myrcianthes pungens</i>	Tacuarembó, Rivera
<i>Myrceugenia glaucescens</i>	Rivera
<i>Myrrhynium atropurpureum</i> Schott var. <i>octandrum</i>	Rivera
<i>Psidium guajava</i>	Tacuarembó
<i>Sizygium jambos</i>	Tacuarembó

Tabla 4. Lista de las cepas de *Puccinia psidii* colectadas, con su correspondiente hospedero, departamento, coordenadas y fecha de colecta.

# Cepa	Hospedero	Departamento	Coordenadas	Fecha de colecta
UYTB 10	<i>Eucalyptus globulus</i>	Rocha	34°16'58.89"S, 54°13'43.68"O	Abril 2006
UYTB 11	<i>Eucalyptus globulus</i>	Lavalleja	33°35'4.36"S, 54°49'37.77"O	Mayo 2006
UYTB 18	<i>Eucalyptus grandis</i>	Tacuarembó	31°51'41.60"S, 55°52'37.90"O	Noviembre 2007
UYTB 20	<i>Eucalyptus grandis</i>	Lavalleja	---	Noviembre 2008
UYTB 26	<i>Eucalyptus globulus</i>	Rocha	34° 1'33.20"S, 54°12'0.30"O	Marzo 2008
UYTB 29	<i>Eucalyptus globulus</i>	Rocha	34°15'57.20"S, 54°12'47.80"O	Marzo 2008
UYTB 31	<i>Eucalyptus globulus</i>	Rocha	34°19'5.30"S, 54°25'59.40"O	Marzo 2008
UYTB 33	<i>Eucalyptus globulus</i>	Maldonado	34°27'56.60"S, 54°33'15.70"O	Marzo 2008
UYTB 36	<i>Eucalyptus globulus</i>	Lavalleja	34° 06'6.20"S, 54°49'2.40"O	Abril 2009
UYTB 39	<i>Eucalyptus globulus</i>	Lavalleja	33°33'42.40"S, 54°46'18.60"O	Abril 2009
UYTB 40	<i>Eucalyptus globulus</i>	Lavalleja	33°32'51.50"S, 54°45'29.40"O	Abril 2009
UYTB 41	<i>Eucalyptus globulus</i>	Lavalleja	33°32'37.00"S, 54°45'5.40"O	Abril 2009
UYTB 42	<i>Eucalyptus globulus</i>	Lavalleja	33°32'36.40"S, 54°44'1.60"O	Abril 2009
UYTB 43	<i>Eucalyptus globulus</i>	Lavalleja	33°46'6.10"S, 55° 3'46.80"O	Abril 2009
UYTB 44	<i>Eucalyptus globulus</i>	Lavalleja	33°45'56.70"S, 55° 3'31.60"O	Abril 2009
UYTB 45	<i>Eucalyptus globulus</i>	Lavalleja	33°46'7.40"S, 55° 3'7.30"O	Abril 2009
UYTB 49	<i>Eucalyptus globulus</i>	Florida	33°15'21.00"S, 55° 9'43.70"O	Abril 2009
UYTB 52	<i>Eucalyptus globulus</i>	Lavalleja	33°27'35.60"S, 55° 5'13.50"O	Abril 2009
UYTB 63	<i>Eucalyptus globulus</i>	Florida	33°42'18.40"S, 55°23'51.00"O	Abril 2009
UYTB 65	<i>Eucalyptus globulus</i>	Florida	33°36'46.50"S, 55°16'16.30"O	Abril 2009
UYTB 67	<i>Eucalyptus globulus</i>	Lavalleja	33°37'30.00"S, 55°15'38.30"O	Abril 2009
UYTB 71	<i>Eucalyptus globulus</i>	Tacuarembó	31°44'19.67"S, 55°58'41.97"O	Marzo 2009
UYTB 72	<i>Eucalyptus globulus</i>	Rocha	34°30'38.76"S, 54°27'0.68"O	Marzo 2009
UYTB 75	<i>Psidium guajava</i>	Tacuarembó	31° 40' 16.31"S, 55° 57' 23.57"O	Febrero 2010
UYTB 76	<i>Eucalyptus grandis</i>	Durazno	32°54'30.28"S, 55°24'53.24"O	Febrero 2010
UYTB 77	<i>Eucalyptus grandis</i>	Durazno	32° 54' 05.51"S, 55° 24' 45.3"O	Febrero 2010
UYTB 79	<i>Eucalyptus grandis</i>	Durazno	32°54'36.28"S, 55°26'59.88"O	Febrero 2010
UYTB 82	<i>Eucalyptus grandis</i>	Durazno	33° 3'22.01"S, 55°51'20.36"O	Febrero 2010
UYTB 83	<i>Eucalyptus grandis</i>	Durazno	33° 3'17.80"S, 55°49'54.17"O	Febrero 2010
UYTB 84	<i>Eucalyptus grandis</i>	Durazno	33° 4'5.95"S, 55°50'27.14"O	Febrero 2010
UYTB 85	<i>Eucalyptus grandis</i>	Durazno	33°04'05.95"S, 55°50'27.08"O	Febrero 2010
UYTB 86	<i>Eucalyptus grandis</i>	Tacuarembó	31°44'19.31"S, 55°58'41.77"O	Abril 2010
UYTB 88	<i>Eucalyptus globulus</i>	Tacuarembó	31°51'41.60"S, 55°52'37.90"O	Noviembre 2007
UYTB 89	<i>Eucalyptus grandis</i>	Tacuarembó	31° 38'46.59"S, 55°50'32.67"O	Octubre 2010
UYTB 94	<i>Psidium guajava</i>	Tacuarembó	31° 40'16.31"S, 55° 57'23.57"O	Marzo 2012
UYTB 95	<i>Eucalyptus grandis</i>	Cerro Largo	32°36'39.06"S, 53°44'31.38"O	Marzo 2012

# Cepa	Hospedero	Departamento	Coordenadas	Fecha de colecta
UYTB 96	<i>Eucalyptus grandis</i>	Paysandú	32°14'54.89"S, 58° 5'11.45"O	Marzo 2012
UYTB 99	<i>Eucalyptus grandis</i>	Cerro Largo	32°29'29.1"S, 53°50'08.3"O	Noviembre 2012
UYTB 100	<i>Eucalyptus grandis</i>	Cerro Largo	32°30'26.7"S, 53°50'35.2"O	Noviembre 2012
UYTB 102	<i>Eucalyptus grandis</i>	Cerro Largo	32°28'00.5"S, 53°50'34.7"O	Noviembre 2012
UYTB 103	<i>Eucalyptus grandis</i>	Cerro Largo	32°36'47.8"S, 53°44'14.2"O	Noviembre 2012
UYTB 104	<i>Eucalyptus grandis</i>	Cerro Largo	32°39'09.2"S, 55°01'48.5"O	Noviembre 2012
UYTB 105	<i>Myrcianthes pungens</i>	Tacuarembó	31°34'2.50"S, 55°43'36.40"O	Diciembre 2012
UYTB 106	<i>Myrceugenia glaucescens</i>	Rivera	31°06'58.7"S, 55°24'57.3"O	Diciembre 2012
UYTB 109	<i>Myrcianthes pungens</i>	Rivera	31°20'36.97"S, 55°44'49.09"O	Diciembre 2012
UYTB 110	<i>Myrrhinium atropurpureum</i> var. <i>octandrum</i>	Rivera	31°20'36.97"S, 55°44'49.09"O	Diciembre 2012
UYTB 114 - 2	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Paysandú	32°15'3.05"S, 57°12'38.62"O	Enero 2013
UYTB 114 - 4	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Paysandú	32°15'3.05"S, 57°12'38.62"O	Enero 2013
UYTB 114 - 5	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Paysandú	32°15'3.05"S, 57°12'38.62"O	Enero 2013
UYTB 115	<i>Eucalyptus globulus</i>	Lavalleja	33°32'09.20"S, 54°48'31.89"O.	Enero 2013
UYTB 117	<i>Eucalyptus grandis</i>	Cerro Largo	32°36'37.49"S, 53°44'0.87"O	Febrero 2013



Figura 4. Pústulas de *Puccinia psidii* sobre diferentes hospederos: A) y B) *Myrcianthes pungens*; C) y D) *Psidium guajava*; E) *Eucalyptus grandis* y F) *Eucalyptus globulus*.

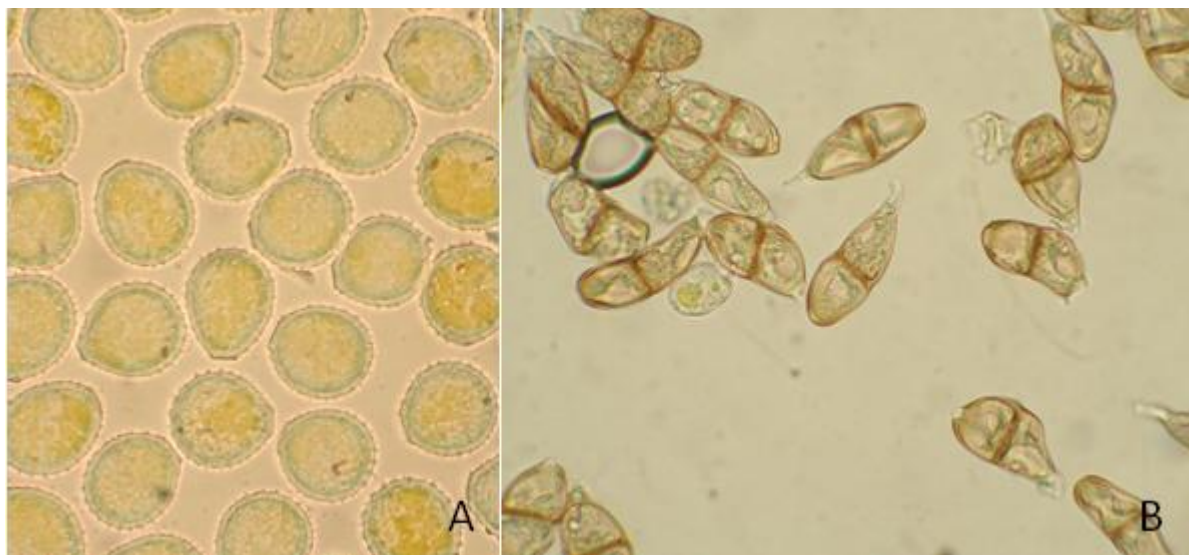


Figura 5. Uredosporas (A) y teliosporas (B) de *Puccinia psidii*.

Análisis de diferentes regiones del ADN ribosómico

Se extrajo ADN exitosamente de 51 cepas de *P. psidii*, a partir del cual se realizaron los diferentes análisis de las regiones ITS, IGS y el análisis mediante SSRs. La Tabla 5 resume el tipo de análisis realizado para cada cepa.

Tabla 5. Análisis realizados a las cepas de *Puccinia psidii* obtenidas en este trabajo.

# Cepa	Análisis realizado		
	ITS	IGS	SSR
UYTB 10	✓		
UYTB 11	✓		
UYTB 18	✓		
UYTB 20	✓		
UYTB 26	✓	✓	✓
UYTB 29	✓	✓	✓
UYTB 31	✓	✓	✓
UYTB 33	✓		
UYTB 36	✓	✓	✓
UYTB 39	✓		✓
UYTB 40	✓	✓	
UYTB 41	✓	✓	✓
UYTB 42	✓		✓
UYTB 43		✓	
UYTB 44			
UYTB 45	✓	✓	✓
UYTB 49	✓		
UYTB 52	✓		
UYTB 63		✓	
UYTB 65		✓	
UYTB 67		✓	
UYTB 71	✓		
UYTB 72		✓	
UYTB 75	✓		
UYTB 76	✓		
UYTB 77	✓		

# Cepa	Análisis realizado		
	ITS	IGS	SSR
UYTB 79	✓		
UYTB 82			
UYTB 83	✓		
UYTB 84			
UYTB 85	✓		
UYTB 86	✓		
UYTB 88			
UYTB 89	✓		
UYTB 94	✓	✓	
UYTB 95		✓	
UYTB 96		✓	
UYTB 99		✓	
UYTB 100	✓	✓	
UYTB 102	✓	✓	
UYTB 103	✓	✓	
UYTB 104	✓	✓	
UYTB 105	✓	✓	
UYTB 106		✓	
UYTB 109		✓	
UYTB 110	✓	✓	
UYTB 114 - 2	✓	✓	
UYTB 114 - 4	✓	✓	
UYTB 114 - 5	✓		
UYTB 115	✓	✓	
UYTB 117	✓	✓	

Análisis de la región ITS

Con los cebadores utilizados se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 1000 pb en el caso de ITS1F/Rust1 y 600 pb para los obtenidos a partir de los cebadores PR1 y PR2. La búsqueda Blast permitió confirmar la identificación de la especie como *P. psidii*, dado que todas las cepas mostraron una muy alta similitud con secuencias de la región ITS de *P. psidii* depositadas en el GenBank, con E-value=0, una cobertura de secuencia (querycover) de 100% y un porcentaje de reconocimiento de identidad de 100% para cada una de las muestras analizadas.

Las secuencias alineadas, incluyendo las consideradas como grupos externos (*P. pachyrhizi*, *P. cygnorum*, *P. hemerocallidis* y *M. laricis-populina*), conformaron un set de 70 secuencias correspondiente a la región ITS completa (ITS1, 5.8 e ITS2) con 547 caracteres, de los cuales 218 fueron constantes, 200 caracteres fueron variables pero no-informativos y 129 fueron informativos para parsimonia. Los árboles obtenidos de los análisis de Neighbor-joining y Máxima Parsimonia fueron similares en cuanto a su topología. El árbol de distancias genéticas obtenido con el análisis de Neighbor-joining se muestra en la Figura 6. En el mismo se observa que las cepas de *P. psidii* (incluidas las obtenidas en este trabajo) muestran un alto nivel de similitud y se agrupan separadas de las otras especies de roya pertenecientes a la familia Pucciniaceae y demás familias, conformando una rama con un alto valor de Bootstrap (100%) lo cual confiere robustez a dicho nodo. En comparación con las secuencias de *P. psidii* depositadas en GenBank, el grado de similitud es tan alto que no se separan en grupos con suficiente robustez según los valores de Bootstrap, salvo las cepas UYTB85 (*E. grandis*) y UYTB79 (*E. grandis*) que se agrupan en una rama que se separa del resto con un valor de 100%.

Para analizar en detalle la variabilidad observada se confeccionó una matriz con las secuencias que presentaron polimorfismo en nucleótido simple (7 secuencias provenientes de *E. grandis*, 2 secuencias de *M. pungens*, 2 secuencias de *M. atropurpureum* var *octandrum*, 1 secuencia de *M. polymorpha*, 1 secuencia de *A. flexuosa* y 1 secuencia de *R. tomentosa*) (Tabla 6). Las cepas UYTB 100 (*E. grandis*) y UYTB 102 (*E. grandis*) presentaron inserciones no presentes en el resto de las secuencias. Las cepas UYTB 105 (*M. pungens*), UYTB 1732 (*E. grandis*), UY220 (*M. atropurpureum* var *octandrum*), UY221 (*M. pungens*) y UYTB 110 (*M. atropurpureum* var *octandrum*) presentaron la misma substitución (posición 408). La cepa UYTB 110 presenta además idénticas substituciones que las cepas UYTB 94 (*Ps. guajava*) y UY220 (posiciones 380 y 478 respectivamente), pero presentó algunas substituciones únicas en otras posiciones. Por otra parte, la cepa UYTB 94 presentó a su vez una inserción única. La cepa UYTB 77 (*E. grandis*) presentó una substitución no presente en el resto de las secuencias y la cepa UYTB 79 (*E. grandis*) presentó inserciones y una

substitución no presentes en el resto de las secuencias. La cepa UYTB 110 es la que presentó mayor cantidad de polimorfismos en nucleótido simple (6).

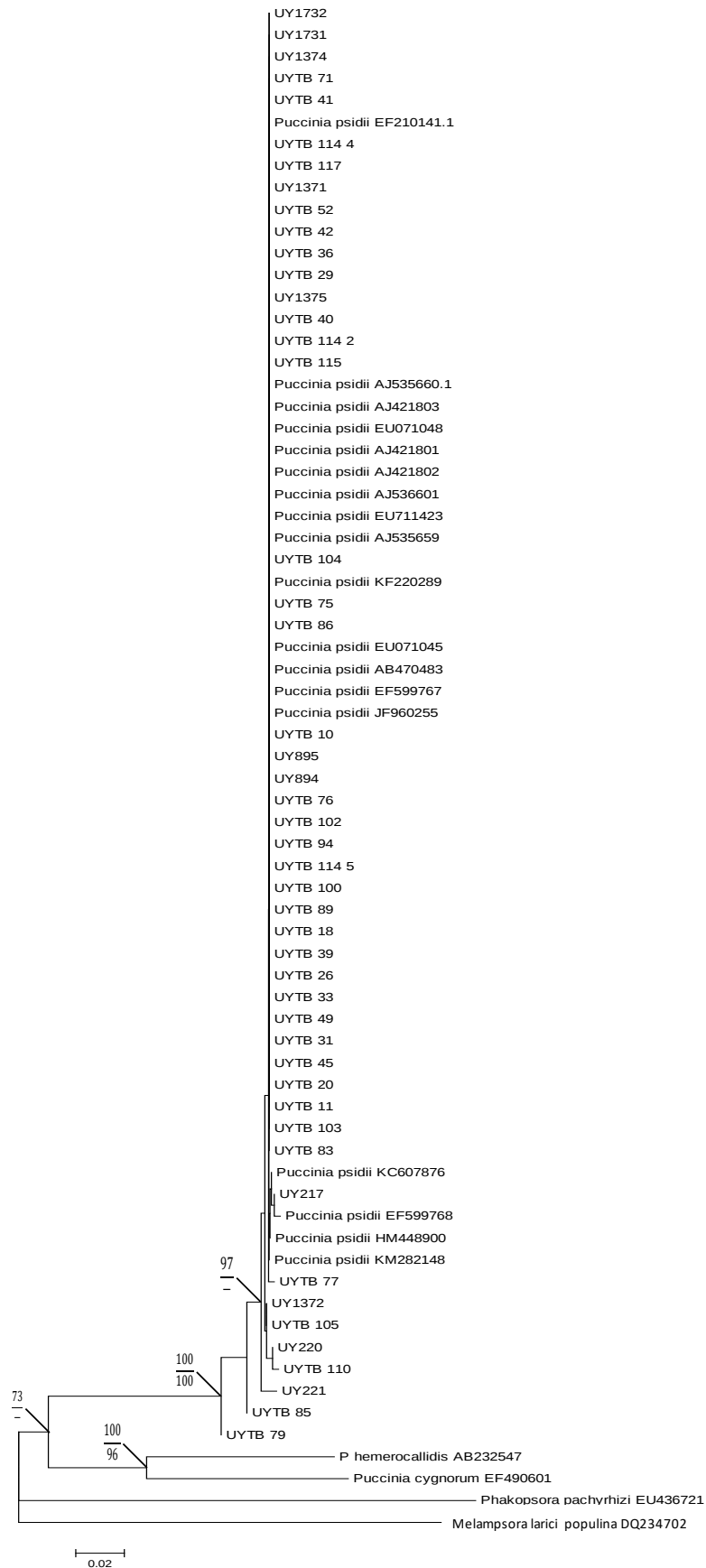


Figura 6. Árbol de distancia genética obtenido del análisis Neighbour-joining en base a la región ITS de *Puccinia psidii* sobre *Eucalyptus* spp., *Psidium guajava*, *Syzygium jambos* y mirtáceas nativas de Uruguay, junto con secuencias de otras especies de royas. Las secuencias obtenidas en este trabajo están identificadas por el prefijo “UYTB”. Los nodos muestran valores de Bootstrap (>75 %) analizado en base a 1000 réplicas. Los valores sobre las ramas y debajo de éstas corresponden a los de los árboles Neighbor-joining consenso y Máxima Parsimonia consenso (obtenidos con el criterio Bootstrap 50% majority –rule), respectivamente.

Tabla 6. Comparación de polimorfismos en nucleótidos simples de las secuencias del ITS del ADN ribosómico. Se incluyó solamente a aquellas secuencias donde se observaron variaciones. Los puntos representan el mismo nucleótido que la cepa tomada como referencia (UY1372) y los guiones representan *gaps*. La letra k representa una ambigüedad de bases entre una citosina y una timina, de acuerdo al código de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC).

	Sitios ITS																				
Cepa	4	81	111	193	219	281	320	321	362	369	380	408	478	518	524	525	526	531	535	539	540
UY1732	G	-	-	A	T	-	-	T	-	-	-	A	A	-	T	A	G	T	A	C	-
<i>P. psidii</i> _EF599767.1	T	-	-	G	.	-	-	.	-	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	-
<i>P. psidii</i> _KC607876.1	k	-	-	.	.	-	-	.	-	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	-
<i>P. psidii</i> _HM448900.1	k	-	-	.	.	-	-	.	-	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	-
UY1372	.	-	-	.	.	-	-	.	-	-	-	G	.	-	.	.	.	.	.	.	-
UY217	T	-	-	.	.	-	-	.	-	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	-
UY220	.	-	-	.	.	-	G	.	-	-	-	G	G	-	.	.	.	.	.	.	-
UY221	.	-	-	.	.	-	-	.	-	-	-	G	.	-	A	G	A	.	.	.	T
UYTB_100	.	-	-	.	.	-	-	.	-	-	-	.	.	T	.	.	.	.	.	.	-
UYTB_102	.	-	-	.	.	T	-	.	T	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	-
UYTB_105	.	-	-	.	.	-	-	.	-	-	-	G	.	-	.	.	.	.	.	.	-
UYTB_110	.	-	-	.	.	-	-	.	-	-	T	G	G	-	.	.	.	G	T	T	-
UYTB_77	.	-	-	.	A	-	-	.	-	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	-
UYTB_79	.	C	A	.	.	-	-	A	-	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	-
UYTB_94	.	-	-	.	.	-	-	.	-	T	T	.	.	-	.	.	.	.	.	.	-

Análisis de la región IGS1

A partir de los cebadores utilizados se obtuvieron fragmentos de entre 300 pb y 500 pb según el par de cebadores utilizados (Figura 7). Las secuencias consenso obtenidas fueron analizadas mediante el algoritmo BLASTn pero no fue posible confirmar la homología con *P. psidii* ya que las secuencias IGS1 generadas en este reporte son las primeras reportadas para esta especie. Curiosamente, la mayoría de las secuencias presentó homología con una secuencia de *P. psidii* depositada en GenBank (n° de acceso KF792096, Tan *et al.*, 2014) correspondiente a una región parcial de la subunidad 18S del ADN ribosómico, la secuencia completa de la región ITS1, la subunidad 1,5S y la región ITS2 y la secuencia parcial de la subunidad 28S del ADN ribosómico, con e-values distintos de cero, cobertura de secuencia del 90% y porcentaje de identidad de 98%. En segundo lugar, las secuencias consenso obtenidas en este trabajo presentaron homologías con regiones IGS1 de otras especies fúngicas con e-values diferentes de cero y coberturas de secuencia inferiores al 85%. Como era de esperar de la comparación con otras especies fúngicas, el porcentaje de identidad en ningún caso superó el 81%. Las secuencias alineadas, incluyendo las consideradas como grupos externos (*P. triticum* y *P. kuehnii*), conformaron un set de 30 secuencias correspondiente a la región IGS1 con 236 caracteres de los cuales 166 fueron constantes, 39 caracteres fueron variables pero no-informativos y 31 fueron informativos para parsimonia. El árbol de distancias genéticas obtenido con el análisis de Neighbor-joining se muestra en la Figura 8. En el mismo se observa que las secuencias del IGS1 de *P. psidii* se agrupan y se separan de las otras especies de roya conformando una rama con un alto valor de Bootstrap (100%), lo cual confiere robustez a dicho nodo. Entre las secuencias estudiadas, las correspondientes a las cepas UYTB 105 (*M. pungens*), UYTB 109 (*M. pungens*) y UYTB 110 (*M. atropurpureum* var. *octadrum*) se agrupan en una rama con un valor de Bootstrap de 84%.

Para analizar en detalle la variabilidad observada se confeccionó una matriz con las secuencias que presentaron polimorfismo en nucleótido simple (4 secuencias provenientes de *E. globulus*, 2 secuencias provenientes de *E. grandis*, 2 secuencias provenientes de *M. pungens*, 1 secuencia proveniente de *M. atropurpureum* var *octadrum* y 1 secuencia proveniente de *M. glaucescens*) (Tabla 7). Las cepas UYTB 109 (*M. pungens*), UYTB 105 (*M. pungens*), UYTB 110 (*M. atropurpureum* var *octadrum*) y UYTB 106 (*M. glaucescens*) presentaron las mismas substituciones en las posiciones 13 y 14. La cepa UYTB 106 (*M. glaucescens*) presenta además una inserción única (posición 7) y una substitución única (posición 9). A su vez, las cepas UYTB 99 (*E. grandis*) y UYTB 115 (*E. globulus*) presentaron la misma substitución en la posición 17 y las cepas UYTB 103 (*E. grandis*) y UYTB 109 (*M. pungens*) presentaron idéntica substitución en la posición 238. Las cepas UYTB 29 (*E. globulus*) y UYTB 41 (*E. globulus*) presentan una substitución única (posición 12)

y una inserción única (posición 109), respectivamente. En la posición 237, las cepas 103 y UYTB 109 presentan diferentes substituciones. La cepa UYTB 106 (*M. glaucescens*) es la que presentó mayor cantidad de polimorfismos de nucleótido simple.

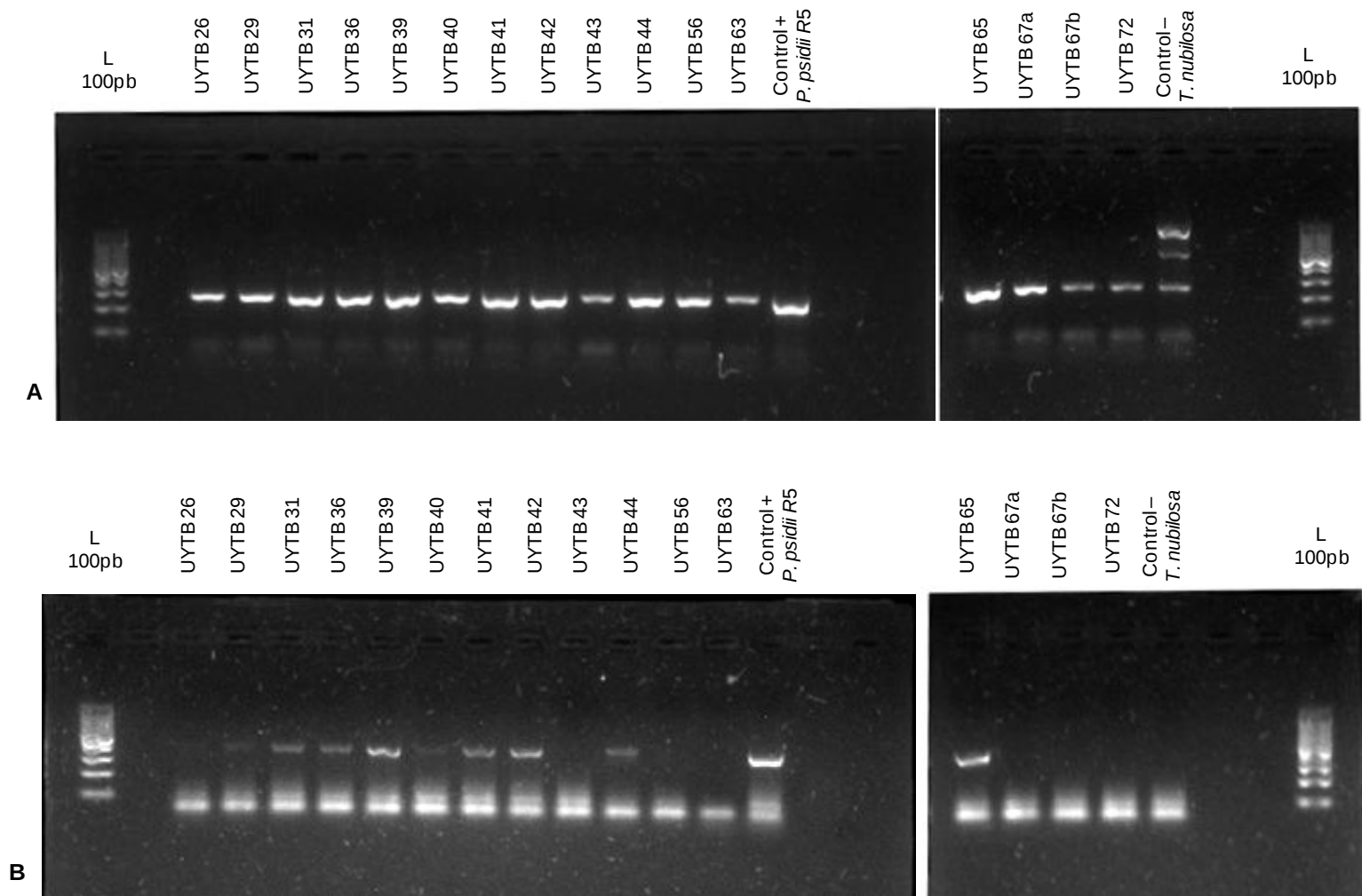
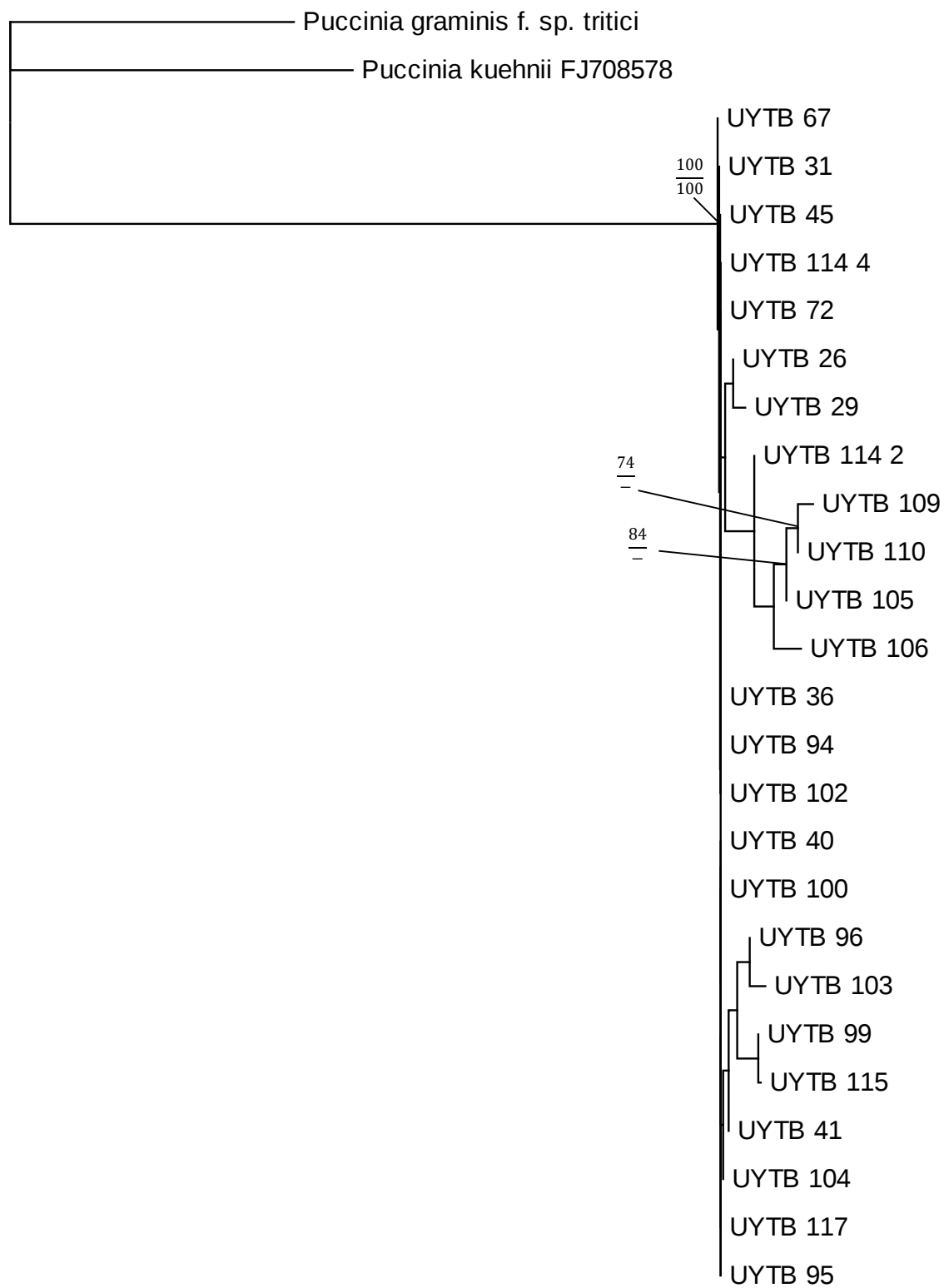


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de la región IGS1 del ADN ribosómico realizada con: A) los cebadores LR12R/MID 01as y B) LR20R/MID 01as.



0.02

Figura 8. Árbol de distancia genética obtenido del análisis Neighbour-joining en base a la región IGS1 de *Puccinia psidii* sobre *Eucalyptus* spp., *Psidium guajava*, *Syzygium jambos* y mirtáceas nativas de Uruguay, junto con secuencias de otras especies de royas. Las secuencias obtenidas en este trabajo están identificadas por el prefijo “UYTB”. Los nodos muestran valores de Bootstrap (>75 %) analizado en base a 1000 réplicas. Los valores sobre las ramas y debajo de éstas corresponden a los de los árboles Neighbor-joining consenso y Máxima Parsimonia consenso (obtenidos con el criterio Bootstrap 50% majority –rule consensus of 100 trees), respectivamente.

Tabla 7. Comparación de polimorfismos en nucleótidos simples de las secuencias del IGS1 del ADN ribosómico. Se incluyó solamente a aquellas secuencias donde se observaron variaciones. Los puntos representan el mismo nucleótido que la cepa tomada como referencia (UY 67) y los guiones representan *gaps*.

	Sitios IGS1								
Cepa	7	9	12	13	14	17	109	237	238
UYTB_67	-	C	C	T	A	T	-	A	G
UYTB_103	.	.	.	.	.	.	.	G	A
UYTB_29	.	.	A	.	.	.	.	.	.
UYTB_99	.	.	.	.	.	C	.	.	.
UYTB_115	.	.	.	.	.	C	.	.	.
UYTB_109	.	.	.	C	T	.	.	C	A
UYTB_105	.	.	.	C	T	.	.	.	.
UYTB_110	.	.	.	C	T	.	.	.	.
UYTB_106	C	T	.	C	T	.	.	.	.
UYTB_41	.	.	.	.	.	.	T	.	.

Análisis de SSRs (Simple Sequence Repeats, microsatélites)

Ocho cepas de *P. psidii* provenientes de *E. globulus* fueron genotipificadas para los microsatélites seleccionados. Las diferencias de más de 2 pb en el tamaño de los fragmentos obtenidos fueron consideradas un alelo diferente. Las muestras analizadas mostraron bajo nivel de polimorfismo, con 2 alelos en general para cada locus y sólo un amplicón, correspondiente a la cepa UYTB 26, mostró diferencias genotípicas con respecto a las demás, comportándose como monomórfica para el locus PpSSR102, con alelos de 287pb en comparación con las demás cepas en las que se observaron alelos de 240-241 pb. Para el resto de los loci analizados no se detectó ningún tipo de variación pero algunos alelos se encuentran por fuera del rango descrito por Zhong *et al.* (2008): PpSSR012, PpSSR087, PpSSR102, PpSSR195, PpSSR208 (Tabla 8), indicando que se trata de nuevos alelos.

Tabla 8. Alelos (tamaño representado por pares de base, pb) obtenidos a partir de *Puccinia psidii*, analizando microsatélites específicos para esta especie (Zhong *et al.*, 2008). El rango de tamaños (pb) de los SSR en el trabajo original se presenta entre paréntesis. En negrita, alelo nuevo.

Cepa	Locus							
	PpSSR012	PpSSR022	PpSSR087	PpSSR102	PpSSR136	PpSSR161	PpSSR195	PpSSR208
UYTB_26	233 – 239	154 – 154	135 - 140	287 – 287	132 - 144	277 - 291	115 - 130	83 - 102
UYTB_29	233 – 239	154 – 154	135 - 140	240 – 241	132 – 144	277 - 291	115 – 130	83 – 102
UYTB_36	233 – 239	154 – 154	135 - 140	240 – 241	132 – 144	277 – 291	115 – 130	83 – 102
UYTB_31	233 – 239	154 – 154	135 - 140	240 – 241	132 – 144	277 – 291	115 – 130	83 – 102
UYTB_39	233 – 239	154 – 154	135 - 140	240 – 241	132 – 144	277 - 291	115 – 130	83 - 102
UYTB_41	233 – 239	154 – 154	135 - 140	240 – 241	132 – 144	277 – 291	115 - 130	83 – 102
UYTB_42	233 – 239	154 – 154	135 - 140	240 – 241	132 – 144	277 – 291	115 – 130	83 – 102
UYTB_45	233 – 239	154 – 154	n/d	n/d	132 – 144	277 - 291	115 - 130	83 - 102
Zhong <i>et al.</i> (2008)	(235 – 258)	(151 – 166)	(143 – 154)	(255 – 295)	(132 – 144)	(276 – 287)	(134 – 145)	(85 – 96)

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman la existencia de variabilidad genética en la población de *P. psidii* presente en diferentes hospederos en Uruguay. Se trata del primer estudio de la variabilidad genética de *P. psidii* mediante el análisis de microsatélites y de la región IGS1 del ADN ribosómico. A su vez, se obtuvieron las primeras secuencias para la región IGS1 de *P. psidii* a nivel mundial.

La sintomatología observada en el campo, tanto en especies de *Eucalyptus* como especies de mirtáceas nativas así como las observaciones morfológicas de las uredosporas y teliosporas (en el caso de *M. pungens*) son consistentes con lo reportado por Coutinho *et al.* (1998) y Alfenas *et al.* (2004). El tipo de infección restringida observada a campo en las mirtáceas nativas en comparación a la observada en *Eucalyptus* es coincidente con lo reportado por Pérez (2008) y podría explicarse por la coevolución que ha tenido este patógeno con los hospederos nativos por tratarse de un patógeno originario de América del Sur.

El análisis de BLASTn de la región ITS del ADN ribosómico y los posteriores análisis filogenéticos permitieron confirmar la identificación de las cepas de *P. psidii* obtenidas en este trabajo ya que todas presentaron fuerte homología con las secuencias de esta especie reportadas en GenBank y agruparon en un único clado con 100 % de soporte estadístico. La baja variabilidad observada para esta región coincide con la reportada en otros trabajos (Langrell *et al.*, 2008), al igual que la presencia de polimorfismos en un único nucleótido (Langrell *et al.*, 2008; Pérez, 2008; Quercine *et al.*, 2014).

La homología presentada por las secuencias de la región IGS1 con la secuencia KF792096 podría estar explicada por una superposición en la amplificación parcial de la subunidad 28S del ADN ribosómico. En el análisis de BLASTn se observa homología en primer lugar con la secuencia KF792096 (únicamente) y seguidamente las secuencias obtenidas en este trabajo presentan homología con secuencias de la región IGS1 del ADN ribosómico de otras especies fúngicas. Los resultados del análisis de la región IGS1 indican que puede existir una especialización entre *Eucalyptus* y mirtáceas nativas ya que dos cepas de *M. pungens* y una cepa de *M. atropurpureum* var. *octandrum* se agrupan formando un clado en común. Estos resultados serían consistentes con los obtenidos por Graça *et al.* (2013) y Ross-Davis *et al.* (2014), quienes evidenciaron una fuerte asociación entre genotipos de *P. psidii* y las especies de hospederos y una baja variabilidad genética entre las cepas provenientes de *Eucalyptus*. Hasta donde se tiene conocimiento no existen otros

estudios en los que se haya analizado la región IGS1 de *P. psidii*, por lo que las secuencias obtenidas en este trabajo son las primeras reportadas para esta especie a nivel mundial. El análisis de la región IGS1 demostró ser una herramienta válida para el estudio de la variabilidad intraespecífica de *P. psidii*, al igual que en el caso de otros patógenos (Jurado *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2001; Yli-Mattila *et al.*, 2004; Braithwaite *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en el análisis de microsatélites mostraron niveles muy bajos de variabilidad, ya que sólo para una cepa (UYTB 26) se observaron diferencias alélicas con respecto a las demás, comportándose como monomórfica para el locus PpSSR102 con un alelo de 287pb. Si bien el número de cepas analizadas es bajo y todas las cepas corresponden a colectas de roya provenientes de *E. globulus*, la variabilidad genética reportada para microsatélites de diferentes especies de *Eucalyptus* en América del Sur es también baja (Ross-Davis *et al.*, 2014; Graça, 2011). A su vez Machado *et al.* (2015a) postulan que las diferencias puntuales en alelos dentro de una población relativamente homogénea podría haberse originado por una mutación puntual y no a recombinación,

Al comparar los resultados obtenidos en este estudio con los rangos alélicos reportados por Zhong *et al.* (2008) para cepas de roya de Hawaii, Brasil y Florida (EEUU) se observan alelos diferentes. Esto indicaría diferencias entre las poblaciones de *P. psidii* en ambos estudios. En el mismo sentido, Ross-Davis *et al.* (2013) plantean que los genotipos multilocus que se encuentran presentes en Australia, el Caribe, México y EEUU están estrechamente relacionados entre sí y que ninguno fue observado en las colectas de América del Sur.

En base a los recientes trabajos sobre la variabilidad genética de *P. psidii* a nivel mundial, para el caso de Uruguay era esperable encontrar un genotipo clonal de *P. psidii* asociado a especies de *Eucalyptus*, el cual correspondería al genotipo que efectuó el “salto” a este hospedero y se perpetuó en el tiempo infectando especies pertenecientes a este género. Por otra parte, también era esperable observar cierto grado de variabilidad entre la población de *P. psidii* en mirtáceas nativas y en *Eucalyptus*, teniendo en cuenta el origen Sudamericano del patógeno. Si bien hoy en día se ha demostrado que en Brasil el “salto de hospedero” de una mirtácea nativa a *Eucalyptus* spp. no tuvo origen en *Ps. guajava* particularmente, aún no está claro de dónde provino y no se descarta que el “salto” se haya dado desde una especie de mirtácea nativa aún no estudiada (Graça *et al.*, 2013). A futuro, sería deseable analizar un mayor número de cepas incluyendo cepas provenientes de diferentes hospederos (introducidos y nativos) en Uruguay, de manera de contrastar los resultados con los obtenidos a nivel internacional.

A partir de los resultados de los análisis de la región IGS1 se puede afirmar que existe variabilidad genética en la población de *P. psidii* en Uruguay al comparar cepas provenientes de mirtáceas nativas con cepas provenientes de *Eucalyptus*. Para comprender el significado biológico de la variabilidad observada, en relación a la virulencia, es vital incluir ensayos de patogenicidad en futuras investigaciones. De esta forma, se podrán seleccionar aquellas cepas que presentaron variabilidad genética en el presente estudio, para ser inoculadas artificialmente sobre diferente material clonal de *Eucalyptus* y otras mirtáceas, con conocida susceptibilidad a *P. psidii*. Aquellas cepas que presenten diferencias en cuanto a su virulencia ante un mismo material susceptible, deberán ser tomadas en cuenta al momento de seleccionar germoplasma de *Eucalyptus* resistente al patógeno, mediante inoculación artificial. Las mirtáceas nativas podrían actuar como un reservorio de diferentes genotipos de *P. psidii* con el potencial de efectuar nuevos “saltos” hacia *Eucalyptus*, por lo que sería deseable repetir este tipo de estudio con cierta periodicidad en el largo plazo. La colección de cepas de *P. psidii* con caracterización genética, producto de esta tesis actuará en futuros estudios de línea de base para contrastar los resultados obtenidos a partir de nuevas colectas. Este tipo de información resulta un aspecto decisivo para el manejo de la enfermedad en plantaciones comerciales de *Eucalyptus* a través de la selección de material resistente y de su inclusión en programas de mejoramiento genético.

CONCLUSIONES

- Se comprobó la existencia de variabilidad genética en la población de *P. psidii* presente en diferentes hospederos en Uruguay.
- Si bien se comprobó la presencia de variabilidad genética, se observó baja variabilidad en la región ITS, en concordancia con trabajos previos.
- El presente trabajo representa el primer estudio de la variabilidad genética de *P. psidii* mediante el análisis de microsatélites en Uruguay y de la región IGS1 del ADN ribosómico a nivel mundial.
- Los resultados obtenidos del análisis de la región IGS1 sugieren que podría existir una especialización del patógeno sobre *Eucalyptus* y mirtáceas nativas, en concordancia con otros trabajos que han utilizado microsatélites.
- Se observó una baja variabilidad genética dentro de la población de *P. psidii* en *Eucalyptus* (tanto para la región IGS1 como para microsatélites), en concordancia con otros trabajos.
- Es vital incluir ensayos de patogenicidad en futuras investigaciones para comprender el significado biológico de la variabilidad observada, en relación a la virulencia.
- La información generada en el presente trabajo resulta un insumo fundamental para el manejo de la enfermedad producida por *P. psidii* en plantaciones comerciales de *Eucalyptus*, a través de la selección de material resistente y de su inclusión en programas de mejoramiento genético.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfenas, A.C., Zauza, E.A.V., Assis, T.F. 2003 - First record of *Puccinia psidii* on *Eucalyptus globulus* and *E. viminalis* in Brazil. *Australasian Plant Pathology* 32: 325-326.
- Alfenas, A.C., Zauza, E.A., Mafia, R.G., Assis, T.F. 2004 - Clonagem e Doenças do Eucalipto. Universidade Federal do Viçosa, Brasil.
- Alonso, R., Bettucci, L. 2009 - First report of the pitch canker fungus *Fusarium circinatum* affecting *Pinus taeda* seedlings in Uruguay. *Australasian Plant Disease Notes* 4: 91-92.
- Aparecido, C.C., Figueiredo, M.B., Furtado, E.L. 2003 - Groups of physiological variability in *Puccinia psidii* populations. *Summa Phytopathologica* 29: 234–238. En: Glen *et al.*, 2007.
- Balmelli, G., Marroni, V., Altier, N., García, R. 2004 - Potencial del mejoramiento genético para el manejo de enfermedades en *Eucalyptus globulus*. *Serie Técnica INIA* nº 143.
- Balmelli, G., Simeto, S., Martínez, G., Torres, D., Pérez, C., Fros, D., Bentancur, O. 2009 - Relevamiento sanitarios de otoño en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus dun nii* en el Sureste y Litoral Oeste. *Serie Actividades de Difusión INIA* nº 594: 51-72.
- Barnes, I., Roux, J., Wingfield, B.D., O'Neill, M., Wingfield, M.J. 2003 - *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 32: 361-366.
- Braithwaite, K., Croft, B., Magarey, R., Scharaschkin, T. 2009 - Phylogenetic placement of the sugarcane orange rust pathogen *Puccinia kuehnii* in a historical and regional context. *Australasian Plant Pathology*. 38: 380-388.
- Bruns, T.D., Vilgalys, R., Barns, S.M., Gonzalez, D., Hibbert, D.S., Lane, D.J. Simon, L.S, Szano, T.M., Weisburg, W.G. & Sogin, M.L. 1992 – Evolutionary relationships within fungi: analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 231-341, EN: *Molecular Identification of Fungi*, Gherbwy & Voigt (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010, pp. 179-193.
- Burgess, T.I., Barber, P.A., Sufaati, S., Xu, D., Hardy, G.E., Dell, B. 2007 - *Mycosphaerella* spp. on *Eucalyptus* in Asia; new species; new hosts and new records. *Fungal Diversity* 24: 135-157.
- Capote, N., Pastrana, A.M., Aguado, A., Sánchez-Torres, P. 2012 - Molecular Tools for Detection of Plant Pathogenic Fungi and Fungicide Resistance. EN: Plant Pathology, Dr. Christian Joseph Cumagun (Ed.), InTech, ISBN: 978-953-51-0489-6, 374pp.
- Carnegie, A.J., Lidbetter, J.R., Walker, J., Horwood, M.A., Tesoriero, L., Glen, M., Priest, M. 2010 - *Uredo rangelii*, a taxon in the guava rust complex, newly recorded on Myrtaceae in Australia. *Australasian Plant Pathology* 39: 463–466.
- Coelho, L., Alfenas, A.C., Ferreira, F.A. 2001 - Physiologic variability of *Puccinia psidii* – the rust of

- Eucalyptus*. *Summa Phytopathologica* 27: 295–300.
- Coutinho, T. A., Wingfield, M.J., Alfenas, A.C., Crous, P.W. 1998 - *Eucalyptus* Rust: A Disease with the Potential for Serious International Implications. *Plant Disease* 82: 819-825.
- Coutinho, T. A., Brady, C. L., Vaart, M., Venter, S. N., Telechea, N., Rolfo, M., Pérez, C., Wingfield, M.J. 2011. A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. *Australasian Plant Pathology* 40: 55-60.
- Cummins, G. B., Hiratsuka, Y. 1983 - Illustrated Genera of Rust Fungi. *American Phytopathological Society*, St Paul, Minnesota.
- DIEA, MGAP, 2015 - Anuario Estadístico Agropecuario 2015.
- Ferreira, F. A. 1983 - Ferrugem do eucalipto. *Revista Árvore* 7: 91-109.
- Ferreira, F.A. 1989 - Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, Sociedad de Investigações Florestais, 570 p.
- Figueiredo, M.B., Coutinho, L.N., Hennen, J.F. 1984 - Estudos para determinação do ciclo vital de *Puccinia psidii* Winter. *Summa Phytopathologica* 10: 53-54
- Figuereido, M.B. 2001 - Life cycle and ecology of *Puccinia psidii*. *Biológico* 63: 69-71.
- Gardes, M., Bruns, T. D. 1993 - ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. 2: 113-118.
- Giblin, F. 2013. Myrtle rust report: New Caledonia. Assessment of myrtle rust situation in New Caledonia. University of the Sunshine Coast Maroochydore, Queensland. Disponible en <http://www.davar.gouv.nc/portal/page/portal/davar/librairie/fichiers/23642181.PDF>.
- Glen, M. 2006 - The use of DNA techniques to identify fungi. EN: *ACIAR Proceedings* 124: 46-55.
- Glen, M., Alfenas, A.C., Zauza, E.A.V., Wingfield, M.J., Mohammed, C. 2007 - *Puccinia psidii*: a threat to Australian environment and economy – a review. *Australasian Plant Pathology* 36: 1-16.
- Graça, R. N. 2011 - Genetic diversity of *Puccinia psidii* populations. PhD tesis, Universidade Federal de Viçosa, Brasil.
- Graça, R. N., Ross-Davis, A. L., Klopfenstein, N. B., Kim, M. S., Peever, T. L., Cannon, P. G., Alfenas, A. C. 2013 - Rust disease of eucalypts, caused by *Puccinia psidii*, did not originate via host jump from guava in Brazil. *Molecular ecology*, 22: 6033-6047.
- Grgurinovic, C.A., Walsh, D., Macbeth, F. 2006 - *Eucalyptus* rust caused by *Puccinia psidii* and the threat it poses to Australia. *EPPO Bulletin* 36: 486-489.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Hibbet, D.S. 1992 – Ribosomal RNA and fungal systematics. *Transactions of the Mycological Society*

- of Japan. 33: 533-556, EN: Molecular Identification of Fungi, Gherbwy & Voigt (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010, pp. 179-193.
- Hillis, D.M., Bull, J.J. 1993 - An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42: 142-152.
- Hodges, Jr.C.S., Alfenas, A.C., Ferreira, F.A. 1986 - The conspecificity of *Cryphonectria cubensis* and *Endothia eugeniae*. *Mycologia*: 343-350.
- James, T.Y., Moncalvo, J., Li, S., Vilgalys, R. 2001 - Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. *Genetics* 157: 149-161.
- Jeffries, M.J., Lawton, J.H. 1984 - Enemy free space and the structure of ecological communities. *Biological Journal of the Linnean Society* 23: 269-286.
- Joffily, J. 1944 - Rust of *Eucalyptus*. *Bragantia* 4:475-487.
- Junghans, D.T., Alfenas, A.C., Brommonschenkel, S.H., Oda, S., Mello, E.J., Grattapaglia, D. 2003 - Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 175-180.
- Jurado, M., Marín, P., Vázquez, C., González-Jaén, M.T. 2010 - Divergence of the IGS rDNA in *Fusarium proliferatum* and *Fusarium globosum* reveals two strain specific non-orthologous types. *Mycological Progress* 11: 101-107.
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H. and Miyata, T. 2005 - MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33: 511-518.
- Kawanishi, T., Uematsu, S., Kakishima, M., Kagiwada, S., Hamamoto, H., Horie, H., Namba, S. 2009 - First report of rust disease on Ohia and the causal fungus, *Puccinia psidii*, in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 75: 428-431.
- Keane, P.J., Kile, G.A., Podger, F.D., Brown, B.N. 2000 - Diseases and Pathogens of Eucalypts. Csiro Publishing. 565p.
- Killgore, E.M., Heu, R.A., 2005 - Ohia rust, *Puccinia psidii* Winter: New Pest Advisory N° 05-04. Hawaii Department of Agriculture.
- Kim, H.J., Choi, Y.K., Min, B.R. 2001 - Variation of the Intergenic Spacer (IGS) region of ribosomal DNA among *Fusarium oxysporum* formae speciales. *The Journal of Microbiology* 39: 265-272.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Stalpers, J.A. 2001 - Dictionary of the fungi. 9th ed. Wallingford, UK: CABI. 655 p.
- Koch De Brotos L., Boasso, C. 1955 – Lista de enfermedades de los vegetales en el Uruguay. Montevideo, Uruguay: Departamento de Agronomía, Laboratorio de fisiología y Patología Vegetal, Ministerio de Ganadería y Agricultura, N° 106:65pp.

- Kropp, B.R.; Albee, S.; Flint, K.M.; Zambino, P.; Szabo, L.J.; Thomson, S.V. 1995 - Early detection of systematic rust infections of Dyers Woad (*Isatis tinctori* L.) using polymerase chain reaction. *Weed Science* 43: 467–472.
- Kropp, B.R., Hansen, D.R., Wolf, P.G., Flint, K.M., Thomson, S.V. 1997 - A Study on the Phylogeny of the Dyer's Woad Rust Fungus and Other Species of *Puccinia* from Crucifers. *Phytopathology* 87: 565-71.
- Langrell, S. R. H., Glen, M., Alfenas, A. C. 2008 - Molecular diagnosis of *Puccinia psidii* (guava rust) –a quarantine threat to Australian eucalypt and Myrtaceae biodiversity. *Plant Pathology*, 57: 687-701.
- Lupo, S.; Pérez, G.; Martínez, S.; Simeto, S.; Rivas, F., Bettucci, L. 2009 - *In vitro* characterization of *Inocutis jamaicensis* and experimental inoculation of *Eucalyptus globulus* standing trees. *Forest Pathology* 39: 293-303.
- Machado, P. D. S., Alfenas, A. C., Alfenas, R. F., Mohammed, C. L., Glen, M. 2015a - Microsatellite analysis indicates that *Puccinia psidii* in Australia is mutating but not recombining. *Australasian Plant Pathology*, 44: 455-462.
- Machado, P. D. S., Glen, M., Pereira, O. L., Silva, A. A., Alfenas, A. C. 2015b - Epitypification of *Puccinia psidii*, Causal Agent of Guava Rust. *Tropical Plant Pathology*, 40: 5-12.
- MacLachlan, J.D. 1938 - A rust of the pimento tree in Jamaica. *Phytopathology* 28: 157-170.
- McTaggart, A. R., Roux, J., Granados, G. M., Gafur, A., Tarrigan, M., Santhakumar, P., Wingfield, M. J. 2015 - Rust (*Puccinia psidii*) recorded in Indonesia poses a threat to forests and forestry in South-East Asia. *Australasian Plant Pathology* DOI 10.1007/s13313-015-0386-z.
- Maier, W., McTaggart, A. R., Roux, J., Wingfield, M.J. 2015 - *Phakopsora myrtacearum* sp. nov., a newly described rust (Pucciniales) on eucalypts in eastern and southern Africa. *Plant Pathology* DOI: 10.1111/ppa.12406.
- Mamani, E., Bueno, N., Faria, D., Guimarães, L., Lau, D., Alfenas, A., Grattapaglia, D. 2010 - Positioning of the major locus for *Puccinia psidii* rust resistance (Ppr1) on the *Eucalyptus* reference map and its validation across unrelated pedigrees. *Tree Genetics & Genomes* 953-962.
- Martins, M.V.V., Silveira, S.F., Maffia, L.A., Rocabado, J.M.A., Mussi-Dias, V. 2010 - Chemical control of guava rust (*Puccinia psidii*) in the Northern Region of Rio de Janeiro State, Brazil. *Australasian Plant Pathology* 40: 48-54.

- Martinez, S. 2006 - The genera *Inocutis* and *Inonotus* (Hymenochaetales) in Uruguay. *Mycotaxon* 96: 1–8.
- Masson, M.V. 2009 - Ferrugem do eucalipto: planejamento evasivo, estimativa de dano e análise da viabilidade do controle químico. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 167p.
- Mitchell, C.E., Power, A.G. 2003 - Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. *Nature* 421: 625-627.
- Morin, L., Talbot, M. J., Glen, M. 2014 - Quest to elucidate the life cycle of *Puccinia psidii* sensu lato. *Fungal biology*, 118: 253-263.
- Narayanasamy, P. 2011 - Assessment of variability in fungal plant pathogens. 1: 245 - 272 EN: *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis*, Narayanasamy (Ed.) Springer-Science Netherlands, 291 pp.
- Old, K. M., Wingfield, J.M., Yuan, Z.Q. 2003 – A Manual of Diseases of *Eucalypts* in South-East Asia. Australian Centre for International Agricultural Research, Center for International Forestry Research, CSIRO, and Forestry and Forest Products.
- Pegg, G. S., Brawner, J. T., Lee, D. J. 2014 - Screening *Corymbia* populations for resistance to *Puccinia psidii*. *Plant Pathology* 63:425-436.
- Perdomo-Sánchez, O., Piepenbring, M. 2008 - A new species of *Puccinia* (Pucciniales, Basidiomycota) and new records of rust fungi from Panama. *Mycological Progress* 7: 161-168.
- Pérez, G. 2006 - Variación intraespecífica de *Inocutis jamaicensis* proveniente de *Eucalyptus globulus*, *Vitis vinifera* y especies nativas. MSc. tesis, Universidad de la República -UdelaR- PEDECIBA- Facultad de Ciencias.
- Pérez, C. 2008 - Relationship between pathogens of *Eucalyptus* and native Myrtaceae in Uruguay. PhD. Thesis, University of Minnesota.
- Pérez, G., Hunter, G., Slippers, B., Pérez, C.A., Wingfield, B., Wingfield, M.J. 2009a - *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa*, the causal agent of *Mycosphaerella* leaf disease (MLD), recently introduced into Uruguay. *European Journal of Plant Pathology* 125: 109-118.
- Pérez, C., Wingfield, M.J., Altier, N.A., Blanchette, R.A. 2009b - *Mycosphaerellaceae* and *Teratosphaeriaceae* associated with *Eucalyptus* leaf diseases and stem cankers in Uruguay. *Forest Pathology* 5: 349-360.
- Pérez, C., Altier, N., Simeto, S., Wingfield, M.J., Blanchette, R.A. - 2011. *Puccinia psidii* infecting cultivated *Eucalyptus* and native myrtaceae in Uruguay. *Mycological Progress*, 10: 273-282.

- Posada, D., Buckley, T. R. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, 53:793-808.
- Posada, D., Crandall, K. A. 1998 - Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818.
- Quecine, M. C., Bini, A. P., Romagnoli, E. R., Andreote, F. D., Moon, D. H., Labate, C. A. 2014 - Genetic Variability in *Puccinia psidii* Populations as Revealed by PCR-DGGE and T-RFLP Markers. *Plant Disease*, 98: 16-23.
- Rayachhetry, M.B., Van, T.K., Center, T.D., Elliott, M.L. 2001 - Host range of *Puccinia psidii*, a potential biological control agent of *Melaleuca quinquenervia* in Florida. *Biological Control* 22: 38-45.
- Roose-Amsaleg, C., de Vallavieille-Pope, C., Brygoo, Y., Levis, C. 2002 - Characterization of a length polymorphism in the two intergenic spacers of ribosomal RNA in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal agent of wheat yellow rust. *Mycological Research* 106: 918-924.
- Ross-Davis, A. L., Graca, R. N., Alfenas, A. C., Peever, T. L., Hanna, J. W., Uchida, J. Y., Hauff, R., Kadooka, C.Y., Kim, M-S., Cannon, P. G., Namba, S., Minato, N., Simeto, S., Pérez, C. A., Rayamajhi, M. B., Morán, M., Lodge, D. J., Arguedas, M., Medel-Ortiz, R., López-Ramírez, M. A., Tennant, P., Glen, M., McTaggart, A., Klopfenstein, N. B. 2013 - Tracking the distribution of the pandemic *Puccinia psidii* genotypes. (Abstr.) *Phytopathology* 103(S2): p123.
- Ross-Davis, A. L., Graca, R. N., Alfenas, A. C., Peever, T. L., Hanna, J. W., Uchida, J. Y., Hauff, R., Kadooka, C.Y., Kim, M-S., Cannon, P. G., Namba, S., Minato, N., Simeto, S., Pérez, C. A., Rayamajhi, M. B., Morán, M., Lodge, D. J., Arguedas, M., Medel-Ortiz, R., López-Ramírez, M. A., Tennant, P., Glen, M., McTaggart, A., Klopfenstein, N. B. 2014 - Genetic and genotypic diversity of *Puccinia psidii* – The cause of guava/eucalypt/myrtle rust – and preliminary predictions of global areas at risk. IUFRO Rust of Forest Trees and Five-Needle Pine Genetics conference proceedings.
- Roux, J., Greyling, I., Coutinho, T.A., Verleur, M., Wingfield, M.J. 2013 - The myrtle rust pathogen, *Puccinia psidii*, discovered in Africa. *IMA Fungus* 4: 155–159.
- Ruiz, R.A.R., Alfenas, A.C., Maffia, L.A., Barbosa, M.M. 1989a - Progresso da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, em condições de campo. *Fitopatologia. Brasileira* 14: 73-81.

- Ruiz, R.A.R., Alfenas, A.C., Ferreira, F.A., Valle, F.X.R. 1989b - Influência de temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. *Fitopatologia Brasileira* 14: 55-61.
- Ruiz, R.A.R., Alfenas, A.C., Ferreira, F.A. 1989c - Effect of temperature, light and inoculum source on teliospore and urediniospore production of *Puccinia psidii*. *Fitopatologia Brasileira* 14: 70-73.
- Simpson, J.A., Thomas, K., Grgurinovic, C.A. 2006 - Uredinales species pathogenic on species of Myrtaceae. *Australasian Plant Pathology* 35: 549-562.
- Slippers, B., Stenlid, J., Wingfield, M.J. 2005 - Emerging pathogens: fungal host jumps following anthropogenic introduction. *Trends in Ecology & Evolution* 20: 420-421.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Staples, R.C. 2000 - Research on the rust fungi during the twentieth century. *Annual Review of Phytopathology* 38: 49-69.
- Takahashi, S.S. 2002 - Ferrugem do eucalipto: Índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionados à intensidade da doença no campo. Botucatu, Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. 101p.
- Tan, M. K., Collins, D., Chen, Z., Englezou, A., Wilkins, M. R. 2014 - A brief overview of the size and composition of the myrtle rust genome and its taxonomic status. *Mycology*, 5: 52-63.
- Telechea, N., Rolfo, M., Coutinho, T.A., Wingfield, M.J. 2003 - *Puccinia psidii* on *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *Plant Pathology* 52:427.
- Tessmann, D.J., Dianese, J.C., Miranda, A.C., Castro, L.H.R. 2001 - Epidemiology of a Neotropical rust (*Puccinia psidii*): periodical analysis of the temporal progress in a perennial host (*Syzygium jambos*). *Plant Pathology* 50: 725-731.
- Uchida, J., Zhong, S., Killgore, E. 2006 - First report of a rust disease on ‘Ohi’a caused by *Puccinia psidii* in Hawaii. *Plant Disease* 90: 524.
- UruguayXXI. 2015 - Sector Forestal. <http://www.uruguayxxi.gub.uy/informacion/wp-content/uploads/sites/9/2015/11/Sector-Forestal-2015-Uruguay-XXI.doc.pdf>
- Vilgalys y Hester, 1990. Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from Several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238-4246.
- Wingfield, M. J., Slippers, B., Hurley, B.P., Coutinho, T.A., Wingfield, B. D., Roux, J. 2008 - Eucalypt pests and diseases: growing threats to plantation productivity. *Southern Forests* 70: 139-144.

- Xavier, A.A. 2002 - Histopatologia da interação *Puccinia psidii* e virulência de isolados do patógeno em espécies de Myrtaceae. PhD thesis, Federal University of Viçosa, Brasil. 71pp.
- Xu, J. 2006 – Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses. *Current Issues in Molecular Biology* 8: 75-90.
- Yli-Mattila, T., R., Mach, L., Alekhina, I. A., Bulat, S. A., Koskinen, S., Kullnig-Gradinger, C.M., Kubicek, C.P., Klemsdal, S.S. 2004 - Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS,[beta]-tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. *International journal of food microbiology* 95: 267-285.
- Zhong, S., Yang, B., Alfenas, A. C. 2008 - Development of microsatellite markers for the guava rust fungus, *Puccinia psidii*. *Molecular ecology resources*, 8: 348-350.
- Zhong, S., Yang, B., Puri, K. D. 2011 - Characterization of *Puccinia psidii* isolates in Hawaii using microsatellite DNA markers. *Journal of General Plant Pathology*, 77: 178-181.
- Zhuang, J-Y., Wei, S-X. 2011 - Additional materials for the rust flora of Hainan Province, China. *Mycosystema* 30: 853–860.

ANEXO 1

Protocolo de extracción de ADN a partir de esporas de *P. psidii*

D. Torres-Dini, N. Nikichuk, 2011

A partir de pústulas de esporas de *P. psidii* almacenadas a -80 °C en forma individual:

1. Transferir cada pústula con esporas de *P. psidii* a un tubo Eppendorf de 2 ml estéril y agregar 3 bolitas de borosilicato (Sigma-Aldrich) estériles y 25 mg de tierra de diatomeas (Sigma-Aldrich).
2. Realizar la ruptura con TissueLyser II (QIAGEN) durante 3 min. a máxima frecuencia (30 Hz).
3. Agregar 700 µl de CTAB 2% y 1,4 µl de beta mercapto etanol. Colocar en baño maría a 65 °C durante 30 min.
4. Agregar 600 µl de CIA 24:1, mezclar por inversión durante 5 minutos y centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos.
5. Transferir la fase superior a un nuevo tubo Eppendorf de 2 ml estéril.
6. Agregar 2/3 de isopropanol frío e incubar a -20°C durante 2 horas, luego centrifugar a 7500 rpm durante 5 minutos
7. Lavar con 1 ml de etanol 70%, centrifugar 1 minuto a 14000 rpm.
8. Secar el pellet, agregar 25 µl de ARNasa e incubar durante 60 minutos a 37 °C.

ANEXO 2

Condiciones de la reacción de PCR y programas de ciclado utilizados para el análisis de la región ITS de *P. psidii*

La reacción de PCR para los cebadores ITS1F/ RUST1 se realizó en una mezcla de reacción con un volumen final de 50 µl constituida por: 5,0 µl de buffer de PCR 10x, 3 µl de MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU), 8 µl de desoxirribonucleótidos (10 mM) (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU), 0,1 µl de cada cebador (25 mM), 0,3 µl de enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU), 30,5 µl de agua destilada estéril y 3,0 µl de ADN de la muestra. Para los cebadores PR1/PR2 la reacción de PCR se realizó en una mezcla de reacción con un volumen final de 20 µl constituida por: 2,0 µl de buffer de PCR 10x, 0,6 µl de MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU), 0,4 µl de desoxirribonucleótidos (10 mM) (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU), 0,08 µl de cada cebador (25 mM), 0,2 µl de enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU), 15,64 µl de agua destilada estéril y 1,0 µl de ADN de la muestra. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Corbett Research Palm Cyclyer, modelo CG1-96 (Corbett Research, AG, Australia) con los siguientes parámetros, según el par de cebadores:

- 1) para los cebadores ITS1F/ RUST1 de modificaron algunos parámetros de Kroop *et al.*, 1997: 1,25 minutos a 95°C para la desnaturalización inicial seguidos de 13 ciclos de 35 segundos a 95°C, 55 segundos a 45°C, 45 segundos a 72 °C, luego 13 ciclos de 35 segundos a 95°C, 55 segundos a 45°C, 120 segundos a 72 °C seguidos de 9 ciclos de 35 segundos a 95°C, 55 segundos a 45°C, 180 segundos a 72 °C. Finalmente una extensión de 20 minutos a 72°C).
- 2) para los cebadores PR1/PR2 de acuerdo a Pérez *et al.*, 2011: 2 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial seguidos de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 44°C, 2 minutos a 72 °C. Finalmente una extensión de 10 minutos a 72°C seguidos de 2 minutos a 4°C.

ANEXO 3

Condiciones de la reacción de PCR y programas de ciclado utilizados para el análisis de la región IGS1 de *P. psidii*

Cada reacción de PCR para ambos pares de cebadores LR12R/ MId 01as y LR20R/Mid 01as se realizó en una mezcla de reacción con un volumen final de 20 µl constituida por: 2,0 µl de buffer de PCR 10x, 0,6 µl de MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU), 0,4 µl de desoxirribonucleótidos (10 mM) (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU), 0,08 µl de cada cebador (25 mM), 0,2 µl de enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU), 15,64 µl de agua destilada estéril y 1,0 µl de ADN de la muestra. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Corbett Research Palm Cycler, modelo CG1-96 (Corbett Research, AG, Australia) con los siguientes parámetros, según el par de cebadores:

- 1) para los cebadores LR12/Mid 01as de acuerdo a Vilgalys y Hester (1990): 3 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 50°C, 1 minuto a 72 °C. Finalmente una extensión de 7 minutos a 72°C.
- 2) para los cebadores LR20R/Mid 01as de acuerdo a Vilgalys y Hester (1990): 3 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 45°C, 1 minuto a 72 °C. Finalmente una extensión de 7 minutos a 72°C.

ANEXO 4

Condiciones de la reacción de PCR y programas de ciclado utilizados para el análisis de los microsatélites SSR de *P. psidii*

Las reacciones de PCR para cada microsatélite se realizó en una mezcla de reacción con un volumen final de 15 µl constituida por: 1,5 µl de buffer de PCR 10x, 1,8 µl de MgCl₂ (25 mM) (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU), 2,4 µl de desoxirribonucleótidos (5 mM) (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU), 1 µl de cada cebador (*forward* y *reverse*) del microsatélite (10 mM), 0,2 µl de enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU), 6,1 µl de agua destilada estéril y 1,0 µl de ADN de la muestra. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Corbett Research Palm Cycler, modelo CG1-96 (Corbett Research, AG, Australia) con los siguientes parámetros, de acuerdo a Zhong *et al.* (2008): 5 minutos a 95°C para la desnaturalización inicial seguidos de 3 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C, 1,20 minutos a 72 °C, luego 33 ciclos de 15 segundos a 94°C, 15 segundos a 52°C, 45 segundos a 72 °C. Finalmente una extensión de 10 minutos a 72°C.