

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MANCHAS FOLIARES
BACTERIANAS EN *EUCALYPTUS***

por

María Cintia PALLADINO ALMADA

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

PAYSANDÚ
URUGUAY
2015

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Dr. Guillermo Pérez, Dra. Elisa Silvera y Dra. María Inés Siri, el 14 de agosto del 2015.

Autora: Ing. Agr. María Cintia Palladino Almada.

Director: Dr. Carlos A. Pérez.

DEDICATORIA

A mis padres, Letty y José, por haberme brindado educación y apoyarme incondicionalmente.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, especialmente a mis padres y a Wilmar por el apoyo y amor incondicional.

A Carlos Pérez por ser mi orientador en este trabajo y fundamentalmente por ser el responsable de mi formación académica y profesional.

A mis compañeros de laboratorio (Andrés, Fabrizio, Felipe, María, Noelia, Rossana, Pilar x2, Pía, Silvana y Cintia) por la amistad recibida y sus infinitas colaboraciones en la realización de este trabajo.

A Noel por su compañerismo y ayuda incondicional, constituyo una ayuda fundamental en el invernáculo.

A las empresas forestales Forestal Oriental-UPM, Montes del Plata, Forestal Atlántico Sur, COFUSA, Weyerhaeuser Uruguay y a la Sociedad de Productores Forestales (SPF) por la inmensa ayuda, cediendo área experimental y apoyando en la logística de los experimentos.

A Sociedad de Productores Forestales y CSIC-UdelaR en su programa VUSP. Por la financiación de este proyecto.

A Raquel Alonso y Carlos Pérez por redactar el proyecto y ser los coordinadores responsables del mismo, sin ellos este trabajo no se hubiera realizado.

A Guillermo Pérez por su compañerismo y su colaboración en el trabajo de campo.

A Acelino Alfenas por darme la oportunidad de realizar un entrenamiento en su laboratorio de Patología Forestal en Viçosa - Brasil y con su grupo de trabajo, del mismo enfatizo el agradecimiento a Hélivio Ferraz y colaboradores por las enseñanzas brindadas, las cuales fueron muy importantes en la realización de este trabajo.

A María Julia Pianzola, Inés Siri y María José Montelongo por aceptarme en sus laboratorios, dejarme aprender con su trabajo, enseñanzarme sus técnicas y por las colaboraciones realizadas en este estudio.

Muchas gracias a todos!!! Sin la ayuda de cada uno de ellos no hubiera sido posible este trabajo. Gracias!!!.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN.....	IX
SUMMARY.....	X
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>ENFERMEDADES BACTERIANAS DEL <i>Eucalyptus</i>. ESTADO DEL</u> <u>CONOCIMIENTO</u>	3
2.1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	6
2.2. <u>MANCHAS FOLIARES BACTERIANAS</u>	7
2.2.1. <u>Etiología y sintomatología</u>	7
2.2.2. <u>Epidemiología</u>	9
2.2.3. <u>Distribución geográfica y rango de hospederos</u>	9
2.2.4. <u>Daños</u>	11
2.2.5. <u>Control de la enfermedad</u>	11
2.2.6. <u>Situación de las manchas foliares bacterianas en</u> <u>Uruguay</u>	12
2.3. <u>TIZÓN APICAL BACTERIANO</u>	12
2.3.1. <u>Etiología y sintomatología</u>	12
2.3.2. <u>Epidemiología</u>	15
2.3.3. <u>Distribución geográfica y rango de hospederos</u>	16
2.3.4. <u>Daños</u>	17
2.3.5. <u>Control de la enfermedad</u>	18
2.3.6. <u>Situación del tizón apical bacteriano en</u> <u>Uruguay</u>	18
2.4. <u>MARCHITAMIENTO VASCULAR CAUSADO POR</u> <u>BACTERIAS</u>	18
2.4.1. <u>Etiología y sintomatología</u>	18
2.4.2. <u>Epidemiología</u>	20
2.4.3. <u>Distribución geográfica y rango de hospederos</u>	21

2.4.4. <u>Daños</u>	22
2.4.5. <u>Control de la enfermedad</u>	23
2.4.6. <u>Situación del marchitamiento vascular bacteriano en en Uruguay</u>	23
2.5. CONSIDERACIONES FINALES	24
2.6. BIBLIOGRAFÍA	24
3. <u>ETIOLOGÍA DE LAS MANCHAS FOLIARES BACTERIANAS EN <i>Eucalyptus</i> Y POSIBILIDADES DE MANEJO POR RESISTENCIA GENÉTICA</u>	33
3.1. INTRODUCCIÓN	36
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.2.1. <u>Colecta e identificación de agentes etiológicos</u>	37
3.2.1.1. Colección de estudio	37
3.2.1.2. Pruebas de hipersensibilidad y patogenicidad	38
3.2.1.3. Caracterización bioquímica	38
3.2.1.4. Análisis molecular	39
3.2.2. <u>Caracterización de la agresividad de las cepas</u>	40
3.2.3. <u>Caracterización de la resistencia de genotipos de <i>E. grandis</i> y <i>E. dunnii</i></u>	41
3.2.4. <u>Análisis estadísticos</u>	42
3.3. RESULTADOS	42
3.3.1. <u>Colecta e identificación de agentes etiológicos</u>	42
3.3.1.1. Colección de estudio	42
3.3.1.2. Pruebas de hipersensibilidad y patogenicidad	43
3.3.1.3. Caracterización bioquímica	44
3.3.1.4. Análisis molecular	46
3.3.2. <u>Caracterización de la agresividad de las cepas</u>	50
3.3.3. <u>Caracterización de la resistencia de genotipos de <i>E. grandis</i> y <i>E. dunnii</i></u>	54
3.4. DISCUSIÓN	57
3.5. BIBLIOGRAFÍA	61

4. <u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	66
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	68

RESUMEN

Las manchas foliares bacterianas en Uruguay a pesar de haber alcanzado niveles epidémicos en *Eucalyptus dunnii* y *E. grandis*, aún no han sido objeto de estudio. El objetivo de esta investigación fue generar conocimientos para contribuir al manejo de las manchas foliares bacterianas en plantaciones de eucalipto. Los objetivos específicos fueron: i) resumir la información actual respecto al estado del conocimiento de las enfermedades bacterianas en eucalipto a nivel mundial, ii) crear una colección de bacterias causantes de manchas foliares bacterianas en eucalipto, iii) caracterizar la agresividad de los aislados, y iv) evaluar el comportamiento sanitario de diferentes clones de *E. grandis* y *E. dunnii* frente a las cepas más agresivas. Para cumplir con estos objetivos se realizó una revisión bibliográfica. Se generó una colección de cepas bacterianas. Éstas fueron sometidas a pruebas de hipersensibilidad y de patogenicidad. Las cepas patogénicas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas y moleculares. Se ajustó un protocolo de inoculación artificial. Seis cepas de la colección fueron inoculadas en plantines seminales de *E. grandis*, de las cuales se seleccionaron las tres cepas más agresivas para evaluar la respuesta de distintos genotipos de *E. grandis* y *E. dunnii* ante las mismas. Se confirmó la presencia de los géneros *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Pantoea*, siendo *Xanthomonas axonopodis* la especie predominante. Los resultados evidencian la presencia de variabilidad en la agresividad de las cepas, aún dentro de la misma especie. Se observó variabilidad en el comportamiento de distintos germoplasmas ante las cepas. Estos resultados permitirán asistir a los programas de mejoramiento genético, que busquen selección por resistencia frente a manchas foliares bacterianas.

Palabras clave: bacterias fitopatógenas, agresividad de cepas, inoculación artificial, resistencia genética.

SUMMARY

Etiology of bacterial leaf spot in *Eucalyptus*

Bacterial leaf spot in Uruguay despite having reached epidemic levels in *Eucalyptus grandis* and *E. dunnii* have not yet been studied. The aim of this study was to generate knowledge to contribute to the management of bacterial leaf spot in eucalyptus plantations. The specific objectives were to: i) conduct a review on the knowledges on bacterial diseases in *Eucalyptus* worldwide, ii) create a culture collection of bacteria associated with leaf spot in eucalyptus iii) characterize the aggressiveness of the isolates collections, and iv) evaluate resistance of different clones of *E. grandis* and *E. dunnii* against the most aggressive strains. Thus, a literature review was conducted. A culture collection of bacterial strains was created. They were tested for hypersensitivity and pathogenicity, and pathogenic strains were identified by biochemical test and molecular tool. An artificial inoculation protocol was developed and adjusted. Six strains were inoculated on seed-originated *E. grandis* seedlings, and the three most aggressive strains were selected to evaluate the response of different genotypes of *E. grandis* and *E. dunnii* on them. Species of *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia* and *Pantoea* were found associated with leaf blotches. *Xanthomonas axonopodis* the predominant species. The results show the presence of variability in aggressiveness of the strains, even within the same species. Differences on susceptibility of *Eucalyptus* genotypes against most aggressive strains were observed. These results will assist breeding programs for genetic resistance against bacterial leaf blotches.

Keywords: plant pathogenic bacteria, aggressive strains, artificial inoculation, genetic resistance.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Eucalyptus* pertenece a la familia *Myrtaceae*, y está compuesto por aproximadamente 950 especies (Bush, 2011). La mayoría de las especies de eucalipto son nativas de Australia, sólo unas pocas se encuentran de forma natural fuera de ese país, como ser norte de Oceanía y sur de Asia; Papúa Nueva Guinea y Timor, sur de Indonesia y sur de Filipinas (Slee *et al.*, 2006). La diversidad y plasticidad fenotípica aún dentro de la misma especie, le han permitido predominar en regiones tropicales y subtropicales, siendo uno de los árboles más plantados en el mundo (Grattapaglia *et al.*, 2012). Se estima que hay más de 20 millones de hectáreas plantadas en el mundo (Naidoo *et al.*, 2014).

El eucalipto como especie introducida en muchas partes del mundo, en un principio, fue separado de la mayor parte de sus enemigos naturales (Wingfield *et al.*, 2008; Mitchell y Power, 2003; Keane y Crawley, 2002), permitiendo que dicho género tuviera excelente desempeño sanitario. A pesar de esto, los problemas sanitarios han aumentado en los últimos años, como producto de re-encuentros de patógenos del eucalipto que han sido introducidos a las nuevas áreas, dado el creciente movimiento de personas y productos en todo el mundo. Pero no solo han aumentado los re-encuentros sino también ha ocurrido la interacción con patógenos nativos que han encontrado en el eucalipto una nueva fuente de sustrato (Wingfield *et al.*, 2013; Wingfield, 2003).

Las primeras introducciones de eucalipto en Uruguay datan del 1853 con el propósito principalmente de bosques de abrigo y sombra para el ganado. Luego de la primer y segunda ley forestal en el año 1968 y 1987 respectivamente, aumentaron las introducciones con el fin de obtener materiales más productivos (Soust, 2012). De esta manera se observa una constante expansión del área plantada, pasando de menos de 50.000 ha a inicios de los 90's a 954.000 ha plantadas en el año 2012. Actualmente las plantaciones forestales representan un 52 % de la masa forestal del país, compuesta por 14 % de pinos y 38 % de eucaliptos. Dentro del género *Eucalyptus* predominan *E. globulus*, *E. grandis* y *E. dunnii*, los cuales representan el 95 % del total del área (MGAP/DIEA, 2013).

Esta expansión en el área plantada y la introducción de gran cantidad de germoplasma al país, aumentan los riesgos de introducir microorganismos asociados al mismo. Este aumento del riesgo se ha visto reflejado en un incremento relativo de los problemas sanitarios en las

plantaciones desde su introducción (Pérez, 2012). En este sentido, a partir de 1999 se han observado problemas sanitarios principalmente de origen fúngico como ser las manchas foliares, cancro de fuste o ramas, muerte regresiva, marchitamiento vascular y roya (Soria *et al.*, 2014; Pérez *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2010; Brady *et al.*, 2009a; Brady *et al.*, 2009b; Pérez *et al.*, 2009a; Pérez *et al.*, 2009b; Pérez *et al.*, 2009c; Cortinas *et al.*, 2006; FAO, 2006; Barnes *et al.*, 2003; Telechea *et al.*, 2003; Bettucci *et al.*, 1999). Por otro lado, desde el 2009 se evidencia un creciente aumento de problemáticas de origen bacteriano, como ser manchas foliares y tizón apical (Balmelli *et al.*, 2009a). Estas enfermedades se han observado en *E. dunnii* y *E. grandis* (Simeto *et al.*, 2010), y pese a los niveles epidémicos reportados en los últimos cinco años en Uruguay (Balmelli *et al.*, 2009a; Balmelli *et al.*, 2009b), son escasos los antecedentes nacionales respecto a las enfermedades bacterianas en los cultivos forestales.

Por este motivo, el objetivo general de este trabajo fue generar conocimientos para contribuir al manejo de las manchas foliares bacterianas en plantaciones de eucalipto. Los objetivos específicos fueron: i) resumir la información actual respecto al estado del conocimiento de las enfermedades bacterianas del eucalipto a nivel mundial, ii) crear una colección de bacterias asociadas a manchas foliares bacterianas en eucalipto, con aislamientos realizados a partir de síntomas característicos de la enfermedad, provenientes de las principales zonas productoras de Uruguay, iii) caracterizar la agresividad de las cepas, y iv) evaluar el comportamiento sanitario de diferentes clones de *E. grandis* y *E. dunnii* frente a las cepas más agresivas.

La estructura central de este trabajo consiste en dos artículos científicos. El primer artículo, corresponde a una revisión bibliográfica, titulada “Enfermedades bacterianas del *Eucalyptus*. Estado del conocimiento”, el cual busca resumir la información disponible a nivel internacional respecto esta problemática. Y un segundo artículo titulado “Etiología de las manchas bacterianas en eucalipto y posibilidades de manejo por resistencia genética”, el cual representa el primer estudio sobre bacterias patógenas del eucalipto en Uruguay. Se proyecta remitir ambos artículos en la revista *Agrociencia Uruguay*, para su publicación.

2. ENFERMEDADES BACTERIANAS DEL *Eucalyptus*. ESTADO DEL CONOCIMIENTO *

Palladino Cintia¹, Pérez Guillermo², Pérez Carlos A.^{3*}

¹ Polo de Desarrollo Universitario “Impacto de los fitosanitarios sobre los productos agroalimentarios y ambiente”, Centro Universitario de Paysandú, UdelaR, EEMAC, Ruta 3 Km 363, 60000, Paysandú, Uruguay. ² Polo de Desarrollo Universitario Forestal, Centro Universitario de Tacuarembó, UdelaR, Ruta 5 Km 386, 45000 Tacuarembó, Uruguay.³ Departamento de Protección Vegetal, EEMAC, Facultad de Agronomía, UdelaR. EEMAC, Ruta 3 Km 363, 60000, Paysandú, Uruguay. *E-mail:* caperez@fagro.edu.uy.

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

Resumen

En los últimos años se ha observado un aumento sustantivo de las problemáticas sanitarias en las plantaciones de eucalipto en Uruguay. Diversas enfermedades afectan actualmente a este cultivo, predominando aquellas causadas por hongos. Sin embargo las enfermedades de origen bacteriano han aumentado su importancia tanto a nivel mundial como nacional. Las bacterias fitopatógenas en eucalipto pueden causar: i) manchas foliares, ii) tizón apical y iii) marchitamiento vascular. En el mundo, las manchas foliares bacterianas han sido asociadas a los géneros *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Pantoea* y *Rhizobiaceae*, siendo *Xanthomonas axonopodis* la especie predominante. El tizón bacteriano puede ser causado por distintas especies bacterianas, *Erwinia psidii*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea eucalypti*, *Pantoea deyli*, *Pantoea vagans*, *Enterobacter cowanii*, *Xanthomonas campestris* y *Xanthomonas vasicola*. Mientras que el marchitamiento vascular ha sido asociado a *Ralstonia solanacearum* y *Erwinia psidii*. Estas enfermedades representan un potencial riesgo para la producción forestal, ya que han sido reportadas en diversas zonas climáticas del mundo ocasionando graves pérdidas económicas, tanto en vivero como en campo, pudiendo afectar un amplio rango de hospederos dentro del género *Eucalyptus*, como también algunas especies del género *Psidium*. Sumado a esto, las bacterias se diseminan con facilidad dificultando su control, por lo que la principal medida de manejo es la utilización de germoplasma con mejor comportamiento sanitario frente a estas enfermedades. En Uruguay solo han sido reportadas bacterias causantes de tizón apical, faltando estudios tanto de etiología como de epidemiología para poder comprender ésta problemática y poder dar respuestas al sector productivo.

Palabras claves: bacterias fitopatógenas, manchas foliares, tizón apical, marchitamiento vascular.

Summary

Bacterial diseases on *Eucalyptus*. Current knowledge.

Over the last 15 years there has been a substantial increase in sanitary problems on *Eucalyptus* plantations in Uruguay. Several diseases are currently affecting this crop, predominantly those caused by fungi. However, bacterial diseases have increased in importance both locally and globally. *Eucalyptus* plant pathogenic bacteria can cause: i) leaf spots, ii) shoot blight and iii) vascular wilt. Bacterial leaf spot have been associated with genera *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Pantoea* and *Rhizobiaceae*, being *Xanthomonas axonopodis* the predominant species. Bacterial shoot blight can be caused by several species, named *Erwinia psidii*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea eucalypti*, *Pantoea deylli*, *Pantoea vagans*, *Enterobacter cowanii*, *Xanthomonas campestris* and *Xanthomonas vasicola*, whereas vascular wilt has been associated with *Ralstonia solanacearum* and *Erwinia psidii*. These diseases represent a potential risk for forestry production, as have been reported worldwide causing serious economic losses, in both nursery and field, affecting a wide host range into the genus *Eucalyptus*, and some species of *Psidium*. In addition, the effective dissemination of these bacterial diseases makes it difficult to control, so the deployment of genetic resistant germplasm is strongly recommended to minimize the impact of these diseases. In Uruguay only bacterial shoot and stem blight has been reported, even though epidemic outbreaks of leaf spots have been observed. Thus further investigation is needed to have a better comprehension of bacterial diseases to assist local forestry industry.

Key words: plant pathogenic bacteria, leaf spots, die-back, vascular wilt.

2.1. INTRODUCCIÓN

La masa forestal de Uruguay totaliza 1.812.000 ha, de las cuales 694.000 (38 % del total) están plantadas con eucalipto (MGAP/DIEA, 2013). Pese a la exitosa producción forestal nacional, en los últimos años, se ha observado un aumento de las problemáticas sanitarias en el país. Diversas enfermedades afectan actualmente las plantaciones de eucalipto de Uruguay, como por ejemplo, las manchas foliares y cancro de fuste causados por *Mycosphaerellaceae* y *Teratosphaeriaceae* (Soria *et al.*, 2014; Pérez *et al.*, 2009a; Pérez *et al.*, 2009c), manchas foliares por *Quambalaria eucalypti* (Bettucci *et al.*, 1999), canchros y muerte regresiva causados por especies *Botryosphaeriaceae* (Pérez *et al.*, 2010), canchros por *Inocutis jamaicensis* (Pérez *et al.*, 2009b), marchitamiento vascular ocasionado por *Ceratocystis fimbriata* (Barnes *et al.*, 2003), cancro del fuste o ramas por *Teratosphaeria gauchensis* (Cortinas *et al.*, 2006), roya causada por *Puccinia psidii* (Pérez *et al.*, 2011; Telechea *et al.*, 2003), y tizón apical causado por cinco especies bacterianas, *Erwinia psidii* (Coutinho *et al.*, 2011), *Pantoea ananatis* (FAO, 2006), *Enterobacter cowanii* (Brady *et al.*, 2009a) *Pantoea eucalypti* y *Pantoea vagans* (Brady *et al.*, 2009b).

Los hongos son y han sido los agentes causales de enfermedades que han predominado históricamente en la producción de *Eucalyptus* a nivel mundial, sin embargo, en los últimos 10 años las enfermedades de origen bacteriano han aumentado su importancia relativa (Pérez *et al.*, 2014; Arriel *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2008). A nivel mundial se han reportado hasta el momento tres grupos de enfermedades bacterianas asociadas a especies de eucalipto: i) manchas foliares, ii) tizón apical y iii) marchitamiento vascular. Estas enfermedades son relativamente recientes, la información disponible está dispersa y relacionada a los lugares en donde se reportó. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue reunir, sintetizar y describir el estado del conocimiento de este grupo de enfermedades a nivel mundial y particularmente en Uruguay. Por esta razón los capítulos de esta revisión son los tres grupos de enfermedades hasta el momento reportadas en el mundo.

2.2. MANCHAS FOLIARES BACTERIANAS

2.2.1. Etiología y sintomatología

Las manchas foliares causadas por bacterias en eucalipto fueron descritas por primera vez en Cuba el año 1983, cuando Querejeta *et al.* (1990), reportaron la ocurrencia de mancha bacteriana asociada a *Xanthomonas* sp. Los síntomas fueron descritos como manchas angulares de aspecto húmedo grasoso, de coloración parda, distribuidas por todo el limbo y/o concentrados a lo largo de la nervadura principal de la hoja (Querejeta *et al.*, 1990).

En Brasil hay diversos reportes de manchas foliares de origen bacteriano los cuales fueron asociados a *Pseudomonas cichorii* (Gonçalves *et al.*, 2008; Pomella *et al.*, 1995), *Xanthomonas campestris* (Gonçalves *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 1996), *Erwinia psidii*, *Pantoea agglomerans* y *Xanthomonas* sp. (Gonçalves *et al.*, 2001), *X. axonopodis*, *Ps. syringae*, *Ps. putida*, *Erwinia* sp. y *Rhizobiaceae* (Gonçalves *et al.*, 2008). Gonçalves *et al.* (2008) concluyeron que *X. axonopodis* fue la especie predominante en la prospección realizada en Brasil.

Las lesiones fueron descritas como manchas foliares amarronadas de forma angular, reseca, con perforaciones en el limbo, necrosis en la porción superior del limbo y lesiones a ambos lados de la nervadura principal (Ferreira y Milani, 2012; Alfenas *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2008; Neves, 2007; Alfenas *et al.*, 2001; Gonçalves *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 1996; Pomella *et al.*, 1995). Los síntomas evolucionan de forma diferente según la edad de las hojas. En hojas jóvenes las manchas son diminutas, superficiales y con aspecto seco, mientras que en hojas completamente expandidas estas manchas son grandes con bordes irregulares y distribuidos en todo el limbo. Con el tiempo las lesiones se fusionan, conduciendo a la caída prematura de las hojas provocando defoliación a nivel de planta (Ferreira y Milani, 2012; Alfenas *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2008; Neves, 2007) (Figura 1).

En Sudáfrica se asocia a *Pantoea ananatis* con síntomas de manchas foliares bacterianas en *Eucalyptus* sp., siendo de aspecto reseco y concentradas principalmente sobre nervadura principal y pecíolo (Coutinho *et al.*, 2002). La enfermedad provoca la muerte regresiva de los ápices y ocasiona el llamado tizón apical, siendo éste el síntoma característico del patógeno.

En Uruguay están reportadas *Pa. ananatis* (FAO, 2006) y *Er. psidii* (Coutinho *et al.*, 2011), ambos patógenos asociados a manchas foliares y tizón apical bacteriano, presentando síntomas similares a los ocasionados por *Pa. ananatis* en Sudáfrica (Coutinho *et al.*, 2002).

En Argentina fue reportada *Er. psidii* en el mismo año que fue reportada en Uruguay y con iguales síntomas (Coutinho *et al.*, 2011). Si bien las manchas foliares bacterianas habían sido mencionadas previamente en Argentina y Paraguay, descritas como lesiones angulares dispersas en todo el limbo, pero más concentradas en los bordes de las hojas y próximo a la nervadura principal, la etiología de las mismas no había sido confirmada hasta ese momento (Ferreira *et al.*, 2001).

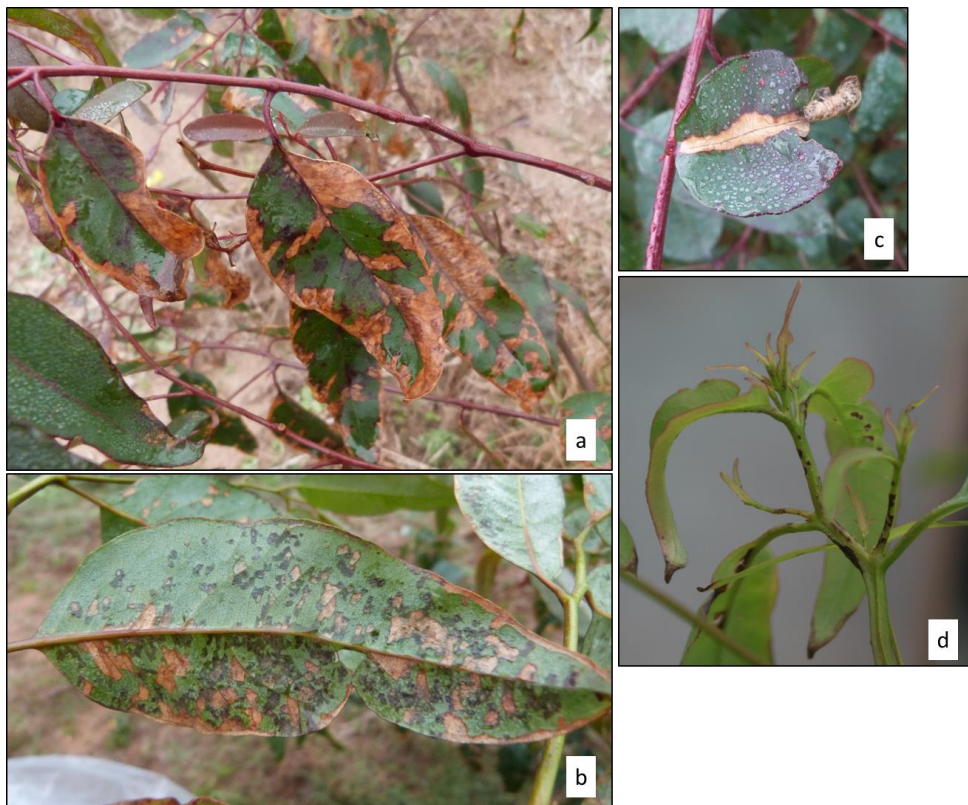


Figura 1. Manchas foliares bacterianas asociadas a *X. axonopodis* en *E. grandis* en Uruguay a) manchas de forma angular, distribuidas en todo el haz de la hoja, pudiendo concentrarse en los bordes de la misma, b) en el envés de la hoja se observa manchas de aspecto acuoso que no se observan en el haz, c) manchas concentradas en la nervadura principal, pudiendo deformar la hoja, d) manchas en pecíolo y tallos jóvenes observado en algunas ocasiones.

2.2.2. Epidemiología

Ferreira *et al.* (2001) asociaron la ocurrencia de infecciones bacterianas con tormentas fuertes con ocurrencia de granizo y vientos mayores a 90 km/h. Mientras que Neves (2007) concluyó que para la infección de *X. axonopodis* es necesaria la presencia de una lámina de agua en la superficie foliar para que permita el movimiento de la misma hacia las entradas naturales o heridas de la planta y así ingresar a los tejidos de la misma. Debido a las condiciones de infección de este patógeno, Silva (2007) explica que las mayores severidades de la enfermedad ocurren en vivero, donde la humedad relativa de ambiente es alta y la presencia de agua libre en la superficie de las hojas debido al riego ocurre con frecuencia.

La temperatura óptima para el desarrollo de la enfermedad se encuentra entre 26 y 30 °C, observándose un aumento de la severidad a mayor temperatura (Neves, 2007). Coincidentemente, Alfenas *et al.* (2009), observaron que la mayor incidencia de bacteriosis a campo, ocurre en los meses del año más cálidos, de octubre a abril, para las condiciones de Brasil.

El período de latencia para *X. axonopodis* es de aproximadamente 20 días, observándose defoliación 30 días post-inoculación. A su vez, la susceptibilidad de las hojas aumenta con la edad de las mismas, obteniendo una mayor severidad de la enfermedad en las hojas más viejas (Neves, 2007).

2.2.3. Distribución geográfica y rango de hospederos

Esta enfermedad ha sido reportada con una amplia distribución geográfica, tanto en zonas tropicales como sub tropicales. Afecta un amplio rango de hospederos del género *Eucalyptus* (Cuadro 1), además de plantas ornamentales como ser *Hibiscus elatus*, *Swietenia macrophylla* y *Eugenia psiloclados* (Querejeta *et al.*, 1990).

Cuadro 1. Rango de hospederos, etapa de producción y país donde se ha reportado la ocurrencia de manchas foliares bacterianas en eucaliptos.

Agente causal	Hospedero	Etapa de producción	País	Referencias
<i>Erwinia</i> sp.	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	campo y vivero	Brasil	Gonçalves <i>et al.</i> , 2008
	<i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i>			
	<i>E. dunnii</i>	campo y vivero	Argentina	Gonçalves <i>et al.</i> , 2001
<i>Er. Psidii</i>	<i>E. grandis</i>		Brasil	Coutinho <i>et al.</i> , 2011
	<i>E. globulus</i>		Uruguay	
	<i>E. globulus</i>	campo y vivero	Sudáfrica	Coutinho <i>et al.</i> , 2002
<i>Pantoea ananatis</i>	<i>E. grandis</i>		Uruguay	FAO, 2006
	<i>E. grandis</i> x <i>E. nitens</i>			
<i>Pa. agglomerans</i>	<i>E. grandis</i>	campo y vivero	Argentina	Gonçalves <i>et al.</i> , 2001
			Brasil	
<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>E. grandis</i>	campo y vivero	Brasil	Pomella <i>et al.</i> , 1995
	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>			Gonçalves <i>et al.</i> , 2008
	<i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i>			
<i>Ps. putida</i>	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	campo y vivero	Brasil	Gonçalves <i>et al.</i> , 2008
	<i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i>			
<i>Ps. syringae</i>	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	campo y vivero	Brasil	Gonçalves <i>et al.</i> , 2008
	<i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i>			
<i>Rhizobiaceae</i>	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	campo y vivero	Brasil	Gonçalves <i>et al.</i> , 2008
	<i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i>			
	<i>Eucalyptus</i> sp.	campo y vivero	Argentina	Gonçalves <i>et al.</i> , 2008
<i>Xanthomonas</i> sp.	<i>E. grandis</i>		Brasil	Gonçalves <i>et al.</i> , 2001
	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>		Cuba	Querejeta <i>et al.</i> , 1990
	<i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i>			
<i>X. axonopodis</i>	<i>E. grandis</i>	campo y vivero	Brasil	Gonçalves <i>et al.</i> , 2008
	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>			
	<i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i>			
<i>X. campestris</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	vivero	Brasil	Reis <i>et al.</i> , 1996
	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>			Gonçalves <i>et al.</i> , 2008
	<i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i>			
<i>Sin identificación</i>	<i>E. grandis</i>	campo y vivero	Argentina	Alfnas <i>et al.</i> , 2001
	<i>E. saligna</i>		Brasil	Ferreira <i>et al.</i> , 2001
	<i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i>		Paraguay	

2.2.4. Daños

La enfermedad causada por *X. axonopodis* pv. *eucalypti* es actualmente una de las más importantes en *Eucalyptus* tanto en condiciones de vivero como de campo, pudiendo provocar daños significativos en materiales genéticos muy susceptibles, cuando ocurren condiciones favorables para la infección (Ferreira *et al.*, 2012; Gonçalves, 2003). Los principales daños de esta enfermedad se deben a la disminución del área foliar fotosintéticamente activa, por necrosis de tejido y defoliación, lo que lleva a la reducción del crecimiento de las plantas (Alfenas *et al.*, 2009). La estimación del daño resulta complejo, ya que es dificultoso mantener un tratamiento libre de enfermedad, debido a los productos químicos registrados para el control bacteriano presentan poca residualidad, se lixivian con la lluvia y deben ser aplicados con alta frecuencia (Palladino *et al.*, 2013).

2.2.5. Control de la enfermedad

La principal medida de control de la enfermedad es el uso de materiales resistentes. Se han observado diferencias en susceptibilidad de clones frente a manchas foliares bacterianas, detectándose diferencias en cuanto a la intensidad de la enfermedad (Ferreira y Milani, 2012; Alfenas *et al.*, 2009; Furtado *et al.*, 2009; Gonçalves, 2003; Ferreira *et al.*, 2001). De esta forma la resistencia genética se constituye en una valiosa herramienta para desarrollar programas de mejoramiento genético.

Alternativas de manejo como ser la eliminación de plantas o partes de plantas enfermas, el uso de riego por goteo, propagación de clones susceptibles en épocas desfavorables a la infección, y la utilización de materiales de propagación y herramientas libre de patógeno pueden disminuir el nivel de enfermedad, principalmente en condiciones de vivero (Alfenas *et al.*, 2009). Entre las más eficientes se encuentra el evitar el humedecimiento excesivo del follaje, lo cual como se mencionó anteriormente, es crucial para el desarrollo de la enfermedad (Silva, 2007).

Otra alternativa de manejo en vivero es el ajuste de la fertilización. Silva (2007) demostró que la aplicación con cloruro de potasio (KCl) en plantines clonales de *E. globulus* reduce la incidencia de bacteriosis, pero menciona que aumenta la incidencia de *Botrytis cinerea*. Esta reducción de bacteriosis podría explicarse por la reducción de la relación nitrógeno/potasio, y por un aumento en el tenor de azúcares en el tejido foliar. Por otro lado, se ha mencionado el

uso de inductores de resistencia (acibenzolar-S-metil) en conjunto con un bactericida Kasumin que es clasificado como fungicida/bactericida y un antibiótico sistémico, resultan en una menor severidad de la enfermedad y mayor sobrevivencia de los plantines (Faria, 2013).

Si bien no existe hasta el momento un manejo químico efectivo de la enfermedad, y no hay ningún agroquímico registrado para su control (Alfenas *et al.*, 2009; Furtado *et al.*, 2009), recientemente se ha generado información respecto al potencial del control biológico, mediante la utilización *Pseudomonas* sp. (Lopes *et al.*, 2012) o la utilización de Rizobacterias para el biocontrol de *X. axonopodis*, aunque restan estudios para su uso a nivel de producción (Marcolin *et al.*, 2015).

2.2.6. Situación de las manchas foliares bacterianas en Uruguay

En Uruguay a partir del año 2009 se comenzaron a observar epidemias importantes de enfermedades foliares de origen bacteriano, tanto en *E. dunnii* como en *E. grandis*. Estas epidemias estuvieron asociadas a abundantes lluvias ocurridas en la primavera de dicho año (Balmelli *et al.*, 2009a), representando actualmente uno de los principales problemas sanitarios de la producción de eucalipto en la región litoral oeste y noreste del país.

En las prospecciones realizadas por Balmelli *et al.* (2009a), *E. grandis* presentó niveles importantes de defoliación, llegando al 8.7% en el estrato inferior del árbol y un Índice de Daño de la Copa por esta enfermedad del 5 %, lo cual significa que el 5% del área foliar de toda la copa estaba afectada por esta enfermedad. A pesar de la ocurrencia de epidemias severas de manchas foliares bacterianas reportadas a partir del año 2009, aún se desconoce la etiología de esta enfermedad en Uruguay. Tampoco se conoce el impacto de esta enfermedad sobre la producción, no habiendo a nivel nacional información respecto al efecto de la misma sobre el crecimiento en altura y diámetro de los árboles afectados.

2.3. TIZÓN APICAL BACTERIANO

2.3.1. Etiología y sintomatología

Por primera vez en 1974, se identificó a *Xanthomonas campestris* pv. *eucalypti* como agente causal del tizón apical bacteriano afectando a *Corymbia citriodora*. Los síntomas fueron descritos como muerte de las zonas distales de las ramas, que avanza hacia toda la rama,

muriendo las hojas, y provocando la caída de las mismas. En epidemias severas, los árboles se defolían completamente (Truman, 1974).

Síntomas similares fueron observados posteriormente en *Eucalyptus* sp. en Sudáfrica (Coutinho *et al.*, 2002), sin embargo en este caso se identificó a *Pantoea ananatis* como el organismo causal. Los síntomas típicos descritos corresponden a una muerte regresiva desde una hoja joven hacia el resto del ápice, similares a los descritos para *X. campestris* pv. *eucalypti* por Truman (1974).

Cuando comienza la enfermedad se observan pequeñas manchas, que a menudo se unen para formar lesiones más grandes, localizándose principalmente sobre la nervadura principal. Los pecíolos de las hojas se vuelven necróticos, provocando la abscisión prematura de las hojas. Con el avance de la enfermedad, los árboles quedan con los ápices con apariencia de quemados, dando el nombre de “tizón” a la enfermedad. Puede observarse en algunos casos levantamiento de la corteza a modo de ampollas en hojas y tallos tiernos que al romperse dejan salir un líquido turbio, que corresponde a la zooglea bacteriana (Coutinho *et al.*, 2002). En especies, híbridos y clones altamente susceptibles se observa una combinación de síntomas de muerte regresiva y manchas, mientras que los que se muestran más tolerantes únicamente se observan manchas foliares (Coutinho *et al.*, 2002) (Figura 2).

Recientemente Coutinho *et al.* (2014) mencionan a *Xanthomonas vasicola* como agente causal de tizón bacteriano, además de *Pa. ananatis*. Los autores consideran a *X. vasicola* caso como un salto de hospedero desde una monocotiledónea como lo es la caña de azúcar, a una especie dicotiledónea como lo es el eucalipto, ya que solo se la había reportado en caña de azúcar. Los síntomas iniciales son lesiones acuosas en las hojas, a lo largo de la nervadura principal, las cuales se convierten rápidamente en necróticas, y se fusionan formando lesiones más grandes. La evolución de la enfermedad provoca también la muerte regresiva de la rama (Coutinho *et al.*, 2014).

En Argentina, Coutinho *et al.* (2011) identificaron a *Erwinia psidii* como agente causal del tizón apical bacteriano, con síntomas similares a los mencionados para *Pa. ananatis*. De igual forma, en Brasil, la enfermedad fue reportada dos años más tarde, asociada a *Er. psidii* (Ariel *et al.*, 2013).

En Uruguay se reportó a *Er. psidii* y *Pa. ananatis* asociadas a los síntomas previamente descritos (Coutinho *et al.*, 2011; FAO, 2006). Además se reportó a *Enterobacter cowanii*

asociada a tizón apical bacteriano, especie que fue aislada junto a *Pa. ananatis* a partir de síntomas de tizón bacteriano en *E. grandis*. Sin embargo es probable que *En. cowanii* no sea el patógeno primario de la muerte regresiva, sino que se comporte como endófito y que en condiciones ambientales favorables para la enfermedad contribuya con ella (Brady *et al.*, 2009a).

Brady *et al.* (2009b) identifica tres especies nuevas dentro del género *Pantoea*, que se diferencian de *Pa. ananatis* filogenéticamente, pero que provocan la misma sintomatología de tizón apical bacteriano en eucalipto. Estas especies fueron *Pa. eucalypti* y *Pa. vagans* reportadas en Uruguay, ésta última especie también reportada en Argentina y Uganda; y *Pa. deleyi* reportada de Uganda.

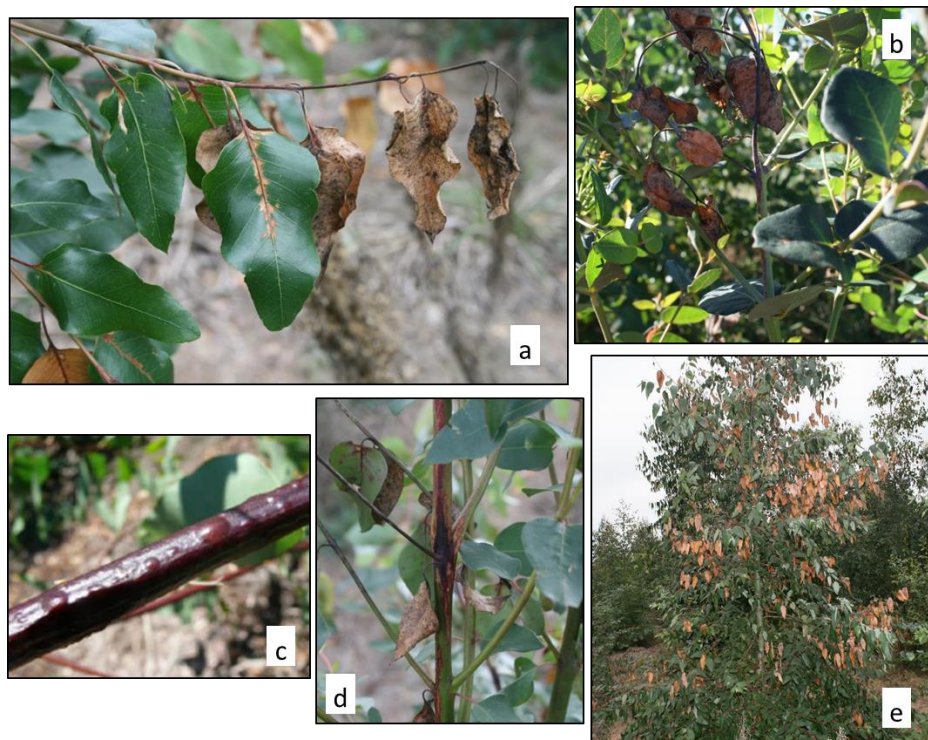


Figura 2. Tizón apical bacteriano asociado a *Erwinia psidii* en Uruguay sobre *E. dunnii*. a) Tizón apical en brote lateral con manchas en las hojas localizadas sobre la nervadura principal, b) muerte descendente desde el ápice hacia el tallo, c) ampollas en tallo suculento conteniendo zooglea bacteriana, d) cancro producido por tizón en tallo y e) árbol con múltiples ápices afectados luego de un ataque severo de tizón.

2.3.2. Epidemiología

Xanthomonas campestris pv. *eucalypti* se la ha observado afectando árboles de 3 a 7 m de altura (Truman, 1974). A *Pa. ananatis* se la ha observado afectando árboles de similar edad, principalmente cuando ocurre el cambio de follaje juvenil a hoja adulta. Este patógeno se dispersa favorecido por el salpicado de gotas de lluvia durante tormentas y/o por insectos que pueden en forma pasiva diseminar la enfermedad (Coutinho *et al.*, 2014; FAO, 2006; Coutinho *et al.*, 2002; Ricaud, 1969), encontrándose frecuentemente asociada al psílido *Ctenarytaina* sp. (FAO, 2006). Otros autores mencionan que no hay una clara asociación de *Pa. ananatis* con insectos vectores (Coutinho y Venter, 2009). A su vez las infecciones por esta bacteria se ven favorecidas por temperaturas entre 20 y 25 °C, y una alta humedad relativa (Coutinho *et al.*, 2014; Coutinho *et al.*, 2002; Ricaud, 1969).

Xanthomonas vasicola se disemina por salpicadura de lluvia, transporte por medio de los insectos o la manipulación y traslado de herramientas por el hombre. Infecta en las mismas condiciones ambientales que *Pa. ananatis* (Coutinho *et al.*, 2014; Ricaud, 1969). Por su parte *Er. psidii* se la ha observado principalmente en plantaciones jóvenes, de 6 a 24 meses de edad (Coutinho *et al.*, 2011). En este caso no hay una clara asociación entre los insectos y la enfermedad, pero sí está asociada a precipitaciones moderadas y frecuentes, y temperaturas mayores a 30 °C, las cuales promueven el desarrollo de la enfermedad (Maschio *et al.*, 1997).

Existen algunos estudios epidemiológicos de *Er. psidii* en *Psidium guajava*, que demuestran la capacidad de la bacteria de sobrevivir en restos de vegetales infectados, en el suelo y/o asociada a hospederos secundarios (Coelho *et al.*, 2002). Esta bacteria puede ingresar a la planta a través de aberturas naturales y/o por heridas causadas por herramientas, viento, o granizo (Junqueira, 2000; Piccinin *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 1985; Romeiro *et al.*, 2002). Además Junqueira (2000) menciona que durante períodos secos y fríos la incidencia de la enfermedad disminuye, favoreciéndose con alta temperatura y humedad relativa. A su vez, existen evidencias de que los niveles de infección aumentan ante un exceso de fertilización nitrogenada (Piccinin *et al.*, 2005; Romeiro *et al.*, 2002).

2.3.3. Distribución geográfica y rango de hospederos

La enfermedad ha sido reportada en países de América del sur, como ser Argentina, Brasil y Uruguay; Sudáfrica y Australia, afectando a un amplio rango de especies de eucaliptos

(Cuadro 2). Esta enfermedad no solo afecta a los géneros *Eucalyptus* y *Corymbia* dentro de la familia de las Mirtáceas sino que también afecta al género *Psidium* (i.e. *Psidium guajava*). La detección de *Er. psidii* en *Eucalyptus* es considerada un salto de hospedero desde el monte nativo, específicamente desde *Psidium guajava*, hacia las plantaciones comerciales de eucalipto (Coutinho *et al.*, 2011). A su vez, mediante inoculación artificial se ha demostrado que la bacteria es capaz de infectar a *Psidium cattleianum*, *Eugenia jambolana* y *Melaleuca viridiflora* (Coelho *et al.*, 2002).

Cuadro 2. Rango de hospederos, etapa de producción y país donde se ha reportado la ocurrencia de tizón apical bacteriano en eucaliptos.

Agente causal	Hospedero	Etapa de producción	País	Referencias
<i>Enterobacter cowanii</i>	<i>E. grandis</i>	Campo	Uruguay	Brady <i>et al.</i> , 2009a
<i>Erwinia psidii</i>	<i>E. dunnii</i>	Campo	Argentina	Arriel <i>et al.</i> , 2013
	<i>E. globulus</i>		Brasil	Coutinho <i>et al.</i> , 2011
	<i>E. grandis</i>		Uruguay	
	<i>E. saligna</i>			
	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>			
<i>Pantoea ananatis</i>	<i>E. globulus</i>	campo y vivero	Argentina	Coutinho <i>et al.</i> , 2014
	<i>E. grandis</i>		Brasil	Coutinho <i>et al.</i> , 2002
	<i>E. grandis</i> x <i>E. nitens</i>		Sudáfrica	FAO, 2006
			Uruguay	
<i>Pa. eucalypti</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	Campo	Uruguay	Brady <i>et al.</i> , 2009b
<i>Pa. deleyi</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	Campo	Uganda	Brady <i>et al.</i> , 2009b
<i>Pa. Vagans</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	Campo	Argentina	Brady <i>et al.</i> , 2009b
			Uganda	
			Uruguay	
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>eucalypti</i>	<i>Corymbia citridora</i>	Campo	Australia	Truman, 1974
<i>X. vasicola</i>	<i>E. grandis</i>	Campo	Sudáfrica	Coutinho <i>et al.</i> , 2014

2.3.4. Daños

Pantoea ananatis puede provocar graves pérdidas económicas (Coutinho y Venter, 2009). En infecciones reiteradas, el ápice principal pierde la dominancia, generando brotes múltiples, deformaciones del fuste, y problemas de arquitectura de copa, lo que ocasiona pérdidas de crecimiento en altura. Pudiendo en ataques severos, ocasionar la muerte de la planta (Coutinho *et al.*, 2002; FAO, 2006).

Para el caso de *Er. psidii*, se han observado incidencias de casi del 100% de las plantas en determinados sitios y épocas del año, resultando en la pérdida de la dominancia apical y reducción del crecimiento (Arriel, 2013; Coutinho *et al.*, 2011). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la recuperación de los árboles es relativamente rápida, probablemente debido al

rápido crecimiento y al desarrollo de yemas axilares que prontamente retoman la dominancia apical (Coutinho *et al.*, 2011). En *P. guajava* se han observado pérdidas de 60-70 % de la producción por causa de esta enfermedad (Romeiro *et al.*, 1994).

2.3.5. Control de la enfermedad

Alfenas *et al.* (2009) mencionan a la resistencia genética como la principal medida de manejo de esta enfermedad, debido a la variabilidad en la intensidad de la enfermedad observada entre distintos germoplasmas de eucalipto.

Para el caso del control de *Er. psidii* pero en guayaba, el manejo de la enfermedad se realiza preventivamente, destruyendo en vivero los restos de poda de los brotes infectados, utilizando plantas sanas, y evitando el uso de semillas, estacas o mudas provenientes de lugares donde ya se ha observado la enfermedad (Marques *et al.*, 2007; Rezende, 2006; Junqueira, 2000). Pulverizaciones preventivas con productos cúpricos previenen infecciones, y son utilizados en el cultivo de guayaba desde la brotación de las hojas, hasta que los frutos tienen un tamaño de 3 cm aproximadamente (Piccinin *et al.*, 2005; Rezende, 2006). Otra alternativa de manejo es evitar el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados, porque estos favorecen las nuevas brotaciones y facilitan la penetración de este patógeno (Coelho *et al.*, 2002).

2.3.6. Situación del tizón apical bacteriano en Uruguay

En Uruguay el tizón apical fue observado a partir del año 2009, en la zona norte del país, principalmente asociado a plantaciones juveniles de *E. dunnii* (Balmelli *et al.*, 2009b). Las especies bacterianas reportadas hasta el presente son *Er. psidii* (Coutinho *et al.*, 2011), *Pa. ananatis* (FAO, 2006), *En. cowanii* (Brady *et al.*, 2009a), *Pa. eucalypti* y *Pantoea vagans* (Brady *et al.*, 2009b).

2.4. MARCHITAMIENTO VASCULAR CAUSADO POR BACTERIAS

2.4.1. Etiología y sintomatología

El marchitamiento vascular bacteriano en eucalipto fue reportado por primera vez en Brasil en 1983, asociado a *Ralstonia solanacearum* (Sudo *et al.*, 1983; Rodríguez *et al.*, 1983). Esta especie es considerada una de las bacterias fitopatógenas más importantes del mundo,

debido a los grandes perjuicios causados, a la amplia distribución geográfica, al extenso rango de hospederos, y a las dificultades de control (Álvarez *et al.*, 2010; Mafia, 2006; Genin y Boucher, 2002; Hayward, 2000; Hayward, 1991).

El síntoma típico es un marchitamiento generalizado de la planta, de arriba hacia abajo (Figura 3). Las hojas presentan lesiones medianas a grandes, irregulares, oscuras, pudiéndose tornar a marrón claras en los bordes de las hojas. Esta enfermedad puede provocar coloración negra en la madera. Las plantas más propensas a la enfermedad son aquellas con sistema radicular malformado, con heridas en el tronco o base del tallo. La enfermedad ha sido observada tanto en vivero como en el campo (Mafia *et al.*, 2012; Marques, 2012; Álvarez *et al.*, 2010; Alfenas *et al.*, 2009; Alfenas *et al.*, 2006; Coutinho *et al.*, 2000; Keane *et al.*, 2000; Ferreira, 1998).

Esta enfermedad ha sido recientemente asociada también a *Er. psidii* (Arriel *et al.*, 2013), causante del tizón apical bacteriano (Coutinho *et al.*, 2011). Este patógeno provoca síntomas muy similares a *R. solanacearum*, lo que resulta imposible diferenciar a campo (Arriel *et al.*, 2013).



Figura 3. Marchitamiento vascular bacteriano observado en *E. grandis* en Uruguay. a) Marchitamiento vascular generalizado, b) corte transversal del fuste y c) corte longitudinal del fuste cercano la base del árbol donde se observa coloración oscura producto de la colonización bacteriana.

2.4.2. Epidemiología

Ralstonia solanacearum es capaz de sobrevivir en el suelo o en residuos de la rotación previa. Pese a esto, no se ha comprobado un claro efecto de la rotación sobre la ocurrencia de la enfermedad (Marques, 2012; Lopes, 2009; Mafia, 2006; Supriadi *et al.*, 2001; Vasse *et al.*, 1995), probablemente debido a la presencia de inóculo aún en situaciones sin precedentes del cultivo. Esta bacteria puede diseminarse a largas distancias por medio de material propagativo infectado, o diseminarse a cortas distancias por herramientas e insectos (Alfenas *et al.*, 2009). La infección ocurre a través de heridas en el sistema radicular, siendo favorecida por alta temperatura y humedad en el suelo. Por esta razón, la mayor intensidad de la enfermedad ocurre en veranos lluviosos (Alfenas *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 1992).

La ocurrencia de altas temperaturas sumadas a déficit hídrico en el suelo, puede resultar en quemadura de cuello de la planta, constituyendo una entrada para la bacteria, la cual puede infectar si se da la presencia de agua libre en el suelo, posterior a dicho período (Alfenas *et al.*, 2006). Por esta razón, el microclima generado en un vivero clonal, es ideal para la supervivencia y multiplicación de la bacteria, desarrollándose así la enfermedad (Marques, 2012; Lopes, 2009; Mafia, 2006; Supriadi *et al.*, 2001; Vasse *et al.*, 1995).

En condiciones controladas, y mediante inoculación artificial, los síntomas de la enfermedad fueron reproducidos a los tres días de la inoculación, observándose muerte de plantas a los 10 días post-inoculación (Coutinho *et al.*, 2000). En condiciones de campo no hay precedentes de inoculación artificial, y es difícil estimar el período de incubación cuando la inoculación ocurre naturalmente. Sin embargo, se ha observado que los síntomas pueden aparecer tan pronto como a los tres o cuatro meses después de la plantación, pudiendo provocar la muerte de los árboles a las dos o tres semanas posteriores a la aparición de los primeros síntomas. En otros casos la muerte puede demorar hasta seis meses post-infección (Supriadi *et al.*, 2001).

Por el contrario, es limitada la información respecto a *Er. psidii*. Esta especie fue recientemente identificada como agente causal del marchitamiento, habiendo limitantes de información respecto a su epidemiología. Arriel *et al.* (2013) mencionan que este patógeno provoca marchitamiento en plantas de dos a tres meses de edad.

2.4.3. Distribución geográfica y rango de hospederos

La marchitez bacteriana ocasionada por *R. solanacearum* presenta una amplia distribución geográfica, es generalizada en todas las regiones templadas, tropicales, subtropicales y cálidas del mundo (Smith *et al.*, 1896) (Cuadro 3).

Ralstonia solanacearum presenta un amplio rango de hospederos, siendo capaz de causar enfermedad en más de 200 especies de plantas, representando aproximadamente 50 familias botánicas (Álvarez *et al.*, 2010; Mafia, 2006; Genin y Boucher, 2002; Hayward, 2000; Hayward, 1991). Dentro de las mirtáceas, afecta a una gran diversidad de especies, las cuales presentan diferente susceptibilidad. En cambio, *Er. psidii* ha sido observada provocando marchitamiento vascular únicamente en híbridos de *E. urophylla* x *E. grandis* y *E. saligna* (Arriel *et al.*, 2013) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Rango de hospederos, etapa de producción y país donde se ha reportado la ocurrencia de marchitamiento vascular bacteriano en eucaliptos.

Agente causal	Hospedero	Etapas de producción	País	Referencias
<i>Erwinia psidii</i>	<i>E. saligna</i>	Campo	Brasil	Ariel <i>et al.</i> , 2013
	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>			
<i>Ralstonia solanacearum</i> (*)	<i>C. citriodora</i>	campo y vivero	Australia	Alfenas, 1993
	<i>E. camaldulensis</i>		Brasil	Askiew y Tevorow, 1994
	<i>E. grandis</i>		China	Ciesla <i>et al.</i> , 1996
	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>		Indonesia	Coutinho <i>et al.</i> , 2000
	<i>E. pellita</i>		Sudáfrica	Roux <i>et al.</i> , 2001
	<i>E. propinqua</i>		Taiwán	Sudo <i>et al.</i> , 1983
	<i>E. saligna</i>		Uganda	Wu y Liang, 1988a
	<i>E. tereticornis</i>		Vietnam	Wang, 1992
	<i>E. urophylla</i>			
	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>			

(*) Sólo se lista la información respecto a eucalipto, debido a que esta especie presenta un amplio rango de hospederos que incluye a numerosos cultivos.

2.4.4. Daños

El marchitamiento vascular bacteriano es una enfermedad de gran importancia económica (Mafia *et al.*, 2012), causando enormes pérdidas en viveros de eucalipto (Alfenas *et al.*, 2009; Alfenas *et al.*, 2006) y a campo (Old *et al.*, 2003). Dentro de estas pérdidas está la disminución en la producción de miniestacas y en los índices de enraizamiento obtenidos en vivero (Alfenas *et al.*, 2006), y un alto porcentaje de mortandad en plantaciones comerciales de *E. urophylla* y *E. pellita* (Old *et al.*, 2003).

2.4.5. Control de la enfermedad

El marchitamiento bacteriano por la naturaleza sistémica de las infecciones dificulta su control (Mafia *et al.*, 2012). Una vez establecida la enfermedad en el campo, el control del patógeno es también difícil. En condiciones de campo se enfatiza en la correcta elección del sitio forestal, evitando suelos con limitantes físicas para el crecimiento radicular, la utilización de plantines con buen pan radicular y excelente arquitectura de raíz, plantación de calidad, y cuidando la correcta deposición del pan radicular en el pozo de plantación, en definitiva todo manejo que minimice la generación de heridas que permitan el ingreso de la bacteria. De igual forma en el vivero se recomienda el control integrado, basado en varias medidas preventivas, como ser el uso de plantines sanos, agua de riego sana, utilización de herramientas libre de inóculo (Ferreira y Milani, 2012; Alfenas *et al.*, 2009; Lopes, 2009; Alfenas *et al.*, 2006; Robbs *et al.*, 1990).

El principal control de esta enfermedad es la resistencia genética, ya que se han observado diferencias en la susceptibilidad del germoplasma frente a esta enfermedad (Coutinho *et al.*, 2000; Dianese y Dristig, 1993). Esta variabilidad observada a campo, debe ser complementada con pruebas de inoculación artificial para poder dilucidar si el mejor comportamiento de un germoplasma se debe a un escape o a resistencia a la enfermedad (Alfenas *et al.*, 2009; Li y Wu, 1996; Dianese y Dristig, 1993; Wu y Liang, 1988b). Mafia *et al.* (2014) mencionan que *E. tereticornis* es una de las especies con mejor comportamiento frente a la enfermedad, en relación al resto de las especies incluidas en el estudio: *E. camaldulensis*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* y *E. saligna*.

Otra alternativa posible para el control de esta enfermedad es el control biológico. Ran *et al.* (2005) mencionan el uso de cepas específicas de *Pseudomonas* fluorescentes (rizobacterias) para el control del marchitamiento en eucalipto en platines en China. Otros autores (Gong *et al.*, 1999) mencionan a hongos ectomicorrícicos como otra alternativa de control biológico.

2.4.6. Situación del marchitamiento vascular bacteriano en Uruguay

Ralstonia solanacearum está presente en otros cultivos (Siri *et al.*, 2011), aún no ha sido confirmada su presencia en el cultivo de eucalipto. En el caso del patógeno *Er. psidii* ha sido

reportado causando manchas foliares y tizón apical en eucalipto, pero no causando marchitamiento vascular.

Pese a la presencia de extensas áreas plantadas con especies susceptibles, a la ocurrencia de condiciones ambientales favorables para la infección y la presencia de ambos patógenos, el marchitamiento bacteriano no ha sido aún confirmado a nivel local. Sin dudas que debido a la presencia de ambos patógenos en el país, el riesgo de ocurrencia de marchitamiento bacteriano es elevado. La vigilancia sanitaria es fundamental para poder identificar los primeros casos de ocurrencia de marchitamiento de eucalipto y poder confirmar la etiología, como requisito fundamental para diseñar estrategias de control de esta enfermedad.

2.5. CONSIDERACIONES FINALES

Las enfermedades de origen bacteriano en eucalipto han aumentado su importancia relativa con respecto a otros agentes etiológicos, ya sea por un aumento en el número de reportes a nivel mundial, como en el daño potencial que ellas ocasionan (Pérez, 2012; Pérez *et al.*, 2009a; Balmelli *et al.*, 2009a). Éstas provocan graves pérdidas económicas tanto a campo como en vivero (Alfenas *et al.*, 2009) y debido a su facilidad para dispersarse, y a la dificultad de control de las mismas, las medidas preventivas deben ser priorizadas (Romeiro, 2011).

A nivel nacional, se requiere un mayor conocimiento en cuanto a la epidemiología de las mismas, para generar de esta forma medidas de control eficientes y poder mitigar las pérdidas. Hasta la fecha sólo se ha reportado el tizón apical, por lo que restan estudios tanto de etiología como de epidemiología para poder entender ésta problemática en el país y poder dar respuestas al sector productivo.

2.6. BIBLIOGRAFÍA

Alfenas AC. 1993. Potential and present status of *Eucalyptus* and *Acacia mangium* diseases in Northern Sumatra. Indonesia: DFP/UFV. 53p.

Alfenas AC, Gonçalves RC, Oliveira JR, Silva IT, Oda S, Assis TF. 2001. Mancha foliar e desfolha de *Eucalyptus urophylla* x *E. maidenii*, causadas por fitobacterias. Fitopatologia Brasileira, 26: 294-294.

- Alfenas AC, Mafia RG, Sartório RC, Binoti DHB, Silva RR, Lau D, Vanetti CA.** 2006. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. Fitopatologia Brasileira, 31: 357-366.
- Alfenas AC, Valverde EA, Mafia R, Assis FT.** 2009. Clonagem e Doenças do Eucalipto. Viçosa: UFV. 500p.
- Álvarez B, Biosca EG, López MM.** 2010. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. En: Méndez Vilas A. [Eds.]. Current research technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Badajoz: Formatex. 267-279.
- Arriel A.** 2013. Seca de ponteiros de *Eucalyptus* spp. Causada por *Erwinia psidii* no Brasil [Tesis de maestria]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 40p.
- Arriel A, Fonseca NR, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Mafia RG, Borges Júnior N, De Souza HP, Alfenas AC.** 2013. Seca de ponteiros de *Eucalyptus* spp. Causada por *Erwinia psidii* no Brasil. Forest Pathology, 44: 255-265.
- Askiew E, Tevorow PR.** 1994. Management of bacterial wilt of tobacco. En: Hayward AC, Hartman GL. [Eds.]. Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford: UK. CAB International. 179-198.
- Balmelli G, Simeto S, Martinez G, Torres D, Gonzalez, Fros D, Bentancur O, Pérez C.** 2009a. Relevamiento sanitario de otoño en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus dunnii* en el Sureste y Litoral Oeste. Relevamiento sanitario de *Eucalyptus* spp. en el sureste y litoral oeste del país. En: Jornada técnica de protección forestal. Montevideo: INIA. Serie de actividades de difusión; 594. pp. 51-71.
- Balmelli G, Simeto S, Martinez G, Torres D, Pérez C, Fros D, Bentancur O.** 2009b. Incidencia y severidad de enfermedades y plagas en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* en las regiones sureste y litoral oeste de Uruguay. En: Jornada técnica de protección forestal. Montevideo: INIA. Serie de actividades de difusión; 567. pp. 51-64.
- Barnes I, Roux J, Wingfield BD, Niell MO, Wingfield MJ.** 2003. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay. Australasian Plant Pathology, 32: 361-366.
- Bettucci L, Alonso R, Tiscornia S.** 1999. Endophytic mycobiota of healthy twigs and the assemblage of species associated with twig lesions of *Eucalyptus globulus* and *E. grandis* in Uruguay. Mycological Research, 103: 468-472.

- Brady CL, Venter SN, Cleenwerck I, Engelbeen K, de Vos P, Wingfield MJ, Telechea N, Coutinho TA.** 2009a. Isolation of *Enterobacter cowanii* from *Eucalyptus* showing symptoms of bacterial blight and dieback in Uruguay. *Letters in Applied Microbiology*, 49: 461-465.
- Brady CL, Venter SN, Cleenwerck I, Engelbeen K, Vancanneyt M, Swings J, Coutinho TA.** 2009b. *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov. and *Pantoea anthophila* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 2339–2345.
- Ciesla WM, Diekmann M, Putter CA.** 1996. *Eucalyptus* spp.: Technical Guide-lines for the safe movement of germplasm. Rome: FAO/IPGRI. 68p.
- Coelho MVS, Mendes AP, Marques ASA.** 2002. Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: Levantamento e caracterização. Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico; 59. pp.1-8.
- Cortinas MN, Crous PW, Wingfield BD, Wingfield MJ.** 2006. Multi-gene phylogenesis and phenotypic characters distinguish two species within the *Colletogloeopsis zuluensis* complex associated with *Eucalyptus* stem cankers. *Studies in Mycology*, 55: 133-146.
- Coutinho TA, Brady CL, Van Der Vaart M, Venter SN, Telechea N, Rolfo M, Pérez C, Wingfield MJ.** 2011. A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. *Australasian Plant Pathology*, 40: 55–60.
- Coutinho TA, Preisig O, Mergaert J, Cnockaert MC, Riedel KH, Swings J, Wingfield MJ.** 2002. Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids, and clones in South Africa. *Plant Disease*, 86: 20-25.
- Coutinho TA, Roux J, Riedel KH, Terblanche J, Wingfield MJ.** 2000. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa. *Forest Pathology*, 30: 205–210.
- Coutinho TA, Van der Westhuizen L, Roux J, McFarlane FA, Venter SN.** 2014. Significant host jump of *Xanthomonas vasicola* from sugarcane to a *Eucalyptus grandis* clone in South Africa. *Plant Pathology*, 64: 576–581.
- Coutinho TA, Venter SN.** 2009. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 10: 325–335.

- Dianese, JC, Dristig MCG.** 1993. Screening Eucalyptus selections for resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. En: Hayward AC, Hartman GL. (Eds.). Bacterial wilt. Canberra: ACIAR Proceedings. 206–210.
- FAO.** 2006. Manual de campo: Plagas y enfermedades de Eucaliptos y Pinos en el Uruguay. [En línea]. Consultado 29 junio 2015. Disponible en: <http://www.fagro.edu.uy/~forestal/cursos/proteccion/Fao%20Manual%20de%20Campo.pdf>
- Faria JMR.** 2013. Severidade e controle da bacteriose foliar em mudas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em função do nível tecnológico do viveiro [Tesis de maestría]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista. 45p.
- Ferreira FA.** 1998. Sintomatologia da murcha bacteriana em plantações de eucalipto. Fitopatologia Brasileira, 23: 201-218.
- Ferreira FA.** 1997. Enfermidades do eucalipto no Brasil. Informe Agropecuario- A cultura do Eucalipto, 18: 5-19, 31-39.
- Ferreira FA, Milani D.** 2012. Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. Mogí Guaçu: International Paper. 98p.
- Ferreira FA, Oliveira JR, Romeiro R.** 2001. Uma bacteriose foliar em *Eucalyptus grandis* na Argentina e Paraguai. Fitopatologia Brasileira, 26: 281-286.
- Ferreira MA, Mafia RG.** 2012. Impacto da mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis*, sobre o crescimento de mudas de eucalipto em condições de campo. [En línea]. Consultado 2 febrero 2015. Disponible en: <http://webftp.cpaa.embrapa.br/site/Trabalhos/367.pdf>.
- Furtado EL, Dias DC, Ohto CT, Rosa DD.** 2009. Doenças do eucalipto no Brasil. Botucatu: FCA/UNESP. 74p.
- Genin S, Boucher C.** 2002. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. Molecular Plant Pathology, 3: 111-118.
- Gonçalves RC.** 2003. Etiología da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil [Tesis de doctorado]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 94p.
- Gonçalves RC, Alfenas AC, Oliveira JR, Silva IT, Oda S, Assis TF, Tonon A.** 2001. Mancha foliar e seca de ponteiros do eucalipto causada por fitobacterias, no Brasil e na Argentina. Fitopatologia Brasileira, 26: 294.

- Gonçalves RC, Lau D, Oliveira JR, Mafia LA, Casardo CM, Alfenas C.** 2008. Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil. *Tropical Plant Pathology*, 33: 180-188.
- Gong MQ, Chen Y, Wang FZ, Chen YL.** 1999. Inhibitory effect of ectomycorrhizal fungi in bacterial wilt of *Eucalyptus*. *Forest Research*, 12: 339-345.
- Hayward AC.** 2000. *Ralstonia solanacearum*. En: Lederberg J. [Eds.]. *Encyclopedia of Microbiology*. San Diego: Academic Press. 32–42.
- Hayward AC.** 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 29: 65-87.
- Junqueira NTV.** 2000. Doenças e Pragas. En: Manica I. [Eds.]. *Fruticultura Tropical 6 Goiaba*. Porto Alegre: Cinco Continentes. 225-270.
- Keane PJ, Kile GA, Podger FD, Brown BN.** 2000. *Diseases and pathogens of eucalypts*. Victoria: CSIRO. 565p.
- Li H, Wu XY.** 1996. The current status, causes and control of forest diseases in Haiman province. *Tropical Forestry*, 24: 101-103.
- Liang ZC, Guo Q, Wu QP.** 1992. Bacterial wilt of *Eucalyptus* in South China. *Bacterial Wilt Newsletter*, 8:5.
- Lopes CA.** 2009. Murcha bacteriana ou murchadeira – Uma inimiga do tomateiro em climas quentes. Brasília DF. Comunicado Técnico Embrapa, 67. pp. 1-10.
- Lopes L, Oliveira AG, Beranger J, Góis C, Vasconcellos F, San Martin J, Andrade C, Mello J, Andrade G.** 2012. Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis in vitro* and bacterial leaf blight in *Eucalyptus*. *Tropical Plant Pathology*, 37: 233-238.
- Mafia R.** 2006. Sintomatologia, etiologia e controle da murcha bacteriana do eucalipto [Tesis de doctorado]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 96p.
- Mafia R, Alfenas A, Ferreira M.** 2014. Avaliação da resistência do eucalipto a murcha-bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. *Revista Árvore*, 38: 649-656.
- Mafia R, Alfenas A, Penchel RM, Ferreira MA, Alfenas R.** 2012. Murcha-bacteriana: Disseminação do patógeno e efeitos da doença sobre a clonagem do Eucalipto. *Revista Árvore*, 36: 593-602.

- Marcolin G, Moura do Carmo AL, Augusto de Oliveira Garcia F.** 2015. Biocontrol *in vitro* de mancha foliar bacteriana do eucalipto, mediado por rizobacterias. Enciclopédia Biosfera, 11: 346.
- Marques ASA, Coelho MVS, Ferreira MASV, Damasceno JPS, Mendes AP, Vieira TM.** 2007. Guava bacterial blight due to *Erwinia psidii*: incidence levels and epidemiological aspects. Revista Brasileira de Fruticultura, 29: 488-493.
- Marques E.** 2012. Murcha bacteriana do eucalipto causada por *Ralstonia solanacearum* Ra 3 biovar 2T: etiologia, influencia do solo e controle [Tesis de doctorado]. Brasilia: Universidade Federal de Brasília. 187p.
- Maschio LMA, Andrade FM, Leite MSP, Bellote FJ, Ferreira CA, Iede ET, Nardeli AMB, Auer CG, Grigolleti A, Wiechetek M.** 1997. Seca dos ponteiros do eucalipto em Arapoti-PR. En: Anais da Conferencia IUFRO de Silvicultura e Melhoramento de eucaliptos, Salvador. San Diego: Academic Press, pp. 32-42.
- MGAP/DIEA** (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca/ Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias). 2013. Anuário Estadístico Agropecuario 2013. Consultado 28 junio, 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2013,O,es,0>
- Neves DA.** 2007. Condições favoráveis à mancha foliar causada por *Xanthomonas axonopodis* em eucalipto [Tesis de maestria]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 33p.
- Old M, Wingfield MJ, Yuan ZQ.** 2003. A manual of diseases of *eucalypts* in South-East Asia [En línea]. Consultado 28 junio 2015. Disponible en: http://www.cifor.org/publications/pdf_files/books/eucalypts.pdf
- Palladino MC, Pérez G, Alonso R, Pérez CA.** 2013. Enfermedades bacterianas en Eucalipto: estado del conocimiento a nivel nacional. En: VI Jornada técnica de protección forestal. Montevideo: INIA. Serie técnica; 213. pp. 53-63.
- Pérez CA.** 2012. El desarrollo forestal y su implicancia sobre la dinámica de las enfermedades. En: 2da jornada bianual de Fitopatología: Impacto de la intensificación de los cultivos en el desarrollo de las enfermedades, 10 agosto; 2012; Montevideo, Uruguay. pp. 15.
- Pérez CA, Wingfield MJ, Altier NA, Blanchette RA.** 2009a. *Mycosphaerellaceae* and *Teratosphaeriaceae* associated with *Eucalyptus* leaf diseases and stem cankers in Uruguay. Forest Pathology, 39: 349-360.

- Pérez CA, Wingfield MJ, Altier NA, Simeto S, Blanchette RA.** 2011. *Puccinia psidii* infecting cultivated *Eucalyptus* and native *myrtaceae* in Uruguay. *Mycological Progress*, 10: 273-282.
- Pérez CA, Wingfield MJ, Slippers B, Altier NA, Blanchette RA.** 2010. Endophytic and canker-associated *Botryosphaeriaceae* occurring on non-native *Eucalyptus* and native *myrtaceae* trees in Uruguay. *Fungal Diversity*, 41: 53-69.
- Pérez G, Lupo S, Bettucci L.** 2009b. Polymorphisms of the ITS región of *Inocutis jamaicensis* associated with *Eucalyptus globulus*, *Vitis vinifera* and native plants in Uruguay. *Sydowia*, 60: 267:275.
- Pérez G, Splippers B, Wingfield, BD, Finkernauer E, Wingfield MJ.** 2009c. *Mycosphaerella* leaf disease (MLD) outbreak on *Eucalyptus globulus* in Brazil caused by *Teratosphaeria (Mycosphaerella) nubilosa*. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 302-306.
- Piccinin E, Pascholati SF, Di Piero RM.** 2005. Doenças da Goiabeira. En: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo L, Rezende J. [Eds.]. *Manual de Fitopatologia Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas*. São Paulo: Editora agrônômica Ceres. 450-455.
- Pomella AWV, Romeiro RS, Ferreira FA, Oliveira JR.** 1995. Lesões foliares em viveiro de Eucalipto incitadas por uma espécie fluorescente de *Pseudomonas*. *Fitopatologia Brasileira*, 20: 374.
- Querejeta M, Cordovez M, Brooks A, Moreno I, Piedra B, Hernandez M.** 1990. Mancha bacteriana en especies forestales causada por *Xanthomonas* sp. *Ciencia Técnica Agrícola Protección de plantas*, 13: 52-59.
- Ran LS, Liu CY, Wu GJ, Van Loon LC, Bakker PAHM.** 2005. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. In China. *Biological Control*, 32: 111-120.
- Reis AV, Souza RM, Castro HA, Cardoso MAFC, Kobayasti L.** 1996. Uma nova bacteriosis em mudas de eucalipto incitada por *Xanthomonas campestris*. *Fitopatologia Brasileira*, 21: 342.
- Rezende AM.** 2006. Estudo sobre a resistencia genética e productos químicos no controle da bacteriose da goiabeira (*Psidium guajava*) causada por *Erwinia psidii*. [Tesis de Maestrante em Fitopatologia]. Brasilia: Universidade Federal de Brasilia. 96p.

- Ribeiro IJK, Sugimori MH, Rodrigues Neto J, Yamashiro T, Piza Júnior C de T, Prates HS, Frediani AJA.** 1985. A bacteriose da goiabeira. Campinas: CATI. 3p.
- Ricaud C.** 1969. Investigation on the systemic infection of gumming disease. En: Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists (13, 1969, Amsterdam). Taiwan, Netherlands. Elsevier. pp 59–69.
- Robbs CF, Cruz AP, Rodríguez Neto JR.** 1990. Algumas estratégias de controle a murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em eucaliptos. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico; 3. pp. 1-4.
- Romeiro RS.** 2011. Bacterias fitopatogênicas. Viçosa: Ed. UFV. 417p.
- Romeiro RS, Batista UG, Barbosa JG, Rodrigues Neto JR.** 2002. Situação e perspectiva de controle da morte das pontas da goiabeira (*Erwinia psidii*) em Minas Gerais- Relato de um caso. Revista Ceres, 49: 329-334.
- Romeiro RS, Moraes RMA, Oliveira J, Couto FFA, Rezende ST.** 1994 Uma enfermidade de etiologia bacteriana no estado de Minas Gerais. Fitopatologia Brasileira, 18: 283.
- Roux J, Coutinho D, Mujini Byabachaija D, Wingfield MJ.** 2001. Diseases of plantation *Eucalyptus* in Uganda. South African Journal of Science, 97: 16-18.
- Silva A.** 2007. Histopatologia e influencia de nutrientes na intensidade da bacteriose foliar do eucalipto causada por *Xanthomonas axonopodis* [Tesis de maestria]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 71p.
- Siri MI, Sanabria A, Pianzola MJ.** 2011. Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. Plant Disease, 95: 1292-1301.
- Smith EF.** 1896. A bacterial disease of tomato, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* sp. Nov.). Bulletin, Division of Vegetable Physiology and Pathology, 12: 1-28.
- Soria S, Alonso R, Bettucci L, Lupo S.** 2014. First report of *Teratosphaeria pseudoeucalypti* in Uruguay. Australasian Plant Pathology Notes, 9: 146-150.
- Sudo S, Oliveira GHN, Pereira AC.** 1983. Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e *bracatinga* (*Mimosa scabrella* Penth), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith. Fitopatologia Brasileira, 8: 631.

- Supriadi D, Karden M, Sitepu D.** 2001. Bacterial wilt disease of Woody tres caused by *Pseudomonas solanacearum*: a review. Journal Litbang Pertanian Local, 20: 106-112.
- Telechea N, Rolfo M, Coutinho TA, Wingfield MJ.** 2003. *Puccinia psidii* on *Eucalyptus globulus* in Uruguay. Plant Pathology, 52: 427.
- Truman R.** 1974. Die-back of *Eucalyptus citriodora* caused by *Xanthomonas eucalypti* sp. n. Phytopathology, 64: 143-144.
- Vasse J, Frey P, Trigalet A.** 1995. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. Molecular Plant-Microbe Interaction, 8: 241-251.
- Wang WY.** 1992. Survey of *Eucalyptus* disease in Taiwan. Bulletin Taiwan Forest Research Institute, 7: 179-194.
- Wu QP, Liang ZC.** 1988a. Identification and pathogenic tests of the causal organism of the bacterial wilt of *Eucalyptus*. Journal South China Agriculture University, 9: 59-67.
- Wu QP, Liang ZC.** 1988b. Selection of species and provenance of *Eucalyptus* for resistance to bacterial wilt. Journal South China Agriculture University, 9: 41-45.

3. ETIOLOGIA DE LAS MANCHAS FOLIARES BACTERIANAS EN *Eucalyptus* Y POSIBILIDADES DE MANEJO POR RESISTENCIA GENETICA *

Palladino Cintia¹, Pérez Guillermo², Alonso Raquel³, Bentancur Oscar⁴, Alfenas, Acelino⁵, Pérez Carlos A^{6*}

¹ Polo de Desarrollo Universitario “Impacto de los fitosanitarios sobre los productos agroalimentarios y ambiente”, Centro Universitario de Paysandú, UdelaR, EEMAC, Ruta 3 Km 363, Paysandú. ² Polo de Desarrollo Universitario Forestal, Centro Universitario de Tacuarembó, UdelaR, Ruta 5 Km 386, Tacuarembó. ³ Laboratorio de Micología. Facultad de Ciencias – Facultad de Ingeniería. UdelaR, Julio Herrera y Reissig 565, Montevideo. ⁴ Departamento de Protección Vegetal, EEMAC, Facultad de Agronomía, UdelaR. EEMAC, Ruta 3 Km 363, Paysandú. ⁵ Departamento de Fitopatología, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. ⁶ Departamento de Protección Vegetal, EEMAC, Facultad de Agronomía, UdelaR. EEMAC, Ruta 3 Km 363, Paysandú. *E-mail: caperez@fagro.edu.uy.*

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

Resumen

En Uruguay, las manchas foliares bacterianas en eucalipto han alcanzado niveles epidémicos, sin embargo se desconoce su etiología, y por consiguiente las posibilidades de manejo. Este estudio tuvo por objetivos: i) identificar a los agentes causales de las manchas foliares bacterianas observadas en distintas especies de eucalipto, ii) caracterizar la agresividad de las mismas, y iii) caracterizar la respuesta fenotípica de distintos genotipos de eucalipto ante la inoculación de las cepas más agresivas. Se generó una colección de cepas bacterianas a partir de muestras colectadas a campo. Éstas fueron sometidas a pruebas de hipersensibilidad, y patogenicidad en hojas escindidas y en plantines de eucalipto. Las cepas patogénicas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas y moleculares. Se validó un método de inoculación y se caracterizó la agresividad mediante inoculación artificial de seis cepas de la colección en plantines de *E. grandis*. Las tres cepas más agresivas fueron seleccionadas para evaluar la respuesta de distintos genotipos de *E. grandis* y *E. dunnii* ante las mismas. Se confirmó la presencia de *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Pantoea*, siendo *X. axonopodis* la especie predominante. Los resultados evidencian variabilidad en la agresividad de las cepas, aún dentro de la misma especie. A su vez, se observó variabilidad en el comportamiento de distintos genotipos de eucalipto ante estas cepas, lo que indica la presencia de resistencia genética a esta enfermedad. Esto constituye un insumo sin precedentes para los programas de mejoramiento genético por resistencia, mediante la generación de herramientas que permiten la caracterización del comportamiento sanitario de distintos germoplasmas.

Palabras clave: *Eucalyptus*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Pantoea*.

Summary

Etiology of bacterial leaf spot in *Eucalyptus* and opportunities for management through genetic resistance.

Epidemics of bacterial leaf spot on *Eucalyptus* have been commonly observed in Uruguay, however the etiology is still unknown, limiting therefore its management. The aims of this study were to: i) identify the causal agent of bacterial leaf spots observed on different species of eucalypts, ii) characterize the aggressiveness of selected strains, and iii) characterize the phenotypic response of different *Eucalyptus* genotypes inoculated with most aggressive strains. A collection of bacterial strains were generated from samples collected in the field. The strains were tested for hypersensitivity and pathogenicity in leaves of *E. grandis* and *E. dunnii*. Pathogenic strains were identified by biochemical and molecular techniques. An artificial inoculation method was validated and aggressiveness of six selected strains was characterized on *E. grandis* seedlings. The three most aggressive strains were selected to evaluate resistance of *E. grandis* and *E. dunnii* genotypes. Species of *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia* and *Pantoea* were found associated with bacterial leaf spot, being *Xanthomonas axonopodis* the predominant. Variability in aggressiveness among strains was found. Also significant differences were found on resistance among *Eucalyptus* tested genotypes. These results suggest the presence of genetic resistant to this disease and will assist breeding programs selecting for genetic resistance against this disease.

Keywords: *Eucalyptus*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Pantoea*.

3.1. INTRODUCCIÓN

Las manchas foliares representan una de las principales enfermedades del eucalipto (Keane *et al.*, 2000), y principalmente aquellas causada por hongos, aunque en los últimos años las manchas de origen bacteriano han aumentado su importancia relativa, observándose epidemias severas en Uruguay (Pérez, 2012; Pérez *et al.*, 2009; Balmelli *et al.*, 2009a).

En Uruguay, *Pantoea ananatis* y *Erwinia psidii*, han sido reportadas como agentes causales de manchas foliares y tizón apical en eucalipto, pero principalmente asociadas a este último síntoma. Estas especies fueron reportadas en plantaciones jóvenes de *E. grandis*, aunque *Erwinia psidii* fue además detectada en plantaciones jóvenes de *E. dunnii*, *E. globulus* y *E. maidenii* (Coutinho *et al.*, 2011; FAO, 2006). Si bien estas especies están fuertemente asociadas al tizón apical, la enfermedad se inicia con una mancha foliar pequeña localizada predominantemente sobre la nervadura principal, provocando la muerte de la hoja, para luego avanzar por el pecíolo hacia la rama, llegando a anillar la rama, necrosando el ápice de la misma (Coutinho *et al.*, 2011; FAO, 2006).

Sin embargo, en prospecciones realizadas en plantaciones comerciales de *E. grandis* y *E. dunnii*, en el año 2008 en el Litoral-Oeste del país, se observaron manchas foliares no asociadas al tizón apical, con otro patrón de distribución de las lesiones, presentándose en todo el limbo de la hoja, pudiendo en ocasiones localizarse más sobre los bordes, comportándose como infecciones locales y no sistémicas (Balmelli *et al.*, 2009a; Balmelli *et al.*, 2009b). Pese a estas observaciones, en dichos estudios no se identificaron los agentes causales involucrados.

En la literatura internacional se mencionan como agentes etiológicos de manchas foliares a *Xanthomonas* sp., *X. axonopodis*, *X. campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Ps. putida*, *Ps. cichorii*, *Erwinia* sp., *E. psidii*, *Rhizobiaceae*, *Pantoea ananatis* y *Pa. agglomerans* (Ferreira y Milani, 2012; Gonçalves *et al.*, 2008; FAO, 2006; Coutinho *et al.*, 2002; Alfenas *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 1996; Pomella *et al.*, 1995; Querejeta *et al.*, 1990). Éstas afectan un amplio rango de hospederos del género *Eucalyptus*, como ser *E. benthamii*, *E. citriodora*, *E. cloeziana*, *E. globulus*, *E. grandis*, *E. maidenii*, *E. pellita*, *E. regnans*, *E. robusta*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. viminalis*, e híbridos de *Eucalyptus camaldulensis* x *E. deglupta* (Alfenas *et al.*, 2009).

En Uruguay hasta el momento se han observado síntomas similares a las manchas foliares bacterianas en *E. dunnii* y *E. grandis* (Simeto *et al.*, 2010), y pese a los niveles epidémicos observados en los últimos cinco años en Uruguay (Balmelli *et al.*, 2009a; Balmelli

et al., 2009b), poco se conoce sobre la etiología, epidemiología y el manejo de esta enfermedad.

Debido a las características del cultivo, y al factor patogénico involucrado, resulta prioritario explorar las posibilidades de caracterizar la resistencia genética de los genotipos de eucaliptos a ser plantados. Para ello es necesario en primer lugar identificar a los agentes causales involucrados, posteriormente determinar si existe variabilidad en la agresividad de los mismos y por último explorar la presencia de variabilidad en la resistencia de los genotipos de eucaliptos (Pérez *et al.*, 2010). Actualmente existen reportes de diferencias en susceptibilidad de diferentes clones frente a manchas foliares bacterianas (Alfnas *et al.*, 2009; Gonçalves, 2003).

Por consiguiente, el presente estudio tuvo por objetivos: i) identificar los agentes causales de las manchas foliares bacterianas observadas en distintas especies de eucalipto en Uruguay, ii) caracterizar la agresividad de las mismas, y iii) caracterizar la respuesta fenotípica de distintos genotipos de eucalipto ante la inoculación de las cepas más agresivas.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Colecta e identificación de agentes etiológicos

3.2.1.1. Colección de estudio

La colecta de muestras de hojas con síntomas característicos de manchas foliares bacterianas se realizó entre los años 2011 y 2013 en todas las estaciones del año, donde se observaron epidemias de manchas en plantaciones comerciales de eucalipto. Las colectas se concentraron en las zonas noreste, litoral norte y centro del país. A partir de dichas muestras se procedió al aislamiento del agente etiológico. En primer lugar se procedió a corroborar la presencia de bacterias en las lesiones mediante la técnica de microcorrida. Para esto, se procedió a cortar fragmentos de hoja de la zona de avance de la mancha, colocar una gota de agua destilada en un cubre objeto y observar al microscopio óptico (200x) si se observaba flujo bacteriano (Romeiro, 2001). Luego de confirmada la presencia de bacterias en las lesiones, se realizó el aislamiento indirecto mediante una desinfección superficial de trozos de hojas de la zona de avance de la enfermedad con hipoclorito de sodio al 0.5 %, enjuagados posteriormente con agua estéril. Dichos trozos fueron macerados en mortero, y el producto fue sembrado

mediante estrías en placas de Petri con medio NAD (Nutrient Agar Dextrosa, Difco, Paris). Estas placas fueron posteriormente incubadas por 48 horas a 28 °C en oscuridad (Dhingra y Sinclair, 1995). Las colonias predominantes y con morfología diferentes fueron repicadas a una nueva placa de Petri con NAD para obtener los cultivos puros. Se generó una colección donde cada cepa fue conservada en suspensión en glicerol al 15 %, en tubos eppendorf de 2 mL (Axygen, Union City), en freezer -20 °C con metodología adaptada de Miller (1972) y Romeiro (2001).

3.2.1.2. Pruebas de hipersensibilidad y patogenicidad

A la totalidad de las cepas de la colección se le realizó la prueba de hipersensibilidad en planta no hospedero (*Nicotiana tabacum*), siguiendo el método descrito por Schaad *et al.* (2001). Brevemente, consta de infiltrar una suspensión bacteriana en el mesófilo de la hoja, mediante una jeringa de 1 mL, con una concentración de 1×10^8 ufc/mL en la escala de McFarland (McFarland, 1907). El testigo fue inoculado con solución salina estéril. Luego de la inoculación las plantas fueron incubadas por 24 horas a temperatura ambiente (temperatura media de 26 °C todo el día). Posteriormente se examinó la ocurrencia de reacción en el área foliar infiltrada, la presencia de necrosis indicó resultado positivo, o sea, bacteria fitopatógena.

La prueba de patogenicidad se realizó en hojas desprendidas de plantines de origen seminal de *E. grandis* y *E. dunnii* de 120 días de edad. Se utilizaron dos métodos de inoculación adaptados de Romeiro (2001), con y sin heridas, inoculando en dos hojas de cada especie de eucalipto. Se inoculó la misma concentración bacteriana que en el test de hipersensibilidad en tres puntos de cada hoja (i.e. peciolo y a ambos lados de la nervadura principal). El testigo fue inoculado con solución salina estéril. Las hojas fueron mantenidas por dos semanas en una cámara de crecimiento a 28 °C, en oscuridad y en una cámara húmeda realizada con algodón. Posteriormente se evaluó la presencia de lesiones, se verificó la presencia de exudado bacteriano, y se procedió a re-aislar la bacteria, para verificar morfología de colonia, dando cumplimiento a los postulados de Koch.

3.2.1.3. Caracterización bioquímica

Las cepas que resultaron patogénicas en eucalipto fueron sometidas a test bioquímicos como: test de Gram, solubilidad en KOH al 3 % (Suslow *et al.*, 1982), producción de pigmento fluorescente en agar King-B (King *et al.*, 1954), crecimiento en agar extracto de levadura-

dextrosa- CaCO₃ (Wilson *et al.*, 1967) y crecimiento anaeróbico (Hugh y Leifson, 1953). En todos los casos, las placas Petri se incubaron a 28 °C en oscuridad (Schaad *et al.*, 2001).

3.2.1.4. Análisis molecular

Se seleccionaron 11 cepas de la colección por diversidad de síntomas, hospedero y sitio de colecta. Se extrajo ADN genómico de las mismas a partir de una adaptación del método descrito por Mahuku (2004). Posteriormente, mediante PCR se amplificaron regiones parciales del operón 16 S del rDNA (Hauben *et al.*, 1997), y para las cepas identificadas como pertenecientes al género *Xanthomonas*, se procedió a la amplificación parcial de los genes *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* y *rpoD* (Young *et al.*, 2008; Adriko *et al.*, 2014) (Cuadro 1). La secuenciación de estas últimas regiones genómicas fue utilizada para discriminar las cepas del género *Xanthomonas* (Parkinson *et al.*, 2009; Parkinson *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Cebadores utilizados para la amplificación de las distintas regiones genómicas analizadas.

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)	Referencia
16 S	fD2	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	1500	Weisburg <i>et al.</i> (1991)
	rP1	ACGGTTACCTTGTTACGACTT		
<i>gyrB</i>	XgyrB1F	ACGAGTACAACCCGGACAA	865	Young <i>et al.</i> (2008)
	XgyrB1R	CCCATCARGGTGCTGAAGAT		
<i>dnaK</i>	XdnaK1F	GGTGAAGACCTGGTCAAGA	940	Young <i>et al.</i> (2008)
	XdnaK1R	TCCTTGACYTCCGTGAACTC		
<i>fyuA</i>	XfyuA1F	AGCTACGAYGTCGCYTACGA	698	Young <i>et al.</i> (2008)
	XfyuA1R	GTTACAGCCRAACTGGTAG		
<i>rpoD</i>	XrpoD1F	TGGAACAGGGCTATCTGACC	875	Young <i>et al.</i> (2008)
	XrpoD1R	CATTCYAGGTTGGTCTGRTT		

Las condiciones de ciclado del PCR para el operón 16S fueron las descritas por Weinsburg *et al.* (1991), mientras que para los genes *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* y *rpoD* se siguió el protocolo descrito por Young *et al.* (2008). El producto de PCR fue corroborado mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega Corporation, Madison, USA), al 1 %, teñido con Goodview® (Fermentas International Inc., Canadá), a una concentración de 5 µL/mL. El gel se

reveló bajo lámpara UV (Benchtop 2UV transiluminator UVP, USA). El tamaño del amplicón obtenido fue estimado por comparación con el marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, ready to use, Fermentas International Inc., Cánada).

Luego de la verificación, el producto de PCR fue enviado a secuenciar a MacroGen (www.macrogen.com, Corea del Sur, verificado 10-08-2015), y las secuencias resultantes fueron editadas manualmente, para luego ser comparadas con aquellas depositadas en GenBank ([Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank), verificado 10-08-2015) mediante búsqueda BLAST (Benson *et al.*, 1999). A partir de las secuencias obtenidas se analizaron las mismas por neighbor-joining (NJ) y máxima parsimonia (MP) usando el programa PAUP versión 4.0b10 (Swofford, 2002). El mejor modelo de sustitución para el análisis de NJ fue determinado usando Modeltest v. 3.7 (Posada y Crandall, 1998), del cual se seleccionó en cada caso el modelo sugerido por el criterio de información Akaike (AIC). El análisis de máxima parsimonia se realizó mediante la opción de búsqueda heurística con simple adición de taxones, partición de árboles y reconexión (TBR) como algoritmo de intercambio de ramas. Los *gaps* fueron tratados como datos perdidos y todos los caracteres fueron tratados como desordenados y de igual peso. Los nodos fueron determinados por análisis de 1000 repeticiones (Hillis y Bull, 1993). La longitud del árbol (TL), y los índices de consistencia (CI), retención (RI), y homoplasia (HI), fueron calculados en cada caso.

En primer lugar se realizó un análisis general que incluyó la totalidad de las cepas analizadas, para ubicar los grupos taxonómicos donde se agrupaban las cepas en estudio, para posteriormente en una segunda etapa, en cada grupo, realizar un nuevo análisis con secuencias taxonómicas más cercanas de acuerdo a la búsqueda BLAST. Para el análisis de las secuencias del 16 S se utilizaron secuencias de cepas de referencia de Gonçalves *et al.* (2008) y Brady *et al.* (2009b), mientras que para los genes *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* y *rpoD* las secuencias de referencias fueron obtenidas de Young *et al.* (2008). En el estudio de las secuencias de los genes concatenadas se utilizó la secuencia del gen *rpoD* de la cepa UYB20 para la cepa UYB34 debido a la dificultad de amplificar esta región para esta cepa.

3.2.2. Caracterización de la agresividad de las cepas

Se seleccionaron seis cepas de la colección (UYB17, UYB20, UYB30, UYB34, UYB35, UYB36), por diferentes síntomas, lugar de colecta y hospedero del cual fue aislada. Éstas

fueron inoculadas cada una en cinco plantines de origen seminal de *E. grandis* de 120 días de edad, al igual que el testigo fue realizado en cinco plantines. La inoculación se realizó siguiendo el protocolo descrito por Romeiro (2001), con modificaciones. Brevemente, el mismo constó de mantener las plantas en cámara húmeda y temperatura ambiente por 24 h, para luego aplicarle por aspersión una suspensión bacteriana en solución salina estéril, a punto de goteo.

La concentración bacteriana utilizada fue ajustada por espectrofotómetro (Único 1100 RS, España) para $AB_{550} = 0.2$, lo que corresponde a 10^8 ufc/mL. Las células bacterianas se obtuvieron a partir de colonias puras con tres días de crecimiento, suspendidas en solución salina estéril al 0.9 %. Los plantines testigos recibieron el mismo tratamiento pero fueron asperjados solo con solución salina estéril. Luego de la inoculación las plantas se mantuvieron en cámara húmeda por 24 h. La temperatura ambiente durante el periodo de incubación osciló entre 25 y 30 °C.

La cuantificación de la enfermedad se realizó mediante escala visual (Alfenas *et al.*, 2009), a los 15 días post inoculación. Se determinó incidencia, como porcentaje de hojas con síntoma en el total de la planta; severidad, como porcentaje promedio de tejido afectado de las hojas con síntoma, y se cuantificó la severidad en la hoja más afectada y en la menos afectada de toda la planta. El índice de la enfermedad se calculó en base al producto de la incidencia por severidad promedio.

3.2.3. Caracterización de la resistencia de genotipos de *E. grandis* y *E. dunnii*

Siguiendo el protocolo de inoculación antes mencionado, se inocularon ocho genotipos de *E. grandis* (dos seminales y seis clonales) y tres de *E. dunnii* (clonales). Para dichas inoculación se utilizaron las tres cepas que mostraron mayor agresividad en la caracterización fenotípica. Siendo UYB30, UYB34 y UYB36 todas cepas pertenecientes al género *Xanthomonas*. Cada cepa fue inoculada en 10 plantas de cada genotipo de *Eucalyptus*. Cinco plantas por genotipo fueron asperjadas con solución salina estéril, como testigo. La cuantificación de la enfermedad se realizó con el método descrito anteriormente pero con lecturas realizadas a los 15 y 30 días.

3.2.4. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de las variables estudiadas (Incidencia, Severidad, Índice de la enfermedad, % de la hoja más afectadas y % de la hoja menos afectada) se realizaron mediante el métodos de mínimos cuadrados generalizados en el programa SAS (release 9.1; SAS Institute, Inc., Cary, NC). En donde las diferentes varianzas de los tratamientos fueron incluidas como ponderadores, aquellos tratamientos en que la varianza fue cero, no fueron incluidos en el análisis debido a que la ponderación se realiza por el inverso de la varianza. El efecto de las cepas y los genotipos sobre las variables analizadas, se estudió mediante modelos lineales. Las medias de los efectos significativos fueron comparados utilizando las prueba Tukey-Kramer con $P=0,05$.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Colecta e identificación de agentes etiológicos

3.3.1.1. Colección de estudio

Se generó una colección de 36 cepas puras obtenidas a partir de manchas foliares colectadas desde plantaciones pertenecientes a seis especies de *Eucalyptus* ubicadas en los departamentos de Cerro Largo, Flores, Florida, Río Negro y Rivera, durante los años 2011 y 2013. El síntoma típico fueron manchas foliares pequeñas, de forma angular, distribuidas en toda la hoja y, en algunos casos, con predominancia en los bordes o sobre la nervadura principal (Figura 1). Estas manchas en algunos casos convergen y forman manchas más grandes. Al inicio, las lesiones presentan aspecto húmedo y translúcido; luego se tornan necróticas y reseca, pudiendo provocar perforaciones y/o deformaciones en el limbo.

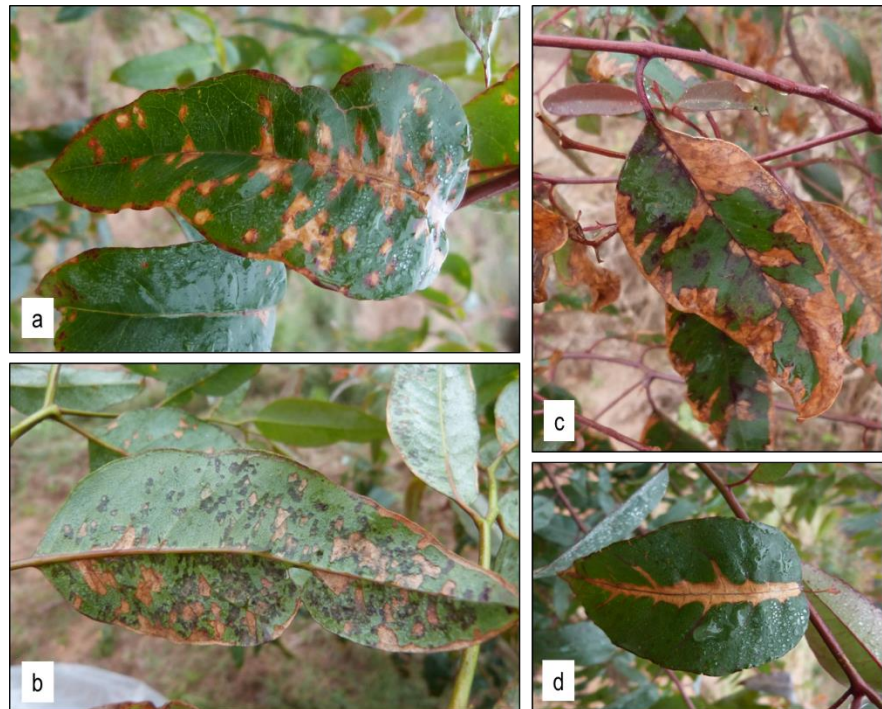


Figura 1. Manchas foliares bacterianas en *E. grandis* colectadas en la localidad de Rivera, Uruguay, (a) manchas pequeñas, angulares, distribuidas en todo el limbo, (b) con apariencia acuosa y translúcida en el envés de la hoja, (c) manchas de gran tamaño, esparcidas en las hojas, con predominancia sobre el borde del limbo, (d) manchas ubicadas sobre la nervadura principal.

De las 36 cepas obtenidas, se descartaron 14 cepas que resultaron Gram (+), y el estudio se continuó con las 22 restantes (Cuadro 2), todas ellas caracterizadas como Gram (-). Estas últimas, fueron aisladas de muestras provenientes de cinco departamentos, a partir de cuatro especies de *Eucalyptus* y un híbrido.

3.3.1.2. Pruebas de hipersensibilidad y patogenicidad

Nueve de las 22 cepas dieron resultado negativo el test de hipersensibilidad en tabaco, en cambio la totalidad de las cepas mostraron reacción positiva en la prueba de patogenicidad en hojas desprendidas de eucalipto, tanto cuando fueron inoculadas con heridas como sin heridas. De las 22 cepas, 17 mostraron patogenicidad tanto en *E. grandis* como *E. dunnii*, mientras que las restantes cinco cepas fueron patogénicas únicamente en *E. grandis* (Cuadro 2).

3.3.1.3. Caracterización bioquímica

Los análisis bioquímicos permitieron identificar seis cepas pertenecientes al género *Xanthomonas*, tres a *Pseudomonas*, cuatro a *Pantoea* y ocho a *Erwinia* (Cuadro 2). De las muestras analizadas de *E. globulus* y *E. benthamii*, sólo se pudo aislar *Erwinia*, mientras que éste fue el único de los géneros encontrados, que no se observó asociado a manchas foliares en *E. dunnii*. En el resto de los hospederos como ser *E. grandis*, *E. grandis* x *E. urophylla* y *E. saligna* se confirmó la presencia de varios géneros, inclusive aislados a partir de una misma muestra.

Cuadro 2. Lista de los 22 cepas bacterianas Gram (-) obtenidos en este estudio resumiendo los resultados obtenidos de las diferentes pruebas bioquímicas realizadas. Cepas con ID en negrita fueron seleccionadas para análisis moleculares.

ID	Sitio de Colecta	Hospedero	Hipersensibilidad	Patogenicidad <i>E. dunnii</i>	Patogenicidad <i>E. grandis</i>	KOH	Gram	OF	YDC	King B	Género
UYB01	Cerro Largo	<i>E. grandis</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	<i>Erwinia</i>
UYB02	Cerro Largo	<i>E. grandis</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	<i>Erwinia</i>
UYB04	Cerro Largo	<i>E. grandis</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	<i>Erwinia</i>
UYB05	Río Negro	<i>E. benthamii</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	<i>Erwinia</i>
UYB13	Cerro Largo	<i>E. grandis</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	<i>Erwinia</i>
UYB17	Río Negro	<i>E. dunnii</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	<i>Pseudomonas</i>
UYB18	Cerro Largo	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>Pantoea</i>
UYB19	Cerro Largo	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>Erwinia</i>
UYB20	Cerro Largo	<i>E. saligna</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	<i>Xanthomonas</i>
UYB21	Cerro Largo	<i>E. saligna</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	<i>Pseudomonas</i>
UYB23	Florida	<i>E. globulus</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>Erwinia</i>
UYB25	Flores	<i>E. dunnii</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>Pantoea</i>
UYB26	Río Negro	<i>E. dunnii</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	<i>Pseudomonas</i>
UYB28	Cerro Largo	<i>E. grandis</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	<i>Erwinia</i>
UYB30	Flores	<i>E. dunnii</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	<i>Xanthomonas</i>
UYB31	Rivera	<i>E. dunnii</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>Pantoea</i>
UYB32	Rivera	<i>E. grandis</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	<i>Xanthomonas</i>
UYB33	Río Negro	<i>E. dunnii</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	<i>Xanthomonas</i>
UYB34	Río Negro	<i>E. dunnii</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	<i>Xanthomonas</i>
UYB35	Río Negro	<i>E. dunnii</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>Pantoea</i>
UYB36	Rivera	<i>E. grandis</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	<i>Xanthomonas</i>
UYB135	Río Negro	<i>E. grandis</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	<i>Erwinia</i>

3.3.1.4. Análisis molecular

El análisis general consistió en un alineamiento de 32 secuencias, incluyendo las secuencias de 11 cepas en estudio (Cuadro 2). De los 1392 caracteres analizados, 776 fueron constantes, 312 variables pero no informativos y 304 fueron parsimoniosamente informativos. El análisis de búsqueda heurística resultó en un árbol de topología similar al obtenido por NJ (Figura 2). Las cepas en estudio agruparon en cuatro grupos taxonómicos distintos, representados por los géneros *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Erwinia* y *Xanthomonas*.

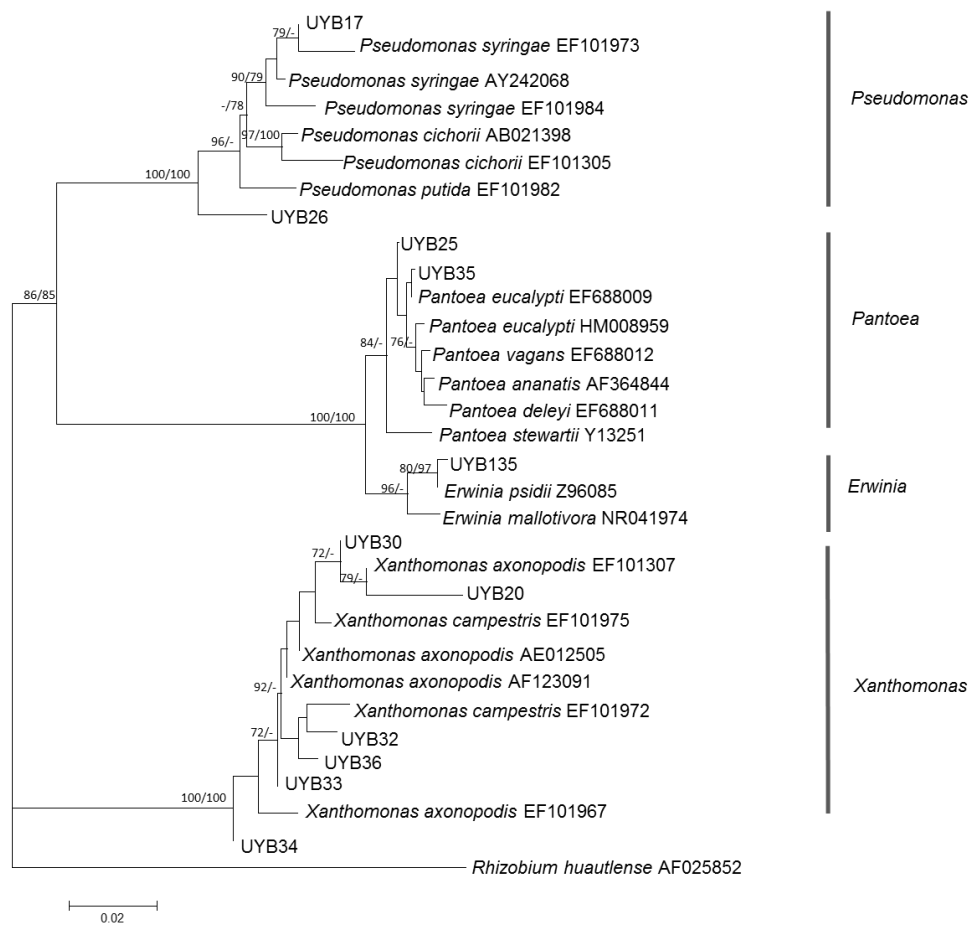


Figura 2. Árbol de distancia genética basado en la región 16S del operon ADN ribosomal, obtenido con análisis neighbor-joining. *Rhizobium huautlense* fue utilizada como grupo externo. Sólo los valores de bootstrap mayores a 50% obtenidos en el análisis por NJ y MP son mostrados en cada nodo, respectivamente. El árbol tuvo los siguientes índices: TL=969 pasos, CI=0.84, RI=0.94, HI=0.16.

El alineamiento realizado para el género *Pseudomonas* constó de 19 secuencias. El análisis se basó en 655 caracteres de los cuales 467 fueron constantes, 135 fueron variables pero no informativos y 53 fueron parsimonia-informativos. Se presenta el árbol de distancia genética obtenida por NJ, el cual presentó topología similar al obtenido con MP (Figura 3). La cepa UYB17 agrupó con *Ps. syringae*, mientras que la cepa UYB26 formó un grupo con *Ps. oryzihabitans* y *Ps. psychrotolerans*, las dos especies de mayor similitud en la búsqueda BLAST, pero representaría una especie distinta.

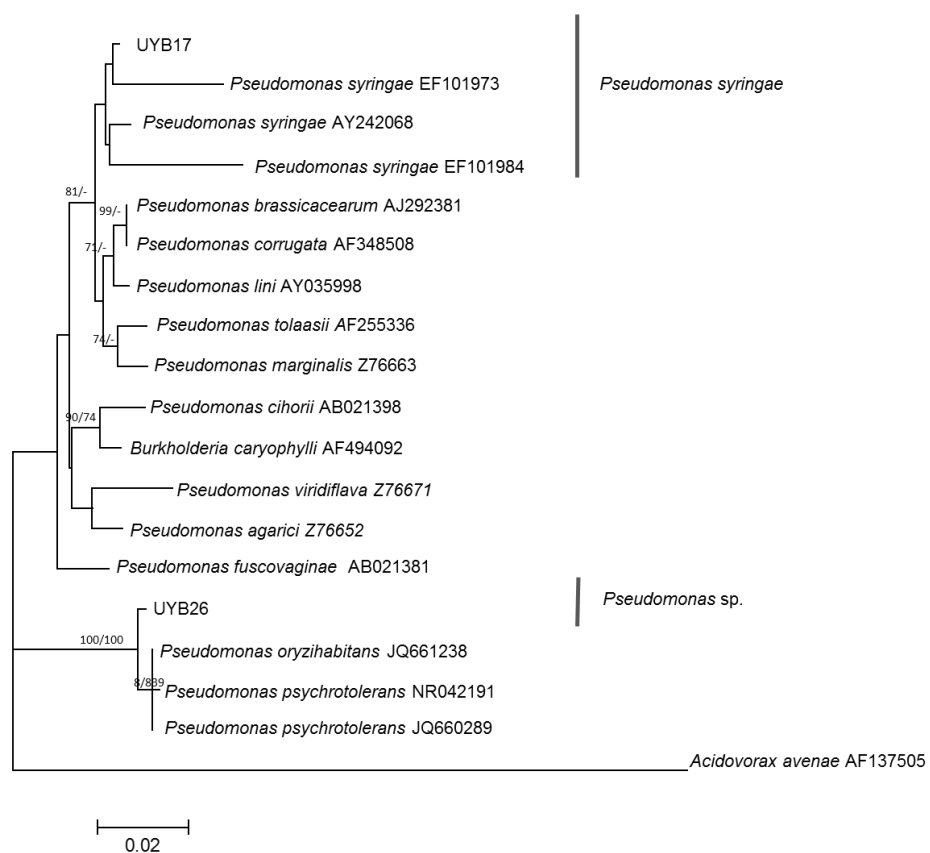


Figura 3. Árbol de distancia genética para el género *Pseudomonas*, basado en la región 16S del operon rADN, obtenido con análisis neighbor-joining. *Acidovorax avenae* fue utilizada como grupo externo. Sólo los valores de bootstrap mayores a 50% obtenidos en el análisis por NJ y MP son mostrados en cada nodo, respectivamente. El árbol tuvo los siguientes índices: TL = 274 pasos; CI = 0.83; RI = 0.77; HI = 0.17.

Para el análisis de los géneros *Pantoea*, el alineamiento constó de 16 secuencias que incluyeron a las cepas UYB25 y UYB35. En este caso el análisis se basó en 892 caracteres de los cuales 843 fueron constantes, 33 fueron variables pero no informativos y 16 fueron parsimoniosamente informativos. Se presenta el árbol de distancia genética obtenida por NJ, con similar topología al obtenido con MP (Figura 4). Las cepas UYB25 y UYB35 agruparon con *Pa. eucalypti*.

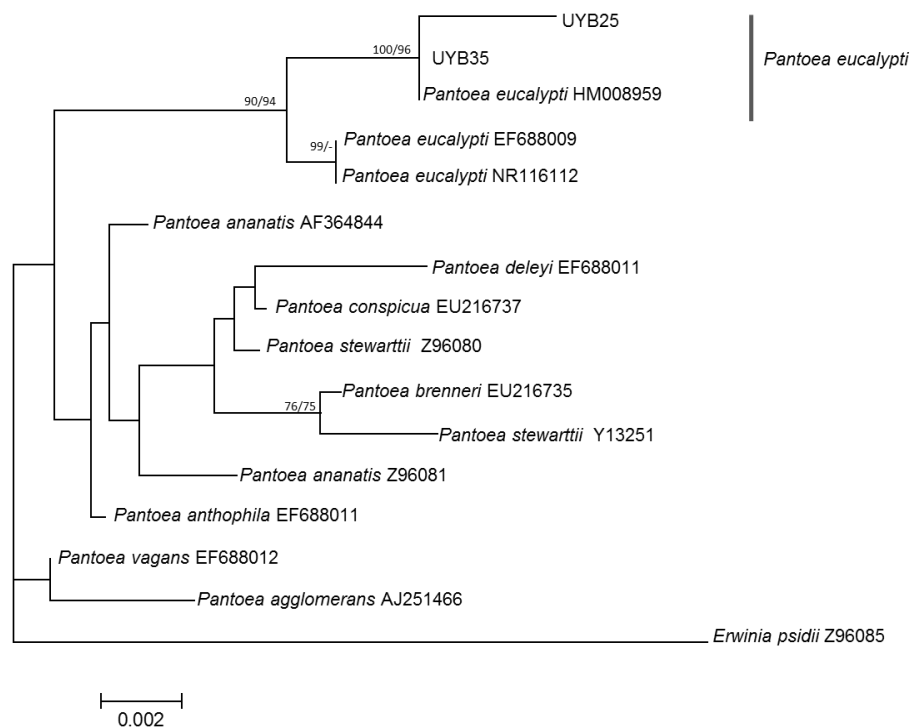


Figura 4. Árbol de distancia genética para los géneros *Erwinia* y *Pantoea*, basado en la región 16S del operon rADN, obtenido con análisis neighbor-joining. *Erwinia psidii* fue utilizada como grupo externo. Sólo los valores de bootstrap mayores a 50% obtenidos en el análisis por NJ y MP son mostrados en cada nodo, respectivamente. El árbol tuvo los siguientes índices: TL = 63 pasos; CI = 0.84; RI = 0.85; HI = 0.16.

Para el análisis de los géneros *Erwinia*, el alineamiento constó de 25 secuencias que incluyó a la cepa UYB135. En este caso el análisis se basó en 701 caracteres de los cuales 625 fueron constantes, 24 fueron variables pero no informativos y 52 fueron

parsimoniosamente informativos. Se presenta el árbol de distancia genética obtenida por NJ, con similar topología al obtenido con MP (Figura 5). La cepa UYB135 agrupó con *Erwinia psidii*.

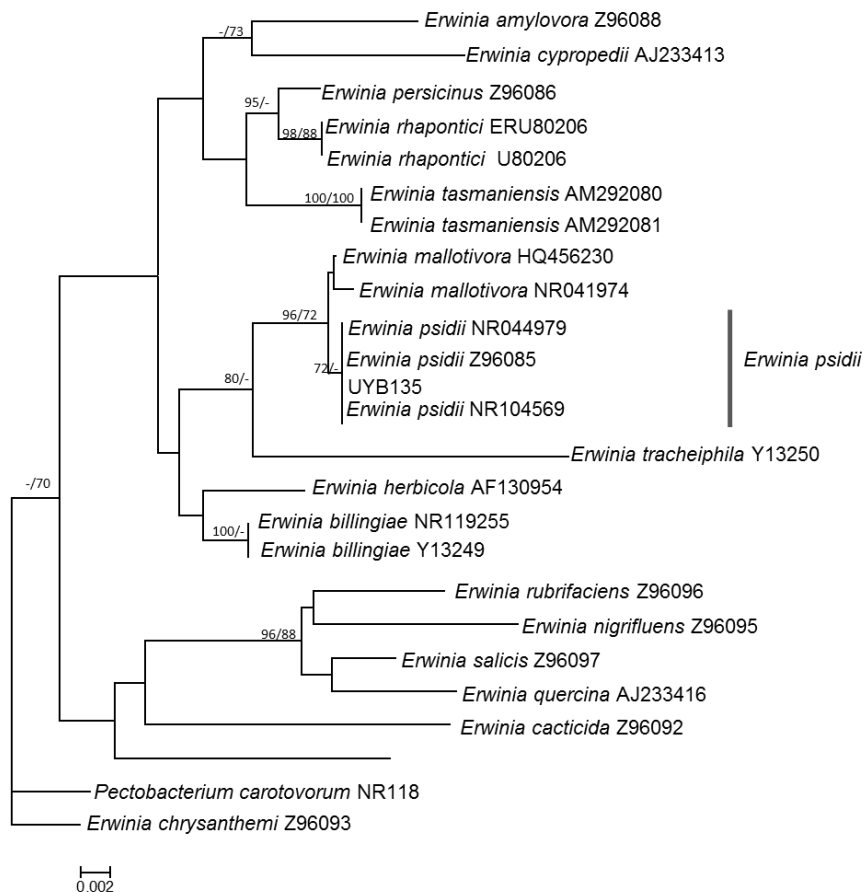


Figura 5. Árbol de distancia genética para los géneros *Erwinia*, basado en la región 16S del operon rADN, obtenido con análisis neighbor-joining. *Pectobacterium carotovorum* fue utilizada como grupo externo. Sólo los valores de bootstrap mayores a 50% obtenidos en el análisis por NJ y MP son mostrados en cada nodo, respectivamente. El árbol tuvo los siguientes índices: TL = 170 pasos; CI = 0.57; RI = 0.72; HI = 0.43.

Para el caso de aquellas cepas que agruparon en el género *Xanthomonas*, se realizó un análisis concatenado de cuatro regiones, tomando como referencias las secuencias del estudio de Young *et al.* (2008). En este caso el alineamiento constó de secuencias correspondientes a 36 cepas incluidas las cepas UYB20, UY30, UYB34, y UYB36. El análisis se basó en 2513 caracteres de los cuales 1828 fueron constantes, 79 fueron variables pero no informativos y

606 fueron parsimonia-informativos. Tanto el análisis NJ, como MP resultaron en árboles de similar topología (Figura 6). Las cuatro cepas analizadas agruparon dentro de *Xanthomonas axonopodis*, cercanas a las cepas ICMP10027 y ICMP10030, aunque formando un grupo separado de éstas.

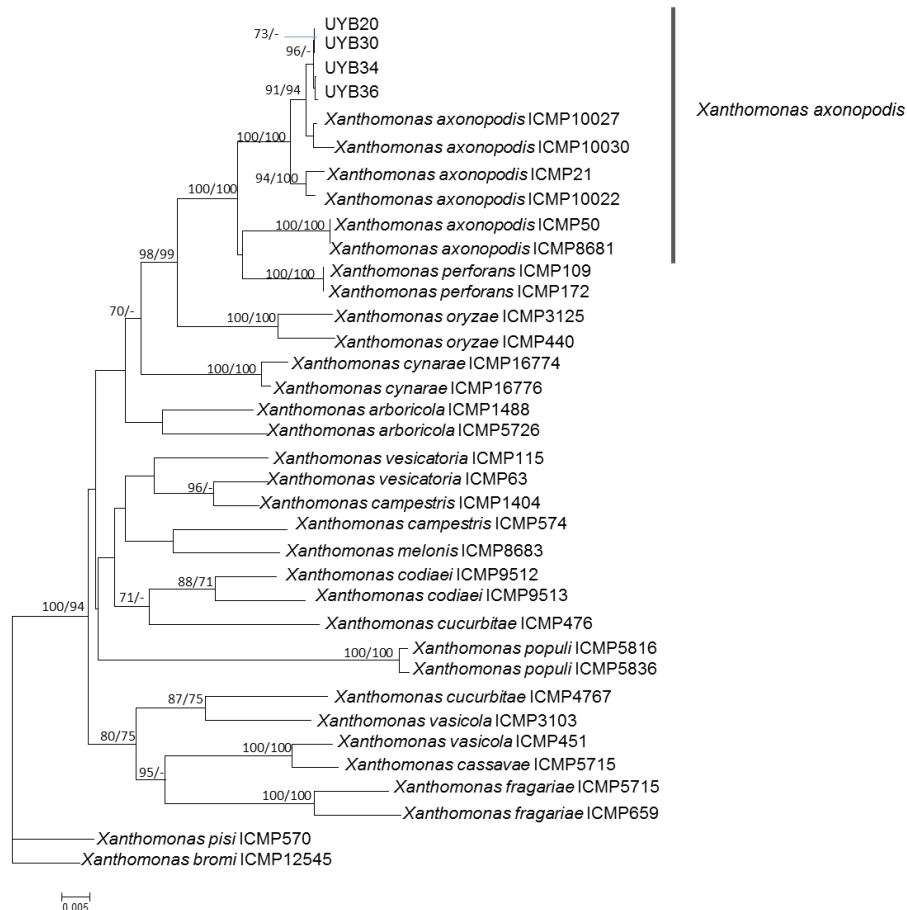


Figura 6. Árbol de distancia genética para el género *Xanthomonas*, basado en el análisis combinado de las regiones *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* y *rpoD*, obtenido con análisis neighbor-joining. *Xanthomonas pisi* fue utilizada como grupo externo. Sólo los valores de bootstrap mayores a 50% obtenidos en el análisis por NJ y MP son mostrados en cada nodo, respectivamente. El árbol tuvo los siguientes índices: TL = 11914 pasos; CI = 0.44; RI = 0.68; HI = 0.56.

3.3.2. Caracterización de la agresividad de las cepas

Se tomaron seis cepas de la colección pertenecientes a diferentes especies de hospederos y lugar de colecta. Cuatro pertenecientes al género *Xanthomonas* (UYB20, UYB30,

UYB34, UYB36), una *Pantoea* (UYB35) y una *Pseudomonas* (UYB17). Las plantas inoculadas mostraron una incidencia promedio para cada cepa que varió de 0 a 82 %. La severidad promedio osciló entre 0 y 30 % (datos no presentados). Las plantas inoculadas con la cepa UYB35 no evidenciaron síntomas durante el período de evaluación, mientras que el resto de las cepas reprodujeron claros síntomas. Se observaron diferencias en forma y tamaño de las lesiones. Las lesiones producidas por las cepas de *X. axonopodis* fueron de forma más angular, translúcidas, fusionadas unas con otras y dispersas en todo el limbo de la hoja, aunque en algunos casos se localizaban en el borde y/o sobre la nervadura principal de la misma. Por su parte, la cepa del género *Pseudomonas* produjo manchas pequeñas, puntuales, no translúcidas y distribuidas en todo el limbo (Figura 7).

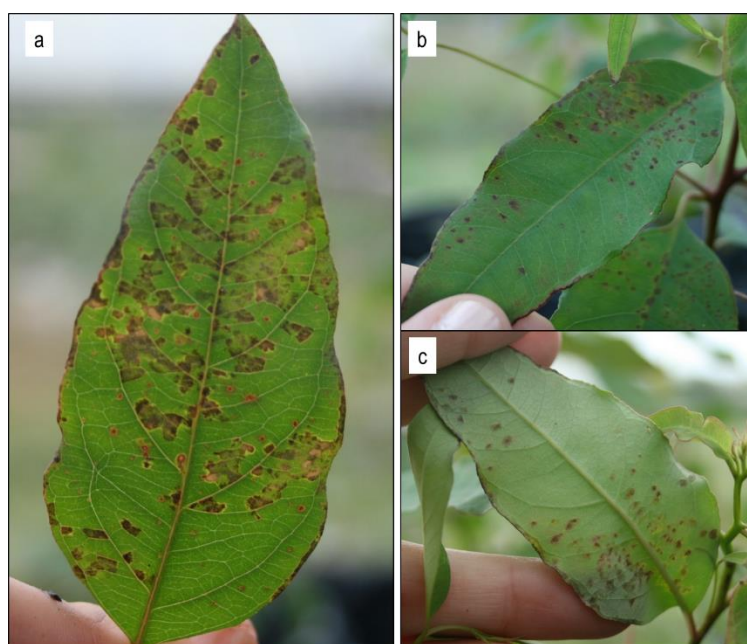


Figura 7. Manchas foliares bacterianas en *E. grandis*, 15 días post inoculación (a) síntomas observados con *X. axonopodis* (UYB36), (b) y (c) síntomas observados en el haz y en el envés de la hoja por *Pseudomonas* (UYB17). Siendo todos los síntomas similares a los observados en campo.

Se observaron diferencias significativas en la agresividad de las cepas, presentando UYB30 significativamente mayor severidad que UYB17, mientras que el resto de las cepas, a excepción de UYB35, tuvieron un comportamiento intermedio (Figura 8). Al estimarse el índice

de la enfermedad se observa un cambio en el ranking de las cepas, donde UYB36 pasa a tener los mayores índices, mientras que UYB17 sigue presentando la menor agresividad (Figura 9).

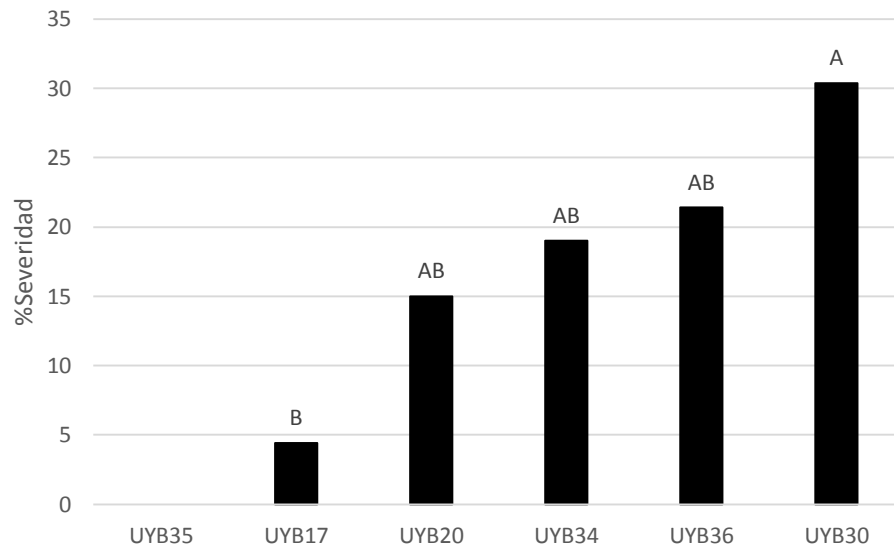


Figura 8. Severidad promedio de mancha foliar bacteriana para cada cepa, evaluada a los 15 días post inoculación, en plantines de *E. grandis* seminal. Medias con distinta letra difieren significativamente entre sí (Tukey-Kramer; $p=0,05$). La inoculación con la cepa UYB35 no presentó síntomas, por lo cual no se incluyó en el análisis estadístico.

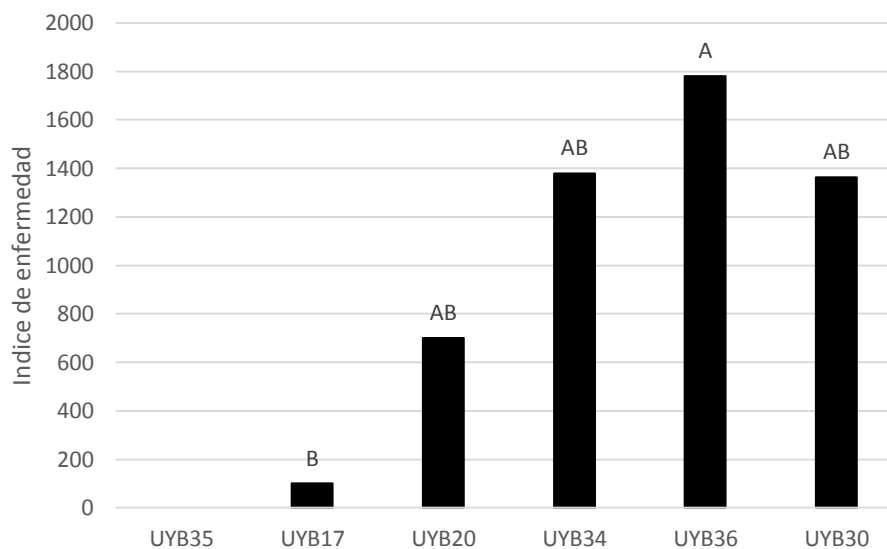


Figura 9. Índice de enfermedad obtenido para las distintas cepas inoculadas en plantines de *E. grandis* seminal. Medias con distinta letra difieren significativamente entre sí (Tukey-Kramer; $p=0,05$). La inoculación con la cepa UYB35 no presentó síntomas, por lo cual no se incluyó en el análisis estadístico.

Al analizar la severidad de la hoja más afectada de la planta, las cepas presentaron el mismo patrón de comportamiento que con la severidad promedio (Figura 10) presentando un significativo coeficiente de correlación de Spearman de 0,9943.

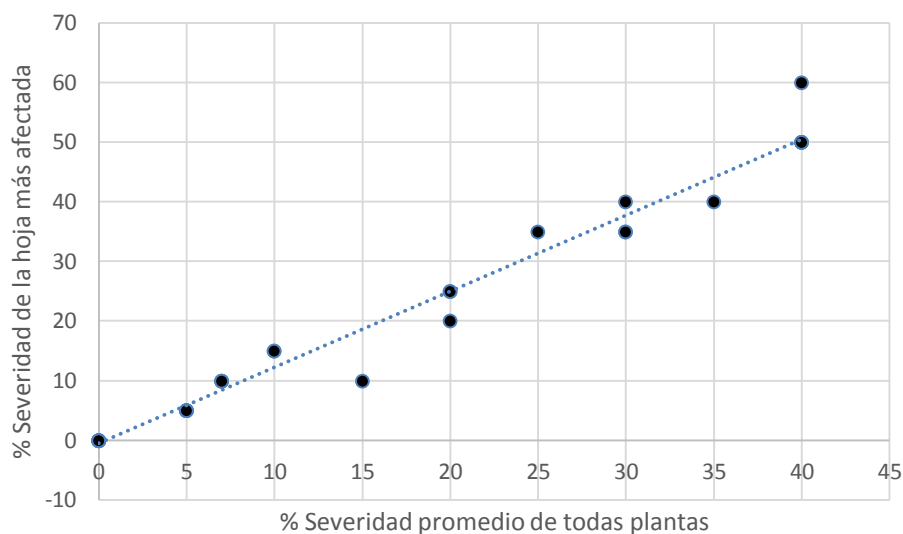


Figura 10. Relación entre la severidad promedio y la severidad de la hoja más afectada de todas las plantas y cepas evaluadas ($p \leq 0,001$).

3.3.3. Caracterización de la resistencia de genotipos de *E. grandis* y *E. dunnii*

Los genotipos evaluados presentaron diferencias significativas respecto a su comportamiento frente a las cepas inoculadas. En general, los plantines de *E. grandis* mostraron mayores niveles de infección que los de *E. dunnii*, tanto en incidencia como en severidad (Figura 11). Independientemente de la especie de *Eucalyptus*, a los 30 dpi se observó mayor nivel de enfermedad en los plantines que a los 15 dpi.

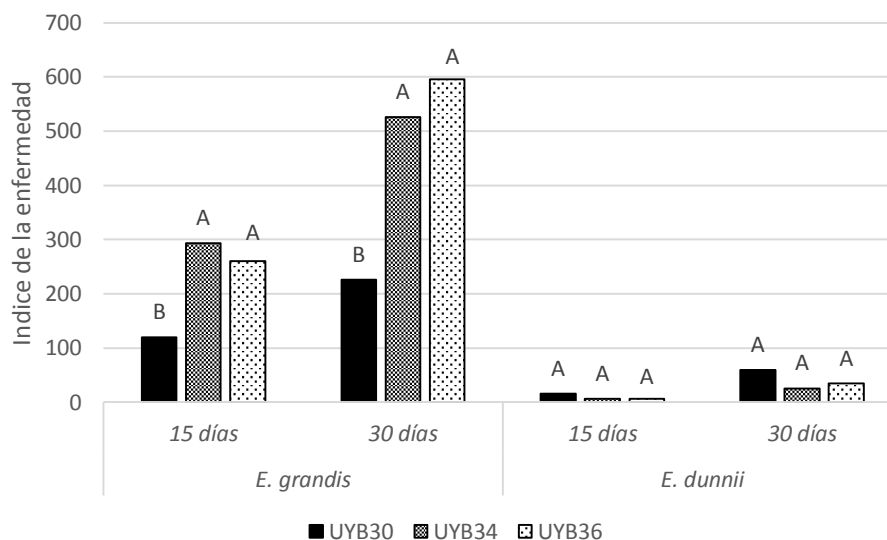


Figura 11. Índice de enfermedad obtenido para cada cepa. Valores promedio de todos los genotipos de *E. dunnii* y *E. grandis* inoculados. Datos correspondientes a la evaluación a los 15 y 30 dpi (días post inoculación). Medias con distinta letra dentro de la misma especie y momento de lectura, difieren significativamente entre sí (Tukey-Kramer; $p=0,05$).

Se observaron diferencias en el índice de enfermedad entre cepas cuando fueron inoculadas en *E. grandis*, mientras que en *E. dunnii*, con menores niveles de enfermedad, no se detectaron diferencias. El análisis de incidencia y severidad para el promedio de los genotipos de *E. grandis*, presentó similares resultados, que los basados en el índice de la enfermedad (Figura 12).

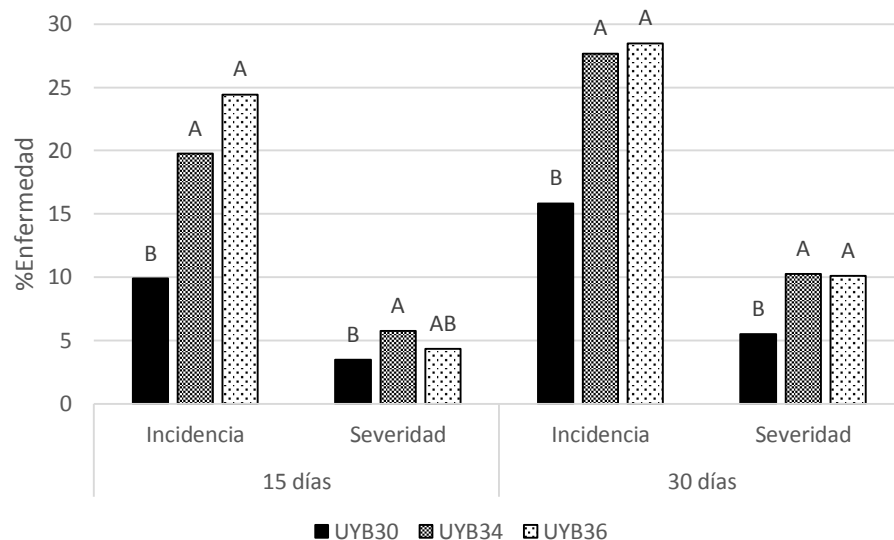


Figura 12. Incidencia y severidad a los 15 y 30 dpi para las cepas UYB30, UYB34 y UYB36. Valores promedio de todos los genotipos de *E. grandis* inoculados. Medias con distinta letra dentro de cada variable y en cada momento de lectura, difieren significativamente entre sí (Tukey-Kramer; $p=0,05$).

Quando se evaluó comportamiento de los genotipos de *E. grandis*, se observó una gran variabilidad en cuanto al nivel de enfermedad. Los genotipos A, K, E y L presentaron los mayores índices de enfermedad, mientras que el genotipo M mostró los menores niveles de enfermedad ante las tres cepas evaluadas (Figura 13). Los diferentes genotipos presentaron un comportamiento diferencial frente a las distintas cepas, denotando una clara interacción cepa x genotipo ($p < 0,05$) (Figura 14). No se observaron diferencias en el índice de la enfermedad de los distintos genotipos de *E. dunnii* al ser inoculados con las distintas cepas (datos no presentados).

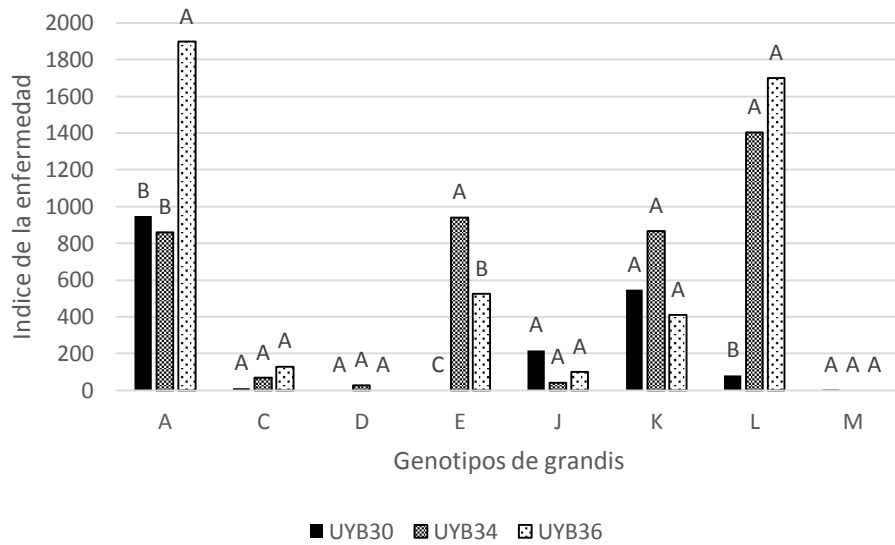


Figura 13. Índice de la enfermedad para las cepas evaluadas en *E. grandis* a los 30 días post inoculación. Medias con distinta letra dentro del mismo genotipo difieren significativamente entre sí (Tukey-Kramer; $p=0,05$).

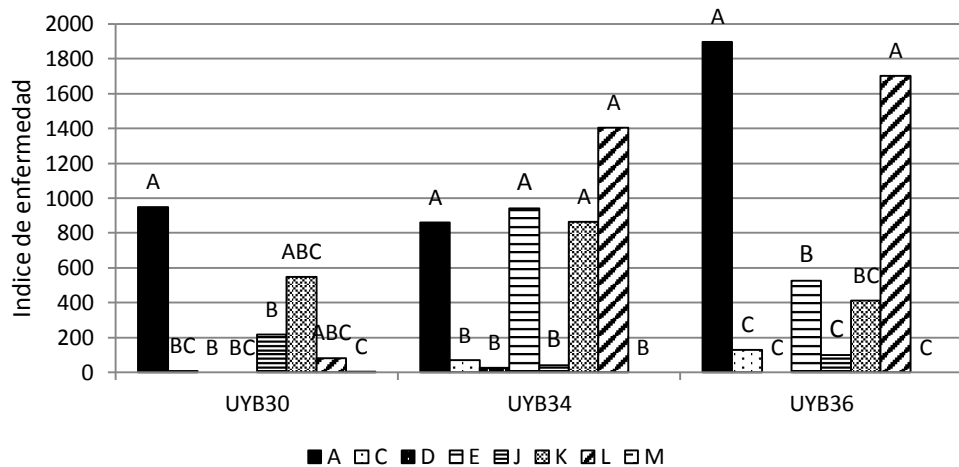


Figura 14. Índice de la enfermedad para las cepas evaluadas en *E. grandis* a los 30 días post inoculación. Medias con distinta letra dentro de la misma cepa difieren significativamente entre sí (Tukey-Kramer; $p=0,05$).

3.4. DISCUSIÓN

Este trabajo representa el primer estudio sobre manchas foliares bacterianas en eucalipto realizado en Uruguay. Las manchas foliares analizadas estuvieron asociadas a

Xanthomonas axonopodis, *Erwinia psidii*, *Pantoea eucalypti*, *Pseudomonas syringae*, y *Pseudomonas* sp.

Erwinia psidii y *Pa. eucalypti* han sido previamente reportadas en Uruguay como agentes etiológicos de manchas foliares bacterianas, pero principalmente asociadas a tizón apical (Coutinho *et al.*, 2011; Brady *et al.*, 2009). El mismo en sus inicios comienza con manchas foliares localizadas en las hojas de los ápices, para luego colonizar por el pecíolo a la rama y ocasionar el síntoma de tizón apical.

Las especies *X. axonopodis* y *Ps. syringae* son reportadas en este estudio por primera vez asociadas a manchas foliares en eucalipto en Uruguay. Ambas especies han sido reportadas previamente en Brasil por Gonçalves *et al.* (2008), como agentes causantes de manchas foliares en diversas especies de eucalipto, como *E. grandis*, *E. grandis* x *E. urophylla* y *E. urophylla* x *E. maidenii*. Estos autores concluyeron que *X. axonopodis* fue la especie predominante en las prospecciones realizadas en dicho país (Gonçalves *et al.*, 2008).

Xanthomonas axonopodis fue también la especie predominante de aquellas asociadas estrictamente a manchas foliares en el presente estudio, aunque al incluir las causales de tizón apical, *Erwinia psidii* fue la que predominó. Por lo que dentro de las especies que ocasionan únicamente manchas la predominante fue *X. axonopodis*, coincidiendo la prospección realizada en Brasil por Gonçalves *et al.* (2008).

Las manchas foliares asociadas a *X. axonopodis* y a *Ps. syringae* presentan diferencias en cuanto a sintomatología, siendo los síntomas causados por *X. axonopodis* muy similares a las manchas foliares reportadas por Gonçalves *et al.* (2008). Mientras que los síntomas causados por *Ps. syringae* se presentaron como infecciones aisladas distribuidas en toda la hoja, sin fusionarse y con una agresividad menor, coincidiendo con la baja agresividad mostrada por la cepa UYB17 en las pruebas de inoculación artificial realizadas. *Ps. syringae* ha sido citada como epífita y endófito sin causar síntomas (Cankar *et al.*, 2005; Whitesides y Spotts, 1991). Sin embargo, pese a mostrar menor agresividad relativa al resto de las cepas evaluadas, los resultados obtenidos en las inoculaciones realizadas confirman la capacidad de esta especie de causar síntomas, confirmando de esta forma su habilidad patogénica.

Respecto a la principal especie encontrada, *X. axonopodis*, restan estudios de rango de hospederos para conocer el patovar de esta especie presente en Uruguay. Gonçalves (2003) sugiere *X. axonopodis* pv. *eucalypti*, ya que la cepa aislada en su estudio sólo ocasionó

sintomas en plantas de *Eucalyptus* y *Corymbia*. Inoculaciones realizadas en Mirtáceas como *Psidium guajava*, *Psidium sativum*, *Myrciaria jaboticaba*, *Eugenia jambolana*, así como en otras especies botánicas como *Prunus persica*, *Caryca papaya*, *Phaseolus vulgaris*, *Lycopersicon esculentum* y *Citrus limon*, no presentaron síntomas. Estos resultados indican el nivel de especialización de esta bacteria al género *Eucalyptus* y *Corymbia*.

La variabilidad en la agresividad entre cepas representa información fundamental para la mejor comprensión de la enfermedad. Los resultados aquí obtenidos indican que la variabilidad en los síntomas observados a campo, y en la agresividad de la enfermedad, podría estar explicada por la presencia de varias especies bacterianas causando manchas foliares, y por una variabilidad en la agresividad tanto entre cepas de distintas especies como entre cepas de la misma especie.

La cepa más agresiva en *E. grandis* (UYB30), fue aislada desde manchas foliares en *E. dunnii*, lo que indica que no hay especificidad en cuanto al hospedero y que estos hospederos están potencialmente compartiendo la misma comunidad bacteriana causante de manchas foliares en Uruguay. Esto representa un grave problema en epidemias severas, ya que las especies de *E. grandis* y *E. dunnii* representan un 46 % del total de masa forestal de Uruguay (MGAP/DIEA, 2013) y las pérdidas económicas pueden alcanzar niveles significativos en materiales genéticos muy susceptibles y condiciones favorables para la infección (Alfenas *et al.*, 2009; Gonçalves, 2003).

Las diferencias en agresividad encontradas entre las cepas de *X. axonopodis* (UYB30, UYB34 y UYB36), remarcan la importancia de caracterizar las cepas que podrían eventualmente ser utilizadas para asistir a los programas de mejoramiento genético. El conocimiento de la agresividad de las cepas a utilizar al momento de asistir a los programas de mejoramiento es un pilar fundamental para hacer eficiente al proceso de selección por resistencia (Pérez *et al.*, 2009).

La cepa de *Pa. eucalypti* (UYB35) estudiada, no presentó síntomas en las pruebas de patogenicidad cuando fue asperjada sobre la planta, pero sí reprodujo los síntomas cuando fue inoculada mediante heridas. Estos resultados sugieren la necesidad de heridas que presenta esta especie para penetrar e infectar la planta, mientras que las cepas de *X. axonopodis* y *Ps. syringae* fueron capaces de causar infección sin necesidad de generar heridas en la planta. Silva (2007) demostró que *X. axonopodis* en Eucalipto ingresa por aberturas naturales como

ser estomas al igual que *Ps. syringae* como lo citan López y Rodríguez (2009) para *Lycopersicon esculentum*.

Las inoculaciones realizadas a diversos genotipos de *E. grandis* y *E. dunnii*, sugieren que *E. grandis*, como especie, presenta mayor susceptibilidad que *E. dunnii*, a pesar de que algunos genotipos de *E. grandis* no mostraron infecciones luego de ser inoculados. Los resultados aquí obtenidos confirman la presencia de una gran variabilidad en la resistencia, entre especies y dentro de las dos especies de *Eucalyptus* evaluadas. Estos resultados concuerdan con Gonçalves (2003), quien demostró la presencia de variabilidad intraespecífica en cuanto a la susceptibilidad a la enfermedad en diferentes especies de *Eucalyptus* y *Corymbia*.

Los clones de *E. grandis* mostraron gran variabilidad en la resistencia frente a las diferentes cepas, con una significativa interacción cepa x genotipo. O sea, un clon con buen comportamiento frente a una cepa, no necesariamente va a presentar mejor comportamiento que otros clones frente a otra cepa. Estos resultados, por un lado, demuestran la ventaja de este tipo de evaluación, para conocer mejor la performance de un clon, pero por otro develan la complejidad del sistema para manejar esta enfermedad por resistencia genética. Esta interacción genotipo x cepa, remarca el potencial del mejoramiento por resistencia genética frente a esta enfermedad. Concordando con los resultados de comportamiento sanitario en eucalipto frente a *Neofusicoccum parvum-N. ribis*, encontrando diferencias significativas entre los clones y una fuerte interacción con las cepas evaluadas (Pérez *et al.*, 2009). En situaciones de interacción significativa genotipo x cepa, es necesario contar con una colección de cepas bacterianas que represente de la mejor forma la variabilidad en agresividad que podría enfrentar un determinado genotipo al ser plantado comercialmente.

Este estudio permitió ajustar un protocolo de inoculación para bacterias, sin precedentes a nivel nacional. Dicho protocolo representa una herramienta efectiva para la caracterización de la resistencia de los genotipos de eucalipto para los programas de mejoramiento genético, siendo un método rápido, sencillo, económico y de gran impacto para el sector productivo (Simeto *et al.*, 2007). En este sentido, los resultados obtenidos indican que la evaluación realizada a los 30 dpi permiten una caracterización más sólida que cuando las evaluaciones se realizan a los 15 dpi. A su vez, la alta correlación observada entre los resultados obtenidos al evaluar el promedio de la totalidad de las hojas de la planta, y la severidad de la hoja más

afectada ($r=0.99$), permite agilizar la evaluación, permitiendo tomar de esta forma como indicador a la hoja más afectada de cada planta inoculada.

El conocimiento del agente etiológico es un insumo fundamental para comenzar la planificación de medidas de manejo de una enfermedad. El uso de materiales resistentes es la principal medida de manejo de enfermedades forestales en plantación (Ferreira y Milani, 2012; Alfenas *et al.*, 2009; Furtado *et al.*, 2009; Gonçalves, 2003; Ferreira *et al.*, 2001), pero principalmente de las enfermedades bacterianas, dada la falta de herramientas para realizar intervenciones que permitan frenar el desencadenamiento de epifitias a nivel de campo. Los resultados aquí obtenidos permiten confirmar la utilidad de esta herramienta en el patosistema a nivel nacional. Este estudio aporta información fundamental para asistir a los programas de mejoramiento genético por resistencia, enfatizando en la importancia y viabilidad del uso de materiales con mejor comportamiento sanitario.

Agradecimientos

Gracias a la Sociedad de Productores Forestales y a la CSIC-UdelaR por el financiamiento del presente estudio. También a UPM-Forestal Oriental, Montes del Plata, COFUSA, Forestal Atlántico Sur y Weyerhaeuser por el apoyo logístico realizado. A Acelino Alfenas y Hélio Ferraz por la capacitación realizada en el laboratorio de Patología Forestal en Viçosa – Brasil. Además agradecer María Pérez, Noelia Benítez y Noel García por su colaboración en este trabajo.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

Adriko J, Mbega MR, Mortensen CN, Wulff EG, Tushemereirwe WK, Kubiriba J, Lund OS.

2014. Improved PCR for identification of members of the genus *Xanthomonas*. Journal Plant Pathology, 138: 293–306

Alfenas AC, Gonçalves RC, Oliveira JR, Silva IT, Oda S, Assis TF. 2001. Mancha foliar e desfolha de *Eucalyptus urophylla* x *E. maidenii*, causadas por fitobacterias. Fitopatologia Brasileira, 26: 294-294.

Alfenas AC, Valverde EA, Mafia R, Assis FT. 2009. Clonagem e Doenças do Eucalipto. Viçosa: UFV. 500p.

- Balmelli G, Simeto S, Martinez G, Torres D, Gonzalez, Fros D, Bentancur O, Pérez C.** 2009a. Relevamiento sanitario de otoño en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus dunnii* en el Sureste y Litoral Oeste. Relevamiento sanitario de *Eucalyptus* spp. en el sureste y litoral oeste del país. En: Jornada técnica de protección forestal. Montevideo: INIA. Serie de actividades de difusión; 594. pp. 51-71.
- Balmelli G, Simeto S, Martinez G, Torres D, Pérez C, Fros D, Bentancur O.** 2009b. Incidencia y severidad de enfermedades y plagas en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* en las regiones sureste y litoral oeste de Uruguay. En: Jornada técnica de protección forestal. Montevideo: INIA. Serie de actividades de difusión; 567. pp. 51-64.
- Brady CL, Venter SN, Cleenwerck I, Engelbeen K, Vancanneyt M, Swings J, Coutinho TA.** 2009. *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov. and *Pantoea anthophila* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59: 2339–2345.
- Cankar K, Kraigher H, Ravnikar M, Rupnik M.** 2005. Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). FEMS Microbiology Letters, 244: 341-345.
- Coutinho TA, Brady CL, Van Der Vaart M, Venter SN, Telechea N, Rolfo M, Pérez C, Wingfield MJ.** 2011. A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. Australasian Plant Pathology, 40: 55–60.
- Coutinho TA, Preisig O, Mergaert J, Cnockaert MC, Riedel KH, Swings J, Wingfield MJ.** 2002. Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids, and clones in South Africa. Plant Disease, 86: 20-25.
- Dhingra OD, Sinclair JB.** 1995 Basic plant pathology methods. EEUU: Boca Raton LA. CRC Press Inc. 355p.
- FAO.** 2006. Manual de campo: Plagas y enfermedades de Eucaliptos y Pinos en el Uruguay. [En línea]. Consultado 29 junio 2015. Disponible en: <http://www.fagro.edu.uy/~forestal/cursos/proteccion/Fao%20Manual%20de%20Campo.pdf>
- Ferreira FA, Milani D.** 2012. Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. Mogí Guaçu, SP: International Paper. 98p.
- Ferreira FA, Oliveira JR, Romeiro R.** 2001. Uma bacteriose foliar em *Eucalyptus grandis* na Argentina e Paraguai. Fitopatologia Brasileira, 26: 281-286.

- Furtado EL, Dias DC, Ohto CT, Rosa DD.** 2009. Doenças do eucalipto no Brasil. Botucatu: FCA/UNESP. 74p.
- Gonçalves RC.** 2003. Etiología da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil [Tesis de doctorado]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 94p.
- Gonçalves RC, Lau D, Oliveira JR, Mafia LA, Casardo CM, Alfenas A.** 2008. Etiología da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil. *Tropical Plant Pathology*, 33: 180-188.
- Hauben L, Vauterin L, Swings J, Moore ERB.** 1997. Comparison of 16s Ribosomal DNA Sequences of All *Xanthomonas* Species. *International journal of systematic bacteriology*, 47: 328-335.
- Hillis DM, Bull JJ.** 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42: 142–52.
- Hugh R, Leifson E.** 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *Journal Bacteriology*, 66: 24-26.
- Keane PJ, Kile GA, Podger FD, Brown BN.** 2000. Diseases and pathogens of eucalypts. Victoria: CSIRO. 565p.
- King EO, Ward MK, Raney DE.** 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44: 301-307.
- López E, Rodríguez P.** 2009. *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 y *Dickeya dadantii* 3937, diferentes modelos de infección en bacterias fitopatógenas. *Actualidad SEM*, 47: 14-18.
- Mahuku GS.** 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 71-81.
- McFarland J.** 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 49: 1176-1178.
- MGAP/DIEA** (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca/ Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias). 2013. Anuário Estadístico Agropecuário 2013. Consultado 28 junio 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2013,O,es,0>

- Miller JH.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring: Cold Spring Harbor Laboratory. 466p.
- Parkinson N, Aritua V, Heeney J, Cowie C, Bew J, Stead D.** 2007. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2881–2887.
- Parkinson N, Cowie C, Heeney J, Stead D.** 2009. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of gyrB sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 264-274.
- Pérez CA.** 2012. El desarrollo forestal y su implicancia sobre la dinámica de las enfermedades. En: 2da jornada bianual de Fitopatología: Impacto de la intensificación de los cultivos en el desarrollo de las enfermedades, 10 agosto; 2012; Montevideo, Uruguay. pp. 15.
- Pérez CA, 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. Montevideo: INIA. Serie de actividades de difusión; 629. pp. 51-65.
- Pérez CA, Wingfield MJ, Altier NA, Blanchette RA.** 2009. *Mycosphaerellaceae* and *Teratosphaeriaceae* associated with *Eucalyptus* leaf diseases and stem cankers in Uruguay. *Forest Pathology*, 39: 349-360.
- Pomella AWV, Romeiro RS, Ferreira FA, Oliveira JR.** 1995. Lesões foliares em viveiro de eucalipto incitadas por uma espécie fluorescente de *Pseudomonas*. *Fitopatologia Brasileira*, 20: 374.
- Posada D, Crandall KA.** 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Querejeta M, Cordovez M, Brooks A, Moreno I, Piedra B, Hernandez M.** 1990. Mancha bacteriana en especies forestales causada por *Xanthomonas* sp. *Ciencia Técnica Agrícola Protección de plantas*, 13: 51-59.
- Reis AV, Souza RM, Castro HA, Cardoso MAFC, Kobayasti L.** 1996. Uma nova bacterios em mudas de eucalipto incitada por *Xanthomonas campestris*. *Fitopatologia Brasileira*, 21: 342.
- Romeiro RS.** 2011. Bacterias fitopatogênicas. Viçosa: Ed. UFV. 417p.
- Romeiro RS, Souza RM, Muchovej JJ, Kimura O.** 1988. Soft rot of peruvian carrot due to *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* in Brazil. *Plant Pathology*, 37: 300-3002.

- Schaad NM, Jones JB, Chun W. 2001.** Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Minnesota: APS Press. 373p.
- Simeto S, Balmelli G, Althier N, Dini B, Bennadji Z. 2007.** Desarrollo de protocolos de inoculación artificial para la caracterización sanitaria de *Eucalyptus globulus*. Montevideo: INIA. Serie Técnica; 169. 25 p.
- Simeto S, Balmelli G, Martínez G, Torres D, Gonzalez P, Fros D, Bentancur O, Pérez CA. 2010.** Relevamiento sanitario de *Eucalyptus* spp. en el sureste y litoral oeste del país. En: Jornada técnica de protección forestal. Montevideo: INIA. Serie de actividades de difusión; 629. pp. 41-51.
- Suslow TV, Schroth MN, Isaka M. 1982.** Application of rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, 72: 917-918.
- Swofford DL. 2002.** PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10a. Sinauer Associates, Sunderland MA, Walters D, Walsh D, Newton A, Lyon G. 2005. Induced resistance for plant disease control: Maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology*, 95: 1368-1373.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991.** 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of bacteriology*, 173: 697-703.
- Whitesides SK, Spotts RA. 1991.** Frequency, distribution, and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringe* in pear trees. *Phytopathology*, 81: 453-457.
- Wilson EE, Zeitoun FM, Fredrickson DL. 1967.** Bacterial phloem canker, a new disease of Persian walnut trees. *Phytopathology*, 57: 618-621.
- Young JM, Park DC, Shearman HM, Fargier E. 2008.** A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31: 366-377.

4. CONCLUSIONES GENERALES

Diversas enfermedades bacterianas afectan actualmente al cultivo de eucalipto, provocando manchas foliares, tizón apical y marchitamiento vascular. En Uruguay se ha confirmado la presencia de las manchas foliares bacterianas y el tizón apical, no existiendo hasta el momento reporte de marchitamiento vascular bacteriano.

Las especies reportadas asociadas a tizón apical en el país actualmente son *Erwinia psidii* (Coutinho *et al.*, 2011), *Pantoea ananatis* (FAO, 2006), *Pantoea eucalypti* y *Pantoea vagans* (Brady *et al.* 2009b), todas ellas asociadas principalmente al tizón apical. También se ha reportado a *E. cowanii*, aunque probablemente en este caso no sea un patógeno primario, sino un endófito que en condiciones ambientales favorables para la enfermedad contribuya con ella (Brady *et al.*, 2009a).

Mediante este estudio se identificó las especies *Xanthomonas axonopodis* y *Pseudomonas syringae* relacionadas con manchas foliares bacterianas en eucalipto, siendo la especie predominante *X. axonopodis*. Además se constató la presencia de *Er. psidii* y *Pa. Eucalypti* causando manchas foliares bacterianas, pero siempre asociadas principalmente a tizón apical bacteriano.

Mediante una prospección en diferentes zonas productoras de eucalipto y de diferentes especies se generó una colección de cepas bacterianas. La misma es conservada en el laboratorio de Fitopatología de la Estación experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC) para futuros estudios del grupo o ajenos a este.

De la colección en estudio, se identificó a *X. axonopodis* y *Ps. syringae* como las principales agentes causales de mancha foliar bacteriana, y en menor frecuencia se observó *Er. psidii* y *Pantoea eucalypti*, ya que estas últimas están muy relacionadas con tizón apical. Los síntomas característicos de la enfermedad son manchas foliares pequeñas de forma angular y translúcidas al inicio de la enfermedad. A medida que avanza la misma se observan fusionadas, de aspecto reseco, con perforaciones y necrosis en la porción superior del limbo. En epidemias severas se observa defoliación.

Para caracterizar la agresividad de cepas como para estudiar la resistencia del hospedero se ajustó un método de inoculación artificial, el mismo permitió en forma eficiente, rápida y económica inocular diferentes cepas en plantines de eucalipto. Mostrando a *X.*

axonopodis como la cepa de mayor agresividad en las inoculaciones realizadas, presentando una gran variabilidad en la agresividad entre cepas.

Mientras que el estudio de la resistencia del hospedero, indicó que *E. grandis* presenta mayor susceptibilidad como especie que *E. dunnii*, con claras diferencias en la susceptibilidad entre genotipos de la misma especie.

En dichas evaluaciones no se observó especificidad de las cepas en cuanto al hospedero, indicando que éstos están potencialmente compartiendo la misma comunidad bacteriana causante de manchas foliares en Uruguay.

Los resultados obtenidos como ser la colección de cepas bacterianas generadas, la caracterización de agresividad de las mismas y la caracterización de la resistencia de genotipos tanto *E. grandis* como *E. dunnii*, sumado al método de inoculación validado, son insumos para futuras investigaciones sobre patogénesis, resistencia, epidemiología y control de la enfermedad.

Estos resultados, si bien son preliminares, son estimulantes debido a que se encontró variabilidad en la resistencia genética tanto entre como dentro de las especies de *Eucalyptus* evaluadas, lo que indica la posibilidad de selección y mejoramiento. Aunque es indiscutible la importancia de continuar con estudios epidemiológicos para Uruguay, y sumar estudios de detección temprana de la enfermedad para poder desarrollar medidas de control efectivas.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Adriko J, Mbega MR, Mortensen CN, Wulff EG, Tushemereirwe WK, Kubiriba J, Lund OS. 2014. Improved PCR for identification of members of the genus *Xanthomonas*. *Journal Plant Pathology*, 138: 293–306
- Alfenas AC. 1993. Potential and present status of *Eucalyptus* and *Acacia mangium* diseases in Northern Sumatra. Indonesia: DFP/UFV. 53 p.
- Alfenas AC, Gonçalves RC, Oliveira JR, Silva IT, Oda S, Assis TF. 2001. Mancha foliar e desfolha de *Eucalyptus urophylla* x *E. maidenii*, causadas por fitobacterias. *Fitopatologia Brasileira*, 26: 294-294.
- Alfenas AC, Mafia RG, Sartório RC, Binoti DHB, Silva RR, Lau D, Vanetti CA. 2006. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 31: 357-366.
- Alfenas AC, Valverde EA, Mafia R, Assis FT. 2009. Clonagem e Doenças do Eucalipto. Viçosa: UFV. 500 p.
- Álvarez B, Biosca EG, López MM. 2010. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. En: Méndez Vilas A. (Eds.). Current research technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Badajoz: Formatex. 267-279.
- Arriel A. 2013. Seca de ponteiros de *Eucalyptus* spp. Causada por *Erwinia psidii* no Brasil. Tesis Magister Scientiae. Viçosa, Brasil. Universidade Federal de Viçosa. 40 p.
- Arriel A, Fonseca NR, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Mafia RG, Borges Júnior N, De Souza HP, Alfenas AC. 2013. Seca de ponteiros de *Eucalyptus* spp. Causada por *Erwinia psidii* no Brasil. *Forest Pathology*, 44: 255-265.
- Askiew E, Tevorow PR. 1994. Management of bacterial wilt of tobacco. En: Hayward AC, Hartman GL. (Eds.). Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford: UK. CAB International. 179-198.
- Balmelli G, Simeto S, Martinez G, Torres D, Gonzalez, Fros D, Bentancur O, Pérez C. 2009a. Relevamiento sanitario de otoño en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus dunnii* en el Sureste y Litoral Oeste. INIA-Las Brujas, Montevideo. Serie de Actividades de Difusión 594: 51-71.

- Balmelli G, Simeto S, Martinez G, Torres D, Pérez C, Fros D, Bentancur O. 2009b. Incidencia y severidad de enfermedades y plagas en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* en las regiones sureste y litoral oeste de Uruguay. En: Jornada técnica de protección forestal. Montevideo: INIA. Serie de actividades de difusión; 567. pp. 51-64.
- Barnes I, Roux J, Wingfield BD, Niell MO, Wingfield MJ. 2003. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay. *Australasian Plant Pathology*, 32: 361-366.
- Bettucci L, Alonso R, Tiscornia S. 1999. *Endophytic mycobiota* of healthy twigs and the assemblage of species associated with twig lesions of *Eucalyptus globulus* and *E. grandis* in Uruguay. *Mycological Research*, 103: 468–472.
- Brady CL, Venter SN, Cleenwerck I, Engelbeen K, de Vos P, Wingfield MJ, Telechea N, Coutinho TA. 2009a. Isolation of *Enterobacter cowanii* from *Eucalyptus* showing symptoms of bacterial blight and dieback in Uruguay. *Letters in Applied Microbiology*, 49: 461-465.
- Brady CL, Venter SN, Cleenwerck I, Engelbeen K, Vancanneyt M, Swings J, Coutinho TA. 2009b. *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov. and *Pantoea anthophila* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 2339–2345.
- Bush D. 2011. Eucalypts for Planting: Trends in Testing and Utilization. (En línea). Consultado 3 mayo 2015. Disponible en: <http://www.ipef.br/eventos/2011/iufro.asp>.
- Cankar K, Kraigher H, Ravnikar M, Rupnik M. 2005. Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *FEMS Microbiology Letters*, 244: 341-345.
- Ciesla WM, Diekmann M, Putter CA. 1996. *Eucalyptus* spp.: Technical Guide-lines for the safe movement of germplasm. Rome: FAO/IPGRI. 68 p.
- Coelho MVS, Mendes AP, Marques ASA. 2002. Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: Levantamento e caracterização. Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico; 59. pp.1-8.
- Cortinas MN, Crous PW, Wingfield BD, Wingfield MJ. 2006. Multi-gene phylogenesis and phenotypic characters distinguish two species within the *Colletogloeopsis zuluensis* complex associated with *Eucalyptus* stem cankers. *Studies in Mycology*, 55: 133-146.

- Coutinho TA, Brady CL, Van Der Vaart M, Venter SN, Telechea N, Rolfo M, Pérez C, Wingfield MJ. 2011. A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. *Australasian Plant Pathology*, 40: 55–60.
- Coutinho TA, Preisig O, Mergaert J, Cnockaert MC, Riedel KH, Swings J, Wingfield MJ. 2002. Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids, and clones in South Africa. *Plant disease*, 86: 20-25.
- Coutinho TA, Roux J, Riedel KH, Terblanche J, Wingfield MJ. 2000. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa. *Forest Pathology*, 30: 205–210.
- Coutinho TA, Van der Westhuizen L, Roux J, McFarlane FA, Venter SN. 2014. Significant host jump of *Xanthomonas vasicola* from sugarcane to a *Eucalyptus grandis* clone in South Africa. *Plant Pathology*, 64: 576–581.
- Coutinho TA, Venter SN. 2009. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 10: 325–335.
- Dhingra OD, Sinclair JB. 1995 *Basic plant pathology methods*. EEUU: Boca Raton LA. CRC Press Inc. 355 p.
- Dianese, JC, Dristig MCG. 1993. Screening Eucalyptus selections for resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. En: Hayward AC, Hartman GL. (Eds.). *Bacterial wilt*. Canberra: ACIAR Proceedings. 206–210.
- FAO. 2006. *Manual de campo: Plagas y enfermedades de Eucaliptos y Pinos en el Uruguay*. (En línea). Consultado 29 junio 2015. Disponible en: <http://www.fagro.edu.uy/~forestal/cursos/proteccion/Fao%20Manual%20de%20Campo.pdf>
- Faria JMR. 2013. Severidade e controle da bacteriose foliar em mudas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em função do nível tecnológico do viveiro. Tesis Mestre em Ciências Florestal. Botucatu, Brasil. Universidade Estadual Paulista. 45 p.
- Ferreira FA. 1998. Sintomatologia da murcha bacteriana em plantações de eucalipto. *Fitopatologia Brasileira*, 23: 201-218.
- Ferreira FA. 1997. Enfermidades do eucalipto no Brasil. Informe Agropecuario- A cultura do Eucalipto, 18: 5-19, 31-39.

- Ferreira FA, Milani D. 2012. Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. Mogí Guaçu: International Paper. 98 p.
- Ferreira FA, Oliveira JR, Romeiro R. 2001. Uma bacteriose foliar em *Eucalyptus grandis* na Argentina e Paraguai. Fitopatologia Brasileira, 26: 281-286.
- Ferreira MA, Mafia RG. 2012. Impacto da mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis*, sobre o crescimento de mudas de eucalipto em condições de campo. (En línea). Consultado 2 febrero 2015. Disponible en: <http://webftp.cpaa.embrapa.br/site/Trabalhos/367.pdf>.
- Furtado EL, Dias DC, Ohto CT, Rosa DD. 2009. Doenças do eucalipto no Brasil. Botucatu: FCA/UNESP. 74 p.
- Genin S, Boucher C. 2002. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. Molecular Plant Pathology, 3: 111-118.
- Gonçalves RC. 2003. Etiología da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil. Tesis Doctor Scientiae. Viçosa, Brasil. Universidade Federal de Viçosa. 94 p.
- Gonçalves RC, Alfenas AC, Oliveira JR, Silva IT, Oda S, Assis TF, Tonon A. 2001. Mancha foliar e seca de ponteiros do eucalipto causada por fitobacterias, no Brasil e na Argentina. Fitopatologia Brasileira, 26: 294.
- Gonçalves RC, Lau D, Oliveira JR, Mafia LA, Casardo CM, Alfenas C. 2008. Etiología da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil. Tropical Plant Pathology, 33: 180-188.
- Gong MQ, Chen Y, Wang FZ, Chen YL. 1999. Inhibitory effect of ectomycorrhizal fungi in bacterial wilt of *Eucalyptus*. Forest Research, 12: 339-345.
- Grattapaglia, D, Vaillancourt, RE, Shepherd, M, Thumma, BR, Foley, W, Kulheim, C, otts, BM, Myburg, AA. 2012. Progress in *Myrtaceae* genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. Tree Genetics and Genomes, 3: 463-508.
- Hauben L, Vauterin L, Swings J, Moore ERB. 1997. Comparison of 16s Ribosomal DNA Sequences of All *Xanthomonas* Species. International journal of systematic bacteriology, 47: 328-335.
- Hayward AC. 2000. *Ralstonia solanacearum*. En: Lederberg J. (Eds.). Encyclopedia of Microbiology. San Diego: Academic Press. 32-42.
- Hayward AC. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology, 29: 65-87.

- Hillis DM, Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42: 142–52.
- Hugh R, Leifson E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *Journal Bacteriology*, 66: 24-26.
- Junqueira NTV. 2000. Doenças e Pragas. En: Manica I. (Eds.). *Fruticultura Tropical 6 Goiaba*. Porto Alegre: Cinco Continentes. 225-270.
- Keane RM, Crawley MJ. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution*, 17: 164–170.
- Keane PJ, Kile GA, Podger FD, Brown BN. 2000. *Diseases and pathogens of Eucalyptus*. Victoria: CSIRO. 565 p.
- King EO, Ward MK, Raney DE. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44: 301-307.
- Li H, Wu XY. 1996. The current status, causes and control of forest diseases in Haiman province. *Tropical Forestry*, 24: 101-103.
- Liang ZC, Guo Q, Wu QP. 1992. Bacterial wilt of eucalyptus in South China. *Bacterial Wilt Newsletter*, 8:5.
- Lopes CA. 2009. Murcha bacteriana ou murchadeira – Uma inimiga do tomateiro em climas quentes. Brasília DF. Comunicado Técnico Embrapa, 67. pp. 1-10.
- Lopes L, Oliveira AG, Beranger J, Góis C, Vasconcellos F, San Martin J, Andrade C, Mello J, Andrade G. 2012. Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis in vitro* and bacterial leaf blight in *Eucalyptus*. *Tropical Plant Pathology*, 37: 233-238.
- López E, Rodríguez P. 2009. *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 y *Dickeya dadantii* 3937, diferentes modelos de infección en bacterias fitopatógenas. *Actualidad SEM*, 47: 14-18.
- Mafia R. 2006. Sintomatologia, etiologia e controle da murcha bacteriana do eucalipto. Tesis Doctor Scientiae. Viçosa, Brasil. Universidade Federal de Viçosa. 96 p.
- Mafia R., Alfenas A, Ferreira M. 2014. Avaliação da resistência do eucalipto a murcha-bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. *Revista Árvore*, 38:649-656.

- Mafia R, Alfenas A, Penchel RM, Ferreira MA, Alfenas R. 2012. Murcha-bacteriana: Disseminação do patógeno e efeitos da doença sobre a clonagem do Eucalipto. *Revista Árvore*, 36: 593-602.
- Mahuku GS. 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 71-81.
- Marcolin G, Moura do Carmo AL, Augusto de Oliveira Garcia F. 2015. Biocontrole *in vitro* de mancha foliar bacteriana do eucalipto, mediado por rizobactérias. *Enciclopédia Biosfera*, 11: 346.
- Marques ASA, Coelho MVS, Ferreira MASV, Damasceno JPS, Mendes AP, Vieira TM. 2007. Guava bacterial blight due to *Erwinia psidii*: incidence levels and epidemiological aspects. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29: 488-493.
- Marques E. 2012. Murcha bacteriana do eucalipto causada por *Ralstonia solanacearum* Raa 3 biovar 2T: etiologia, influencia do solo e controle. Tesis Doctor em fitopatologia. Brasília, Brasil. Universidade Federal de Brasília. 187 p.
- Maschio LMA, Andrade FM, Leite MSP, Bellote FJ, Ferreira CA, Iede ET, Nardeli AMB, Auer CG, Grigolleti A, Wiechetek M. 1997. Seca dos ponteiros do eucalipto em Arapoti-PR. En: *Anais da Conferencia IUFRO de Silvicultura e Melhoramento de eucaliptos*, Salvador. San Diego: Academic Press, pp. 32-42.
- McFarland J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 49: 1176-1178.
- MGAP/DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca/ Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias). 2013. Anuário Estadístico Agropecuario 2013. Consultado 28 junio, 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2013,O,es,0>
- Miller JH. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring: Cold Spring Harbor Laboratory. 466 p.
- Mitchell CE, Power AG. 2003. Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. *Nature*, 421: 625–627

- Naidoo S, Külheim C, Zwart L, Mangwanda R, Oates CN, Visser EA, Wilken FE, Mamni TB, Myburg AA. 2014. Uncovering the defence responses of *Eucalyptus* to pests and pathogens in the genomics age. *Tree Physiology*, 34: 931–943.
- Neves DA. 2007. Condições favoráveis à mancha foliar causada por *Xanthomonas axonopodis* em eucalipto. Tesis Magister Scientiae. Viçosa, Brasil. Universidade Federal de Viçosa. 33 p.
- Old M, Wingfield MJ, Yuan ZQ. 2003. A manual of diseases of eucalypts in South-East Asia (En línea). Consultado 28 junio 2015. Disponible en: http://www.cifor.org/publications/pdf_files/books/eucalypts.pdf
- Palladino MC, Pérez G, Alonso R, Pérez CA. 2013. Enfermedades bacterianas en Eucalipto: estado del conocimiento a nivel nacional. En: VI Jornada técnica de protección forestal. Montevideo: INIA. Serie técnica; 213. pp. 53-63.
- Parkinson N, Aritua V, Heeney J, Cowie C, Bew J, Stead D. 2007. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2881–2887.
- Parkinson N, Cowie C, Heeney J, Stead D. 2009. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 264-274.
- Pérez CA. 2012. El desarrollo forestal y su implicancia sobre la dinámica de las enfermedades. En: 2da jornada bianual de Fitopatología: Impacto de la intensificación de los cultivos en el desarrollo de las enfermedades, 10 agosto; 2012; Montevideo, Uruguay. pp. 15.
- Pérez CA, Bentancur O, Simeto S, Fros D, Altier N. 2010a. Resistencia genética a las enfermedades de la utopía a la realidad. En: Jornada técnica de protección forestal. Montevideo: INIA. Serie de actividades de difusión; 629. pp. 51-65.
- Pérez CA, Wingfield MJ, Altier NA, Blanchette RA. 2009a. *Mycosphaerellaceae* and *Teratosphaeriaceae* associated with *Eucalyptus* leaf diseases and stem cankers in Uruguay. *Forest Pathology*, 39: 349-360.
- Pérez CA, Wingfield MJ, Altier NA, Simeto S, Blanchette RA. 2011. *Puccinia psidii* infecting cultivated *Eucalyptus* and native *myrtaceae* in Uruguay. *Mycological Progress*, 10: 273-282.

- Pérez CA, Wingfield MJ, Slippers B, Altier NA, Blanchette RA. 2010b. Endophytic and canker-associated *Botryosphaeriaceae* occurring on non-native *Eucalyptus* and native *myrtaceae* trees in Uruguay. *Fungal Diversity*, 41: 53-69.
- Pérez G, Lupo S, Bettucci L. 2009b. Polymorphisms of the ITS region of *Inocutis jamaicensis* associated with *Eucalyptus globulus*, *Vitis vinifera* and native plants in Uruguay. *Sydowia*, 60: 267:275.
- Pérez G, Slippers B, Wingfield, BD, Finkernauer E, Wingfield MJ. 2009c. *Mycosphaerella* leaf disease (MLD) outbreak on *Eucalyptus globulus* in Brazil caused by *Teratosphaeria (Mycosphaerella) nubilosa*. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 302-306.
- Piccinin E, Pascholati SF, Di Piero RM. 2005. Doenças da Goiabeira. En: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo L, Rezende J. (Eds.). *Manual de Fitopatologia Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas*. São Paulo: Editora agrônômica Ceres. 450-455.
- Pomella AWV, Romeiro RS, Ferreira FA, Oliveira JR. 1995. Lesões foliares em viveiro de eucalipto incitadas por uma espécie fluorescente de *Pseudomonas*. *Fitopatologia Brasileira*, 20: 374.
- Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Querejeta M, Cordovez M, Brooks A, Moreno I, Piedra B, Hernandez M. 1990. Mancha bacteriana en especies forestales causada por *Xanthomonas* sp. *Ciencia Técnica Agrícola Protección de plantas*, 13: 51-59.
- Ran LS, Liu CY, Wu GJ, Van Loon LC, Bakker PAHM. 2005. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. In China. *Biological Control*, 32: 111-120.
- Reis AV, Souza RM, Castro HA, Cardoso MAFC, Kobayashi L. 1996. Uma nova bacteriose em mudas de eucalipto incitada por *Xanthomonas campestris*. *Fitopatologia Brasileira*, 21: 342.
- Rezende AM. 2006. Estudo sobre a resistência genética e produtos químicos no controle da bacteriose da goiabeira (*Psidium guajava*) causada por *Erwinia psidii*. Tesis Maestrante em Fitopatologia. Brasília, Brasil. Universidade Federal de Brasília. 96 p.
- Ribeiro IJK, Sugimori MH, Rodrigues Neto J, Yamashiro T, Piza Júnior C de T, Prates HS, Frediani AJA. 1985. A bacteriose da goiabeira. Campinas: CATI. 3 p.

- Ricaud C. 1969. Investigation on the systemic infection of gumming disease. En: Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists (13, 1969, Amsterdam). Taiwan, Netherlands. Elsevier. pp. 59–69.
- Robbs CF, Cruz AP, Rodríguez Neto JR. 1990. Algunas estrategias de controle a murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em eucaliptos. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico; 3. pp. 1-4.
- Romeiro RS. 2011. Bacterias fitopatogênicas. Viçosa: Ed. UFV. 417 p.
- Romeiro RS, Batista UG, Barbosa JG, Rodrigues Neto J. 2002. Situação e perspectiva de controle da morte das pontas da goiabeira (*Erwinia psidii*) em Minas Gerais- Relato de um caso. Revista Ceres, 49: 329-334.
- Romeiro RS, Moraes RMA, Oliveira J, Couto FFA, Rezende ST. 1994 Uma enfermidade de etiologia bacteriana no estado de Minas Gerais. Fitopatologia Brasileira, 18: 283.
- Romeiro RS, Souza RM, Muchovej JJ, Kimura O. 1988. Soft rot of peruvian carrot due to *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* in Brazil. Plant Pathology, 37: 300-302.
- Roux J, Coutinho D, Mujini Byabachaija D, Wingfield MJ. 2001. Diseases of plantation *Eucalyptus* in Uganda. South African Journal of Science, 97: 16-18.
- Schaad NM, Jones JB, Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Minnesota: APS Press. 373 p.
- Silva A. 2007. Histopatología e influencia de nutrientes na intensidade da bacteriose foliar do eucalipto causada por *Xanthomonas axonopodis*. Tesis Doctor Scientiae. Viçosa, Brasil. Universidade Federal de Viçosa. 71 p.
- Simeto S, Balmelli G, Altier N, Dini B, Bennadji Z. 2007. Desarrollo de protocolos de inoculación artificial para la caracterización sanitaria de *Eucalyptus globulus*. Montevideo: INIA. Serie Técnica; 169. 25 p.
- Simeto S, Balmelli G, Martinez G, Torres D, Gonzalez P, Fros D, Bentancur O, Pérez CA. 2010. Relevamiento sanitario de *Eucalyptus* spp. en el sureste y litoral oeste del país. En: Jornada técnica de protección forestal. Montevideo: INIA. Serie de actividades de difusión; 629. pp. 41-51.
- Siri MI, Sanabria A, Pianzola MJ. 2011. Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. Plant Disease, 95: 1292-1301.

- Slee AV, Brooker MIH, Duffy SM, West JG. 2006. EUCLID Eucalypts of Australia. (En línea). Consultado 24 mayo 2015. Disponible en: <http://www.publish.csiro.au/samples/euclid/sample/html/about.htm>.
- Smith EF. 1896. A bacterial disease of tomato, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* sp. Nov.). Bulletin, Division of Vegetable Physiology and Pathology, 12: 1-28.
- Soria S, Alonso R, Bettucci L, Lupo S. 2014. First report of *Teratosphaeria pseudoeucalypti* in Uruguay. Australasian Plant Pathology Notes, 9: 146-150.
- Soust P. 2012. A 25 años de la aprobación de la ley 15.939 (Ley Forestal). (En línea). En: MGAP (Ed.). Montevideo: Anuario 2012- OPYPA. pp. 167-172. Consultado 27 junio 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/opypapublicaciones/ANUARIOS/Anuario2012/material/pdf/14.pdf>
- Sudo S, Oliveira GHN, Pereira AC. 1983. Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e *bracatinga* (*Mimosa scabrella* Penth), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith. Fitopatologia Brasileira, 8: 631.
- Supriadi D, Karden M, Sitepu D. 2001. Bacterial wilt disease of Woody trees caused by *Pseudomonas solanacearum*: a review. Journal Litbang Pertanian Local, 20: 106-112.
- Suslow TV, Schroth MN, Isaka M. 1982. Application of rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology, 72: 917-918.
- Swofford DL. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10a. Sinauer Associates, Sunderland MA, Walters D, Walsh D, Newton A, Lyon G. 2005. Induced resistance for plant disease control: Maximizing the efficacy of resistance elicitors. Phytopathology, 95: 1368-1373.
- Telechea N, Rolfo M, Coutinho TA, Wingfield MJ. 2003. *Puccinia psidii* on *Eucalyptus globulus* in Uruguay. Plant Pathology, 52: 427.
- Truman R. 1974. Die-back of *Eucalyptus citriodora* caused by *Xanthomonas eucalypti* sp. n. Phytopathology, 64: 143-144.
- Vasse J, Frey P, Trigalet A. 1995. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. Molecular Plant-Microbe Interaction, 8: 241-251.

- Wang WY. 1992. Survey of *Eucalyptus* disease in Taiwan. Bulletin Taiwan Forest Research Institute, 7: 179-194.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. Journal of bacteriology, 173: 697-703.
- Whitesides SK, Spotts RA. 1991. Frequency, distribution, and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringe* in pear trees. Phytopathology, 81: 453-457.
- Wilson EE, Zeitoun FM, Fredrickson DL. 1967. Bacterial phloem canker, a new disease of Persian walnut trees. Phytopathology, 57: 618-621.
- Wingfield MJ. 2003. Increasing threat of diseases to exotic plantation in the Southern Hemisphere: lessons from Cryphonectria canker. Australasian Plant Pathology, 32: 133-139.
- Wingfield MJ, Roux J, Slippers B, Hurley BP, Garnas J, Myburg A, Wingfield DB. 2013. Established and new technologies reduce increasing pest and pathogen threats to *Eucalypt* plantations. Forest Ecology and Management, 301: 35-42.
- Wingfield MJ, Slippers B, Hurley BP, Coutinho TA, Wingfield DB, Roux J. 2008. *Eucalypt* pests and diseases: growing threats to plantation productivity. Southern Forests, 70: 139-144.
- Wu QP, Liang ZC. 1988a. Identification and pathogenic tests of the causal organism of the bacterial wilt of *Eucalyptus*. Journal South China Agriculture University, 9: 59-67.
- Wu QP, Liang ZC. 1988b. Selection of species and provenance of *Eucalyptus* for resistance to bacterial wilt. Journal South China Agriculture University, 9: 41-45.
- Young JM, Park DC, Shearman HM, Fargier E. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. Systematic and Applied Microbiology, 31: 366-377.