

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL MARCHITAMIENTO POR *Ceratocystis*
EN EUCALIPTO**

por

Rossana Giselle REYNA ÁVILA

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

MONTEVIDEO

URUGUAY

julio 2015

Tesis aprobada por el tribunal integrado por:

Lic. Biol. MSc. PhD. Guillermo Pérez

Ing. Agr. MSc. PhD. Gustavo Balmelli

Ing. Agr. MSc. PhD. Nora Altier

El 7 de agosto de 2015

Autor/a: Ing. Agr. Rossana Reyna

Director: Ing. Agr. MSc. PhD. Carlos Pérez

Dedico este trabajo a Martina la luz de mi vida...

AGRADECIMIENTOS

A Carlos Pérez por su orientación y apoyo durante todo el desarrollo de la Maestría, a Michael Wingfield, Teboho Letsoalo y Jolanda Roux por sus aportes a este trabajo y su contribución a mi capacitación, a Cintia Palladino y Andrés Villar compañeros de maestría, a Lorena San Román, Ana de Armas, Pilar Gasparri y Alejandro Vidal amigos y compañeros que contribuyeron con su ayuda a este trabajo, a Joaquin Dutour y Oscar Bentancur por su contribución en el análisis estadístico, a las empresas Cambium y Weyerhaeuser Productos que cedieron sus campos para los estudios, a UPM-Forestal Oriental por la financiación, recursos y apoyo durante todo el desarrollo de mi Maestría, a la Sociedad de Productores Forestales, a Guillermo Pérez, Raquel Alonso, Démian Gómez y Sofía Simeto por sus aportes y sugerencias, a Jorge Martínez Haedo y Giovanni Vargas por su disposición brindando información para este estudio, a mi familia en especial a mis padres, a Martina y Federico por su soporte fundamental en este proceso y de mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VII
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
A. IMPORTANCIA DEL EUCALIPTO EN URUGUAY.....	1
B. MARCHITAMIENTO VASCULAR POR <i>Ceratocystis</i>	1
C. IMPORTANCIA DEL MARCHITAMIENTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE EUCALIPTO.....	2
D. SÍNTOMAS CARACTERÍSTICOS DE LA ENFERMEDAD.....	3
E. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.....	3
II. <u>ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL MARCHITAMIENTO POR</u> <u><i>Ceratocystis fimbriata s.l. EN Eucalyptus grandis</i></u>	6
A. RESUMEN.....	6
B. SUMMARY.....	7
C. INTRODUCCIÓN.....	8
D. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
1. <u>Estacionalidad de las infecciones</u>	11
2. <u>Evolución de los síntomas en el tiempo</u>	13
a. Inoculación de árboles a campo.....	13
b. Inoculaciones múltiples.....	15
3. <u>Prospección de plantaciones con intervención</u>	15
E. RESULTADOS.....	17
1. <u>Estacionalidad de las infecciones</u>	17
2. <u>Evolución de los síntomas en el tiempo</u>	20
a. Inoculaciones de árboles a campo.....	20
b. Inoculaciones múltiples.....	22
3. <u>Prospección de plantaciones con intervención</u>	24
F. DISCUSIÓN.....	32

	G. BIBLIOGRAFÍA.....	37
III.	<u>AGRESIVIDAD DE <i>Ceratocystis fimbriata</i> s.l. Y CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA GENÉTICA DE <i>Eucalyptus grandis</i> AL MARCHITAMIENTO POR <i>Ceratocystis</i></u>	41
	A. RESUMEN.....	41
	B. SUMMARY.....	42
	C. INTRODUCCIÓN.....	43
	D. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
	1. <u>Agresividad de <i>Ceratocystis fimbriata</i> s. l.</u>	45
	a. Colección de estudio.....	45
	b. Inoculación de plantines para caracterizar agresividad de cepas.....	46
	2. <u>Caracterización de la resistencia de distintos genotipos de <i>E. grandis</i></u>	47
	E. RESULTADOS.....	49
	1. <u>Agresividad de <i>Ceratocystis fimbriata</i> s. l.</u>	49
	2. <u>Caracterización de la resistencia de distintos genotipos de <i>E. grandis</i></u>	52
	F. DISCUSIÓN.....	54
	G. BIBLIOGRAFÍA.....	56
IV.	<u>DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES GLOBALES</u>	58
V.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	60

RESUMEN

Eucalyptus es uno de los géneros de madera dura más ampliamente plantado a nivel mundial. En Uruguay el marchitamiento del eucalipto por *Ceratocystis* fue reportado en el año 2003, contándose con escasa información acerca de la epidemiología de esta enfermedad. Los objetivos del presente estudio fueron: i) determinar la estacionalidad en la ocurrencia de infecciones, ii) conocer la evolución de los síntomas en el tiempo, iii) determinar si existe una asociación estricta entre los eventos de infección y la tarea de poda, iv) caracterizar la agresividad de cepas del patógeno, y v) explorar la resistencia genética de distintos genotipos de *Eucalyptus grandis* frente a esta enfermedad. Para ello, durante el período 2012-2014, se instalaron árboles trampa, registrándose mensualmente la ocurrencia de infección por *Ceratocystis*. Se realizaron inoculaciones artificiales con uno, tres y cinco disco de agar con micelio de *Ceratocystis* por árbol en una plantación de *E. grandis* clonal y paralelamente se realizaron prospecciones en plantaciones de *Eucalyptus* en el norte de Uruguay. Se evaluó la agresividad de diferentes cepas de *Ceratocystis fimbriata* s.l., seleccionando las de mayor agresividad, para luego evaluar la resistencia de distintos genotipos de *E. grandis*. Los resultados obtenidos indican que existe estacionalidad de las infecciones, con un período sin infecciones en los meses con bajas temperaturas. Se registró muerte de árboles inoculados en verano a los 120 días post inoculación, no así en los inoculados en invierno. Además se infiere que múltiples infecciones en un mismo árbol favorecerían la colonización y posterior muerte del árbol. Asimismo se determinó que las infecciones no están estrictamente asociadas a las tareas de poda. Se observaron diferencias significativas en la agresividad de las cepas evaluadas, así como, diferencias en susceptibilidad de los genotipos de *E. grandis* evaluados, sin observarse interacción cepa x genotipo, indicando que los genotipos se comportarían de igual manera independientemente de la cepa inoculada. La existencia de resistencia frente a *Ceratocystis fimbriata* s.l. observada en los diferentes genotipos representa una importante herramienta para el manejo de esta enfermedad, permitiendo asistir a los programas de mejoramiento tendientes a minimizar el impacto de esta enfermedad en las plantaciones de *Eucalyptus*.

Palabras clave: patología forestal, silvicultura, inoculación artificial, resistencia genética.

Epidemiological studies of *Ceratocystis* wilt on *Eucalyptus*

SUMMARY

Eucalyptus is one of the most widely planted hardwood genera worldwide. *Ceratocystis* wilt was first reported in Uruguay in 2003, however very little is known about its epidemiology. The objectives of this study were to: i) determine the seasonality of infections, ii) study the evolution of symptoms over time, iii) determine whether there is a strict association between infection events and pruning, iv) characterize the aggressiveness of pathogen isolates, and v) explore the genetic resistance of different genotypes of *Eucalyptus grandis* against this disease. During 2012-2014 tree traps were settled monthly, registering occurrence of *Ceratocystis* infections. Artificial inoculations with one, three and five *Ceratocystis* mycelial plugs per tree, were performed in clonal *E. grandis* in the field, and surveys were conducted in *Eucalyptus* plantations in northern Uruguay. Aggressiveness of different isolates of *Ceratocystis fimbriata* s.l. was evaluated and then the most aggressive isolates were selected to evaluate the resistance of different genotypes of *E. grandis*. Results indicate seasonality of infections, with a period without infection in low temperature months. Death of artificially inoculated trees was not observed when inoculated in winter but in summer inoculations 120 days after inoculation. Moreover, it was inferred that multiple infection sites on the same tree favors colonization and subsequent tree death. Infections were not strictly associated with pruning. Significant differences in aggressiveness of tested isolates were observed as well as differences in susceptibility of *E. grandis* genotypes. Interaction of isolate x genotype was not observed, thus, genotypes behave similarly regardless of the inoculated isolate. The existence of genetic resistance against *Ceratocystis fimbriata* s.l. represents an opportunity for disease management, and will assist to improvement programs aiming to minimize the impact of this disease in *Eucalyptus* plantations.

Keywords: forest pathology, silviculture, artificial inoculation, genetic resistance.

I. INTRODUCCIÓN

A. IMPORTANCIA DEL EUCALIPTO EN URUGUAY

Eucalyptus es uno de los géneros de madera dura más ampliamente plantado a nivel mundial. En el año 2009 las plantaciones con especies de este género alcanzaron los 20 millones de hectáreas (Naidoo *et al.* 2014). Uruguay no es ajeno a dicha tendencia, donde el área forestada con *Eucalyptus* spp. ha aumentado de forma vertiginosa en los últimos 20 años, alcanzando las 726.323 ha en el año 2012 según DIEA (2014). Diversas especies han sido plantadas, aunque con predominancia de *E. globulus* y *E. grandis* (DGF, 2012b). Este crecimiento permitió que en el año 2012, el rubro forestal se posicionara como el cuarto rubro exportador luego de los granos, la carne y los productos lácteos, alcanzando exportaciones por valor de 595 millones de dólares, sin incluir las exportaciones de pasta de celulosa desde zonas francas (DIEA, 2014).

B. MARCHITAMIENTO VASCULAR POR *Ceratocystis*

Aunque en Uruguay *Eucalyptus* spp. se encuentra alejado de sus enemigos naturales, plantar estas especies en nuevos sitios puede exponerlos a nuevas enfermedades ante las cuales pueden carecer de resistencia o bien pueden quedar expuestos ante un reencuentro con patógenos de su lugar de origen, mediante introducción accidental de los mismos al nuevo ambiente (Wingfield y Wingfield, 1999). A su vez, el hecho de que las plantaciones comerciales se basen en una acotada base genética, trae aparejado que frente al encuentro o reencuentro con dichos patógenos se puedan producir grandes pérdidas (Wingfield, 1999; Wingfield y Wingfield, 1999).

En los últimos años se han constatado diversas problemáticas sanitarias en las plantaciones. Uno de los problemas que afectan las plantaciones de *Eucalyptus grandis* en el norte del país es el marchitamiento por *Ceratocystis*. Esta enfermedad fue detectada por primera vez en el año 2001 por Barnes *et al.* (2003b), ocasionando la muerte de árboles podados de *E. grandis* de 1 a 5 años de edad, en el Departamento Rivera. En aquel momento se identificó como agente causal a *Ceratocystis fimbriata sensu lato*.

Ceratocystis fimbriata sensu stricto es la especie tipo de *Ceratocystis fimbriata sensu lato* descrita para boniato (*Ipomoea batatas*) en el año 1890 (Wingfield *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 2003). Si bien, Webster y Butler (1967) consideraban *Ceratocystis fimbriata* como una única

especie muy diversa, que contaba con varias cepas diferentes con características en común como la interfertilidad y otras características de su estado perfecto como la uniformidad morfológica de los peritecios y ascosporas, Wingfield *et al.* (1996) sugieren que *Ceratocystis fimbriata* podría ser considerada un complejo de especies que representa varias especies morfológica y ecológicamente similares (*Ceratocystis fimbriata sensu lato*). A través de análisis filogenéticos, Harrington (2000) proponen que hay varias especies crípticas bajo el nombre *Ceratocystis fimbriata*, con hospederos y distribuciones geográficas únicas, mencionando cuatro grupos o clados filogenéticos: Latino América, Norte América, Asia y la especie *Ceratocystis albifundus* de África. A través del estudio de datos de secuenciación de ADN, se ha confirmado que *Ceratocystis fimbriata* representa un complejo de especies (van Wyk *et al.*, 2009), cuya fuerza de especiación más fuerte es la especialización hacia el hospedero (Harrington, 2000; Baker *et al.*, 2003).

Ceratocystis fimbriata s.l. ha sido reportada en una gran diversidad de hospederos (Wingfield *et al.*, 1996). En *Eucalyptus* spp. ha sido reportada en Australia en *E. sieberi* y *E. globoidea* (Kile *et al.*, 1996), Brasil en *Eucalyptus* spp. (Ferreira *et al.*, 1999 citado por Ferreira *et al.*, 2005), Colombia en *E. grandis* (Rodas *et al.*, 2008), Congo en híbridos de *E. urophylla* x *E. pellita* y *E. tereticornis* x *E. grandis* (Roux *et al.*, 2000), China en híbridos de *E. urophylla* x *E. grandis* (Chen *et al.*, 2013), Ecuador en *E. deglupta* (van Wyk *et al.*, 2010), Indonesia y Thailandia en *Eucalyptus* spp. (van Wyk *et al.*, 2012), Sudáfrica en *E. grandis* (Roux *et al.*, 2004), Uganda en *E. grandis* (Roux *et al.*, 2001), Uruguay en *E. grandis* (Barnes *et al.*, 2003b) y Venezuela en híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* (van Wyk *et al.*, 2009).

C. IMPORTANCIA DEL MARCHITAMIENTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE EUCALIPTO

En eucalipto, *C. fimbriata* causa la enfermedad llamada marchitamiento por *Ceratocystis*, la cual es considerada una de las principales enfermedades del cultivo clonal de Eucalipto (*Eucalyptus* spp. e híbridos) en Brasil (Mafia *et al.*, 2011; Mafia *et al.*, 2013 y Ferreira *et al.*, 2013a). Se han registrado mortandades de más del 40 % en plantaciones monoclonales de 18 meses de edad, en Bahía (Ferreira *et al.*, 2006). A su vez, Ferreira *et al.* (2007), estimaron reducciones en rendimiento volumétrico de un clon de *E. grandis* x *E. urophylla* de hasta un 58 %. Por su parte, Mafia *et al.* (2013) estimaron reducciones en rendimiento volumétrico de un

clon de híbrido de *E. grandis* de hasta 87 % causado por esta enfermedad. Alfenas y Ferreira (2008) mencionan además pérdidas de 13,7 % en rendimiento pulvable.

D. SÍNTOMAS CARACTERÍSTICOS DEL MARCHITAMIENTO POR *Ceratocystis*

La sintomatología del marchitamiento por *Ceratocystis* se caracteriza por el marchitamiento de ramas o de toda la copa de los árboles (Ferreira *et al.*, 2006), manteniéndose las hojas adheridas a las ramas, pudiendo llevar a la muerte del árbol (Mafia *et al.*, 2011). Puede observarse, además, la depresión de la corteza a consecuencia de la muerte del cambium vascular (Ferreira *et al.*, 2013b).

Al realizar un corte transversal del leño se observan estrías de decoloración radial, este oscurecimiento de los vasos es la consecuencia del transporte de sustancias producto de la oxidación y polimerización de compuestos fenólicos del árbol (Tumura *et al.*, 2012; Mafia *et al.*, 2013) y por la pigmentación de las hifas y esporas del patógeno (Ferreira *et al.*, 2013b).

El marchitamiento de los árboles es el resultado del bloqueo de los haces vasculares por el crecimiento del micelio del hongo que impide que el agua absorbida por las raíces llegue a la parte aérea de la planta (Tumura *et al.*, 2012). Si este bloqueo se produce en la parte alta del árbol se puede observar la muerte del ápice. En estos casos, por un desbalance hormonal, se produce la emisión de brotes epicórmicos en la parte media y basal del fuste pero si la obstrucción de los vasos se da en la base del fuste o en sus raíces el árbol muere (Ferreira *et al.*, 2006).

E. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

Kile (1993) menciona que para que ocurra la infección por *Ceratocystis* en plantas leñosas, generalmente se requiere exposición del cambium y del xilema. Heath *et al.* (2009) mencionan como posibles vías para que se produzca la infección, heridas originadas por daños ambientales como viento o granizo, rajaduras por crecimiento de los árboles, daño por insectos u otros animales, o por actividad humana como injertos o poda, siendo también común la infección de tocones recientemente cosechados.

Los insectos juegan un rol importante en la dispersión de esta enfermedad (Kile, 1993). Dentro de estos insectos se mencionan insectos inespecíficos como moscas (Diptera) y escarabajos (Coleoptera: Nitidulidae) (Barnes *et al.*, 2003a; Kamgam *et al.*, 2013) y en menor

medida los escarabajos de Ambrosia (Coleóptera: Curculionidae: Scolytinae y Platypodinae) (Firmino *et al.*, 2013). Estos insectos visitan las heridas de las plantas enfermas en cuyos cuerpos se adhieren las masas de ascosporas producidas en los ápices de los peritecios de *Ceratocystis*, llevando consigo al hongo hacia otras heridas del mismo árbol u otros árboles de la zona. De esta forma la diseminación ocurre en forma pasiva, lo cual explica la no especificidad del vector. Esta relación entre el insecto y el hongo se ve favorecida por la producción de compuestos aromáticos por parte del hongo que atrae a los insectos (Barnes *et al.*, 2003a).

Otra vía de diseminación mencionada por Ferreira *et al.* (2013b), es a través de contacto radicular. También las herramientas utilizadas en tratamientos culturales, como cosecha o manejo de rebrotes, pueden diseminar al patógeno a través del aserrín contaminado con aleurioconidios. En Brasil, el traslado de plantines asintomáticos o sintomáticos es considerada una de las principales vías de diseminación de la enfermedad hacia diferentes zonas de país (Ferreira *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2013a; Ferreira *et al.*, 2013b; Harrington *et al.*, 2011).

En Uruguay, desde su reporte, en la región norte del país, se registran anualmente ataques por *Ceratocystis fimbriata*, causando la muerte de árboles con niveles de incidencia variable según el año, y la genética del eucalipto entre otros factores (Carlos Pérez com. pers.). Estas epidemias, han estado asociadas mayormente a eventos de poda, con la concomitante generación de heridas, y exposición del xilema. La información epidemiológica de esta enfermedad para Uruguay es limitada, desconociéndose tanto los momentos de infección, como la evolución de los síntomas en el campo, la eficiencia de la resistencia genética como herramienta de manejo, así como la asociación estricta entre la ocurrencia de la infección con eventos de poda.

El presente estudio tuvo por objetivo generar información epidemiológica sobre el marchitamiento vascular del eucalipto que permita minimizar su impacto sobre la producción de madera. Específicamente se buscó determinar si existe estacionalidad en la ocurrencia de infecciones, conocer la evolución de los síntomas en el tiempo, y determinar si existe una asociación estricta entre los eventos de infección y la tarea de poda. Paralelamente, se ajustó un método de inoculación artificial que permitió caracterizar la agresividad de distintas cepas

de *Ceratocystis* colectadas desde árboles con síntoma, así como explorar la posibilidad de manejar esta enfermedad mediante resistencia genética.

II. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL MARCHITAMIENTO POR *Ceratocystis* EN *Eucalyptus grandis*¹

A. RESUMEN

Eucalyptus es uno de los principales géneros forestales plantados en Uruguay. Reportado en el año 2003, el marchitamiento por *Ceratocystis* es una de las enfermedades que afectan estas plantaciones, siendo escasa la información acerca de la epidemiología de la enfermedad. Los objetivos del presente estudio fueron determinar la estacionalidad en la ocurrencia de infecciones, conocer la evolución de los síntomas en el tiempo, y determinar si existe una asociación estricta entre los eventos de infección y la tarea de poda. Para ello, en el período diciembre 2012 a octubre 2014 se instalaron árboles trampa, registrándose mensualmente la ocurrencia de infección por *Ceratocystis*. Se realizaron inoculaciones artificiales con uno, tres y cinco disco de agar con micelio de *Ceratocystis* por árbol en *E. grandis* clonal. Paralelamente, se realizaron, prospecciones en plantaciones de *E. grandis* en el norte de Uruguay. Los resultados obtenidos indican que existe estacionalidad de las infecciones, con un período sin infecciones en los meses con bajas temperaturas. En las inoculaciones artificiales de verano se registró la muerte de árboles a los 120 días post-inoculación, no así en las inoculaciones de invierno. Los resultados obtenidos permiten inferir que múltiples sitios de infección simultáneos favorecerían la rápida colonización y obstrucción del tejido del árbol, provocando su posterior muerte. Asimismo se determinó que las infecciones no están estrictamente asociadas a las tareas de poda. La información aquí generada permite tener una mayor comprensión de la enfermedad, aportando elementos claves para su manejo.

Palabras clave: patología forestal, silvicultura, inoculación artificial.

¹ Este capítulo fue escrito bajo el formato de Artículo de investigación de la revista Agrocencia Uruguay

EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF *Ceratocystis* WILT ON *Eucalyptus grandis*

B. SUMMARY

Eucalyptus is one of the most planted genera in Uruguay, being *Ceratocystis* wilt one of the diseases affecting these plantations. *Ceratocystis* wilt, was first reported in Uruguay in 2003, however very little is known about its epidemiology. The objectives of this study were to determine the seasonality of infections, to evaluate the evolution of symptoms over time, and to determine whether there is a strict association between infection events and pruning. Between December 2012 and October 2014, tree traps were settled monthly, registering occurrence of *Ceratocystis* infections. Artificial inoculations were performed with *Ceratocystis* mycelial plug in clonal *E. grandis*, inoculated with one, three and five mycelial plugs per tree. At the same time, surveys were conducted in *E. grandis* plantations, located in northern Uruguay. Results indicate the existence of seasonality on the infections, with no-infection observed in low temperature months. Dead trees were recorded after 120 days when inoculated in summer but not in winter inoculated trees. Results also suggest that multiple infection sites favor a rapid colonization and xylem block out, causing subsequent wilting and death of the tree. It was also determined that infections are not strictly related to pruning. Our results acknowledge a greater understanding of the disease, and provide key elements for its management.

Keywords: forest pathology, silviculture, artificial inoculation.

C. INTRODUCCIÓN

En Uruguay el área forestada ha aumentado de forma vertiginosa en los últimos 20 años, principalmente con especies de los géneros *Pinus* y *Eucalyptus*, siendo este último el género dominante, con 726.323 ha en el año 2012 según DIEA (2014). Las especies más utilizadas son *E. globulus* y *E. grandis* y en menor proporción *E. dunnii*, entre otras especies (DGF, 2012b).

Dichas plantaciones están siendo afectadas por un diverso grupo de enfermedades, dentro de las cuales el marchitamiento por *Ceratocystis* se ha vuelto una de las principales enfermedades en la producción de *E. grandis* en el norte del país. El primer reporte de esta enfermedad en Uruguay fue realizado por Barnes *et al.* (2003b), como resultado de una severa epidemia que causó la muerte de árboles podados de *E. grandis* de 1 a 5 años de edad en los Departamentos de Rivera y Tacuarembó. El organismo causal fue identificado como *Ceratocystis fimbriata* s.l.

A nivel mundial *Ceratocystis fimbriata* s.l. ha sido reportado sobre *Eucalyptus* spp. en Australia (Kile *et al.*, 1996), Brasil (Ferreira *et al.*, 1999, citado por Ferreira *et al.*, 2005) Colombia (Rodas *et al.*, 2008), Congo (Roux *et al.*, 2000), China (Chen *et al.*, 2013), Ecuador (van Wyk *et al.*, 2010) Indonesia y Tailandia (van Wyk *et al.*, 2012), Sudáfrica (Roux *et al.*, 2004), Uganda (Roux *et al.*, 2001), Uruguay (Barnes *et al.*, 2003b) y Venezuela (van Wyk *et al.*, 2009). El marchitamiento por *Ceratocystis fimbriata* es considerada una de las principales enfermedades del cultivo clonal de eucalipto en Brasil (Mafia *et al.*, 2011; Mafia *et al.*, 2013; Ferreira *et al.* 2013a).

La sintomatología del marchitamiento por *Ceratocystis* se caracteriza por el marchitamiento de ramas, o de toda la copa de los árboles, manteniéndose las hojas adheridas a las ramas, pudiendo llevar a la muerte de los árboles. En un corte transversal del fuste se puede observar una decoloración radial estriada (Ferreira *et al.*, 2006 y Mafia *et al.*, 2011). El marchitamiento de los árboles se debe al bloqueo de los vasos por el crecimiento del micelio del hongo que impide que el agua absorbida por las raíces llegue a la parte aérea de las plantas (Tumura *et al.*, 2012). En este sentido, dependiendo de la ubicación de ese bloqueo es que se produce la muerte total del árbol o solamente la muerte de parte de la copa, y la posterior brotación de yemas epicórmicas (Ferreira *et al.*, 2006).

Los insectos juegan un rol importante en la diseminación del patógeno (Kile, 1993), mencionándose insectos como moscas (Diptera) y escarabajos (Coleoptera: Nitidulidae) (Barnes *et al.*, 2003a; Kamgam *et al.*, 2013), y en menor medida los escarabajos de Ambrosia (Coleóptera: Curculionidae: Scolytinae y Platypodinae) (Firmino *et al.*, 2013). Los insectos visitan las heridas de las plantas enfermas, donde *Ceratocystis* produce peritecios con cuello largo que permite exponer las ascosporas de forma que cuando los insectos circulan por el sustrato, entran en contacto con estas fructificaciones, adhiriéndose las esporas a su cuerpo. Luego dicho insecto visita heridas de otro árbol, dispersando de esta forma al patógeno (Harrington, 2008). Esta relación entre el insecto y el hongo se ve favorecida por la producción de compuestos aromáticos del hongo que atrae a los insectos (Barnes *et al.*, 2003a).

Como otras posibles vías de diseminación Ferreira *et al.* (2013b) mencionan el contacto radicular, la utilización de herramientas infectadas en tratamientos culturales, como cosecha o manejo de rebrotes, dándose la diseminación a través del aserrín presente en las herramientas contaminadas con aleuroconidios. Se menciona además, el traslado de plantines asintomáticos o sintomáticos como una de las principales vías de diseminación de la enfermedad en diferentes zonas de Brasil (Ferreira *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2013a; Ferreira *et al.*, 2013b y Harrington *et al.*, 2011). Según Harrington (2013), los ciclos de la enfermedad causadas por *Ceratocystis* pueden ser variables y complejos debido a la diversidad de fuentes de inóculo, y de mecanismos de dispersión, ocurriendo una epidemia cuando varios de los factores coinciden en el mismo tiempo y espacio.

Las heridas en los árboles juegan un rol primordial en la ocurrencia de la infección y posterior desarrollo de la enfermedad. Kile (1993) menciona que para que ocurra la infección por *Ceratocystis* en plantas leñosas es necesaria la exposición del tejido cambial y del xilema. Por lo tanto, las heridas originadas por factores ambientales, como viento o granizo, rajaduras por crecimiento de los árboles, daño por insectos u otros animales, o por actividad humana como injertos o poda, son vías de ingreso para este patógeno, siendo también común la infección de tocones recientemente cosechados (Heath *et al.*, 2009).

Poco se sabe acerca del período en el cual las heridas son susceptibles a la infección. Kile (1993) menciona que el período de susceptibilidad de las heridas para *Ceratocystis fagacearum* y *Ceratocystis fimbriata*, en árboles como roble y plátano, es de 2 a 5 días. Para *C. fagacearum*, Gibbs y French (1980) mencionan que la susceptibilidad de la herida puede

estar dada por la respuesta del árbol a través de la formación de tilosis o por la acumulación de compuestos fenólicos, así como por la colonización de la herida por otros microorganismos.

En Uruguay, desde su reporte en el año 2003, si bien anualmente se observan infecciones por este patógeno causando la muerte de árboles, es escasa la información acerca de la epidemiología de esta enfermedad. Por tal motivo, el presente estudio tuvo por objetivos: i) determinar la estacionalidad en la ocurrencia de infecciones, ii) conocer la evolución de los síntomas en el tiempo, y iii) determinar si existe una asociación estricta entre los eventos de infección y la tarea de poda.

D. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estacionalidad de las infecciones

Para determinar la estacionalidad en la ocurrencia de infecciones, se instalaron árboles trampa en tres sitios distribuidos en la región norte del país donde normalmente se observa la enfermedad. Los sitios elegidos correspondieron a plantaciones de *E. grandis* de 3 años de edad, ubicados en los departamentos de Tacuarembó (S31° 59.180'- W56° 2.169') y Rivera (S31° 9.238'- W55° 22.915' y S31° 44.063'- W54° 56.492') (Figura 1).

Estas trampas consistieron en la generación de una herida en el fuste del árbol, a 1,5-2 m de altura, de 100 cm² (10 x 10 cm). La herida consistió en la remoción de la corteza y el cambium en dicha superficie, exponiendo el xilema, en cuyo interior se realizaron cortes de aproximadamente 5 mm para aumentar la exposición del mismo, según metodología propuesta por Barnes *et al.* (2003a).

En cada sitio se instalaron 5 trampas por mes durante 22 meses consecutivos (diciembre 2012 a octubre 2014). Los árboles seleccionados se ubicaban cercanos unos de otros, en torno a las coordenadas antes mencionadas. A los 30 días de instalada la trampa, se tomó muestra del tejido expuesto, con especial énfasis en tejido que mostrara decoloración (Figura 2). Las muestras se colectaron en bolsas de papel correctamente identificadas y fueron llevadas al laboratorio para su procesamiento.

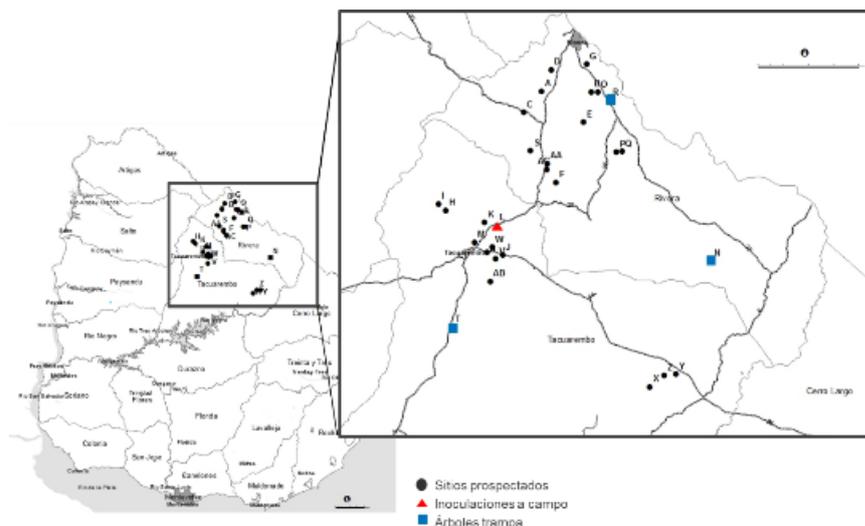


Figura 1: Ubicación de los establecimientos prospectados en los meses de agosto 2012 y setiembre 2013, del sitio donde se realizaron las inoculaciones a campo, y sitios donde se ubicaron los árboles trampa.



Figura 2: a) Herida generada en el árbol trampa para *Ceratocystis* spp. en fuste de *E. grandis*, con retiro de la corteza y cortes para la exposición del xilema y b) decoloración del tejido del xilema a los 30 días de instalada la trampa, de la cual se extraía la muestra para confirmar la presencia de *Ceratocystis* spp.

En el laboratorio se tomaron trozos de madera de aproximadamente 2-4 cm de lado por 5 mm de espesor, para luego incubar cada trozo entre dos discos de zanahoria de 5 mm de espesor previamente desinfectada con alcohol al 70 % por 1 minuto. Los discos de zanahoria conteniendo el trozo de madera fueron cubiertos con film de nylon y se incubaron a $25^{\circ} \text{C} \pm 0,5$ durante 5 días, al cabo de los cuales en la superficie de la zanahoria se examinó por presencia de peritecios característicos de *Ceratocystis fimbriata* (Figura 3), según metodología propuesta por Barnes *et al.* (2003a). Posteriormente, bajo lupa estereoscópica y con una aguja estéril, se colectaron esporas desde la masa de esporas presente en el ápice del peritecio y se sembraron en medio de cultivo agar extracto de malta y levadura (MEA por sus siglas en inglés, extracto de malta al 2%, agar al 1,5% y extracto de levadura al 0,2 %). Los cultivos puros se obtuvieron por repique de punta de hifa de las colonias originales.

Tanto la instalación de árboles trampa, colecta de muestras de madera, confección de trampas en zanahoria, como el aislamiento en medio de cultivo (en caso de que en las trampas de zanahoria se constatará la presencia de peritecios), se repitió mensualmente durante el período diciembre 2012 a octubre 2014. Si la muestra presentaba infección por *Ceratocystis*, se cambiaba de árbol, ubicándose la nueva trampa en un nuevo árbol para evitar interferencia de resultados, manteniendo siempre 5 árboles trampa por sitio. En caso de que la muestra no presentara infección se realizaba una nueva herida en otro sector del mismo árbol. En cada

mes se determinó el porcentaje de árboles por sitio con infección, esto es, con presencia confirmada del patógeno.

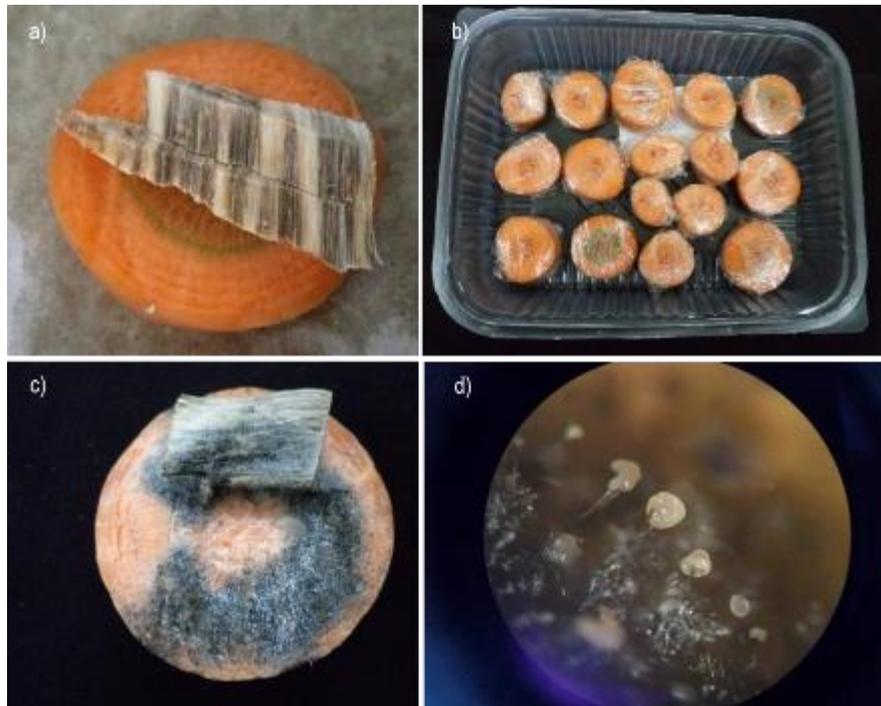


Figura 3: a) Trozo de madera con decoloración de xilema colocado en trampa de zanahoria; b) cámara húmeda de las trampas de zanahoria con madera con decoloración; c) trampa de zanahoria con desarrollo de micelio y peritecios característicos de *Ceratocystis* spp.; d) peritecios de *Ceratocystis* spp. a partir de los cuales se realizaron los aislamientos.

2. Evolución de los síntomas en el tiempo

a. Inoculación de árboles a campo

Para determinar la evolución de los síntomas en condiciones de campo se realizaron inoculaciones artificiales en un sitio ubicado en el departamento de Tacuarembó (S31° 36.795'-W55° 50.872') (Figura 1), donde naturalmente se registró una epidemia de marchitamiento por *Ceratocystis* en el mes de abril 2013. En dicho sitio, se colectaron muestras, se realizó el aislamiento de cepas puras siguiendo la metodología descrita anteriormente, y una de las cepas obtenidas fue utilizada para las inoculaciones de campo en el mismo sitio de dónde provenía. Para ello se utilizó la cepa CA1 (perteneciente a la colección fúngica de la EEMAC), la cual fue repicada en medio MEA e incubada a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ durante 8 días.

Las inoculaciones se realizaron en una plantación clonal de *Eucalyptus grandis*, plantada en octubre de 2010. Este estudio se repitió en dos épocas del año contrastantes, diciembre del año 2013 (verano) y junio del año 2014 (invierno), respectivamente. La inoculación se realizó mediante la técnica de disco de micelio, inoculándose directamente en el fuste. Para ello se desinfectó la superficie del fuste a inocular, con alcohol 70 %, posteriormente se realizó una incisión con sacabocado de 10 mm de diámetro, retirando la corteza y aproximadamente 5 mm del xilema. En dicho orificio se colocó un disco de micelio, de colonias crecidas por 8 días. Luego de la inoculación se cubrió el orificio con un algodón humedecido con agua destilada estéril, y se sujetó con cinta de papel para evitar la desecación (Figura 4), según Roux *et al.* (2000). Veinte árboles fueron inoculados con 1 disco de micelio, para luego registrar la evolución de los síntomas a los 15, 30, 60, 90 y 120 días.

En cada una de las evaluaciones se describió el síntoma observado, mortandad de ramas o del árbol entero, se determinó el diámetro a la altura del pecho (DAP), y se realizó medición del largo del cancro o de la lesión interna en el xilema mediante el corte del área inoculada en 5 de los árboles inoculados con un disco de micelio para registrar así el avance de la infección en el fuste. Además se colectaron muestras de la zona de avance para verificar la presencia del patógeno mediante el método de trampa en zanahoria, descrito anteriormente.

Aquellos árboles que se constató su muerte, fueron apeados para verificar si existía decoloración del xilema a diferentes alturas, mediante cortes transversales del fuste cada 1 m, registrándose además si dicha decoloración se iniciaba en la zona donde se había realizado la inoculación. En cada caso se extrajeron muestras para verificar la presencia del patógeno mediante el método de pesca en zanahoria y cumplir con los postulados de Koch.



Figura 4: Inoculación a campo de árboles clonales de *E. grandis*. a) Incisión con sacabocado con exposición del xilema, b) placa de Petri con la cepa CA1 utilizada para la inoculación, c) colocación del disco de agar con micelio dentro de la herida; d) protección de la herida de inoculación con algodón humedecido y cinta de papel para evitar su desecación.

b. Inoculaciones múltiples

Paralelamente, para evaluar el efecto de las infecciones múltiples sobre la evolución de los síntomas, se inocularon 15 árboles aleatorizados, donde 5 fueron inoculados con 1 disco de micelio, otros 5 con 3 discos de micelio, y por último otros 5 con 5 discos de micelio. En el caso de las inoculaciones múltiples, cada inoculación se ubicó equidistante de las restantes, distribuidas en la circunferencia del fuste, todas ubicadas a la misma altura.

A los 15, 30, 60, 90 y 120 días luego de la inoculación, se registró el síntoma observado, y se determinó el DAP para determinar si existía un efecto del número de inoculaciones en el crecimiento del árbol. El muestreo destructivo se realizó una vez verificada la muerte del árbol para lo cual se procedió al apeo, y al análisis del xilema como se mencionó anteriormente.

3. Prospección de plantaciones con intervención

Para determinar si existe asociación estricta entre los eventos de poda y las infecciones, y para determinar si existe una asociación entre el momento en que se realiza la poda y las infecciones, se realizaron prospecciones de plantaciones de *E. grandis*, en 29 predios ubicados en el norte y noreste del país, departamentos de Tacuarembó y Rivera (Figura 1). Se

prospectaron en el período de agosto 2012 a setiembre 2013 realizando recorridas en sitios forestales elegidos en base a: edad, genética e intervención (con o sin poda). En aquellos sitios (considerándose cada sitio como un lugar dentro de un predio) en donde se encontraron árboles afectados se cuantificó el % de incidencia calculado como: $\text{Incidencia} = \frac{[(\text{N}^\circ \text{ de árboles muertos} + \text{N}^\circ \text{ de árboles infectados}) / \text{N}^\circ \text{ total de árboles evaluados}] * 100$, y se colectaron muestras para posteriormente realizar confirmación del diagnóstico y generar una colección de cepas.

Para estudiar la distribución espacial de los árboles infectados se procedió a mapear un sitio con alta incidencia registrando los árboles sanos, infectados y muertos presentes en las distintas líneas de plantación. A su vez, se obtuvieron los registros climáticos de la estación meteorológica perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA, 2015), ubicado en el departamento de Tacuarembó, para poder establecer la relación entre los eventos de infección y las condiciones climáticas prevalentes.

El cálculo de correlaciones del estudio de estacionalidad de las infecciones se realizó con el paquete Hmisc (Harrel y Dupont, 2015); en el estudio de inoculaciones a campo se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y luego comparación múltiple de medias de la variable largo de lesión con Tukey con el paquete Lsmean (Russell, 2015); para el estudio de inoculaciones múltiples se realizó un análisis de medidas repetidas en el tiempo para el parámetro incremento del diámetro a la altura del pecho (DAP) utilizando el paquete nlme (Fox y Weisberg, 2011), todos ellos del programa estadístico R versión 3.1.2 (R Core Team, 2014).

E. RESULTADOS

1. Estacionalidad de las infecciones

En los tres sitios donde se instalaron los árboles trampa se confirmó la ocurrencia de infecciones, en al menos un momento del año, indicando que el patógeno está presente en las tres zonas estudiadas. En aquellos sitios ubicados dentro de un área altamente forestada con eucalipto, sitios T y R, generalmente la proporción de trampas con infección fue mayor que en el sitio N, el cual se encuentra alejado de áreas forestadas (Figura 5 y 6).

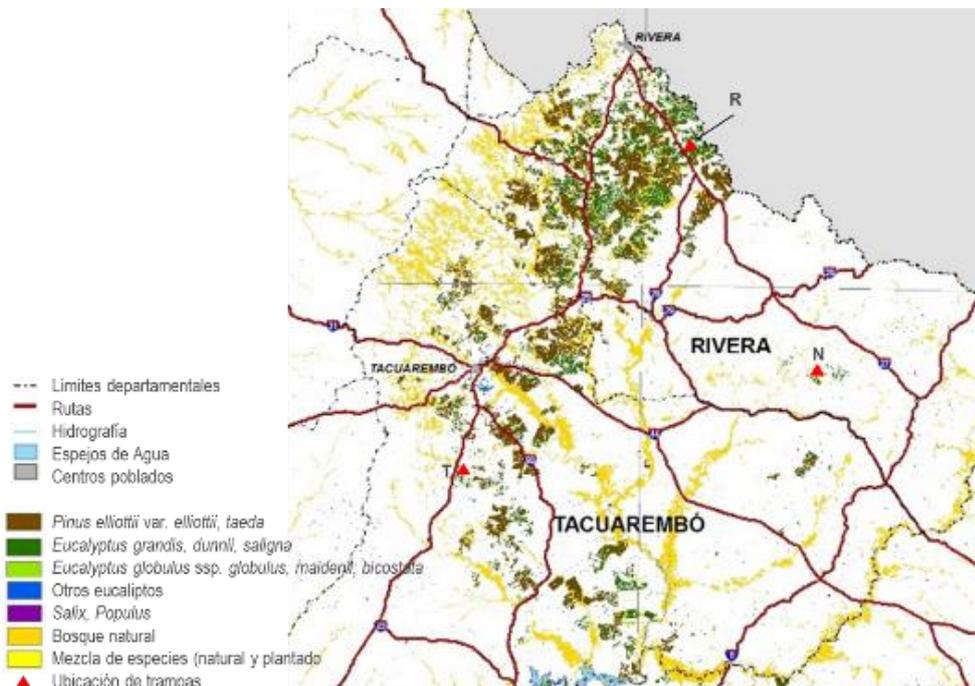


Figura 5: Áreas forestadas de los departamentos de Tacuarembó y Rivera y ubicación de los sitios en donde se instalaron trampas para *Ceratocystis* (adaptado de DGF, 2012b).

Se observó estacionalidad en la ocurrencia de infecciones. El número de árboles trampa infectados fue mayor en los meses de primavera, verano y otoño, disminuyendo en invierno (Figura 6), sin registrarse infecciones en los meses más fríos del período en estudio (junio, julio y agosto del año 2013 y mayo y junio del año 2014). La evolución de la proporción de árboles trampa infectados estuvo asociada con la evolución de la temperatura mínima y máxima promedio de los 5 días posteriores a la instalación de la trampa (Figura 7), presentando un coeficiente de correlación de Pearson entre las trampas con infección y temperaturas de 0,48 y de 0,41 para temperaturas mínimas y máximas promedio respectivamente (Figura 8).

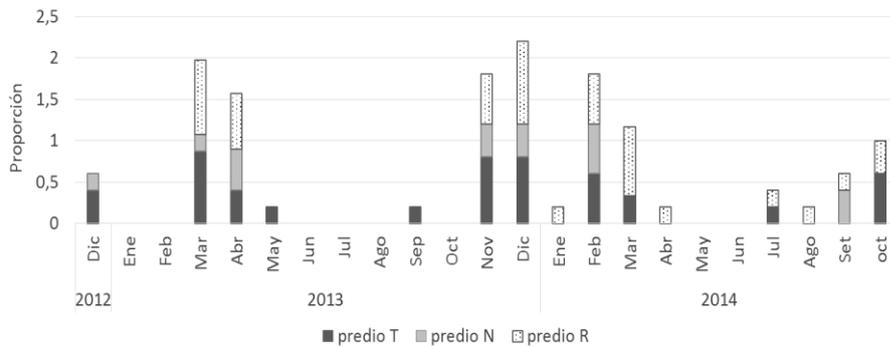


Figura 6: Proporción de árboles trampa con infección de *Ceratocystis fimbriata s.l.*, acumulado para los tres sitios instalados mensualmente.

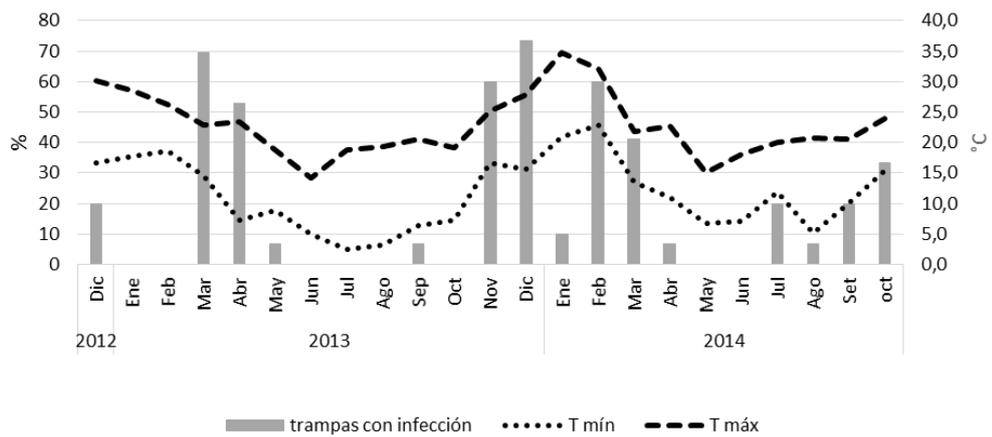


Figura 7: Porcentaje de árboles trampa con infección de *Ceratocystis fimbriata s.l.* en los tres sitios estudiados y evolución de la temperatura máxima promedio y temperatura mínima promedio de los 5 días posteriores a la instalación de la trampa.

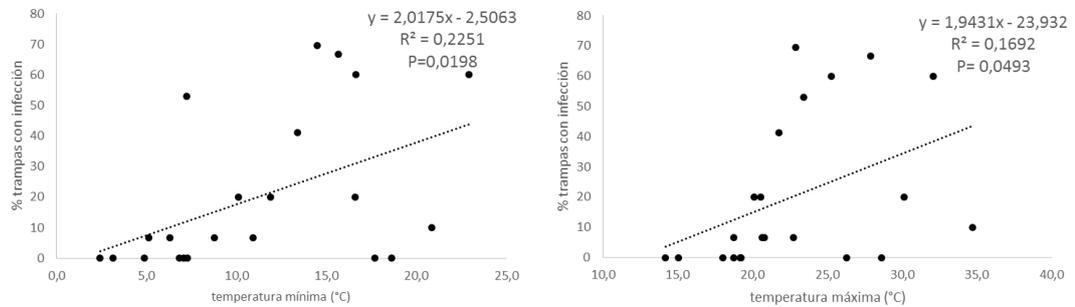


Figura 8: Relación entre el porcentaje de trampas con infección y las temperaturas mínimas promedio (izquierda) y máximas promedio (derecha). La ecuación, el ajuste de la relación y el p-valor son presentados en cada caso.

A su vez, para algunos meses de verano se observó, un limitado porcentaje de trampas con infección (diciembre 2012, enero y febrero 2013 y enero 2014). Para los meses de verano se analizaron los datos de precipitación acumulada de los 30 días anteriores a la instalación de las trampas (Figura 9), observándose que en aquellos meses en donde las precipitaciones de dicho período fueron superiores a los 150 mm, se observaron trampas con infección, mientras que para aquellos meses en que las precipitaciones fueron escasas el número de infecciones fue escaso o nulo.

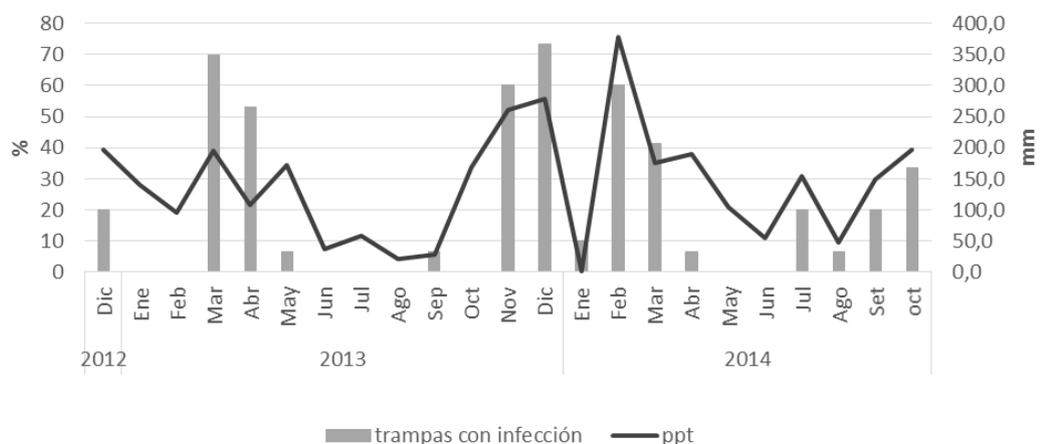


Figura 9: Porcentaje de trampas con infección del total de los tres sitios y precipitaciones acumuladas para los 30 días anteriores a la instalación de las trampas del período en estudio.

2. Evolución de los síntomas en el tiempo

a. Inoculaciones de árboles a campo

En las inoculaciones realizadas en el mes de diciembre 2013 se observaron árboles muertos o con síntomas de marchitamiento a los 120 días post-inoculación (Figura 10). Los árboles con menos de 15 cm de diámetro a la altura del pecho (DAP) (n=2), fueron los que presentaron mayor mortandad, seguidos por los árboles de clase diamétrica media (DAP=15-20 cm) (n=5), sin registrarse muertes en los árboles de mayor diámetro (n=6) (Figura 11).

Al analizar los síntomas de marchitamiento, la clase diamétrica mayor fue la que presentó mayor proporción de árboles con síntoma, mientras que la clase menor ya tenía a todos sus individuos muertos (Figura 11). Los síntomas de marchitamiento observados variaron desde ramas laterales secas asociadas al sitio de inoculación hasta gran parte de la copa seca (Figura 12).

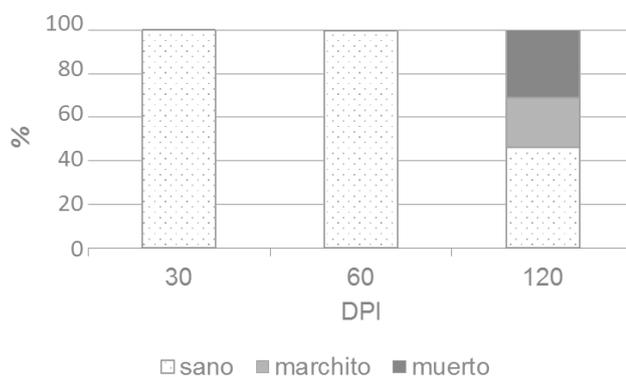


Figura 10: Porcentaje de árboles sanos, con síntomas de marchitamiento o muertos para tres clases diamétricas, inoculados con *Ceratocystis fimbriata* s.l, cepa CA1 en el mes de diciembre de 2013, evaluados a los 30, 60 y 120 días post-inoculación (DPI).

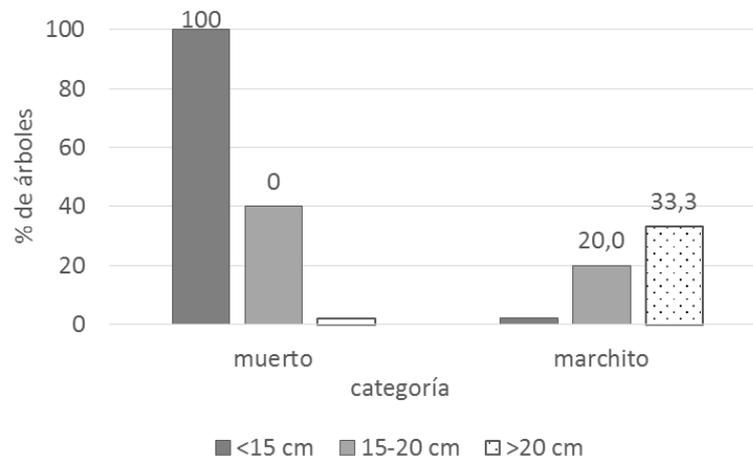


Figura 11: Porcentaje de árboles muertos o con síntomas de marchitamiento para tres clases diamétricas, inoculados con *Ceratocystis fimbriata s.l.*, cepa CA1 en el mes de diciembre de 2013, a los 120 días post-inoculación (DPI).



Figura 12: Árboles inoculados con la cepa CA1 en el sitio L, a) árbol muerto por marchitamiento por *Ceratocystis fimbriata s.l.* el cual mantiene sus hojas adheridas, b) árbol con parte superior de la copa muerta indicada con la flecha, y c) decoloración radial característica de *Ceratocystis fimbriata s.l.* asociada al área inoculada indicada con la flecha.

En las inoculaciones realizadas en el mes de junio no se observaron individuos muertos a los 120 días post-inoculación, e incluso los árboles no presentaron síntomas de

marchitamiento. Sin embargo, se observó decoloración del xilema pudiendo además re-aislarse el hongo desde la zona de decoloración. Las medidas de largo de lesión se realizaron a los 15, 30, 60 y 120 DPI, no difirieron significativamente entre sí cuando se toma en cuenta un intervalo de confianza del 95 %. Dado que el p -valor se encontraba en el límite, se realizó el análisis con un intervalo de confianza del 90 %, observándose en este caso que el largo de lesión de la lectura a los 30 DPI difirió significativamente del largo de lesión a los 15 DPI, no así con las mediciones posteriores (Figura 13).

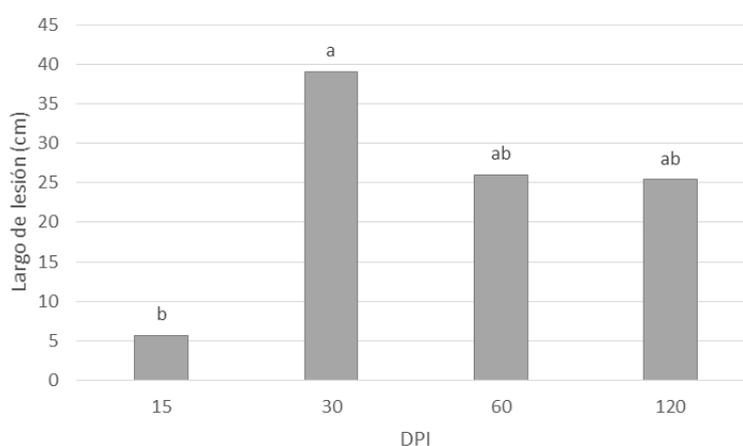


Figura 13: Largo de lesión en árboles inoculados en junio 2014 con *Ceratocystis fimbriata s.l.*, cepa CA1, evaluados a los 15, 30, 60 y 120 (DPI). Medias seguidas de la misma letra no difieren significativamente, Tukey ($p= 0,067$ y CV 38,7%).

b. Inoculaciones múltiples

Se observó en los árboles inoculados la decoloración del xilema en el área subyacente a las inoculaciones confirmando que las infecciones iniciales provenían del sitio inoculado (Figura 14). El tratamiento con árboles inoculados con 5 discos de micelio de *C. fimbriata s.l.*, cepa CA1, registró mayor número de árboles muertos que aquellos inoculados con 1 y 3 discos de micelio (Figura 15). No se observó un efecto significativo del número de sitios de inoculación sobre el incremento en diámetro de los árboles (Figura 16).



Figura 14: a) Árbol muerto inoculado con cinco discos de micelio de *Ceratocystis fimbriata s.l.* cepa CA1, en diciembre de 2013, b) parte basal del árbol por debajo de la inoculación en donde se observa una leve decoloración en lado inferior derecho y brote epicórmico vivo, c) corte del árbol en el área de la inoculación con decoloración de xilema en área subyacente a los 5 sitios inoculados, y d) decoloración radial del xilema generalizada 1 m por encima de la zona inoculada.

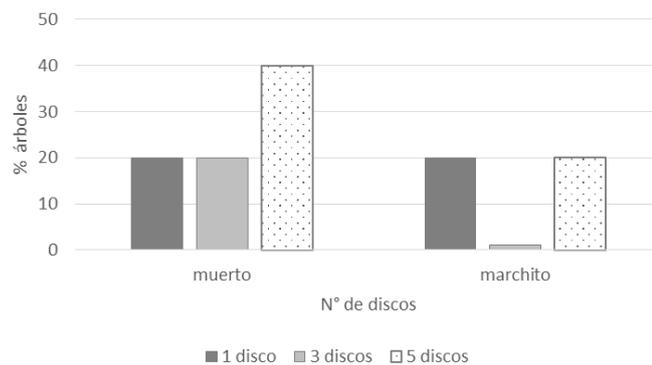


Figura 15: Porcentaje de árboles muertos o con síntomas de marchitamiento a los 120 días de inoculados con 1, 3 y 5 discos de micelio de *Ceratocystis fimbriata s.l.*, cepa CA1, inoculados en diciembre del 2013.

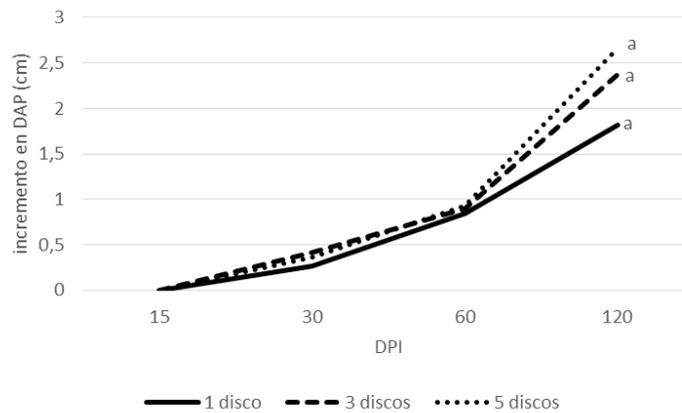


Figura 16: Incremento en DAP promedio de los árboles inoculados con 1, 3 y 5 discos de micelio de *Ceratocystis fimbriata s.l.*, cepa CA1, en diciembre 2013, evaluado a los 15, 30, 60 y 120 DPI. No hubo efecto significativo del número de discos inoculados en ninguna de las fechas evaluadas ($p=0,195$ y $CV=42,3\%$).

3. Prospección de plantaciones con intervención

En el año 2012, se registraron árboles con síntomas de marchitamiento por *Ceratocystis* en cuatro de los 15 sitios visitados en los departamentos de Tacuarembó y Rivera, correspondiendo a plantaciones realizadas en los años 2007 y 2008, con tercera poda en los meses de febrero y diciembre del año 2011 (Cuadro 1). En el año 2013, se visitaron 25 sitios, registrándose árboles con síntomas de marchitamiento por *Ceratocystis* en 6 de ellos, en plantaciones de los años 2009 y 2010, con segunda poda realizada en los meses de octubre 2012, diciembre 2012, febrero 2013 y marzo 2013 (Cuadro 2).

Tomando en cuenta las temperaturas promedio mínima y máxima de la región para el período en estudio, se observó que la presencia de árboles muertos o con síntomas de marchitamiento se registró en aquellos sitios en los cuales las actividades de poda se llevaron a cabo en los meses con temperaturas mínima por encima de $12\text{ }^{\circ}\text{C}$, aunque no necesariamente todos los sitios podados con temperaturas superiores a ésta presentaron infecciones. En aquellos sitios donde las podas se realizaron en los meses más fríos no se registraron árboles con síntomas de marchitamiento (Figura 17).

En el establecimiento R se observaron árboles muertos en tres sitios diferentes dentro del mismo, en dos de ellos solo se encontró un árbol muerto aislado, mientras que en el restante

se observaron cinco árboles muertos. En los establecimientos B, F, I, J y K se encontraron árboles muertos aislados no superando en ninguno de los casos los 5 árboles por sitio. En el establecimiento L, donde no se realizaron tareas de poda, se observó un número mayor de árboles muertos por marchitamiento por *Ceratocystis* que en el resto de los sitios visitados. En estos árboles se observó la presencia de rajaduras en el estrato superior, probablemente causadas por la ocurrencia de vientos fuertes.

En este sitio se registró el mayor nivel de enfermedad de las zonas prospectadas. Se observaron dentro del mismo sitio dos sectores (Figura 18), uno con alta incidencia alcanzando valores de 39% de los árboles afectados, con síntomas de marchitamiento o muertos (Figura 19), y otro con una incidencia menor alcanzando el 5% de los árboles afectados (Figura 20), sin observarse un padrón de árboles afectados en las líneas de plantación observándose una distribución aleatoria de los mismos (Figura 19 y 20).

Cuadro 1: Establecimientos en donde se realizaron las prospecciones del año 2012, con identificación del genotipo de *E. grandis* plantado, año de plantación, momento en el cual se realizó la tarea de poda y ocurrencia o no de infecciones por *Ceratocystis fimbriata* s.l.

Ubicación geográfica	Fecha de visita	Establecimiento	Genotipo	Año plantación	Número de poda	Momento de poda	Infección
Rivera	Agosto 12	D	Semilla	2007	2da	oct-10	NO
		B	Semilla	2007	3ra	feb-11	SI
		E	Semilla	2009	1ra	feb-12	NO
		A	Semilla	2009	3ra	jun-12	NO
		G	Semilla	2010	1ra	abr-may-12	NO
		C	Semilla	2010	1ra	mar-may-12	NO
	Diciembre 12	P	Semilla	2000	4ta	ND	NO
		F	Clón	2009	2da	oct-12	NO
		R	Semilla	2009	2da	oct-12	NO
	Tacuarembó	Agosto 12	K	Semilla	2007	3ra	dic-11
I			Semilla	2008	3ra	dic-11	SI
J			Semilla	2008	3ra	dic-11	SI
J			Semilla	2008	3ra	dic-11	NO
J			Semilla	2007	3ra	dic-11	SI
H			Semilla	2008	2da	feb-mar2012	NO

Cuadro 2: Establecimientos en donde se realizaron las prospecciones del año 2013, con identificación del genotipo de *E. grandis* plantado, año de plantación, momento en el cual se realizó la tarea de poda y ocurrencia o no de infecciones por *Ceratocystis fimbriata* s.l.

Ubicación geográfica	Fecha de visita	Establecimiento	Genotipo	Año plantación	Número de poda	Momento de poda	Infección
Rivera	ene-13	P	<i>E. grandis</i>	2000	4ta	ND	NO
		O	<i>E. grandis</i>	2007	4ta	dic-12	NO
		N	<i>E. grandis</i>	2007	3ra	ago-dic-11	NO
		N	<i>E. grandis</i>	2007	3ra	ago-dic-11	NO
		N	<i>E. grandis</i>	2007	3ra	ago-dic-11	NO
		Q	<i>E. grandis</i>	2007	4ta	dic-12	NO
	feb-13	R	<i>E. grandis</i>	2009	2da	oct-12	SI
		R	<i>E. grandis</i>	2009	2da	oct-12	SI
	mar-13	R	<i>E. grandis</i>	2009	2da	oct-12	SI
	abr-13	S	<i>E. grandis</i> clon	2010	2da	mar-13	NO
		F	<i>E. grandis</i>	2010	2da	dic2012-feb2013	SI
	set-13	AA	<i>E. grandis</i> clon	2011	1ra	mar-13	NO
		AC	<i>E. grandis</i> clon	2010	1ra	abr-13	NO
		C	<i>E. grandis</i>	2010	2ra	mar-13	NO
F		<i>E. grandis</i> clon	2010	3ra	dic2012-feb2013	NO	
Tacuarembó	may-13	L	<i>E. grandis</i> clon	2010	sin poda	sin poda	SI
	set-13	K	<i>E. grandis</i> clon	2010	2da	mar-13	SI
		U	<i>E. grandis</i> clon	2010	2da	mar-13	NO
		V	<i>E. grandis</i>	2009	2da	mar-13	NO
		W	<i>E. grandis</i> clon	2010	2da	mar-13	NO
		X	<i>E. grandis</i>	2007	2da y 3ra	nov-dic 2012	NO
		Y	<i>E. grandis</i> clon	2010	1ra	ene-mar 2013	NO
		Z	<i>E. dunnii</i>	2007	3ra	oct-nov 2013	NO
		AB	<i>E. grandis</i>	2009	2da	feb-13	NO
		AD	<i>E. grandis</i> clon	2010	1ra	ene-13	NO

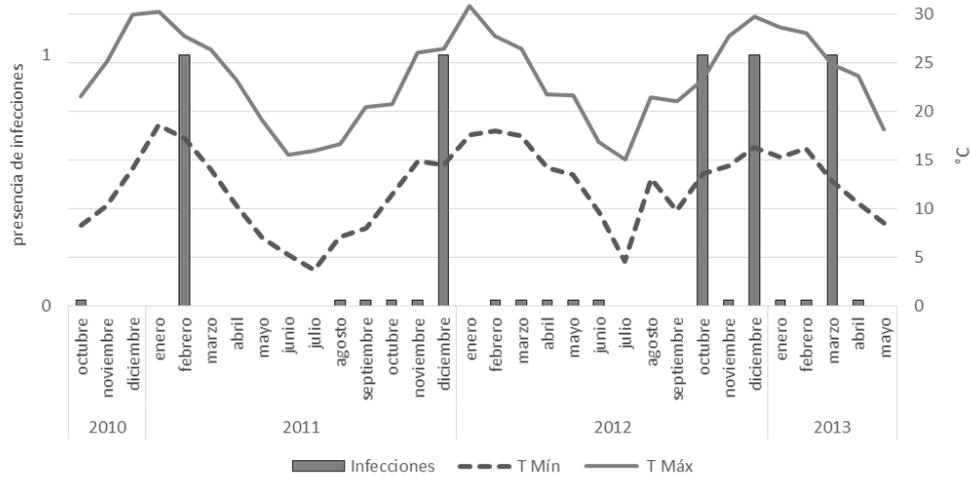


Figura 17: Presencia de árboles con síntomas de marchitamiento, según el momento en el que se realizó la poda, visitados en las prospecciones de los años 2012 y 2013, y temperaturas mínimas y máximas promedio (°C) de Tacuarembó, para el período octubre 2010 a mayo 2013 (solo se indica la presencia sin cuantificación de cantidad de árboles afectados, no se visitaron sitios podados en los meses que no presentan barras en la figura).

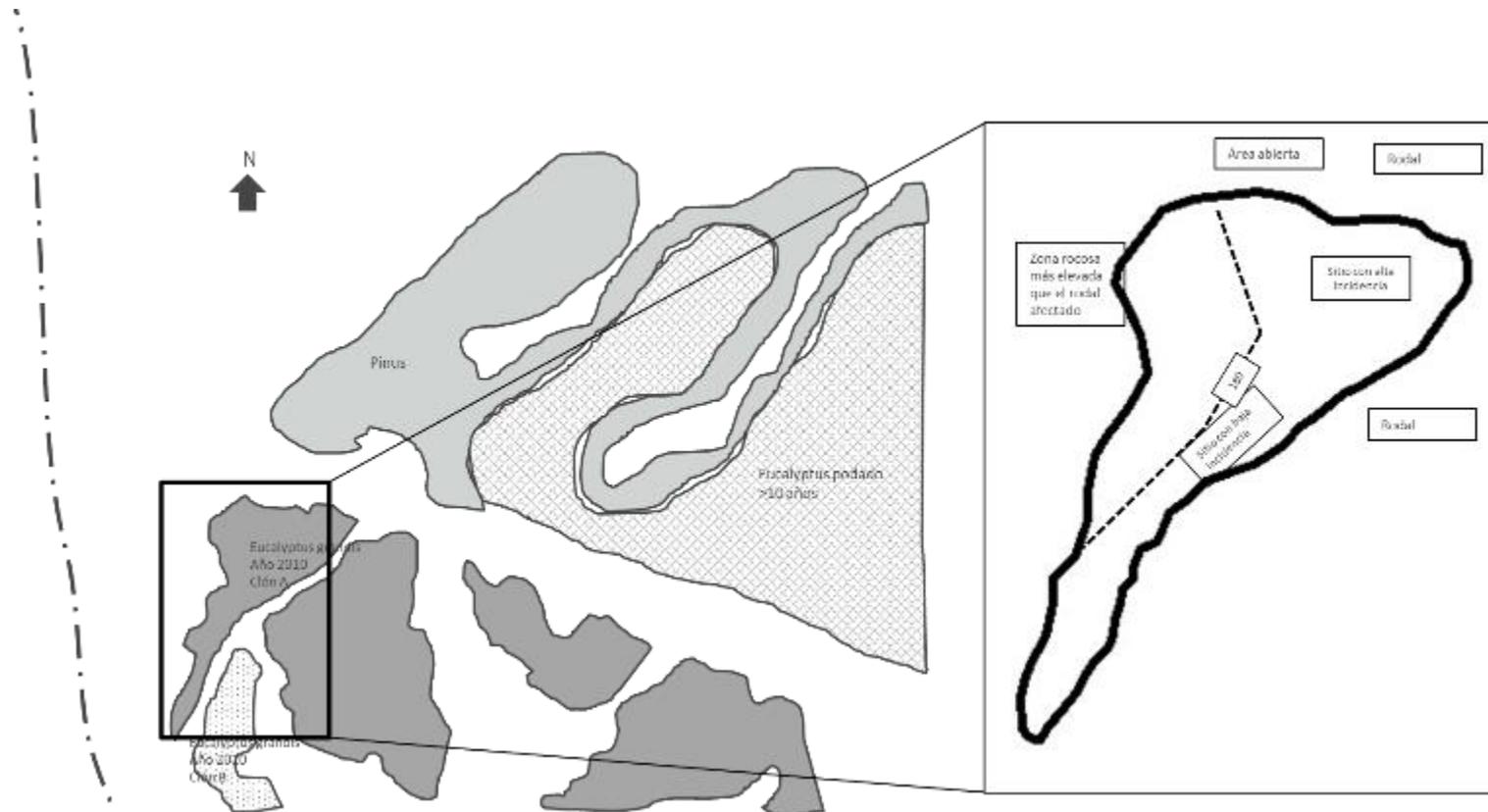


Figura 18: Ubicación del sitio afectado con marchitamiento por *Ceratocystis fimbriata* s.l. dentro del establecimiento L. A la izquierda la figura muestra la ubicación del cuadro afectado, y las características de las plantaciones cercanas. A la derecha un aumento del cuadro estudiado, plantado con *E. grandis* clonal en el año 2010. La figura de la derecha muestra a su vez la isocuota de altura del terreno.

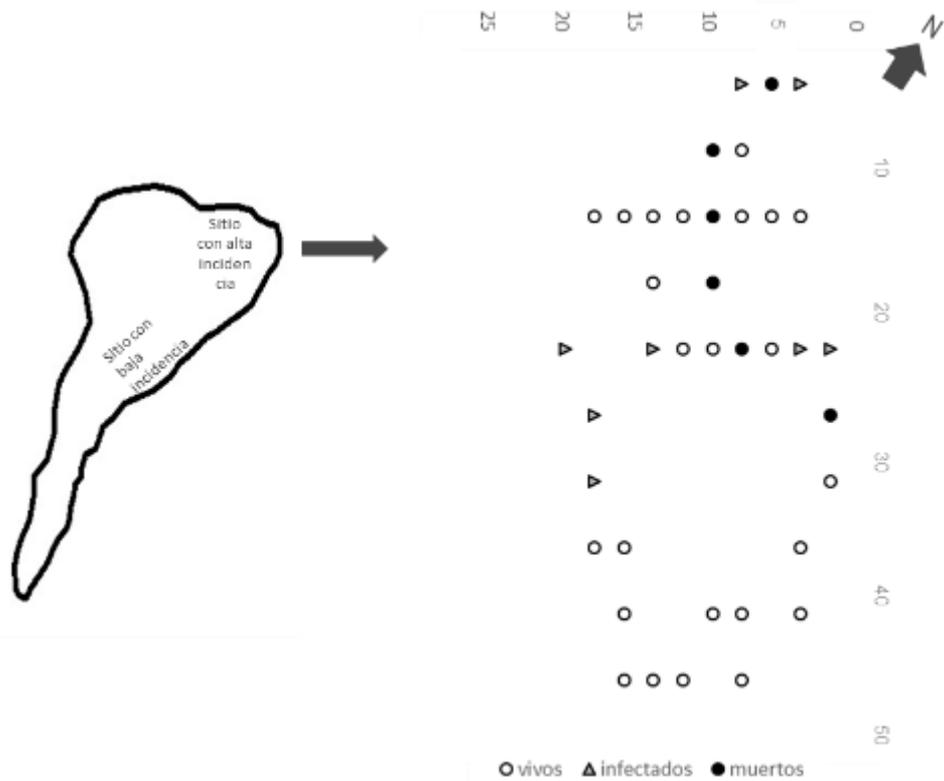


Figura 19: Plano del sector con mayor incidencia de marchitamiento por *Ceratocystis*, en el establecimiento L, mostrando la distribución espacial de los árboles sanos, con síntomas de marchitamiento y muertos. Cada círculo o triángulo representa un árbol. Los números en posición horizontal y vertical representan las distancias (en metros) de ancho y largo del sitio.



Figura 20: Plano del sector con menor incidencia de marchitamiento por *Ceratocystis*, en el establecimiento L, mostrando la distribución espacial de los árboles sanos, con síntomas de marchitamiento y muertos. Cada círculo o triángulo representa un árbol. Los números en posición horizontal y vertical representan las distancias (en metros) de ancho y largo del sitio.

F. DISCUSIÓN

Este estudio representa el primer acercamiento al conocimiento de aspectos epidemiológicos del marchitamiento por *Ceratocystis fimbriata s.l.* para *E. grandis* en Uruguay. Se pudo determinar la estacionalidad de las infecciones, la evolución de los síntomas a campo, y la importancia de la infección masiva, lo cual contribuye a la comprensión de la dinámica de la enfermedad.

Los sitios rodeados por áreas altamente forestadas mostraron una mayor proporción de árboles trampa con infección, lo que sugiere una probable mayor presión de inóculo presente en estas zonas, respecto a zonas con menor masa forestal del hospedero de esta enfermedad. Ferreira *et al.* (2013a) mencionan que en suelos con alto nivel de inóculo provenientes de bosques nativos del estado de Minas Gerais en Brasil, las incidencias encontradas fueron altas comparadas con aquellas encontradas en plantaciones realizadas en áreas de pasturas con menor nivel de inóculo en el suelo, por lo cual se puede inferir que el nivel de inóculo presente es uno de los factores condicionantes para la ocurrencia de infecciones.

Se observó una estacionalidad marcada de las infecciones, condicionada principalmente por las temperaturas mínimas. En las trampas establecidas en invierno la infección fue mínima o inexistente. Si bien la presencia de infecciones está condicionada por la presencia de inóculo en el lugar y a la susceptibilidad de los genotipos plantados, la presencia de infección en los árboles trampa se registró en los meses con temperaturas mínimas por encima de 10 °C. La ausencia de infecciones con temperaturas por debajo de la mencionada puede explicarse por el efecto de las bajas temperaturas sobre la dinámica de los insectos, quienes juegan un rol fundamental en la dispersión del hongo y por lo tanto en la posible infección de la herida. Durante este estudio se constató la presencia de insectos circundando la herida solo en los meses más cálidos, de los cuales pudo aislarse *Ceratocystis fimbriata s.l.*, lo que indicaría que estos podrían llegar a ser posibles vectores de este hongo. Gibbs y French (1980) mencionan la estacionalidad de las infecciones de *C. fagacearum* en Estados Unidos para el marchitamiento de los robles, asociándola a la dinámica de los insectos Nitidulidos (Coleóptera: Nitidulidae) que están asociados a la infección de este patógeno. Para confirmar este hecho es necesario realizar estudios que permitan comprender la dinámica de la relación patógeno-insectos vectores, sin precedentes en las condiciones de Uruguay.

A su vez, las inoculaciones realizadas en junio 2014 permitieron determinar que con bajas temperaturas no sólo se disemina menos la enfermedad, sino que el hongo también se ve limitado en su crecimiento. Esto es coincidente con la temperatura óptima de crecimiento de *C. fimbriata*, la cual se ubica entre 18 y 28 °C (Kile, 1993; Mafia *et al.*, 2011). Mafia *et al.* (2011) también

mencionan el ejemplo de *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani*, para el cual está determinado que con temperaturas menores a 10°C o superiores a 45°C el hongo no crece (EPPO/CABI, 1997). Por consiguiente, es probable que las bajas temperaturas del invierno limiten el crecimiento del hongo y por consiguiente la colonización de los tejidos luego de la infección.

A su vez, en meses con altas temperaturas también se observó una limitada ocurrencia de infecciones, en este caso es probable que haya una combinación de alta temperatura y limitada humedad. Gibbs y French (1980) mencionan que la humedad tiene un efecto importante en las infecciones naturales, condicionando tanto la transferencia de esporas desde el insecto al xilema, como la germinación y desarrollo del hongo, concluyendo que en estas condiciones el agua de lluvia podría favorecer las infecciones.

Al momento de la infección, no sólo la humedad relativa juega un rol importante sino también la humedad de la herida (dada por el flujo de savia del árbol), la cual está condicionada por la disponibilidad de agua que tenga el árbol (Zeppel *et al.*, 2004). Por lo tanto, en condiciones de alta temperatura y alta demanda atmosférica de agua, la disponibilidad de agua en el suelo condiciona el flujo de savia, y a su vez éste condiciona la humedad en la herida, y las probabilidades de germinación de las esporas inoculadas. La disponibilidad de agua en el suelo está determinada por diversos factores, siendo el principal la ocurrencia de lluvias (Soares y Almeida, 2001). En este sentido, los resultados aquí obtenidos indican que las infecciones ocurrieron en meses donde las precipitaciones ocurridas 30 días previos a la instalación de las trampas superaron los 150 mm, mientras que en aquellos meses donde las precipitaciones fueron escasas se observaron escasas o nulas infecciones. Por lo arriba expuesto, el volumen de lluvias pudo haber influenciado la actividad del árbol y por lo tanto la humedad disponible para que ocurriera la infección.

Las inoculaciones a campo permitieron determinar que en las condiciones de verano, un solo sitio de infección fue suficiente para matar al árbol a los 120 DPI; coincidentemente, Barnes *et al.* (2003b) mencionan que para Uruguay, los síntomas de marchitamiento, siempre asociado a podas, aparecían entre 1 y 6 meses posteriores a esta actividad, rango de tiempo dentro del cual se encuentran los resultados del presente estudio.

Sin embargo, en las inoculaciones realizadas en invierno no se registraron síntomas de marchitamiento ni árboles muertos. Pese a que en todos los casos se verificó el establecimiento de la infección, verificado por el re-aislamiento del patógeno en sucesivos muestreos, la colonización de los tejidos en invierno se vio limitada. Como se mencionó anteriormente, es probable que la temperatura haya limitado el crecimiento micelial. Las inoculaciones realizadas en verano tuvieron, para la zona de Tacuarembó, temperaturas promedio de 24,7 °C (INIA, 2015), mientras que las inoculaciones de invierno se realizaron con temperaturas promedio de 11,5 °C

(INIA, 2015), muy por debajo de las temperaturas óptimas para el crecimiento del hongo (Kile, 1993; Mafia *et al.*, 2011).

La limitada extensión micelial del hongo dentro del árbol, en las inoculaciones de invierno, se pudo verificar a través del largo de lesión en los árboles inoculados, donde si bien se observaron lesiones en el xilema que aumentaron significativamente en los primeros 30 DPI, éstas permanecieron sin cambios entre las evaluaciones de 30, 60 y 120 DPI, sugiriendo que el crecimiento del hongo dentro del árbol se detuvo. Las bajas temperaturas del invierno limitan el crecimiento del patógeno, pero también limita el crecimiento de los árboles, ya que en el período invernal los árboles disminuyen su actividad, realizando menor translocación tanto de agua como de nutrientes. Tomando en cuenta que una de las vías de colonización del hospedero por parte del patógeno ocurre mediante la diseminación longitudinal de las esporas dentro a través del xilema (Mafia *et al.*, 2013), la reducida translocación del árbol estaría afectando también dicha diseminación dentro del árbol y por lo tanto su capacidad de colonización.

La muerte del árbol se produce cuando la decoloración alcanza toda la circunferencia de las raíces o del fuste, por inactivación del xilema debido a la obstrucción de los vasos ya sea por estructuras del hongo como por parte de sustancias producidas por el propio árbol (Tumura *et al.*, 2012; Mafia *et al.*, 2013), alterando el transporte de agua, produciéndose de esta manera la muerte a causa del estrés hídrico generado (Ferreira *et al.*, 2006). Este proceso fue verificado con las inoculaciones de campo realizadas en el verano, donde el patógeno causó la obstrucción de los vasos del xilema, causando el marchitamiento y muerte de la copa por déficit hídrico inducido. Por el contrario, en las inoculaciones de invierno, la colonización fue muy localizada, no llegando a obstruir completamente el flujo de savia en el xilema, y por lo tanto a evidenciar síntomas de marchitamiento ni muerte de árboles, pese al éxito del patógeno en establecer la infección.

Es interesante el efecto diferencial de la enfermedad según la clase diamétrica. Los resultados obtenidos indican que con un único sitio de infección, las clases diamétricas menores y medias podrían marchitarse y morir en un período de 120 DPI, mientras que en las clases diamétricas mayores solo se registraron síntomas de marchitamiento pero no muerte de los árboles en el período estudiado. Las diferencias entre los árboles de diámetro menor y medio comparado con los de mayor diámetro pueden radicar en la menor área a colonizar por *Ceratocystis* en los primeros, pudiendo, por lo tanto obstruir más rápidamente los tejidos. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por Mafia *et al.* (2011), en condiciones de vivero.

El ensayo de inoculaciones múltiples permitió tener una aproximación al proceso de muerte de los árboles, en donde el mayor número de puntos de entrada favorecería la colonización y obstrucción del tejido del árbol, produciendo la posterior muerte de los mismos. Estos resultados

sugieren que a mayor número de sitios de infección, como resultado de mayor número de heridas en el árbol, y con alta población de insectos vectores del patógeno, puede ocurrir una colonización masiva distribuida en la circunferencia del árbol, que resulte en un marchitamiento y muerte acelerada del árbol, asociado a la velocidad con que el hongo logra obstruir la translocación.

Los resultados obtenidos respecto al efecto de la enfermedad sobre el DAP de los árboles, indican que no hubo efecto del número de puntos de inoculación sobre el mismo. Mafia *et al.* (2013) encontraron efecto significativo de la enfermedad para el parámetro altura, DAP y volumen, de árboles sanos con respecto a árboles con diferentes grados de severidad de la enfermedad, no encontrando diferencias en DAP dentro los árboles infectados, lo que es coincidente con los resultados obtenidos en el presente estudio en donde si bien no se realizaron mediciones de árboles sanos los árboles con uno, tres y cinco discos no mostraron diferencias en DAP en las diferentes evaluaciones. Según Mafia *et al.* (2013), el crecimiento de los árboles infectados se ve afectado por el marchitamiento por *Ceratocystis*, donde aquellos árboles infectados que no mueren serían suprimidos por los árboles sanos más cercanos.

Las prospecciones realizadas mostraron que no hay una relación estricta entre la ocurrencia de infecciones y la actividad de poda, observándose una epidemia en un sitio donde no se realizó esta actividad. En este sitio en particular se observó la presencia de heridas a lo largo del estrato superior del fuste causados probablemente por eventos de vientos fuertes. Esto concuerda con Heath *et al.* (2009), quienes mencionan que las heridas necesarias para la infección pueden ser originadas en las actividades de poda o causadas por viento, granizo o rajaduras provocadas por el crecimiento de los árboles.

Respecto al momento de poda, se observó que en aquellos sitios donde la poda se había realizado en los meses más cálidos con temperaturas mínimas promedio mensuales por encima de los 10°C, se registraron infecciones independientemente del año de plantación de los montes, del genotipo y del número de podas (primera, segunda, tercera o cuarta poda). En el mismo sentido, los datos obtenidos de los árboles trampa mostraron una mayor proporción de trampas con infección en los meses de primavera, verano y otoño, con temperaturas mínimas promedio por encima de los 10°C. Esta estacionalidad es coincidente con los reportes de Kile (1993) y Mafia *et al.* (2011), quienes mencionan temperaturas óptimas de crecimiento para *Ceratocystis fimbriata* de entre 18 y 28 °C.

La limitada prevalencia de la enfermedad, observada en 10 de los 40 plantaciones visitadas, puede deberse a que se parte de un bajo nivel de inóculo presente, probablemente asociado a la corta historia forestal de los sitios, siendo en muchas de las plantaciones la primera rotación y en menor medida la segunda rotación del cultivo. En Brasil, la principal fuente de inóculo se encuentra

en el suelo, produciéndose las infecciones a través de las raíces (Ferreira *et al.*, 2011). Otra fuente de inóculo de importancia en Brasil corresponde a los plantines infectados por *Ceratocystis* que en condición asintomática podrían ser llevados al campo (Ferreira *et al.*, 2011). En Uruguay, de acuerdo al presente estudio, y en forma preliminar, de acuerdo a las prospecciones realizadas se puede concluir que la principal vía de infección serían las heridas en el fuste. Es probable que esta sea la razón por la cual la prevalencia de la enfermedad aún no ha alcanzado niveles altos ni que los daños estén generalizados en todas las plantaciones con presencia del patógeno. Barnes *et al.* (2003b) mencionan que los daños para Uruguay son marginales, con incidencias del orden del 10% de los árboles en un rodal podado. Datos preliminares indicarían que los tocones post-cosecha serían una fuente de inóculo de importancia de este patógeno (Jolanda Roux com. pers.), por lo cual, en el futuro, y con las sucesivas rotaciones, es probable que el nivel de inóculo pueda ir incrementándose, aumentando así el riesgo de ocurrencia de epidemias en las plantaciones cercanas.

En el año 2013 se observó una epifítia en una plantación de *E. grandis* clonal, de 3 años de edad, donde en algunos sectores se registraron niveles de incidencia de entre 5 y 39 %. Esta plantación no había tenido intervención de poda pero las heridas observadas en el fuste, presumiblemente luego de un evento de vientos fuertes, podría ser la vía de infección. Al analizar la distribución de los árboles afectados en el rodal, se observó que las zonas más afectadas no presentaron un padrón en líneas de plantación sino aleatorio, con mayor incidencia observada en la zona más expuesta del rodal, lo cual sustentaría la hipótesis de que las heridas causadas por el viento fueron la principal vía de entrada a los árboles.

La información aquí generada permite contar con importante información sobre la biología del patógeno y sobre la epidemiología de la enfermedad en Uruguay, de gran utilidad para el sector forestal. El profundo conocimiento de la enfermedad permite una mejor visualización de las probables estrategias de manejo que puedan aportar a minimizar su impacto sobre la producción de *E. grandis*. Es claro que este estudio representa el primer estudio epidemiológico de la enfermedad a nivel nacional, y por consiguiente no es concluyente sino que comienza a generar interrogantes que deberán ser abordadas con mayor profundidad en estudios futuros.

G. BIBLIOGRAFÍA

- Barnes I, Roux J, Wingfield B, Dudzinski M, Old K, Wingfield M. 2003a. *Ceratocystis pirilliformis*, a new species from *Eucalyptus nitens* in Australia. *Mycologia*, 95 (5): 865–871.
- Barnes I, Roux J, Wingfield B, O'Neil M, Wingfield M. 2003b. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay. *Australian Plant Pathology*, 32: 361-366.
- Chen S, Van Wyk M, Roux J, Winfield M, Xie J, Zhou X. 2013. Taxonomy and pathogenicity of *Ceratocystis* species on *Eucalyptus* trees in South China, including *C. chinaeucensis* sp. nov. *Fungal Diversity*, 58: 267–279.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2014. Anuario estadístico agropecuario 2014 [En línea]. Montevideo MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 6 de agosto 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2014/Diea-Anuario%202014-Digital01.pdf>.
- DGF (Dirección General Forestal). 2012a. Cartografía Forestal 2012 República Oriental del Uruguay [En línea]. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 21 de marzo 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,dgf,dgf-cartografia-forestal-2012,O,es,0>,
- DGF (Dirección General Forestal). 2012b. Bosques plantados registrados Eucalyptus [En línea]. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 17 de diciembre 2014. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,dgf,dgf-recurso-forestal,O,es,0>
- EPPO/CABI. 1997. Data Sheets on Quarantine Pests. *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* [En línea]. Consultado 23 enero 2015. Disponible en: https://www.eppo.int/QUARANTINE/fungi/Ceratocystis_fimbriata_platani/CERAFP_ds.pdf.
- Ferreira MA, Harrington T, Gongora-Canul C, Mafia R, Zauza E, Alfenas A. 2013a. Spatial-temporal patterns of *Ceratocystis* wilt in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Forest Pathology*, 43 (2): 153-164.
- Ferreira MA, Alfenas A, Mafia RG. 2013b. *Ceratocystis fimbriata* em espécies florestais e agronômicas no Brasil. En: NETIF-Núcleo de Estudos em Fitopatologia 1 ed. Patologia Florestal: desafios e perspectivas. Sao Carlos, SP. Suprema Gráfica e Editora. 75-101.
- Ferreira MA, Harrington T, Alfenas A, Mizubuti E. 2011. Movement of genotypes of *Ceratocystis fimbriata* within and among *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Phytopathology*, 101 (8): 1005-1012.

- Ferreira E, Harrington T, Thorpe D, Alfenas A. 2010. Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. *Plant Pathology*, 59: 721–735.
- Ferreira F, Mafia L, Barreto R, Demuner N, Pigatto S. 2006. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. *Revista Árvore*, 30 (2): 155-162.
- Ferreira F, Mafia L, Ferreira E. 2005. Detecção Rápida de *Ceratocystis fimbriata* em lenho infetado de Eucalipto, Mangueira e Outros Hospedeiros Lenhosos. *Fitopatologia Brasileira*, 30 (5): 543-545.
- Firmino A, Tozze H, Gava de Souza I, Furtado E. 2013. Resistência de genótipos de Eucalipto a *Ceratocystis* spp. *Scientia Forestalis*, 41 (98): 165-173.
- Fox J y Weisberg S. 2011. *An {R} Companion to Applied Regression*. Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage [En línea]. Consultado 17 febrero 2015. Disponible en: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>
- Gibbs J y French D. 1980. Transmission of Oak wilt. USDA Forest Service Research paper NC-185. 17 p.
- Harrell F, Dupont C. 2015. Hmisc: Harrell Miscellaneous [En línea]. Consultado 17 febrero 2015. Disponible en: <http://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>
- Harrington T. 2013. *Ceratocystis* diseases. En: Gonthier P, Nicolotti G. (Eds.). *Infectious Forest Diseases*. UK: Library of Congress cataloging in publication data: 230-256.
- Harrington T, Thorpe D, Alfenas A. 2011. Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among brazilian populations of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*, 101 (5): 555-566.
- Harrington T. 2008. The genus *Ceratocystis*: Where does the Oak wilt fungus fit? En: Billings R, Appel D (Eds). *National Oak wilt symposium (2º, 2007, Austin Texas)*. Proceedings. 27-42.
- Heath R, Wingfield M, Wingfield B, Meke G, Mbaga A, Roux J. 2009. *Ceratocystis* species on *Acacia mearnsii* and *Eucalyptus* spp. in eastern and southern Africa including six new species. *Fungal Diversity*, 34: 41-67.
- INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria). 2015. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA –Uruguay Unidad de agroclima y sistemas de información [En línea]. Consultado 16 de diciembre 2014. Disponible en: <http://www.inia.uy/investigación-e-innovación/unidades/GRAS/Clima/Banco-datos-agroclimatico>.
- Kamgam G, Wingfield M, Roux J. 2013. *Ceratocystis* species, including two new taxa, from *Eucalyptus* trees in South Africa. *Australasian Plant Pathology*, 42 (3): 283-311.

- Kile G, Harrington T, Yuan Z, Dudzinski M, Old K. 1996. *Ceratocystis eucalypti* sp. nov., a vascular stain fungus from eucalypts in Australia. *Mycological Research*, 100 (5): 571-579.
- Kile G. 1993. Plant diseases caused by species of *Ceratocystis sensu stricto* and *Chalara*. En: Wingfield M., Seifert K y Webber J. *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity. Saint Paul MN. APS Press. 173-183.
- Mafia RG, Ferreira M, Zauza E, Silva J, Colodette J, Alfenas A. 2013. Impact of *Ceratocystis* wilt on *Eucalyptus* tree growth and cellulose pulp yield. *Forest Pathology*, 43: 379–385.
- Mafia RG, Alfenas A, Ferreira E, Breda D. 2011. Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. *Revista Árvore*, 35 (4): 817-824.
- R Core Team 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria [En línea]. Consultado 17 febrero 2015. Disponible en: <http://www.R-project.org/>
- Rodas C, Roux J, Van Wyk M, Wingfield B, Wingfield M. 2008. *Ceratocystis neglecta* sp. nov., infecting *Eucalyptus* trees in Colombia. *Fungal Diversity*, 28: 73-84.
- Roux J, Van Wyk M, Hatting H, Wingfield M. 2004. *Ceratocystis* species infecting stem wounds on *Eucalyptus grandis* in South Africa. *Plant Pathology*, 53: 414–421.
- Roux J, Coutinho T, Byabashaija D, Wingfield M. 2001. Diseases of plantation *Eucalyptus* in Uganda. *South African Journal of Science*, 97 (1): 16-18.
- Roux J, Wingfield M, Bouillet J, Winfield B, Alfenas A. 2000. A serious new wilt disease of *Eucalyptus* caused by *Ceratocystis fimbriata* in Central Africa. *Forest Pathology*, 30: 175–184.
- Russell V, Lenth and Maxime Hervé. 2015. Lsmeans: Least-Squares Means. R package version 2.14 [En línea]. Consultado 17 febrero 2015. Disponible en: <http://CRAN.R-project.org/package=lsmeans>
- Soares J y Almeida A. 2001. Modeling the water balance and soil water fluxes in a fast growing *Eucalyptus* plantation in Brazil. *Journal of Hydrology*, 253: 130-147.
- Tumura K, De Pieri C, Furtado E. 2012. Murcha por *Ceratocystis* em eucalipto: avaliação de resistência e análise epidemiológica. *Summa Phytopathologica*, 38 (1): 54-60.
- van Wyk M, Roux J, Kamgam G, Wingfield B, Wlingfield M. 2012. *Ceratocystis eucalypticola* sp. nov. from *Eucalyptus* in South Africa and comparison to global isolates from this tree. *IMA Fungus*, 3 (1): 45–58.
- van Wyk M, Wingfield B, Marin M, Wingfield M. 2010. New *Ceratocystis* species infecting coffee, cacao, citrus and native trees in Colombia. *Fungal Diversity*, 40: 103–117.

- van Wyk M, Wingfield B, Mohali S, Wingfield M. 2009. *Ceratocystis fimbriatomima*, a new species in the *C. fimbriata sensu lato* complex isolated from *Eucalyptus* trees in Venezuela. *Fungal Diversity*, 34: 173-183.
- Zeppel M, Murray B, Barton C, Eamus D. 2004. Seasonal responses of xylem sap velocity to VDP and solar radiation during drought in a stand of native trees in temperate Australia. *Functional Plant Biology*, 31: 461-470.

III. AGRESIVIDAD DE *Ceratocystis fimbriata* s.l. Y CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA GENÉTICA DE *Eucalyptus grandis* AL MARCHITAMIENTO POR *Ceratocystis*²

A. RESUMEN

Ceratocystis fimbriata s.l. ha sido descrito como agente causal de enfermedades en un amplio rango de especies vegetales de importancia económica, causando en especies del género *Eucalyptus* el marchitamiento por *Ceratocystis*. Pese a haber sido reportada en Uruguay en el 2003, no existen para el país antecedentes de estudios de agresividad de cepas de *C. fimbriata* s.l. presentes ni de la resistencia del germoplasma plantado en el país. El presente estudio tuvo por objetivo caracterizar la agresividad de cepas y explorar la resistencia genética de distintos genotipos de *E. grandis*. Para evaluar la agresividad de las cepas se inocularon plantines de *E. grandis*, con una suspensión de $2,5 \times 10^6$ conidios/mL. Las cinco cepas más agresivas se utilizaron para evaluar la resistencia de diez genotipos de *E. grandis*. Se observaron diferencias significativas en la agresividad de las cepas, medida como largo de lesión. Los genotipos de *E. grandis* evaluados mostraron diferencias significativas en su resistencia, sin un efecto significativo de la interacción cepa x genotipo. Las diferencias de agresividad entre cepas sugieren la importancia de contar con este tipo de información para asistir a los programas de mejoramiento con las cepas correctas, a su vez, la existencia de resistencia frente a *Ceratocystis fimbriata* s.l. de los diferentes genotipos evidencian la importancia de esta herramienta, tendiente a minimizar el impacto de esta enfermedad en las plantaciones de eucalipto

Palabras clave: patología forestal, inoculación artificial, control genético.

² Este capítulo fue escrito bajo el formato de Artículo de investigación de la revista Agrociencia Uruguay

**AGGRESSIVENESS OF *Ceratocystis fimbriata* s.l. STRAINS AND GENETIC RESISTANCE
OF *Eucalyptus grandis* TO *Ceratocystis*. WILT**

B. SUMMARY

Ceratocystis fimbriata s.l. has been described as the causal agent of diseases in a wide range of economically important plant species, being the causal agent of *Ceratocystis* wilt on *Eucalyptus*. In Uruguay, the disease was first reported in 2003, however studies of aggressiveness of local *C. fimbriata* s.l. strains is unprecedented. In addition, the genetic resistance of planted genotypes is unknown. Thus, this study aimed to characterize the aggressiveness of isolates and explore the genetic resistance of different genotypes of *E. grandis*. To assess the aggressiveness, *E. grandis* seedling plants were inoculated by injecting a spore suspension of $2,5 \times 10^6$ conidia/mL. Five of the most aggressive isolates were used to evaluate the genetic resistance of ten *E. grandis* genotypes. Significant differences in lesion size were observed among isolates and among *E. grandis* genotypes but isolate x germplasm interaction was not observed. The differences found in aggressiveness of the studied isolates highlights the importance of this information to assist the breeding programs with the correct isolates. Additionally, the existence of genetic resistance to *Ceratocystis fimbriata* s.l. of different genotypes evidenced the availability of this technology to minimize the impact of this disease in eucalypt plantations.

Keywords: forest pathology, artificial inoculation, genetic control.

C. INTRODUCCIÓN

Ceratocystis fimbriata s.l. Ellis & Halsted ha sido descrito como agente causal de enfermedades en un amplio rango de especies vegetales de importancia económica, causando marchitamientos, canchros y podredumbre de raíces (Baker *et al.*, 2003). El rango de hospederos incluye especies leñosas tales como plátano (*Platanus* spp.), mango (*Mangifera indica* L.), *Gmelina arborea* Roxb., cacao (*Theobroma cacao* L.), *Citrus* spp., café (*Coffea arabica* L.), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.D. Juss) Müll. Arg.), *Spathodea* sp., *Prunus* spp., higuera (*Ficus carica* L.), álamos (*Populus* spp.), *Acacia* spp., y *Eucalyptus* spp. (Baker *et al.*, 2003). También está citada en teca (*Tectona grandis*) (Firmino *et al.*, 2012a) y en Atemoya (híbrido de *Annona cherimola* con *A. squamosa*) (Firmino *et al.*, 2012b).

La infección en plantas leñosas se da a través de heridas con exposición del cambium y el xilema (Kile, 1993), aunque también puede darse directamente por contacto de raíces infectadas con raíces sanas (Ferreira *et al.*, 2013b). La diseminación ocurre mediante insectos vectores, herramientas de cosecha o poda, o incluso por plantines asintomáticos o sintomáticos (Ferreira *et al.*, 2013b, Kile *et al.*, 1996, Tumura *et al.*, 2012). Los síntomas característicos del marchitamiento por *Ceratocystis* en árboles son ramas que presentan las hojas secas adheridas, y decoloración del xilema de forma radial. También se puede observar la presencia de canchros alargados en la superficie del fuste (Ferreira *et al.*, 2006, Ferreira *et al.*, 2013a).

El marchitamiento por *Ceratocystis fimbriata* es una de las principales enfermedades del cultivo clonal de Eucalipto (*Eucalyptus* spp. e híbridos) en Brasil (Mafia *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2013a). En Uruguay, fue reportada en el año 2003, por Barnes *et al.* (2003b) luego de detectada la muerte de árboles podados de *E. grandis* de 1 a 5 años de edad, en el Departamento de Rivera.

La instalación de las plantaciones en Uruguay se realiza a partir de plantines provenientes de semilla o a partir de estacas, denominándose clones a los plantines obtenidos por propagación vegetativa. La propagación clonal permite producir genotipos de rápido crecimiento, con características de fibra homogéneas, facilitando además el desarrollo de clones resistentes a enfermedades en caso de que estos puedan ser identificados (Zauza *et al.*, 2004). Según Ferreira *et al.* (2006) en Brasil, el marchitamiento por *Ceratocystis* se ha manifestado como una enfermedad clon-específica y son varios los estudios que se han realizado en este sentido.

Zauza *et al.* (2004) realizaron estudios de resistencia a *C. fimbriata* en 18 clones comerciales de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*, frente a dos cepas de *C. fimbriata*. Seis de los clones se mostraron altamente susceptibles, ocho clones se mostraron medianamente susceptibles y los cuatro restantes no presentaron diferencias con el testigo sin inoculación. Estudios similares fueron realizados por Mafia *et al.* (2011), Tumura *et al.* (2012) y Firmino *et al.*

(2013), evaluando la resistencia de distintas especies de *Eucalyptus* y distintos clones, observándose en todos los estudios diferentes grados de resistencia dependiendo del material inoculado. Por su parte, Chen *et al.* (2013), realizaron inoculaciones a campo con diferentes cepas, y diferentes especies y clones de *Eucalyptus*, observando diferencias de susceptibilidad entre los diferentes genotipos.

En Uruguay, la presencia de resistencia genética en el germoplasma plantado aún no ha sido estudiada. Por consiguiente, el presente estudio tuvo por objetivo caracterizar la agresividad de cepas pertenecientes a la colección fúngica de la Estación Experimental Dr. Mario Cassinoni (Facultad de Agronomía), obtenidas desde plantaciones comerciales en estudios precedentes, y explorar la resistencia genética de distintos genotipos de *E. grandis* mediante la inoculación de las cepas más agresivas.

D. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Agresividad de *Ceratocystis fimbriata* s.l.

a. Colección de estudio

Las cepas utilizadas en este estudio fueron elegidas al azar de la colección de *Ceratocystis fimbriata sensu lato*, del laboratorio de fitopatología de la Facultad de Agronomía, Estación Experimental Dr. Mario Cassinoni. Esta colección se generó a partir de prospecciones realizadas en el norte del país (Departamentos de Tacuarembó y Rivera) en los años 2012 y 2013 (Cuadro 1).

Cuadro 1: Cepas de *Ceratocystis fimbriata* s.l. utilizadas en el presente estudio, obtenidas de *E. grandis*, según sustrato y ubicación geográfica.

Cepa	Sustrato	Ubicación geográfica
8289	Árbol muriendo	Rivera
CS3c12	Árbol trampa	Tacuarembó
P2d	Árbol trampa	Rivera
M1c*	Árbol trampa	Rivera
8318	Árbol muriendo	Rivera
8317	Árbol muriendo	Rivera
CS315	Árbol trampa	Tacuarembó
827112*	Árbol muriendo	Rivera
827011	Árbol muriendo	Rivera
CS5i	Insecto	Tacuarembó
83110	Árbol muriendo	Rivera
CS6c12*	Árbol trampa	Tacuarembó
827912	Árbol muriendo	Rivera
CS515	Árbol trampa	Tacuarembó
P5d	Árbol trampa	Rivera
827111*	Árbol muriendo	Rivera
CA1-3*	Árbol muriendo	Tacuarembó

*cepas utilizadas en la evaluación del comportamiento de distintos genotipos de *E. grandis*

Para evaluar la agresividad de las cepas, éstas fueron cultivadas en medio MEA+Y (por sus siglas en inglés, extracto de malta al 2%, agar al 1,5% y extracto de levadura al 0,2 %), a 25°C ± 0,5 durante 8 días. Luego de ese período se realizó una suspensión de esporas en 1 mL de agua estéril, con una gota de Tween 20%. Posteriormente se realizó el conteo de conidios en cámara de Neubauer, ajustando la suspensión a una concentración de 2,5 x 10⁶ conidios/mL.

b. Inoculación de plantines para caracterizar agresividad de cepas

El experimento se llevó a cabo en el mes de noviembre de 2013 en la Facultad de Agronomía, Estación Experimental Dr. Mario Cassinoni (EEMAC), bajo sombráculo. Se utilizaron plantines de *E. grandis* seminal, de 4 meses de edad, crecidos en macetas de 5 L de capacidad, con sustrato compuesto por 60% de corteza de pino compostada y 40% turba Pindstrup fertilizado con Osmocote 650 gr/m³ y superfosfato ISUSA 850 gr/m³.

Cada planta fue inoculada mediante una incisión en el tallo con bisturí estéril, realizada a 10 cm de altura desde su base. En dicha incisión se inyectaron 0,2 mL de la suspensión de conidios. Posteriormente, la herida fue cubierta con algodón humedecido con agua estéril, y sujeto con cinta de papel para evitar la desecación de las esporas, de acuerdo a una adaptación del método propuesto por Mafia *et al.* (2011). Como testigo se inyectaron plantas con 0,2 mL de agua estéril. Cada cepa fue inoculada en 10 plantas. Las plantas fueron distribuidas completamente al azar sobre mesadas y regadas a demanda.

Luego de 15 días de inoculadas, se evaluó el largo de la lesión en el xilema en cinco de los plantines inoculados por cada cepa. Para ello, se expuso el xilema mediante la remoción de la corteza con bisturí, midiéndose el largo de la zona con decoloración del tejido (lesión) (Baker *et al.*, 2003). Se registró además el número de plantas muertas con hoja adherida o con síntomas de marchitamiento.

Las cinco plantas restantes fueron evaluadas a los 4 y 6 meses, registrándose número de plantas muertas o con síntomas de marchitamiento. En la última evaluación además se cortaron los tallos de las plantas asintomáticas para corroborar si en el xilema se encontraba decoloración de tejido. Se extrajeron muestras del tejido con decoloración y se re-aisló el patógeno, siguiendo la técnica descrita por Barnes *et al.* (2003a). Brevemente, se tomó un trozo de tejido a analizar y se incubó entre dos rodajas de zanahoria desinfectada superficialmente con alcohol al 70 %, y envueltas en film para conservar la humedad. Luego de 5 días se examinó por la presencia de peritecios en la superficie de la zanahoria. Posteriormente, bajo lupa estereoscópica y con una aguja estéril, se colectaron esporas desde la masa de esporas presente en el ápice del peritecio y se sembraron en placas con MEA+Y. Luego de 8 días de incubación a 25°C ± 0,5, se confirmó la identidad de las cepas por morfología de colonia, fructificaciones y esporas, completando los postulados de Koch.

Se realizó análisis de varianza (ANOVA) para el largo de lesión. La comparación de todas las cepas contra el testigo se realizó con la prueba Dunnett con el paquete Multcomp (Hothorn, 2008) y la comparación múltiple de medias con Tukey con el paquete Agricolae (Mendiburu, 2014).

En todos los casos los análisis se realizaron con el programa estadístico R versión 3.1.2 (R Core Team, 2014).

2. Caracterización de la resistencia de distintos genotipos de *E. grandis*

Para caracterizar la resistencia de los distintos genotipos de *E. grandis*, se seleccionaron las cepas CS6c12, 827111, 827112, M1c y CA1-3. Las mismas fueron seleccionadas por presentar la mayor agresividad en el estudio anterior (Cuadro 1). La preparación de inóculo y la inoculación, se realizaron siguiendo los protocolos descritos anteriormente.

El experimento se llevó a cabo en el mes de agosto de 2014 en la Facultad de Agronomía, Estación Experimental Dr. Mario Cassinoni (EEMAC), en invernáculo cerrado con ventilación (temperatura promedio 17,1 °C). Se evaluaron nueve genotipos clonales de *E. grandis*, más un lote de *E. grandis* seminal de la fuente de semilla que fue utilizada en la prueba de agresividad de cepas. La instalación del experimento fue similar al detallado anteriormente, pero en este caso se inocularon seis plantas por genotipo con cada una de las cepas (Figura 1).



Figura 1: a) Solución de esporas utilizada en la inoculación de plantas de *E. grandis* con *C. fimbriata* s.l., b) inyección de solución de esporas a plantín de clon de *E. grandis*, y c) vista general de los plantines inoculados bajo invernáculo.

La evaluación se realizó a los 60 días post inoculación, registrándose el largo de la lesión en el xilema mediante el descortezado con bisturí, identificada como zona con decoloración del

tejido. Se registró además el número de plantas muertas con hoja adherida o con síntomas de marchitamiento. La verificación de la presencia del hongo se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el punto anterior, mediante trampas en rodajas de zanahoria.

El diseño del experimento fue multifactorial considerando como factores las diferentes cepas y los genotipos evaluados. El factor cepa tuvo cinco niveles mientras que el factor genotipo tuvo 10 niveles. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y luego comparación múltiple de medias con Tukey con el paquete Lsmean (Russell, 2015). En ambos casos se utilizó el programa estadístico R versión 3.1.2 (R Core Team, 2014).

E. RESULTADOS

1. Agresividad de distintas cepas de *Ceratocystis*

A los 15 días posteriores a la inoculación se registraron plantas muertas para cuatro de las cepas inoculadas y plantas con síntomas de marchitamiento para ocho de las cepas inoculadas. A los 120 y 180 días posteriores a la inoculación, si bien también se registraron plantas muertas o con síntomas de marchitamiento, en su mayoría se encontraban asintomáticas (Cuadro 2) (Figura 2). A los 180 días post inoculación se realizó el corte de los tallos de aquellas plantas asintomáticas y se observó que la mayoría de ellas presentaba decoloración en el xilema (Figura 2f). A su vez, de las muestras extraídas del xilema se logró re-aislar *C. fimbriata* desde plantas inoculadas con las cepas CA1-3, 8317, 827011, C315, 8278, 827111, 827112, 827912, 8318, CS3c12, lográndose cumplir con los postulados de Koch.

Cuadro 2: Número de plantas muertas o con síntomas de marchitamiento por *Ceratocystis* a los 15 y 120 días post inoculación (DPI)

	15 DPI		120 DPI	
	Con síntomas de marchitamiento	muertas	Con síntomas de marchitamiento	muertas
Testigo	0	0	0	0
8318	0	0	0	0
8289	0	0	0	0
827011	0	0	0	0
827912	0	0	0	0
8317	1	0	0	0
CS5i	1	0	0	0
CS3c12	1	0	0	1
CS515	0	1	0	0
83110	0	0	0	0
P5d	1	0	0	0
P2d	0	0	0	0
CS6c12	0	0	0	2
CS315	1	1	0	0
827111	1	0	0	0
827112	1	1	0	0
M1c	0	1	0	0
CA1-3	2	0	0	0

Nota: a los 180 DPI se registró una planta marchita en planta inoculada con la cepa 83110.



Figura 2: a) Plantines de *E. grandis* inoculados para la caracterización de agresividad de cepas de *Ceratocystis fimbriata* s.l., b) planta con marchitamiento en zona apical a los 15 DPI (indicado con flecha negra), c) planta muerta por marchitamiento por *C. fimbriata* s.l. a los 15 DPI, d) testigo a los 180 DPI sin decoloración de xilema, e) planta sin síntomas externos a los 180 DPI, y f) misma planta que en e con decoloración de xilema a los 180 DPI.

En la evaluación realizada a los 15 días, seis de las 17 cepas mostraron un largo de lesión significativamente mayor que el testigo (Cuadro 3). A su vez, se observaron diferencias significativas entre cepas (Figura 3), siendo las más agresivas la CA1-3 y la M1c.

Cuadro 3: Largo de lesión (cm), a los 15 DPI, en plantas de *E. grandis* en respuesta a la inoculación de cepas de *Ceratocystis fimbriata* s.l.

Cepa	Largo de lesión (cm)	Comparación Dunnett
CA1-3	25,09	***
M1c	20,78	***
827112	17,87	***
827111	15,27	***
CS315	12,87	***
CS6c12	11,74	***
P2d	11,67	Ns
P5d	10,66	Ns
83110	10,6	Ns
CS515	9,63	Ns
CS3c12	9,58	Ns
CS5i	8,54	Ns
8317	7,28	Ns
827912	7,19	Ns
827011	5,39	Ns
8289	4,43	Ns
8318	4,25	Ns
Testigo	0,27	

(***) Indica las cepas que difirieron significativamente del testigo según Dunnett ($p < 0,05$, CV=57,4%)

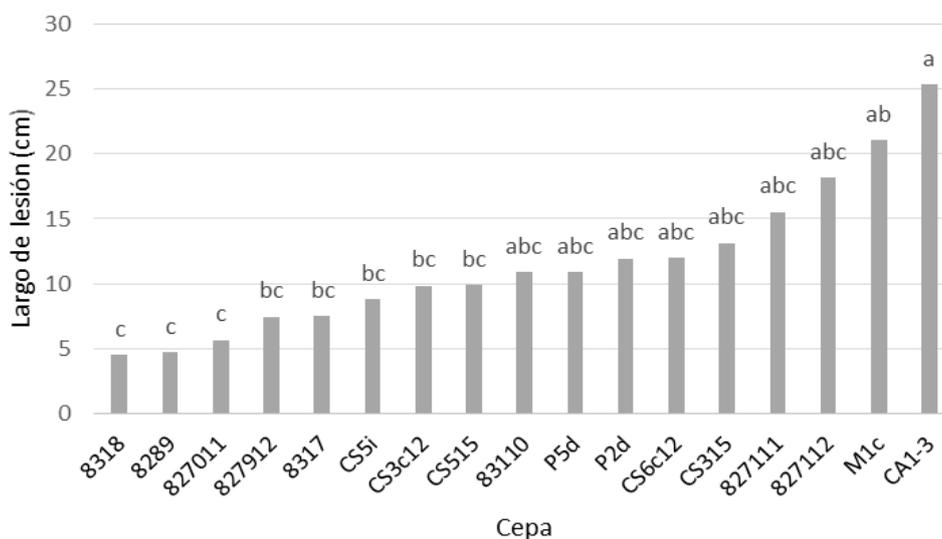


Figura 3: Largo de lesión en el xilema, a los 15 DPI, de plantas de *E. grandis* de origen seminal en respuesta a la inoculación de cepas de *Ceratocystis fimbriata* s.l. Medias con distinta letra difieren significativamente entre sí (Tukey, $p < 0,05$, CV=55,8%).



Figura 4: a y b) Cicatrización de un plantín testigo inoculado con agua estéril, c) cancro en corteza con decoloración producto de la infección por *C. fimbriata s.l.*, d y e) decoloración de xilema causada por la infección por *C. fimbriata s.l* con largo de lesión de 3 cm y más de 10 cm, respectivamente.

2. Caracterización de la resistencia de distintos genotipos de *E. grandis*

Los resultados del análisis de la varianza indican un efecto significativo del genotipo, no habiendo efecto de la cepa ni de la interacción cepa x genotipo (Cuadro 4). Todas las cepas evaluadas difirieron significativamente del testigo (datos no mostrados).

Las plantas de semilla presentaron el mayor largo de lesión, no difiriendo de los clones C6, C7, C8 y C9 (Figura 5). Los clones C1 y C2 mostraron las lesiones de menor tamaño, mientras que los restantes clones presentaron lesiones de tamaño intermedio.

Cuadro 4: Análisis de varianza para largo de lesión de xilema, a los 60 DPI, en diferentes clones de *E. grandis* como respuesta a la inoculación de cepas de *Ceratocystis fimbriata s.l.*

	GL	Cuadrado medio del error	Valor F	Pr (>F)	
Clon	9	2,04443	9,0396	1,04 x 10 ⁻¹¹	***
Cepa	4	0,37065	1,6388	0,1652	ns
Clon:Cepa	36	0,18894	0,8354	0,7359	ns
Residuales	234	0,22616			

*** $p < 0,001$, ns $p > 0,1$

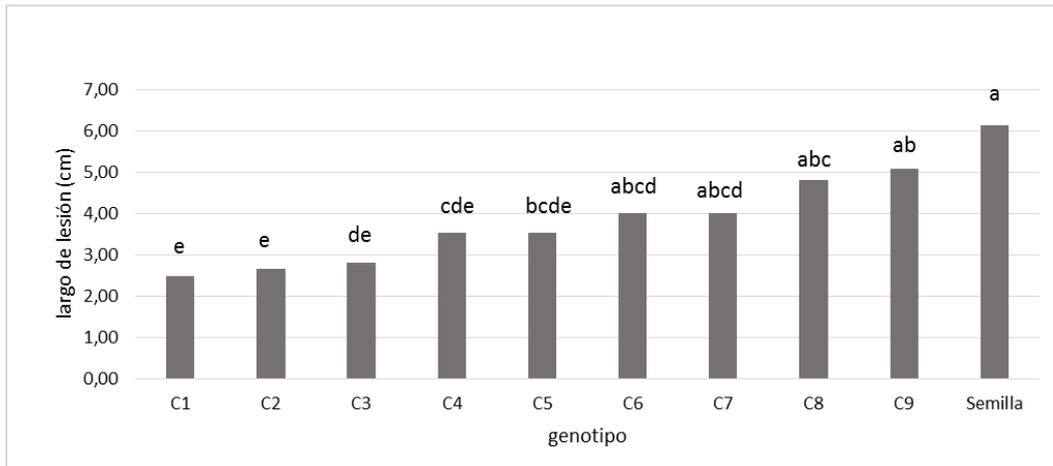


Figura 5: Largo de lesión de xilema, a los 60 DPI, observadas en plantines de distintos genotipos de *E. grandis*. Los valores corresponden al promedio de las 5 cepas de *Ceratocystis fimbriata* s.l. inoculadas en cada genotipo. Medias con distinta letra difieren significativamente entre sí (Tukey, $p < 0,05$, CV=34,7%).

F. DISCUSIÓN

Este trabajo representa el primer estudio de caracterización de la agresividad de cepas de *Ceratocystis fimbriata sensu lato* en Uruguay, de importancia fundamental para asistir a los programas de mejoramiento genético por resistencia al marchitamiento por *Ceratocystis*. A su vez, también representa la primer evidencia de la presencia de resistencia en genotipos de *E. grandis* utilizados en Uruguay.

Tanto la agresividad de las cepas de *C. fimbriata s.l.* como la resistencia de los diferentes genotipos de *E. grandis* se evaluó tomando al largo de lesión como variable, debido al escaso número de plantas muertas o con síntomas de marchitamiento de los materiales evaluados. Zauza *et al.* (2004), Machado *et al.* (2008), Tumura *et al.* (2012) y Firmino *et al.* (2013) también utilizaron el largo de lesión como variable ya que, al igual que en el presente estudio, la muerte de plantines fue limitado, observándose decoloración de xilema en plantines que no presentaban síntomas de marchitamiento.

Según Zauza *et al.* (2004), la baja mortandad o limitada expresión de los síntomas puede deberse, junto a otros factores aun no claramente identificados, a la edad de las plantas inoculadas y a las condiciones en las cuales se encuentran las mismas. En referencia a esto menciona que para un mismo clon de susceptibilidad conocida, en otro estudio no publicado, plantas de 4 meses de edad mostraron síntomas de marchitamiento comparado con las plantas inoculadas a los 8 meses de edad que no evidenciaron síntomas de marchitamiento.

Los resultados aquí obtenidos indican diferencias de agresividad entre cepas, con cepas de escasa agresividad (8218 y 8389), y otras altamente agresivas (CA1 y M1C). Las diferencias de agresividad entre cepas coinciden con la bibliografía. Baker *et al.* (2003) concluyeron que sólo 2 de las 3 cepas de *C. fimbriata* aisladas de *Eucalyptus* spp. causaron decoloración de xilema. Por su parte, Zauza *et al.* (2004) también observaron diferencias en el largo de lesión causada por la cepa C1442 frente a la cepa C1345. Resultados similares fueron obtenidos por Firmino *et al.* (2013). Rodas *et al.* (2008) para *Ceratocystis neglecta* en Colombia también observaron, para un mismo clon de *E. grandis*, diferencias en largo de lesión registrada para las dos cepas inoculadas.

Las cepa CA1-3, que mostró la mayor agresividad de las cepas evaluadas, fue aislada de un sitio donde se registró una severa epifita causada por este patógeno, lo cual podría indicar que el método de inoculación utilizado es adecuado para conocer la susceptibilidad a campo. La inoculación artificial presenta grandes ventajas por utilizar plantines de pequeño tamaño, permitiendo una caracterización de la agresividad en muy escaso tiempo y espacio.

La diferencia en resistencia observada entre genotipos permite visualizar una importante medida de manejo de esta enfermedad, sin precedentes a nivel nacional. Si bien hay evidencias de resistencia genética en estudios realizados en otros países, este representa la primera evidencia a nivel nacional. En este estudio se inoculó el genotipo que a nivel de campo sufrió una severa epifitía, mostrando ser uno de los materiales moderadamente susceptible (clon C5); este hecho corrobora que la inoculación artificial en plantines es un método efectivo también para la caracterización de genotipos frente a esta enfermedad.

No se observó efecto significativo de la interacción cepa x genotipo, lo cual indica que los genotipos tuvieron igual comportamiento independientemente de la cepa inoculada. La falta de interacción cepa x genotipo otorga mayor seguridad al momento de la búsqueda de genotipos resistentes, debido a que un genotipo resistente tendrá buen comportamiento independientemente de la cepa de *C. fimbriata* a la cual se enfrente. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Zauza *et al.* (2004), Firmino *et al.* (2013) y Chen *et al.* (2013). En todos estos casos los genotipos inoculados presentaron comportamiento diferencial dependiendo de la cepa con la cual eran inoculados.

El estudio de caracterización de agresividad permitió conocer la existencia de variabilidad entre las cepas. Pérez *et al.* (2010) mencionan la importancia de conocer la estructura poblacional del patógeno, debiéndose seleccionar aquellas cepas más agresivas o las más predominante dentro de la población del patógeno a la hora de implementar programas de mejoramiento genético por resistencia a determinado patógeno. Si bien los resultados obtenidos en el presente estudio indican que no hubo interacción cepa x genotipo, los mismos podrían presentar cierto sesgo debido a que se seleccionaron las cepas más agresivas para la caracterización de la resistencia.

El contar con una colección de cepas caracterizadas por agresividad, con un método de inoculación artificial validado, y con resultados preliminares de presencia de resistencia genética en los genotipos utilizados a nivel nacional, genera un escenario promisorio respecto al manejo de esta enfermedad. El conocimiento generado en este estudio permitirá asistir a los programas de mejoramiento genético, que busquen resistencia genética al marchitamiento por *Ceratocystis*, lo que en definitiva contribuirá a minimizar el impacto de esta enfermedad en las plantaciones.

G. BIBLIOGRAFÍA

- Baker C, Harrington T, Krauss U, Alfenas A. 2003. Genetic Variability and Host Specialization in the Latin American Clade of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*, 93 (10): 1274-1284.
- Barnes I, Roux J, Wingfield B, Dudzinski M, Old K, Wingfield M. 2003a. *Ceratocystis pirilliformis*, a new species from *Eucalyptus nitens* in Australia. *Mycologia*, 95 (5): 865–871.
- Barnes I, Roux J, Wingfield B, O’Neil M, Wingfield M. 2003b. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay. *Australian Plant Pathology*, 32: 361-366.
- Chen S, Van Wyk M, Roux J, Winfield M, Xie J, Zhou X. 2013. Taxonomy and pathogenicity of *Ceratocystis* species on *Eucalyptus* trees in South China, including *C. chinaeucensis* sp. nov. *Fungal Diversity*, 58: 267–279.
- Ferreira MA, Harrington T, Gongora-Canul C, Mafia R, Zauza E, Alfenas A. 2013a. Spatial-temporal patterns of *Ceratocystis* wilt in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Forest Pathology*, 43 (2): 153-164.
- Ferreira MA, Alfenas A, Mafia RG. 2013b. *Ceratocystis fimbriata* em espécies florestais e agronômicas no Brasil. En: NETIF-Núcleo de Estudos em Fitopatologia 1 ed. Patologia Florestal: desafios e perspectivas. Sao Carlos, SP. Suprema Gráfica e Editora. 75-101.
- Ferreira F, Mafia L, Barreto R, Demuner N, Pigatto S. 2006. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. *Revista Árvore*, 30 (2): 155-162.
- Firmino A, Tozze H, Gava de Souza I, Furtado E. 2013. Resistência de genótipos de Eucalipto a *Ceratocystis* spp. *Scientia Forestalis*, 41 (98): 165-173.
- Firmino A, Tozze Jr H, Furtado E, 2012a. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. *New Disease Reports*, 25: 24.
- Firmino A, Tozze Jr H, Costa P, Furtado E. 2012b. *Ceratocystis fimbriata* causando murcha em atemóia na região de Botucatu-SP. *Summa Phytopathologica*, 38 (2): 171.
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P. 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, 50 (3): 346-363.
- Kile G, Harrington T, Yuan Z, Dudzinski M, Old K. 1996. *Ceratocystis eucalypti* sp. nov., a vascular stain fungus from eucalypts in Australia. *Mycological Research*, 100 (5): 571-579.
- Kile G. 1993. Plant diseases caused by species of *Ceratocystis sensu stricto* and *Chalara*. En: Wingfield M., Seifert K y Webber J. *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity. Saint Paul MN. APS Press. 173-183.
- Machado P, Ferreira E, Binoti D, Mafia R, Alfenas A. 2008. Resistencia interespecífica de *Eucalyptus* a murcha -de- *Ceratocystis*, causada por *Ceratocystis fimbriata*. *Tropical plant pathology*, 33 (suplemento): 268.

- Mafia RG, Alfenas A, Ferreira E, Breda D. 2011. Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. Revista Árvore, 35 (4): 817-824.
- Mendiburu F. 2014. Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.2-1 [En línea]. Consultado 17 febrero 2015. Disponible en: <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.
- Pérez C, Bentancur O, Simeto S, Fros D, Altier N. 2010. Resistencia genética a las enfermedades: de la utopía a la realidad. En: Jornada técnica de Protección Forestal. Serie de actividades de difusión INIA. 629: 57-66.
- R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria [En línea]. Consultado 17 febrero 2015. Disponible en: <http://www.R-project.org/>
- Rodas C, Roux J, Van Wyk M, Wingfield B, Wingfield M. 2008. *Ceratocystis neglecta* sp. nov., infecting *Eucalyptus* trees in Colombia. Fungal Diversity, 28: 73-84.
- Russell V, Lenth and Maxime Hervé. 2015. Lsmeans: Least-Squares Means. R package version 2.14 [En línea]. Consultado 17 febrero 2015. Disponible en: <http://CRAN.R-project.org/package=lsmeans>
- Tumura K, De Pieri C, Furtado E. 2012. Murcha por *Ceratocystis* em eucalipto: avaliação de resistência e análise epidemiológica. Summa Phytopathologica, 38 (1): 54-60.
- Zauza E, Alfenas A, Harrington T, Mizubuti E, Silva J. 2004. Resistance of Eucalyptus clones to *Ceratocystis fimbriata*. Plant Disease, 88 (7): 758-760.

IV. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES GLOBALES

El marchitamiento vascular por *Ceratocystis fimbriata s.l.* es una importante enfermedad que afecta a *Eucalyptus* spp. En Uruguay anualmente se registran ataques por este patógeno causando la muerte de árboles con incidencias variables dependientes del año y del genotipo. Estas incidencias han sido relativamente bajas y principalmente localizadas en la región Noreste del territorio.

Las inoculaciones a campo indicaron que un único sitio de infección puede causar la muerte del árbol. Sin embargo, las inoculaciones múltiples mostraron que la misma ocurre más rápido cuando coinciden infecciones múltiples, donde es más probable que el bloqueo del xilema se produzca de forma generalizada, impidiendo el transporte de agua desde las raíces hacia los ápices, provocando un estrés hídrico que lleva a su muerte. La muerte de los árboles inoculados en el verano 2013-2014, con temperaturas promedio del período de 24,7 °C, se observaron a los 120 días posteriores a la inoculación, principalmente en las menores clases diamétricas.

De acuerdo a las prospecciones realizadas, la enfermedad estuvo presente en los diferentes sitios independientemente del número de poda, y del año de plantación. Sin embargo, sí estuvo relacionada al momento de poda, restringiéndose la ocurrencia de árboles muertos a aquellos sitios en donde la poda se había realizado en los meses correspondientes a las estaciones de primavera, verano y otoño. Esta estacionalidad se corroboró con el estudio de árboles trampa. Es probable que la estacionalidad esté explicada por las temperaturas mínimas que condicionan el crecimiento del hongo, la actividad metabólica del árbol, y la dinámica de los insectos asociados a la diseminación e infección de *Ceratocystis fimbriata s.l.*

Si bien las heridas son la principal vía de infección de *Ceratocystis fimbriata s.l.* en Uruguay, las mismas no se asocian exclusivamente a las tareas de poda. Esto quedó demostrado en este estudio, donde se registró una severa epifitía en un sitio en donde no se había realizado esta actividad. El origen de las heridas por tanto, pueden generarse por otros eventos como los climáticos (vientos, granizos, etc.).

Se requieren mayor investigación para lograr una completa comprensión acerca de la asociación de los insectos con la ocurrencia de las infecciones, siendo necesaria la identificación de aquellos insectos involucrados, así como la determinación de la dinámica poblacional de los mismos y los factores que hacen que estos se vean atraídos por las heridas.

Se logró ajustar un método de inoculación de cepas de *Ceratocystis* para *E. grandis* lo que permitió caracterizar la agresividad de diferentes cepas de *Ceratocystis fimbriata s.l.* A su vez, este método permitió la caracterización del comportamiento de 10 genotipos de *E. grandis* a esta enfermedad, observándose diferencias significativas en la resistencia entre genotipos, no

encontrándose interacción cepa x genotipo. Este estudio es el primer antecedente de caracterización de genotipos de *Eucalyptus* frente a *Ceratocystis fimbriata* s.l. en Uruguay, lo que posibilita la identificación de fuentes de resistencia de *Eucalyptus* frente a la enfermedad, herramienta fundamental para el manejo de la misma.

Es necesario continuar con estudios de este tipo que permitan caracterizar otras especies de *Eucalyptus* plantadas en Uruguay, ya que si bien en la actualidad no se registran grandes áreas afectadas por marchitamiento por *Ceratocystis*, a futuro y con la sucesión de rotaciones de *Eucalyptus*, el nivel de inóculo presente puede incrementarse, y con esto, también otras vías de infecciones pueden tomar importancia, como las infecciones que pueden ocurrir a través de raíces en sitios con historia de esta enfermedad.

V. BIBLIOGRAFIA

- Alfenas A, Ferreira E. 2008. Emerging diseases in *Eucalyptus* plantations. *Tropical Plant Pathology*, 33 (Suplemento): 25-28.
- Baker C, Harrington T, Krauss U, Alfenas A. 2003. Genetic Variability and Host Specialization in the Latin American Clade of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*, 93 (10): 1274-1284.
- Barnes I, Roux J, Wingfield B, Dudzinski M, Old K, Wingfield M. 2003a. *Ceratocystis pirilliformis*, a new species from *Eucalyptus nitens* in Australia. *Mycologia*, 95 (5): 865–871.
- Barnes I, Roux J, Wingfield B, O’Neil M, Wingfield M. 2003b. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay. *Australian Plant Pathology*, 32: 361-366.
- Chen S, Van Wyk M, Roux J, Winfield M, Xie J, Zhou X. 2013. Taxonomy and pathogenicity of *Ceratocystis* species on *Eucalyptus* trees in South China, including *C. chinaeucensis* sp. nov. *Fungal Diversity*, 58: 267–279.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2014. Anuario estadístico agropecuario 2014 [En línea]. Montevideo MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 6 de agosto 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2014/Diea-Anuario%202014-Digital01.pdf>.
- DGF (Dirección General Forestal). 2012a. Cartografía Forestal 2012 República Oriental del Uruguay [En línea]. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 21 de marzo 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,dgf,dgf-cartografia-forestal-2012,O,es,0>,
- DGF (Dirección General Forestal). 2012b. Bosques plantados registrados Eucalyptus [En línea]. Montevideo : MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 17 de diciembre 2014. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,dgf,dgf-recurso-forestal,O,es,0>
- EPPO/CABI. 1997. Data Sheets on Quarantine Pests. *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* [En línea]. Consultado 23 enero 2015. Disponible en: https://www.eppo.int/QUARANTINE/fungi/Ceratocystis_fimbriata_platani/CERAFFP_ds.pdf.
- Ferreira MA, Harrington T, Gongora-Canul C, Mafia R, Zauza E, Alfenas A. 2013a. Spatial-temporal patterns of *Ceratocystis* wilt in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Forest Pathology*, 43 (2): 153-164.
- Ferreira MA, Alfenas A, Mafia RG. 2013b. *Ceratocystis fimbriata* em espécies florestais e agrônômicas no Brasil. En: NETIF-Núcleo de Estudos em Fitopatologia 1 ed. Patologia Florestal: desafios e perspectivas. Sao Carlos, SP. Suprema Gráfica e Editora. 75-101.
- Ferreira MA, Harrington T, Alfenas A, Mizubuti E. 2011. Movement of genotypes of *Ceratocystis fimbriata* within and among *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Phytopathology*, 101 (8): 1005-1012.

- Ferreira E, Harrington T, Thorpe D, Alfenas A. 2010. Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. *Plant Pathology*, 59: 721–735.
- Ferreira, E, Alfenas A, Binoti D, Machado P, Santos C. 2007. Influência da murcha de *Ceratocystis* sobre o crescimento de um clone híbrido de *Eucalyptus* spp. *Fitopatologia Brasileira*, 32 (Suplemento): 216.
- Ferreira F, Mafía L, Barreto R, Demuner N, Pigatto S. 2006. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. *Revista Árvore*, 30 (2): 155-162.
- Ferreira F, Mafía L, Ferreira E. 2005. Detecção Rápida de *Ceratocystis fimbriata* em lenho infetado de Eucalipto, Mangueira e Outros Hospedeiros Lenhosos. *Fitopatologia brasileira*, 30 (5): 543-545.
- Firmino A, Tozze H, Gava de Souza I, Furtado E. 2013. Resistência de genótipos de Eucalipto a *Ceratocystis* spp. *Scientia Forestalis*, 41 (98): 165-173.
- Firmino A, Tozze Jr H, Furtado E, 2012a. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. *New Disease Reports*, 25: 24.
- Firmino A, Tozze Jr H, Costa P, Furtado E. 2012b. *Ceratocystis fimbriata* causando murcha em atemóia na região de Botucatu-SP. *Summa Phytopathologica*, 38 (2): 171.
- Fox J y Weisberg S. 2011. An {R} Companion to Applied Regression. Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage [En línea]. Consultado 17 febrero 2015. Disponible en: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>
- Gibbs J y French D. 1980. Transmission of Oak wilt. USDA Forest Service Research paper NC-185. 17 p.
- Harrell F, Dupont C. 2015. Hmisc: Harrell Miscellaneous [En línea]. Consultado 17 febrero 2015. Disponible en: <http://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>
- Harrington T. 2013. *Ceratocystis* diseases. En: Gonthier P, Nicolotti G. (Eds.). *Infectious Forest Diseases*. UK: Library of Congress cataloging in publication data: 230-256.
- Harrington T, Thorpe D, Alfenas A. 2011. Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among brazilian populations of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*, 101 (5): 555-566.
- Harrington T. 2008. The genus *Ceratocystis*: Where does the Oak wilt fungus fit? En: Billings R, Appel D (Eds). *National Oak wilt symposium (2°, 2007, Austin Texas)*. Proceedings. 27-42.
- Harrington T. 2000. Host specialization and speciation in the American wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. *Fitopatologia Brasileira*, 25 (suplemento): 262-263.
- Heath R, Wingfield M, Wingfield B, Meke G, Mbaga A, Roux J. 2009. *Ceratocystis* species on *Acacia mearnsii* and *Eucalyptus* spp. in eastern and southern Africa including six new species. *Fungal Diversity*, 34: 41-67.

- Hothorn T, Bretz F, Westfall P. 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, 50 (3): 346-363.
- INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria). 2015. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA–Uruguay Unidad de agroclima y sistemas de información [En línea]. Consultado 16 de diciembre 2014. Disponible en: <http://www.inia.uy/investigación-e-innovación/unidades/GRAS/Clima/Banco-datos-agroclimatico>.
- Kamgan G, Wingfield M, Roux J. 2013. *Ceratocystis* species, including two new taxa, from *Eucalyptus* trees in South Africa. *Australasian Plant Pathology*, 42 (3): 283-311.
- Kile G, Harrington T, Yuan Z, Dudzinski M, Old K. 1996. *Ceratocystis eucalypti* sp. nov., a vascular stain fungus from eucalypts in Australia. *Mycological Research*, 100 (5): 571-579.
- Kile G. 1993. Plant diseases caused by species of *Ceratocystis sensu stricto* and *Chalara*. En: Wingfield M., Seifert K y Webber J. *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, Ecology and Pathogenecity. Saint Paul MN. APS Press. 173-183.
- Machado P, Ferreira E, Binoti D, Mafia R, Alfenas A. 2008. Resistencia interespecífica de *Eucalyptus* a murcha –de- *Ceratocystis*, causada por *Ceratocystis fimbriata*. *Tropical plant pathology*, 33 (suplemento): 268.
- Mafia RG, Ferreira M, Zauza E, Silva J, Colodette J, Alfenas A. 2013. Impact of *Ceratocystis* wilt on *Eucalyptus* tree growth and cellulose pulp yield. *Forest Pathology*, 43: 379–385.
- Mafia RG, Alfenas A, Ferreira E, Breda D. 2011. Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. *Revista Árvore*, 35 (4): 817-824.
- Mendiburu F. 2014. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.2-1 [En línea]. Consultado 17 febrero 2015. Disponible en: <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.
- Naidoo S, Külheim C, Zwart L, Mangwanda R, Oates C, Visser E, Wilken F, Mamni T, Myburg A. 2014. Uncovering the defence responses of *Eucalyptus* to pests and pathogens in the genomics age. *Tree Physiology*, 34: 931–943.
- Pérez C, Bentancur O, Simeto S, Fros D, Altier N. 2010. Resistencia genética a las enfermedades: de la utopía a la realidad. En: Jornada técnica de Protección Forestal. Serie de actividades de difusión INIA. 629: 57-66.
- R Core Team. 2014. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria [En línea]. Consultado 17 febrero 2015. Disponible en: <http://www.R-project.org/>
- Rodas C, Roux J, Van Wyk M, Wingfield B, Wingfield M. 2008. *Ceratocystis neglecta* sp. nov., infecting *Eucalyptus* trees in Colombia. *Fungal Diversity*, 28: 73-84.

- Roux J, Van Wyk M, Hatting H, Wingfield M. 2004. *Ceratocystis* species infecting stem wounds on *Eucalyptus grandis* in South Africa. *Plant Pathology*, 53: 414–421.
- Roux J, Coutinho T, Byabashaija D, Wingfield M. 2001. Diseases of plantation *Eucalyptus* in Uganda. *South African Journal of Science*, 97 (1): 16-18.
- Roux J, Wingfield M, Bouillet J, Winfield B, Alfenas A. 2000. A serious new wilt disease of *Eucalyptus* caused by *Ceratocystis fimbriata* in Central Africa. *Forest Pathology*, 30: 175–184.
- Russell V, Lenth and Maxime Hervé. 2015. Lsmeans: Least-Squares Means. R package version 2.14 [En línea]. Consultado 17 febrero 2015. Disponible en: <http://CRAN.R-project.org/package=lsmeans>
- Soares J y Almeida A. 2001. Modeling the water balance and soil water fluxes in a fast growing *Eucalyptus* plantation in Brazil. *Journal of Hydrology*, 253: 130-147.
- Tumura K, De Pieri C, Furtado E. 2012. Murcha por *Ceratocystis* em eucalipto: avaliação de resistência e análise epidemiológica. *Summa Phytopathologica*, 38 (1): 54-60.
- van Wyk M, Roux J, Kamgam G, Wingfield B, Wingfield M. 2012. *Ceratocystis eucalypticola* sp. nov. from *Eucalyptus* in South Africa and comparison to global isolates from this tree. *IMA Fungus*, 3 (1): 45–58.
- van Wyk M, Wingfield B, Marin M, Wingfield M. 2010. New *Ceratocystis* species infecting coffee, cacao, citrus and native trees in Colombia. *Fungal Diversity*, 40: 103–117.
- van Wyk M, Wingfield B, Mohali S, Wingfield M. 2009. *Ceratocystis fimbriatomima*, a new species in the *C. fimbriata sensu lato* complex isolated from *Eucalyptus* trees in Venezuela. *Fungal Diversity*, 34: 173-183.
- Webster R, Butler E. 1967. A morphological and biological concept of the species *Ceratocystis fimbriata*. *Canadian Journal of botany*, 45 (9): 1457-1468.
- Wingfield M, Winfield B. 1999. A positive prognosis for plantation species. *Asian timber*. Julio 1999: 16-19.
- Wingfield M. 1999. Pathogens in exotic plantation forestry. *International Forestry Review*, 1 (3): 163-168.
- Wingfield M, Beer C, Visser C, Wingfield B. 1996. A new *Ceratocystis* species defined using morphological and ribosomal DNA sequences comparisons. *System. Appl. Microbiology*, 19: 191-202.
- Zauza E, Alfenas A, Harrington T, Mizubuti E, Silva J. 2004. Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. *Plant Disease*, 88 (7): 758-760.
- Zeppel M, Murray B, Barton C, Eamus D. 2004. Seasonal responses of xylem sap velocity to VDP and solar radiation during drought in a stand of native trees in temperate Australia. *Functional Plant Biology*, 31: 461-470.