

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**ETIOLOGÍA DE LA PODREDUMBRE RADICULAR Y MUERTE DE PLANTAS
JOVENES DE *Eucalyptus smithii***

por

**Franco DE BENEDETTI
Josefina FREIRE**

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

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2019**

Tesis aprobada por:

Director:

PhD. (Ing. Agr.) Sandra Alaniz

PhD. (Ing. Agr.) Pedro Mondino

PhD. (Ing. Agr.) Carlos Pérez

Fecha: 11 de febrero de 2019

Autores:

Franco de Benedetti

Josefina Freire

AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias, compañeros y amigos que nos apoyaron y acompañaron en las distintas etapas de la carrera y a todos los integrantes de la cátedra de Fitopatología por la dedicación y el apoyo brindado en todo momento, en especial a nuestra tutora Dra. Ing. Agr. Sandra Alaniz. Se agradece también al personal de Biblioteca por la corrección de este documento. Finalmente, un agradecimiento especial al Lic. C. Biol. Guillermo Pérez PhD, que lamentablemente no pudo acompañarnos físicamente hasta el final.

Franco de Benedetti
Josefina Freire

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. OBJETIVOS GENERALES	2
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1. EL CULTIVO DE EUCALYPTUS.....	3
2.2. ENFERMEDADES QUE AFECTAN AL EUCALYPTUS SPP.....	5
2.2.1. <u>Marchitamiento y muerte de <i>Eucalyptus smithii</i></u>	6
2.2.2. <u>Especies de <i>Phytophthora</i> asociadas a <i>Eucalyptus</i> spp.</u>	6
2.2.3. <u>El género <i>Phytophthora</i></u>	7
2.2.4. <u>Aislamiento e identificación de <i>Phytophthora</i> spp.</u>	8
2.2.4.1. Aislamiento de <i>Phytophthora</i> spp. a partir de material vegetal.....	8
2.2.4.2. Aislamiento de <i>Phytophthora</i> spp. a partir de suelos....	10
2.2.4.3. Aislamiento de <i>Phytophthora</i> spp. a partir de cursos de agua.....	11
2.2.4.4. Identificación de <i>Phytophthora</i> spp.....	12
2.2.4.5. Técnicas de diagnóstico directo.....	13
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	14
3.1. OBSERVACIÓN DE SÍNTOMAS Y MUESTREO A CAMPO	14
3.2. PROCESAMIENTO EN LABORATORIO	15
3.2.1. <u>Procesamiento de las plantas</u>	15
3.2.1.1. Aislamientos en medio de cultivo.....	15
3.2.1.2. Trampeos de material vegetal utilizando manzanas como cebo	16
3.2.2. <u>Procesamiento de suelos</u>	17
3.2.2.1. Trampeo de suelos utilizando material vegetal como cebo.....	17
3.2.2.2. Trampeo de suelos utilizando manzanas como cebo ..	17
3.2.3. <u>Identificación de las colonias desarrolladas</u>	18
3.2.3.1. Pre-selección de aislados basados en la morfología de la colonia, tipo de hifas y estructuras reproductivas..	18
3.2.3.2. Identificación molecular	19

3.2.4. <u>Caracterización fenotípica de los aislados de <i>Phytophthora alticola</i></u>	20
3.2.4.1. Morfología de las colonias en diferentes medios de cultivo.....	20
3.2.4.2. Caracterización de las estructuras reproductivas	21
3.2.4.3. Crecimiento a diferentes temperaturas	21
4. <u>RESULTADOS</u>	22
4.1. OBSERVACIÓN DE SÍNTOMAS Y MUESTREO A CAMPO	22
4.2. PROCESAMIENTO EN LABORATORIO	24
4.2.1. <u>Procesamiento de las plantas</u>	24
4.2.2. <u>Procesamiento de suelos</u>	24
4.2.3. <u>Identificación de las colonias desarrolladas</u>	25
4.2.3.1 Pre-selección de aislados basados en la morfología de la colonia y tipo de hifas	25
4.2.3.2. Identificación molecular	27
4.2.4. <u>Caracterización de los aislados de <i>Phytophthora alticola</i></u>	29
4.2.4.1. Morfología de las colonias en diferentes medios de cultivo	29
4.2.4.2. Caracterización de las estructuras reproductivas	30
4.2.4.3. Crecimiento a diferentes temperaturas.....	35
5. <u>DISCUSIÓN</u>	36
6. <u>CONCLUSIONES</u>	39
7. <u>RESUMEN</u>	40
8. <u>SUMMARY</u>	41
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	42
10. <u>ANEXOS</u>	50

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Figura No.	Página
1 Superficie de forestación en Uruguay según especie	5
2 Procesamiento de las plantas en el laboratorio	17
3 Aspecto de síntomas de enfermedad en el campo	25
4 Vista panorámica de uno de los campos muestreados	26
5 Trampeo de suelos utilizando manzanas Granny Smith y bandejas con material vegetal como cebo	28
6 Uno de los árboles obtenidos por máxima parsimonia generado a partir del análisis filogenético del alineamiento de la región ITS de los seis aislados obtenidos de plantas de <i>E. smithii</i> y aislados de especies identificadas obtenidas del GenBank	30
7 Uno de los árboles obtenidos por máxima parsimonia generado a partir del análisis filogenético del alineamiento de la región ITS de los restantes tres aislados obtenidos de plantas de <i>E. smithii</i> y aislados de especies identificadas obtenidas del GenBank	31
8 Aspecto del aislado 29.1 identificado como <i>P. alticola</i> a los 7 días de crecimiento a 20°C en diferentes medios de cultivo	32
9 Estructuras reproductivas asexuales y sexuales de <i>P. alticola</i>	34
10 Promedio del ratio de crecimiento diario (mm/día) de los aislados 5.2, 12.1, 25.5 y 29.1 identificados como <i>P. alticola</i> en medio V8A y CA a 15, 20, 25 y 30 °C respectivamente	37
Tabla No.	
1 Características de las plantaciones de <i>E. smithii</i> muestreadas	15
2 Fecha de muestreo, aislados y especies de oomycetes obtenidos en los campos 1 (Lavalleja/Campanero) y 2 (Lavalleja/Sta. Lucía)...	29
3 Comparación de caracteres morfológicos y temperaturas de crecimiento entre <i>P. alticola</i> , <i>P. boodjera</i> y <i>P. arenaria</i>	35

1. INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente en Uruguay, los rubros agropecuarios predominantes han sido la agricultura y la ganadería. A partir de la década de '60, surge el rubro forestal como complemento de los ya existentes y es por tal motivo que aparece la primera ley forestal en el año 1968. Si bien la primera ley ofrecía a empresas agropecuarias, y a pequeños y medianos productores, grandes incentivos para incluir la actividad forestal dentro de sus rubros, no fue hasta el año 1987 con la aprobación de la segunda ley forestal (vigente hasta la actualidad), y un escenario de mercado internacional favorable, que el sector forestal se vio atractivo para inversores tanto nacionales como internacionales. Hacia la década del '90, se registró una alta tasa de plantación de *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus*, en la zona Sur y Sureste del Uruguay, avalado por las excelentes propiedades de la madera que éste presenta para la producción de pasta de celulosa.

En el año 2007, la aparición del patógeno foliar *Teratosphaeria nubilosa* en Uruguay, causante de la enfermedad conocida como "Manchas por *Mycosphaerella*", afectó a numerosas plantaciones de *E. globulus* ssp. *globulus* y *E. globulus* ssp. *maidenii*, atacando principalmente al follaje juvenil, causando manchas foliares y severas defoliaciones (de hasta un 80% en algunos casos) (Soria et al., 2014). Esto generó reducciones en el volumen de madera de hasta un 50% y en otros casos la muerte de los árboles (Balmelli et al., 2016). Tal comportamiento obligó al sector a dejar de plantar, casi por completo, a *E. globulus* ssp. *globulus* cayendo la plantación anual desde 11.600 ha en el año 2006 a 706 ha en el año 2011, optándose por la inclusión de especies con similares propiedades pulpables y mayor resistencia al patógeno.

Actualmente en Uruguay, las especies de eucaliptos más plantadas son *E. grandis* seguido por *E. dunnii*; ambas tienen como principal finalidad producir madera para la elaboración de pulpa de celulosa y en menor porcentaje, madera sólida para aserrío. A partir del año 2015, algunas empresas forestales comenzaron a plantar con más frecuencia a *E. smithii* como especie sustituta de *E. globulus* ssp. *globulus*, alcanzando en el año 2017 un total de 3.500 ha plantadas. Al igual que la madera de *E. globulus*, la madera de *E. smithii* es de excelente calidad para elaborar pasta de celulosa por lo que se puede comercializar sin inconvenientes, tanto en la industria local como internacional (Thompson, 2012). Si bien esta especie también es afectada por *T. nubilosa*, la misma presenta un nivel de resistencia al patógeno bastante mayor, por lo que no se llegan a observar defoliaciones graves y muertes de plantas como si ocurre en *E. globulus*.

La presente investigación surgió de la preocupación de productores forestales independientes y asociaciones de productores nacionales de *E. smithii* en el Sureste del país. Se comenzó a observar marchitamiento y muerte de árboles jóvenes en las plantaciones de esta especie instaladas en diferentes localidades del Sureste (Aiguá, Parallé, Campanero, Santa Lucía y Castillos, entre otras).

Los síntomas observados consisten en un enrojecimiento de la parte aérea, seguido por un marchitamiento progresivo, manteniendo las hojas adheridas a ella. También se constató en reiteradas ocasiones el vuelco de árboles; al excavar y desenterrarlos, los mismos presentan lesiones necróticas en el sistema radicular y podredumbres. A nivel del cuello del tallo de las plantas, también se observaron lesiones necróticas bien definidas y, al remover la corteza, se pudo apreciar una clara zona de transición entre el tejido enfermo y el sano. La sintomatología observada indica que el agente causal podría corresponder a *Phytophthora* spp. aunque él/los agente/s causal/es de la misma no ha/n sido aún determinados en Uruguay.

De acuerdo con las consultas realizadas a productores y técnicos del sector, se constata que una gran cantidad de plantaciones recientes están siendo afectadas por esta sintomatología. Es así, que algunas empresas forestales demandaron la necesidad de que se determine con certeza la causante de esta mortandad y, a partir de ello, evaluar futuras alternativas de manejo. De esta manera se planteó el presente trabajo final de carrera, como requisito para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo de la Universidad de la República.

1.1. OBJETIVOS GENERALES

Determinar la etiología de la muerte de plantas jóvenes de *Eucalyptus smithii* en la zona Sureste del Uruguay.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Conocer detalladamente los síntomas asociados al marchitamiento y muerte de plantas de *E. smithii* y su distribución en plantaciones jóvenes de la zona Sureste del país.

2) Identificar el/los agente/s asociados a los síntomas mediante aislamientos desde plantas en marchitamiento y suelo circundante, utilizando técnicas micro-morfológicas y moleculares.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. EL CULTIVO DE *Eucalyptus*

Existen más de 600 especies de eucaliptos distribuidas en más de 90 países, ocupando unos 22 millones de hectáreas en todo el mundo. De este total, solo alrededor de 18 millones tienen productividad de interés comercial, sin tener en cuenta a los bosques nativos (ENCE, 2009).

En Uruguay, el eucalipto fue introducido en el año 1853 con la especie *E. globulus* ssp. *globulus*, la cual se considera la de mayor distribución geográfica dentro del género. Si bien la especie es nativa del Sureste de Australia y Tasmania, se estima que al año 1973 existían más de 800.000 ha plantadas con esta especie fuera de Australia (Jacobs, 1981). Asimismo, las condiciones climáticas del Uruguay son similares a las de Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica, siendo muy favorables al cultivo de eucaliptos (Krall, 1970).

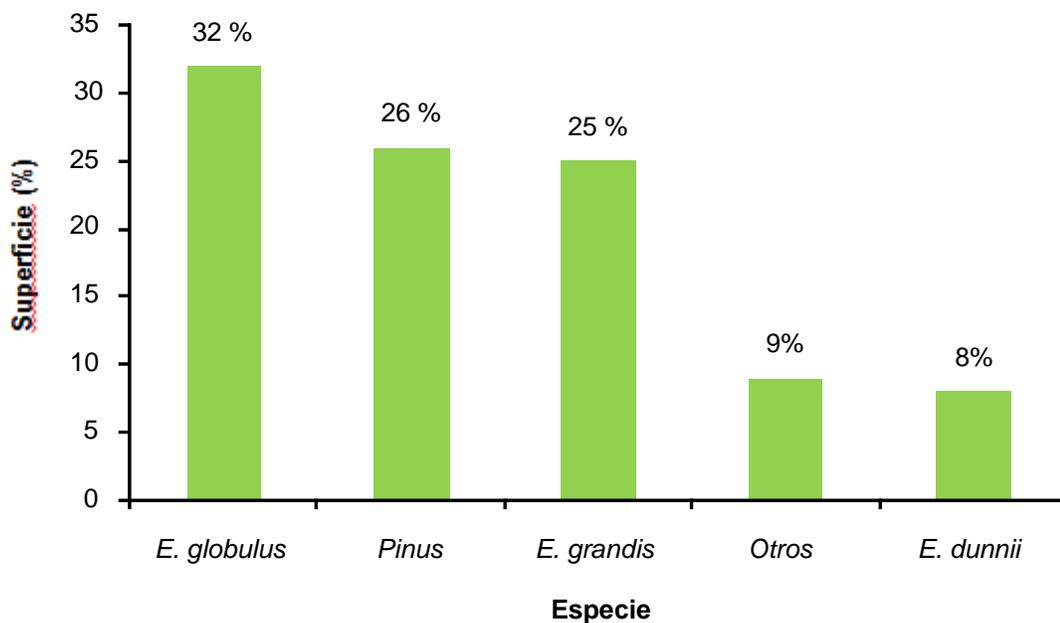
De acuerdo con los datos provistos por la Sociedad de Productores Forestales (SPF), la superficie boscosa del Uruguay es cercana a los 2 millones de hectáreas. De estas, alrededor de un 58% (1.200.000 ha aprox.) corresponden a bosques implantados, con diferentes especies de eucaliptos y pinos y, el 42% restante, a bosques nativos. En Uruguay el eucalipto se planta con diversos fines. La elaboración de pasta de celulosa de alta calidad abarca un 68% del volumen total de madera producida. Un 20% es ocupado en la producción de biocombustibles y montes de abrigo y sombra para el ganado, y el restante 12% corresponde a la obtención de madera sólida para aserrío como; debobinados, tableros y contrachapados (SPF, 2017).

Con la llegada de grandes empresas forestales extranjeras, como Montes del Plata y UPM Forestal Oriental, se introdujo la especie *Eucalyptus dunnii*, como complemento a las especies usadas anteriormente en la producción de pasta de celulosa. De igual manera, recientemente se introdujo el *E. smithii* como especie alternativa para sustituir al *E. globulus* ssp. *globulus* debido a los graves problemas sanitarios que éste presenta.

En cuanto a la distribución zonal de las especies, la zona Norte (Rivera y Tacuarembó) posee un predominio de especies de Pinos, ocupando un 65% de las masas boscosas allí implantadas (compuestas principalmente por *Pinus taeda* y en menor medida *P. elliotti*), sobre las especies de eucalipto que abarcan el restante 35% (con predominancia de *E. grandis*). En la zona Sureste (Florida, Lavalleja, Maldonado y Rocha), las principales especies plantadas son *E. globulus* ssp. *globulus*, *E. globulus* ssp. *maidenii*, *E. dunnii* que se encuentra en expansión y, a una escala mucho menor, plantaciones recientes de *E.*

smithii. En la zona centro-Este (Durazno, Cerro Largo y Treinta y Tres) se encuentran varias especies, pero con una marcada predominancia de *E. grandis*, mientras que la zona litoral Oeste (Soriano, Río Negro y Paysandú), presenta la mayor concentración de eucaliptos, alcanzando un 89% del total de árboles plantados, con predominio de *E. grandis*, *E. dunnii* y *E. globulus* (éste último más hacia la zona Sur, Figura 1).

Respecto a *E. smithii*, datos publicados por MGAP. DIEA (2016) indican que menos del 1 % de la superficie de eucaliptos plantados corresponden a esta especie. Asimismo, no está discriminada de las demás, sino que se contabiliza dentro del grupo “otros”. Según Pou et al. (2016), la producción en vivero de *E. smithii* en el año 2013 era de 419.312 plantines al año, aumentando a 1.085.000 en el año 2015. Actualmente en Uruguay, hay en torno a las 3.500 ha de *E. smithii* plantadas con fines comerciales (SPF, 2017).



Valores expresados como porcentaje del total

Figura 1. Superficie de forestación en Uruguay según especie
Fuente: adaptado de MGAP. DIEA (2017).

2.2. ENFERMEDADES QUE AFECTAN AL *Eucalyptus* spp.

Según datos aportados por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y la FAO, las enfermedades que afectan a los eucaliptos se pueden discriminar según sean patógenos foliares, de tronco o radiculares.

Dentro de las enfermedades reportadas para *Eucalyptus* spp., en brotes y hojas se encuentran: el tizón apical bacteriano causado por *Erwinia psidii*, la mancha bacteriana por *Xanthomonas axonopodis*, la mancha bacteriana por *Pantoea ananatis*, la mancha por “*Mycosphaerella*” causada por integrantes del género *Teratosphaeria* (*T. nubilosa*, *T. suberosa*, entre otros), la mancha amarilla por *Teratosphaeria pseudoeucalypti*, la roya del eucalipto por *Austropuccinia psidii*, la mancha por *Epicoccoides* (*Teratosphaeria suttonii*), mancha causadas por *Criptosporiopsis eucalypti*, manchas foliares causadas por *Alternaria alternata* y *Pestalotiopsis guepinii*, entre otras (Baldini et al. 2006, Glen et al. 2007, Pérez et al. 2009, Alonso et al. 2013, Balmelli et al. 2013, 2016, Simeto y Balmelli 2014, Beenken 2017)

Dentro de las enfermedades que afectan al tronco, se encuentran el tizón apical bacteriano causado por *Erwinia psidii*, canchros y muerte descendente causados por integrantes de la familia *Botryosphaeriaceae* (*Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum ribis*, *N. eucalyptorum*) canchros por *Coniothyrium* (*Teratosphaeria gauchensis*), marchitamiento por *Ceratocystis* (*Ceratocystis fimbriata*), así como también el canchro del fuste causado por *Arambarria cognata* (Martínez 2005, Baldini et al. 2006, Pérez et al. 2009, Simeto y Balmelli 2014).

En cuanto a las enfermedades radiculares, la más común es causada por *Phytophthora cinnamomi* provocando podredumbres en raíces y raicillas (Newhook y Podger 1972, Podger 1975). También el hongo basidiomycete causante de podredumbre radicular de árboles en pie y descomposición de madera *Armillaria ostoyae* y *A. luteobubalina* (Kile 1983, Morrison y Mallet 1996).

Con respecto a la producción de plantines en viveros, las enfermedades más frecuentes son el moho gris (*Botrytis cinerea*), Damping off y Die back causados por el grupo de hongos patógenos integrado por *Cylindrocladium* (*C. scoparium*), *Pythium* (*P. debaryanum*, *P. ultimum*), *Phytophthora* (*P. cinnamomi*), *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. solanum*, *F. moniliforme*, entre otros), *Rhizoctonia* (*R. solani*) y *Cylindrocarpon* (*C. destructans*) (Baldini et al. 2006, Simeto y Balmelli 2014).

2.2.1. Marchitamiento y muerte de *Eucalyptus smithii*

Desde que se comenzó a plantar *E. smithii*, se ha observado una alta incidencia de árboles con síntomas de marchitamiento y muerte, desde el primer año de implantación. Los síntomas consisten en un amarillamiento, seguido de un enrojecimiento gradual de la copa, manteniéndose las hojas adheridas a la planta. Esta sintomatología está asociada a la ocurrencia de podredumbres radiculares y de la base del tallo y consecuentemente, volcado y muerte de plantas. Asimismo, esta sintomatología indica que el agente causal podría corresponder a patógenos del grupo Oomycetes y en particular a especies del género *Phytophthora* (Erwin y Ribeiro, 1996).

Diferentes autores han descrito síntomas de enfermedades causadas por *Phytophthora* spp. como un marchitamiento de la planta, seguido por muerte regresiva del huésped asociado con necrosis del sistema radicular, comenzando por las raíces más finas (Newhook y Podger 1972, Erwin y Ribeiro 1996, Agrios 2005). Asimismo, Agrios (2005) describe la sintomatología de *Phytophthora* spp. en *Eucalyptus* spp. como podredumbres radiculares, canchros y necrosis en raíces en numerosos huéspedes, causando en muchos casos la muerte de estos. También menciona la ocurrencia de sistemas radiculares poco desarrollados. A nivel de cuello describe el desarrollo de canchros y gomosis. Finalmente, en la parte aérea clorosis y necrosis foliar, manchas foliares localizadas, marchitez, defoliación, exudaciones y en muchos casos muerte de plantas.

2.2.2. Especies de *Phytophthora* asociadas a *Eucalyptus* spp.

Existen numerosos reportes en el mundo sobre especies de *Phytophthora* afectando al cultivo de eucalipto. Ruperez y Muñoz (1980) indican que se ha observado frecuentemente la presencia de *P. cinnamomi* en ramas y tronco, causando lesiones necróticas en yemas vegetativas y pequeños canchros en tallo con exudaciones en Australia, Argentina, Chile y Perú, entre otros. De igual manera Domsch (1980) afirma que a nivel mundial *P. cinnamomi* posee una gran capacidad destructiva en un amplio rango de huéspedes, causando daños en bosques naturales, plantas ornamentales y frutales.

De acuerdo con Bain et al. (2006) en Nueva Zelanda *Phytophthora captiosa* y *P. fallax* son patógenas de *E. saligna*, *E. botryoides*, *E. regnans*, *E. delegatensis* y *E. fastigata*. Los síntomas van desde pequeñas manchas foliares, a defoliación masiva y muerte regresiva de los árboles. En el Oeste de Australia Rea et al. (2010) aislaron a *P. elongata* de raíz y cuello de *E. marginata* en proceso de muerte. En la misma zona de Australia, *P. cinnamomi*

fue la causante de destrucciones masivas en bosques naturales de *E. marginata* (Podger, 1975).

Ensayos de patogenicidad realizados por Scott et al. (2011) con *P. multivora* y *P. cinnamomi* utilizando como huéspedes a *E. gomphocephala* y *E. marginata*, resultaron en una reducción del área radicular de raíces y raicillas finas y posterior muerte de las plantas debido a podredumbres en el sistema radicular. Se observó también, infecciones en retoños de *E. marginata*, dificultando en un principio el desarrollo de estos y luego la muerte. De la misma forma, un estudio más reciente en Sudáfrica determinó que *E. dunnii* es afectado por dos nuevas especies de *Phytophthora*; *P. frigida* y *P. alticola*, aunque en pruebas de patogenicidad se comportaron menos agresivas que *P. cinnamomi* (Maseko et al., 2007).

En el Oeste de Australia Simamora et al. (2015, 2016), describieron a *P. boodjera* como patógeno de *Eucalyptus* spp. causando damping off y muerte de plántulas. La secuencia de la región ITS de esta especie resultó muy similar a la de *P. alticola* y *P. arenaria*. En el mismo artículo plantean la necesidad de una reevaluación de *P. alticola*.

En Sudáfrica, Bose et al. (2017) realizaron un exhaustivo estudio para revisar la descripción de *P. alticola* (originalmente descrita por Maseko et al., 2007) basada en nuevos estudios morfológicos y análisis filogenéticos. Para ello, estos investigadores utilizaron nuevas cepas y definieron un neotipo debido a que la descripción original fue basada en una mezcla de cultivos. *P. alticola* fue re-descrita y a partir de los resultados obtenidos, se concluyó que podría tratarse de una especie nativa de Sudáfrica, dónde fue aislada a partir de suelo de plantaciones de *E. grandis* y *Acacia mearnsii*.

2.2.3. El género *Phytophthora*

Phytophthora, que proviene del griego *phytón* ("planta") y *phthorá* ("destructor de plantas"), fue descrita por primera vez por de Bary (1875). Este género ha sido sujeto a constantes revisiones, en la actualidad taxonómicamente pertenece al reino *Chromista*, superfilo *Heterokonta*, filo *Pseudofungi*, clase *Oomycetes*, orden *Peronosporales*, familia *Peronosporaceae* y subfamilia *Phythiae*. Este género comparte el orden *Peronosporales* con el género *Pythium* (Agrios, 2005).

La gran mayoría de las especies de este género son patógenas en un amplio rango de especies vegetales tales como cultivos agrícolas, frutales y forestales, así como ornamentales. Asimismo, se destacan en importancia por las innumerables pérdidas económicas que han causado (FAO 1981, Erwin y

Ribeiro 1996, Agrios 2005). Por otra parte, muchas de las especies de *Phytophthora* son relativamente específicas de las plantas que parasitan, causando enfermedades de diversa índole, principalmente en plantas dicotiledóneas (Ruperez y Muñoz, 1980).

En cuanto a la reproducción de estas especies, la estructura asexual más común es el esporangio el cual se origina en los esporangióforos. El engrosamiento apical del esporangio se llama papila; existen esporangios sin papilas, semi-papilados, papilados y bi-papilados. En algunas especies los esporangióforos emergen de la base de un antiguo esporangio por donde las zoosporas uninucleadas han sido liberadas y en otras especies los esporangióforos nuevos surgen por debajo de la base del antiguo esporangio (carácter simpodial). La forma de los esporangios varía según la especie y pueden ser esféricos, ovoides, obovados, limoniformes, piriformes, entre otros (Erwin y Ribeiro, 1996).

Las zoosporas, contenidas en el interior de los esporangios, suelen ser reniformes y biflageladas. Las clamidosporas (si las presenta) son esféricas a ovaladas, hialinas con un leve color amarronado y su pared puede ser fina o gruesa. Las mismas pueden formarse al final de la hifa o pueden ser intercalares (Erwin y Ribeiro, 1996).

Las estructuras sexuales se diferencian en anteridio (gameto masculino) y oogonio con una oospora desarrollándose en su interior (gameto femenino). Los oogonios generalmente son globosos o sub-globosos, aunque eventualmente pueden ser piriformes. En el caso de los oogonios, se separan de las hifas mediante un septo, mientras que los anteridios se adjuntan a los oogonios de dos maneras diferentes, dando lugar a dos clasificaciones. El anteridio es anfígeno cuando el oogonio crece atravesando al anteridio, de manera que el anteridio rodea la base del pedúnculo del oogonio, o es paragino cuando se une al oogonio por cualquier parte externa de la pared de éste (Erwin y Ribeiro, 1996).

2.2.4. Aislamiento e identificación de *Phytophthora* spp.

2.2.4.1. Aislamiento de *Phytophthora* spp. a partir de material vegetal

Para aumentar las probabilidades de éxito en el aislamiento, la colecta de material vegetal infectado por *Phytophthora* spp., así como su traslado y procesamiento en el laboratorio, requiere de un protocolo cauteloso a cumplir.

Se sugiere coleccionar muestras de material vegetal (raíces, tallos, hojas, flores, frutos, etc.) que presenten una zona de tejido sano frente al avance de la

lesión, ya que es allí donde el patógeno se encuentra más activo. Es posible sembrar el material vegetal colectado directamente en medios de cultivo selectivos, sin la necesidad de una previa desinfección. Para ello, basta con lavar el material colectado con abundante agua para retirar restos de tierra (Erwin y Ribeiro 1996, Streito 2002, Jung y Blaschke 2004, Jung y Burgess 2009, Kasuga et al. 2012, Soto-Plancarte et al. 2017).

Asimismo, no se recomienda aislar *Phytophthora* spp. de tejidos necróticos debido a la presencia de bacterias y hongos saprófitos, por lo que algunos autores sugieren la desinfección superficial del material vegetal, sumergiendo trozos en alcohol al 70% durante 30 segundos, enjuagar con agua destilada estéril y luego secar en papel de filtro estéril. Una vez retirado el exceso de agua, sembrar el trozo de material vegetal en el medio de cultivo específico correspondiente. También puede sustituirse el alcohol por una solución de cloro comercial al 10% (5% de hipoclorito de sodio), en el procedimiento anterior (Ghimere et al. 2009, Moralejo et al. 2009, Soto-Plancarte et al. 2017).

Por otra parte, Hong et al. (2003) han demostrado que la sensibilidad al cloro es especie-dependiente variando entre una especie de *Phytophthora* y otra, incluso existen especies sensibles al etanol. Por lo tanto, si se desconoce la sensibilidad de la especie de *Phytophthora* con la que se está trabajando, se sugiere desinfectar solo una parte del tejido vegetal a sembrar, dejando algunos o parte de ellos sin desinfectar.

Para el aislamiento de *Phytophthora* spp. existen diversos medios de cultivo selectivos. Estos medios tienen como base Agar harina de maíz e incluyen el agregado de antibióticos para la inhibición del crecimiento de bacterias y fungicidas para la inhibición del crecimiento de hongos de los grupos Ascomycete y Basidiomycete. Los más utilizados son PARPH, PARP, PVP (P-pimaricina, A-ampicilina, R-rifampicina, P-pentacloronitrobenzoceno, H-hymexazol, V-vancomicina), 3-P (P-pimaricina, P-penicilina, P-polimixina B), CARP (C-cornmeal agar [harina de maíz agar], A-ampicilina, R-rifamicina, P-pimaricina) y la modificación a éste con el agregado de Dicloran (CARPD) y el agregado de Benlato e Hymexazol (CARP+). Las concentraciones de los antibióticos y fungicidas que se aplican pueden variar de un medio a otro. Asimismo, las incorporaciones deben realizarse luego de que el medio base haya sido esterilizado (Jeffers y Martin 1986, Erwin y Ribeiro 1996, Drenth y Sendall 2001).

La pimaricina suele ser un antibiótico costoso, por lo tanto, se puede sustituir por Delvolid Instant[®], que contiene natamicina y es de menor costo. A

este medio se lo conoce como NARPH (Jeffers y Martin 1986, Erwin y Ribeiro 1996).

2.2.4.2. Aislamiento de *Phytophthora* spp. a partir de suelos

Debido a que las especies de *Phytophthora* frecuentemente habitan en suelos (Ferguson y Jeffers, 1999), es posible aislarlas desde allí realizando trampeos con material vegetal. Erwin y Ribeiro (1996) afirman que la idea general del procesamiento de suelo radica en que, si este presentara estructuras de Oomycetes, el agua estimularía la inducción y desarrollo de esporangios con zoosporas. Las mismas nadarían (favorecidas por la presencia de flagelos) y al tomar contacto con el material vegetal utilizado como cebo en las trampas, provocarían lesiones desde las cuáles se podría aislar *Phytophthora* spp.

Asimismo, se pueden utilizar una amplia gama de tejidos vegetales para realizar trampeos en la recuperación de *Phytophthora* desde suelo, ya que no todos los tejidos son infectados de igual manera por las diferentes especies. Los tipos de material vegetal más usados como cebos son hojas de *Rhododendron*, *Camellia*, *Quercus*, *Lupinus*, acículas de *Juniperus*, manzanas, peras y pepinos. Se colocan en aquellas muestras de suelo, en la que se sospeche que podría encontrarse *Phytophthora* spp., para descartar o no, la presencia de este patógeno (Jeffers y Aldwinckle 1987, Erwin y Ribeiro 1996, Ferguson y Jeffers 1999).

En cuanto a las colectas de suelo, en árboles adultos se deben tomar de cuatro submuestras en torno al tronco (no más de un metro de distancia de este), retirar la cobertura vegetal de la superficie y muestrear a una profundidad de aproximadamente 30 cm. Luego, mezclar las submuestras en una sola bolsa de polietileno, obteniendo así, una única muestra homogénea de aproximadamente 1 kg por planta muestreada. En el caso de plantas jóvenes, se colecta suelo circundante al sistema radicular y se incluyen en la muestra raíces y raicillas finas. Se deben eliminar las piedras y restos vegetales que no sean de interés en el muestreo (Erwin y Ribeiro 1996, Moralejo et al. 2009, Almaraz-Sánchez et al. 2013, Soto-Plancarte et al. 2017, Rodríguez-Padrón et al. 2018).

Para llevar a cabo el trampeo, se cubre la base de un recipiente con la muestra de suelo y se humedece por 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se añade agua destilada hasta inundar la muestra de suelo, algunas de las proporciones más utilizadas para mezclar sustrato y agua son 1:2, 2:3,5 (peso de suelo/volumen de agua). Se deja decantar la muestra al menos 6 horas y se retira con una rejilla fina, servilleta absorbente o gazas, los restos de materia

orgánica que queden suspendidos en el agua. Colocar las hojas para el trapeo e incubar a 18 – 20°C hasta la aparición de síntomas. Se retiran las hojas y se secan en papel. Las secciones del borde de las lesiones necróticas son transferidas a un medio selectivo. Se comprueba si hay crecimiento de hifas al cabo de 12 horas y se transfieren las puntas de hifas (Erwin y Ribeiro, 1996).

Otra forma de recuperar *Phytophthora* desde suelos, es mediante la utilización de manzanas como cebo vegetal. Hendrix y Campbell (1970) describen la metodología de trapeo para especies de *Phytophthora* y *Pythium*, utilizando manzanas de las variedades Granny Smith o Golden delicious como trampas vegetales. Para ello, las manzanas se desinfectan superficialmente con alcohol al 70% y utilizando un sacabocados de 10 mm de diámetro, se realizan cuatro agujeros aproximadamente a 15 mm de profundidad. Cada agujero se rellena con una muestra de suelo correspondiente, se satura con agua destilada y se sella con cinta adhesiva. Las manzanas se incuban a temperatura ambiente favorable a las condiciones de crecimiento de *Phytophthora* spp., hasta la aparición de lesiones necróticas en el tejido de las manzanas (aprox. entre 4 a 7 días). Se extraen pequeños trocitos de la zona de avance de las lesiones y se siembran en el medio específico más apto para la especie en cuestión (Hendrix y Campbell, 1970).

2.2.4.3. Aislamiento de *Phytophthora* spp. a partir de cursos de agua

Los cursos de agua son una importante fuente de inóculo y vía de dispersión de diferentes patógenos vegetales. Especies del género *Phytophthora* y *Pythium*, son los más comunes, destructivos y contaminantes en sistemas de riego. Reservorios de agua tanto natural como artificial, pueden ser contaminados con estos patógenos, debido a escurrimientos de campos infectados, favoreciendo la dispersión de estos a lugares donde antes no se encontraban presentes (Erwin y Ribeiro 1996, Drenth y Sendall 2001).

Ghimire et al. (2009) en un estudio utilizando métodos de filtración como técnica de aislamiento, obtuvieron altas tasas de recuperación en distintas fuentes de agua filtrando las muestras a través de membranas de diferentes materiales y tamaños de poro que retienen propágulos. Luego las membranas se colocan invertidas directamente sobre el medio específico correspondiente. Las membranas más efectivas en la retención de propágulos fueron Millipore 5 y Durapore 5.

Otra técnica radica en tomar muestras de agua en un recipiente de plástico y bombear el agua con un pulverizador (o mochila pulverizadora), conteniendo un filtro limpio en la punta. Parte de ese filtro se utiliza para el

aislamiento directo en el medio selectivo correspondiente (Alvarado-Rosales et al., 2008).

2.2.4.4. Identificación de *Phytophthora* spp.

Hoy en día se utilizan simultáneamente métodos clásicos y moleculares para la identificación de especies de *Phytophthora* spp. Los métodos clásicos, están basados en caracteres morfológicos de las estructuras vegetativas y reproductivas (sexuales y asexuales) y en características de crecimiento, incluyendo el uso de claves taxonómicas. Además de ser una metodología que insume bastante tiempo, muchas veces este tipo de análisis puede causar confusiones al momento de identificar las especies, debido a variaciones tanto interespecíficas como intraespecíficas, de las características morfológicas y culturales de los aislados. Es por tal motivo que se recomienda integrar la caracterización morfológica con la molecular en la descripción e identificación de *Phytophthora* spp. (Erwin 1983, Brasier 1991, Erwin y Ribeiro 1996, Hong 2003, Soto-Plancarte et al. 2017).

Para inducir la formación de estructuras reproductivas de *Phytophthora* spp., fragmentos colonizados de micelio del margen de colonias de 6 – 7 días de edad creciendo en medio V8A, se colocan en placas de Petri estériles y se inundan con solución de extracto de suelo estéril. Se sugiere cambiar el agua de suelo estéril diariamente. Tras 3 o 4 días de incubación a temperatura ambiente y exposición a luz, se observarán las estructuras reproductivas asexuales, como esporangióforos y esporangios. En cambio, para observar estructuras sexuales tales como oogonios con oosporas y anteridios, se deben transcurrir al menos 14 – 21 días (Erwin y Ribeiro, 1996, Drenth y Sendall 2001, Maseko et al. 2007, Bose et al. 2017, Soto-Plancarte et al. 2017, Rodríguez-Padrón et al. 2018).

Por otra parte, el análisis filogenético de secuencias de diferentes regiones génicas permite identificar a los individuos a nivel de especie con mayor certeza. Estos análisis han contribuido a comprender mejor las relaciones filogenéticas entre las especies, agrupándolas en 10 clados principales. Las especies pertenecientes a un clado comparten características morfológicas y culturales semejantes, que no se comparten con las de otros clados. Las regiones génicas más utilizadas para llevar a cabo estos análisis, son en primer lugar la región ITS (cebadores ITS-6 / ITS-4), y también otros genes que codifican para las proteínas β -tubulina (cebadores Btub_F1A / Btub_R1), proteína de shock térmico (hsp90), (cebadores HSP90_F1 / HSP90_R2) y la subunidad 1 del citocromo c oxidasa mitocondrial (cox1), (cebadores FM84 / FM83) (Cooke et al. 2000, Kong et al. 2003, Martin y Tooley

2003, Maseko et al. 2007, Blair et al. 2008, Bose et al. 2017). Asimismo, existen cebadores específicos para algunas especies de *Phytophthora*, como LPV2/LPV3 diseñados para *P. cinnamomi* (Kong et al., 2003).

2.2.4.5. Técnicas de diagnóstico directo

Existen kits y técnicas de diagnóstico rápido como el test de ELISA, hibridación fluorescente *in situ* (FISH), biosensores basados en anticuerpos, técnicas hiperespectrales, imágenes de fluorescencia, termografía y pruebas de tiras reactivas. Estos kits y técnicas permiten una rápida y directa detección de patógenos en el campo, entre ellos *Phytophthora* spp. (Miller et al. 1994, Fang y Ramasamy 2015, Soto-Plancarte et al. 2017).

El uso en el campo de kits basados en técnicas serológicas permite obtener resultados rápidos *in situ*, por lo que son muy útiles y sus resultados son fácilmente interpretables. Algunos de los kits disponibles en el mercado son: *Phytophthora* Late Blight Pocket Diagnostic[®] Test, ALERT LF[®] y los Immuno-Strips que permiten identificar infecciones de *Phytophthora* spp. en diversos cultivos (Soto-Plancarte et al., 2017).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. OBSERVACIÓN DE SÍNTOMAS Y MUESTREO A CAMPO

Se visitaron campos con plantaciones jóvenes de *E. smithii* en la zona Sureste del Uruguay, situados concretamente en los Departamentos de Lavalleja, Maldonado y Rocha. Los campos fueron seleccionados debido a que presentaban antecedentes de marchitamiento y muertes de árboles. Los muestreos fueron efectuados en los meses de marzo, abril y mayo del año 2017. Las características de las plantaciones muestreadas se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de las plantaciones de *E. smithii* muestreadas

Campo	Departamento/ Localidad	Fecha de plantación	Replante	Origen de la semilla	Fecha de muestreo
1	Lavalleja/ Campanero	Primavera 2016	No	Australia, Montdromedary	23 de marzo
2	Lavalleja/ Sta. Lucía	Primavera 2016	No	Australia, Montdromedary	23 de marzo
3	Rocha/ Parallé	Primavera 2015	No	s/d	22 de abril
4	Maldonado/ Aiguá	Primavera 2016	Si	s/d	22 de abril
5	Rocha/ Castillos	Primavera 2016	Si	s/d	18 de mayo

s/d: sin datos

En cada campo se observó la distribución de los árboles afectados y posteriormente se seleccionaron y retiraron 15 árboles con distinto grado de avance de la sintomatología (preferentemente en los primeros estados) pero que no estuviesen completamente muertos. En cada árbol seleccionado, se hicieron observaciones minuciosas *in situ*, detallando los síntomas que presentaba y su grado de avance. Se procedió a apear cada árbol a una altura de entre 10 y 15 cm desde el ras del suelo, utilizando diferentes herramientas de corte (serrucho y machete). Luego se extrajo el tocón (porción de tronco que queda unida a las raíces luego de que el árbol es cortado) utilizando un pico de punta y paleta para desenterrarlo, mientras que la parte aérea fue descartada.

Junto con cada árbol también se colectó una muestra del suelo circundante al sistema radicular, para lo que se retiró y desechó la capa más

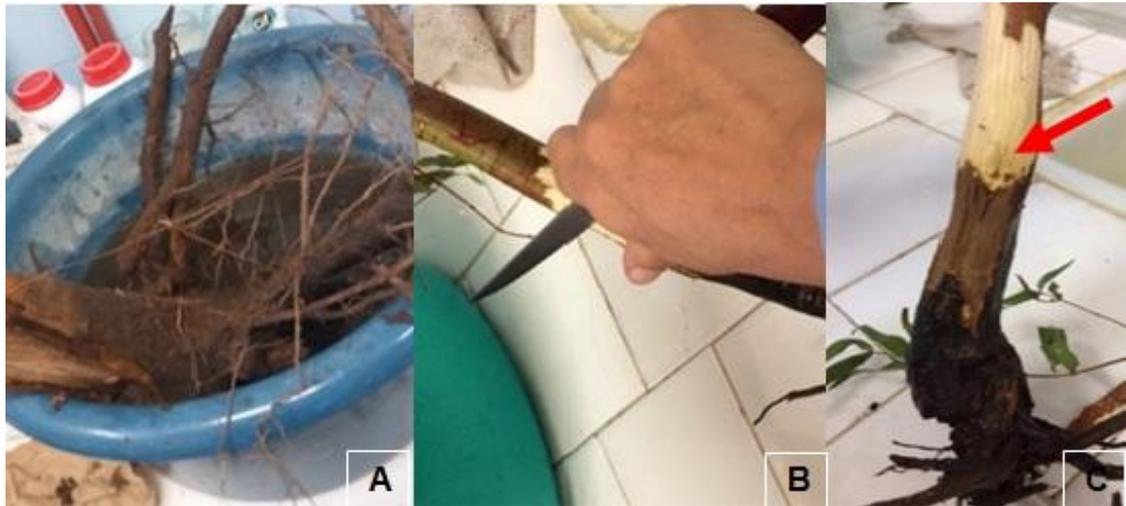
superficial del mismo y se excavó entorno a las raíces y raicillas hasta una profundidad aproximada de 30 cm. Cada tocón con las raíces y suelo se guardaron en una bolsa de polietileno, previamente identificada con un número de colecta. Las muestras fueron llevadas el mismo día al Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, con el fin de aislar e identificar el/los agente/s causal/es asociados a este marchitamiento y muerte de plantas.

3.2. PROCESAMIENTO EN LABORATORIO

3.2.1. Procesamiento de las plantas

3.2.1.1. Aislamientos en medio de cultivo

Las 75 plantas colectadas en los 5 campos fueron procesadas individualmente. En primer lugar, se efectuó un lavado con abundante agua para remover el exceso de tierra de las raíces y de la base del cuello (Figura 2A). Posteriormente, utilizando una herramienta cortante (navaja o bisturí) se retiró cuidadosamente la corteza del tronco (Figura 2A). Se buscó la transición entre el tejido sano y el tejido enfermo, ya que es en esa zona de avance de la enfermedad donde se espera encontrar al patógeno más activo, y se procedió a extraer pequeños trozos de material vegetal (aproximadamente de 3 mm²) con la ayuda de un bisturí estéril. De igual manera se colectaron pequeños trozos de raicillas finas, que presentaban un color marrón-castaño oscuro. Los trozos colectados se sembraron de a siete por placa en dos medios de cultivo diferentes; NARPBH (Anexo 1) selectivo para aislar *Phytophthora*, dos placas por planta y medio Papa Dextrosa Agar (PDA, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra), una placa por planta.



(A) Lavado abundante de las raíces y cuello basal de las plantas, (B) remoción de la corteza de la madera, (C) detalle de la lesión necrótica, nótese la zona de avance de la lesión, indicado con una flecha.

Figura 2. Procesamiento de las plantas en el laboratorio

Las placas sembradas con material vegetal en medio NARPBH se incubaron a 20°C y las placas con medio PDA a 25°C, todas por al menos 2 semanas. Durante este tiempo toda colonia crecida en medio NARPBH se repicó a medio de cultivo V8A (Anexo 1).

3.2.1.2. Trampeos de material vegetal utilizando manzanas como cebo

Se utilizaron manzanas de la variedad Granny Smith como trampas vegetales (una por planta de eucalipto colectada) y se procesaron mediante la técnica de Hendrix y Campbell (1970). El objetivo de hacer trampeos vegetales fue intentar aislar de forma indirecta ejemplares de *Phytophthora* spp. que estuviesen presentes en el tejido vegetal enfermo.

En primer lugar, las manzanas fueron desinfectadas superficialmente con alcohol 70° e, inmediatamente, con una navaja se efectuaron tres cortes biselados a media profundidad. Haciendo un leve descalce, se colocaron en el interior de cada corte, varios trozos de material enfermo (6 mm² aprox. de tamaño) extraídos de la zona de avance de las lesiones encontradas (Figura 2C). Finalmente, las manzanas fueron selladas con cinta adhesiva y mantenidas a temperatura ambiente hasta por 14 días, donde fueron observadas detalladamente cada dos días.

De aquellas manzanas en las que se desarrolló podredumbre de color marrón castaño a oscuro, consistencia relativamente firme y forma irregular

asociada a los trozos de madera inoculados, se efectuaron aislamientos a medio de cultivo NARPBH, desde la zona de avance de la podredumbre. Las placas fueron incubadas en las mismas condiciones indicadas más arriba.

3.2.2. Procesamiento de suelos

3.2.2.1. Trampeo de suelos utilizando material vegetal como cebo

El suelo circundante a las raíces de cada planta muestreada se colocó en bandejas de plástico de 23 cm largo x 13 cm ancho x 5 cm altura, ocupando 1/3 de su capacidad. Posteriormente se humedeció cada bandeja con agua destilada hasta haber alcanzado el punto de capacidad de campo y se dejó reposar por 24 horas.

Pasado ese tiempo, las bandejas se inundaron cuidadosamente con agua destilada hasta alcanzar casi el total de su capacidad. Posteriormente y con una malla de punteado muy fino, se retiraron restos de materia orgánica y otros residuos que flotaban en la superficie del agua (intentando no generar agitación) mientras que con servilletas de papel absorbente se retiraron las partículas más finas que no pudieron ser retiradas con la malla.

Se dejó decantar el agua de las bandejas por 6 horas y luego se colocó sobre la superficie de la misma, el material vegetal en forma de cebo (*baiting*). Como material cebo se utilizaron hojas tiernas de *Rhododendron indicum* y *R. grandiflorum*, así como también pétalos de rosa blancos, hojas juveniles de individuos de *E. smithii*, *Quercus rubra* y *Q. robur* (Tsao 1983, Erwin y Ribeiro 1996).

Las trampas fueron mantenidas a temperatura ambiente y luz natural por dos semanas. Durante este tiempo fueron observadas cada dos días y todas aquellas hojas que presentaron algún tipo de lesión fueron retiradas para efectuar aislamientos. Para ello, se cortaron 5 pequeños trozos de la zona de avance de diferentes lesiones y se sembraron en placas con medio de cultivo NARPBH. Las placas fueron incubadas en las mismas condiciones indicadas más arriba.

3.2.2.2. Trampeo de suelos utilizando manzanas como cebo

Al igual que en el trampeo con material vegetal descrito anteriormente, se utilizaron manzanas Granny Smith (una manzana por muestra de suelo), como cebo para intentar capturar *Phytophthora* desde el suelo circundante a las raíces de cada planta colectada.

Las manzanas se desinfectaron superficialmente con alcohol 70°. Utilizando un sacabocados se efectuaron cuatro agujeros perpendiculares de 10 mm de diámetro y 15 mm de profundidad aproximadamente, en la zona media de cada manzana. Los agujeros se rellenaron con suelo y se saturaron con agua destilada estéril, utilizando un cuentagotas. Finalmente, se selló cada uno de los orificios con cinta adhesiva para mantener un alto nivel de humedad.

Las manzanas se mantuvieron hasta por dos semanas en condiciones similares a las del trampeo con bandejas y también fueron observadas detalladamente cada dos días. Al igual que en el trampeo anterior, las manzanas que desarrollaron una podredumbre de color marrón castaño a oscuro, consistencia relativamente firme y forma irregular originada desde el suelo incorporado en los agujeros, fueron seleccionadas para efectuar aislamientos. Para ello, se extrajeron varios trocitos pequeños de la zona de avance de la podredumbre interna, se sembraron en medio de cultivo NARPBH. Las placas fueron incubadas en las mismas condiciones indicadas más arriba.

3.2.3. Identificación de las colonias desarrolladas

3.2.3.1. Pre-selección de aislados basados en la morfología de la colonia, tipo de hifas y estructuras reproductivas

Inicialmente, se realizó una primera selección de los aislados crecidos en medio NARPBH y PDA. Esta selección se basó en la morfología y coloración de las colonias. También se registró el aspecto de las hifas, así como el tipo de conidios que producían.

En el caso de las colonias crecidas en NARPBH, aquellas que presentaban color blanco y micelio cenocítico y eventualmente, hinchamientos hifales, fueron repicadas a medio de cultivo V8A e incubados a 20°C. Las que presentaron micelio tabicado o colorido, fueron descartadas. En cuanto a las colonias crecidas en medio PDA, aquellas que, por su aspecto y tipo de conidios producidos, fueron identificadas como pertenecientes a la familia *Botryosphaeriaceae* (micelio blanco al inicio, tornándose gris a gris oscuro y negro con el transcurso de los días) fueron repicadas a medio PDA, para futuros estudios. En cambio, las colonias pertenecientes a géneros que suelen aparecer como contaminantes en este tipo de aislamientos como *Alternaria* o *Penicillium*, fueron descartadas.

Las estructuras reproductivas de todos los aislados repicados del medio NARPBH, fueron inducidas mediante inundación con una solución de agua de extracto de suelo estéril (Anexo 1). Para ello se cortaron 4 trozos de 1 cm² de las colonias crecidas en V8A, se colocaron en una placa de petri estéril e

inmediatamente fueron inundadas con la solución antes indicada. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente por al menos dos semanas. Se hicieron observaciones periódicas del desarrollo de estructuras reproductivas como esporangios, esporangióforos, oogonios, oosporas y anteridios. Las colonias que presentaron estructuras típicas del orden Peronosporales (*Phytophthora* o *Pythium*) fueron seleccionadas, descartándose las demás.

De los aislados seleccionados se efectuaron cultivos puros a partir de puntas de hifas. Posteriormente y para su conservación, 8 a 10 discos de micelio extraído desde el margen de colonias creciendo en PDA, se colocaron en tubos de ensayo de 15 ml de capacidad, estériles, conteniendo solución de extracto de suelo estéril (dos tubos por aislado). Los tubos fueron almacenados a 12°C.

3.2.3.2. Identificación molecular

Para el análisis molecular de la región ITS se seleccionó y secuenció solamente una colonia por planta (Tabla 2). Luego de 10 días de crecimiento en medio PDA a 25°C y en condiciones de oscuridad, se extrajo el ADN de cada colonia utilizando un kit de extracción (Zymo Research, Epigenetics Company, USA). El ADN extraído se conservó a -24°C en microtubos de 1,5 ml de capacidad.

Para identificar los aislados a nivel de especie se analizó filogenéticamente la región ITS. Para ello se amplificó mediante PCR esta región génica utilizando los cebadores ITS6/ITS4 (White et al. 1990, Cooke et al. 2000, Bose et al. 2017). La mezcla de reacción estuvo conformada por 1X de buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM MgCl₂), 0,2 μM de cada dNTPs, 0,4 μM de cada uno de los cebadores, 1U de U-Taq ADN polimerasa (SBS Genetech Co. Ltd., China) y 1 μl de la solución del ADN extraído. La mezcla se completó con agua ultrapura (MilliQ) hasta alcanzar un volumen final de 20 μL. Las amplificaciones se realizaron utilizando un termociclador MultiGene™ Mini (Labnet Internacional Inc., Estados Unidos) en las condiciones descritas a continuación: desnaturalización a 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos compuestos por desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C por 30 segundos y 1 minuto de extensión a 72°C. El último paso fue 72°C por 5 minutos para completar las extensiones.

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis. Para ello se tomaron muestras de 2 μL de cada uno de los productos amplificados y se cargaron en un gel de agarosa (AMRESCO®, Estados Unidos) al 1,5% en tampón TBE 0,5X (TBE 1X = tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2

mM, pH= 8,0). En la corrida se incluyó un marcador de peso molecular constituido por una mezcla de bandas de ADN (Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder Plus, Thermo Fisher Scientific®, USA).

Para la visualización de las bandas, los geles se tiñeron en solución acuosa con GelRed™ (Biotium, Estados Unidos) (5 µL GelRed, 2 ml NaCl 0,1 M y 48 ml de agua) por al menos 30 minutos. Luego fueron expuestos a luz UV en transiluminador (DyNA Light Dual Intensity UV Transiluminator, Labnet Internacional Inc., Estados Unidos). Los geles fueron fotografiados con un sistema de foto documentación DigiDoc-It™ (Ultra-Violet Products Ltd., Reino Unido). Los productos de amplificación obtenidos fueron secuenciados en Macrogen Inc. (Seul, Korea).

Las secuencias de ADN obtenidas se alinearon mediante el programa informático Clustal W (Larkin et al., 2007) incluido en el programa MEGA 7 (Tamura et al., 2013). Posteriormente las secuencias se editaron con ayuda de los cromatogramas. Inmediatamente fueron comparados con la base de datos disponible en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) mediante el recurso BLAST. Los aislados identificados como pertenecientes a los géneros *Phytophthora* y *Pythium* fueron posteriormente sometidos a análisis filogenético por separado. Para ello, dentro del alineamiento fueron incluidas secuencias génicas de especies similares o filogenéticamente cercanas obtenidas del GenBank. El análisis filogenético se efectuó por los métodos de máxima parsimonia y máxima verosimilitud utilizando el programa MEGA 7. El soporte de los nodos de los árboles más parsimoniosos se obtuvo mediante 1000 réplicas de bootstrap.

3.2.4. Caracterización fenotípica de los aislados de *Phytophthora alticola*

Para la caracterización fenotípica de *P. alticola* se seleccionaron 4 de los aislados identificados molecularmente como esta especie, estos fueron 5.2, 12.1, 25.5 y 29.1.

3.2.4.1. Morfología de las colonias en diferentes medios de cultivo

Los aislados seleccionados se hicieron crecer en cuatro medios de cultivo diferentes: Agar zanahoria (CA) 10%, Extracto de Malta Agar (MEA) 2% (Anexo 1), PDA y V8-Agar (Bose et al., 2017). Para ello se colocó en el centro de cada placa un disco de micelio de 5 mm de diámetro, previamente crecido en V8A. Se realizaron cuatro repeticiones por aislado y medio de cultivo. Las pacas se mantuvieron 7 días en oscuridad a 20°C. Al cabo de este tiempo se observó el aspecto de las colonias, coloración y tipo de crecimiento.

3.2.4.2. Caracterización de las estructuras reproductivas

La inducción de las estructuras reproductivas se efectuó de igual manera a lo indicado más arriba. En este caso las placas se mantuvieron a temperatura ambiente y luz natural por al menos cuatro semanas. Durante ese tiempo se efectuaron observaciones periódicas bajo microscopio (Olympus Cx21) a 400x de aumento.

Al cabo de 2 semanas se registraron las características de las estructuras reproductivas asexuales, tales como forma y tamaño de los esporangios (dos mediciones perpendiculares de cada uno), presencia o ausencia de papilas, persistencia y tipo de proliferación de los esporangios, y tipo de ramificación de los esporangióforos. En el caso de los esporangios vacíos se midió el tamaño del poro de salida. Las mediciones de las estructuras reproductivas sexuales se efectuaron al cabo de 4 semanas. Se realizaron mediciones y descripciones de cada estructura, tales como diámetro de oogonios, diámetro de oosporas, largo y ancho de anteridios, y el índice de la pared celular de la oospora, calculado como el ratio (cociente) entre el volumen de la pared de la oospora y el volumen total de la oospora (Dick, 1990). En todos los casos se utilizó una cámara digital (Dino-Eye, Taiwán) con el programa Dino Capture 2.0 y se registraron entre 30 y 50 mediciones por cada estructura y aislado.

3.2.4.3. Crecimiento a diferentes temperaturas

El crecimiento a diferentes temperaturas se estudió en dos medios de cultivo diferentes, V8A y CA. Las temperaturas evaluadas fueron 15, 20, 25 y 30°C respectivamente. Con un sacabocados de 5 mm de diámetro se extrajeron varios discos de micelio del margen de colonias de 7 días de edad crecidas en medio V8A. Los discos fueron sembrados en el centro de placas conteniendo uno u otro medio de cultivo. Se realizaron cuatro repeticiones por aislado, medio de cultivo y temperatura evaluada.

A partir del cuarto día de incubación y hasta el séptimo inclusive, se efectuaron mediciones del diámetro de las colonias (dos medidas perpendiculares por aislado), utilizando un calibre digital (KAMASA[®] Electronic Digital Calipers, USA). Con los datos obtenidos se calculó la tasa de crecimiento diario en mm/día.

4. RESULTADOS

4.1. OBSERVACIÓN DE SÍNTOMAS Y MUESTREO A CAMPO

En todos los campos visitados, se observaron árboles con marchitamiento de la parte aérea en distinto grado de avance. Los síntomas iniciales consistían en marchitamiento de la parte aérea acompañado por una coloración verde pálida de la hoja, en comparación con las hojas de árboles sanos que permanecían verde normal (Figura 3A). En estados más avanzados de la marchitez, aparece un enrojecimiento anormal del follaje (Figura 3B), seguido por un declinamiento súbito y finalmente la muerte de la planta. A nivel de la base del cuello, se observaron lesiones de color ocre a marrón oscuro avanzando por el tallo dirigiéndose en dirección acrópeta y manifestando un color marrón claro a marrón castaño, el cuál contrastaba con el color del tejido aún sano (Figura 3C y 3D). Al excavar y desenterrar los árboles, el sistema radicular de los mismos presentaba una coloración marrón oscuro, con diferentes tonalidades de color marrón a negro, característico de un proceso de muerte radicular causado por podredumbre de estas.

Asimismo, las plantas afectadas no mostraron un patrón claro de distribución en el campo, ya que no solo se encontraban en zonas de deposición de agua o suelos con problemas de drenaje (como es de esperarse), sino que su distribución era completamente al azar (Figura 4). Las plantas enfermas también se observaban en zonas altas, sin aparentemente problemas graves de drenaje.



(A) árbol en estado inicial de marchitamiento con amarillamiento foliar; (B) estado avanzado del marchitamiento con enrojecimiento pronunciado; (C) lesión de color ocre a marrón en la base del cuello (D) necrosis en la base del cuello por debajo de la corteza.

Figura 3. Aspecto de síntomas de enfermedad en el campo



Nótese el color rojizo del follaje de los arboles afectados y sin un patrón de distribución definido.

Figura 4. Vista panorámica de uno de los campos muestreados

4.2. PROCESAMIENTO EN LABORATORIO

4.2.1. Procesamiento de las plantas

A partir de la siembra a medio NARPBH de material vegetal de diferentes orígenes (zona de avance de la enfermedad en cuello, raíces gruesas y finas y trapeo de material vegetal sintomático utilizando manzanas como cebo) se obtuvieron 78 colonias. De estas colonias, 68 provinieron de la siembra del material vegetal sintomático directamente en medio NARPBH y el resto del trapeo en manzana verde.

En el caso del trapeo de material vegetal utilizando manzanas como cebo, las podredumbres desarrolladas no se correspondieron exactamente con las esperadas producidas por *Phytophthora* spp., sino que más bien eran blandas, color castaño claro, bordes enteros y con un avance hacia el interior de la fruta de tipo más bien regular (Figura 5B).

4.2.2. Procesamiento de suelos

La cantidad de colonias logradas en medio NARPBH provenientes del procesamiento de suelo con los dos métodos utilizados, fue notoriamente

menor que las obtenidas con el procesamiento de material vegetal, lográndose únicamente 8 colonias.

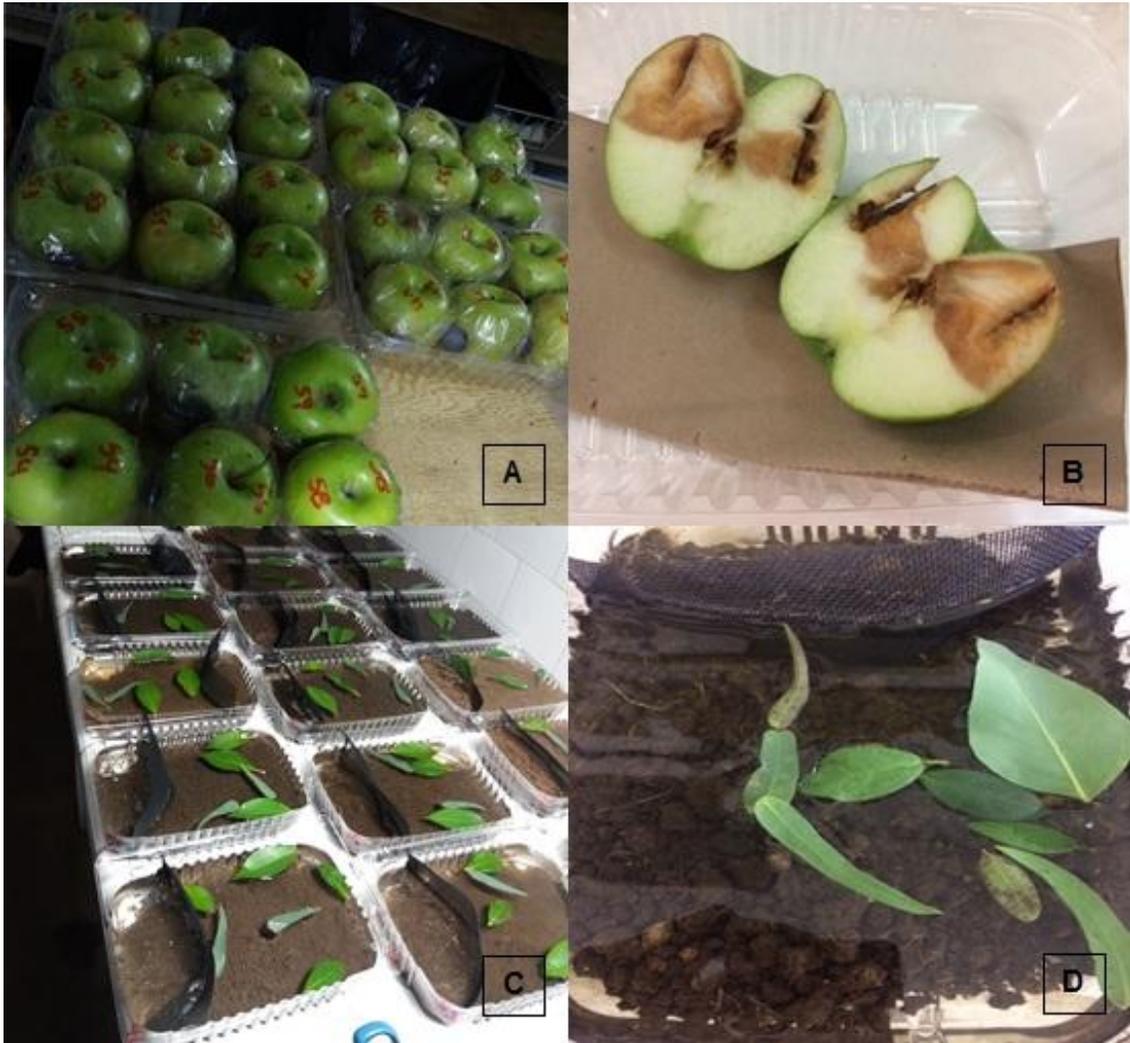
En el caso de trapeo de suelos utilizando hojas tiernas como cebo, las lesiones desarrolladas fueron escasas (Figura 5D); mientras que en el caso del trapeo utilizando manzana verde como cebo, ocurrió algo similar que lo ocurrido con tejido vegetal; las pudriciones desarrolladas no fueron las típicas esperadas, sino que eran más blandas, de bordes enteros y avance regular hacia el interior de la fruta.

4.2.3. Identificación de las colonias desarrolladas

4.2.3.1. Pre-selección de aislados basados en la morfología de la colonia y tipo de hifas

De las 86 colonias crecidas en medio NARPBH (provenientes del procesamiento de plantas y suelo), 40 presentaron micelio blanco e hifas cenocíticas por lo que fueron repicadas a medio V8 y posteriormente inducidas mediante inmersión en solución de agua de extracto de suelo estéril. De estas colonias solamente 17 produjeron estructuras reproductivas típicas de oomycetes.

Estas 17 colonias provienen de la siembra de material vegetal directamente a medio NARPBH de 12 árboles diferentes. Estos árboles pertenecen a los campos 1 y 2 que fueron muestreados en marzo. No se obtuvieron colonias de oomycetes a partir de los campos 3, 4 y 5 que fueron los muestreados en los meses de abril y mayo (Tabla 2).



(A) Trampeo de suelo utilizando manzanas Granny Smith; (B) podredumbre generada a partir de la inoculación de material vegetal extraído del cuello de la raíz; (C y D) trampeo de suelo en bandejas utilizando hojas frescas de *E. smithii*, *R. indicum*, *R. grandiflorum* y hojas juveniles de *E. globulus*.

Figura 5. Trampeo de suelos utilizando manzanas Granny Smith y bandejas con material vegetal como cebo

Tabla 2. Fecha de muestreo, aislados y especies de oomycetes obtenidos en los campos 1 (Lavalleja/ Campanero) y 2 (Lavalleja/ Sta. Lucía) de *Eucalyptus smithii*.

Campo	Fecha de muestreo	Número planta	Número aislado	Especie
1	23 de marzo	3	3.1	"P. alticola"
			3.5*	
			3.6	
			5.2*	
	23 de marzo	5	5.2*	P. alticola
			7	7.1*
	7.2			
	7.3			
	7.4			
	23 de marzo	11	11.1*	Pythium sp
	23 de marzo	12	12.1*	P. alticola
	23 de marzo	13	13.1*	P. alticola
	23 de marzo	14	14.1*	Pythium sp
	23 de marzo	15	15.2*	P. alticola
2	23 de marzo	18	18.1*	Pythium sp.
			25	P. alticola
			28	"P. alticola"
			29	P. alticola

(*) Aislados seleccionados para identificación molecular.

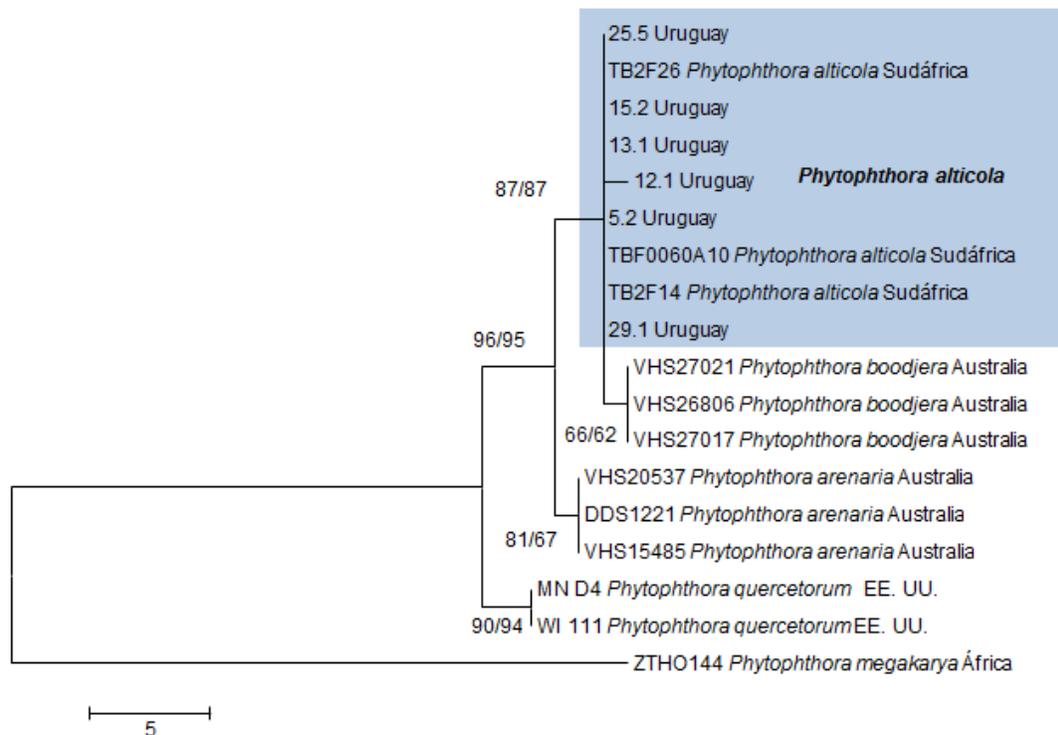
(" ") Aislados en los que no se pudo amplificar la región ITS. La identificación de estos aislados se basa exclusivamente en aspectos morfológicos.

A la derecha se presentan los resultados de la identificación molecular de la región ITS utilizando los cebadores ITS6/ITS4.

4.2.3.2. Identificación molecular

Debido a que el aspecto y estructuras reproductivas de las colonias provenientes de una misma planta eran similares, se seleccionó solo un aislado por planta para la identificación molecular que en total fueron 12. De estos 12 aislados solamente en nueve se logró amplificar la región ITS (Tabla 2). La comparación de estos nueve aislados con la base de datos del GenBank determinó que seis de ellos pertenecen al género *Phytophthora* y los tres restantes al género *Pythium*.

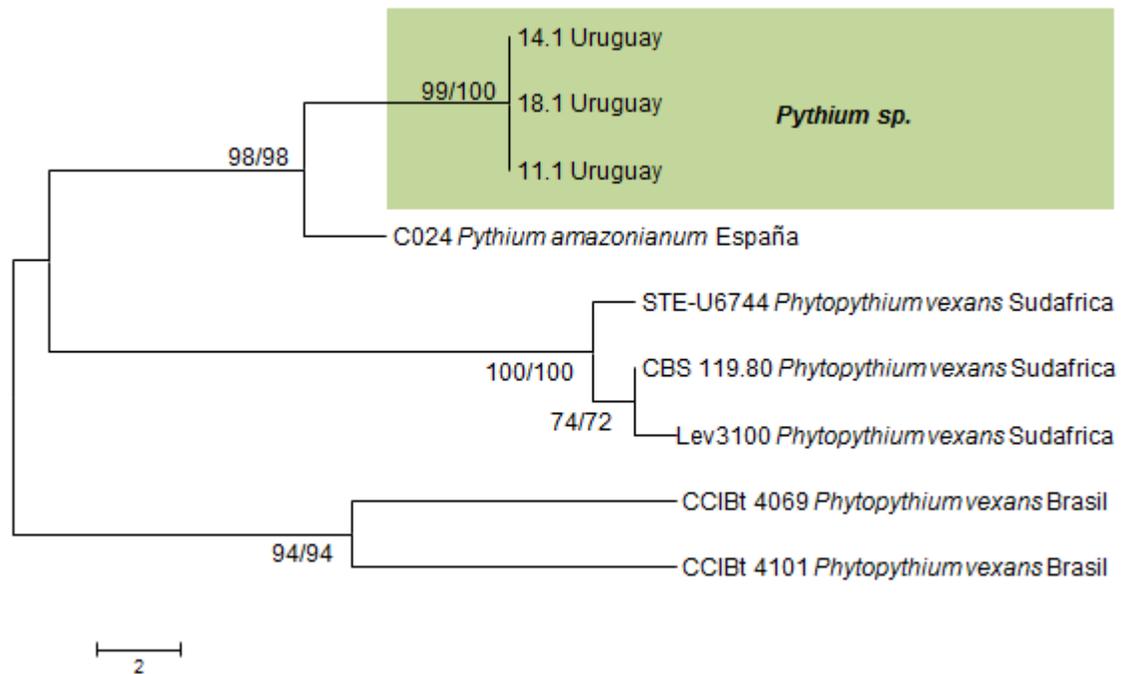
El análisis filogenético de las secuencias identificadas como *Phytophthora* indicó que los seis aislados pertenecen a la especie *P. alticola*. El aspecto de la colonia, así como de las estructuras reproductivas de los aislados 3.5 y 28.1 en los que la región ITS no pudo ser amplificada, era similar a aquellos identificados como *P. alticola*.



Los valores de Bootstrap de soporte en los nodos corresponden a los análisis de máxima parsimonia y máxima verosimilitud respectivamente. La barra representa el número de cambios.

Figura 6. Uno de los árboles obtenidos por máxima parsimonia generado a partir del análisis filogenético del alineamiento de la región ITS de los seis aislados obtenidos de plantas de *Eucalyptus smithii* y aislados de especies identificadas obtenidas del GenBank.

En el caso de los 3 aislados pertenecientes al género *Pythium*, el análisis filogenético de la región ITS no fue suficiente para identificarlos a nivel de especie (Figura 7). Respecto al aislado 7.1 en el que la región ITS tampoco pudo ser amplificada, el aspecto de la colonia, así como de las estructuras reproductivas era similar a aquellos pertenecientes al género *Pythium*.



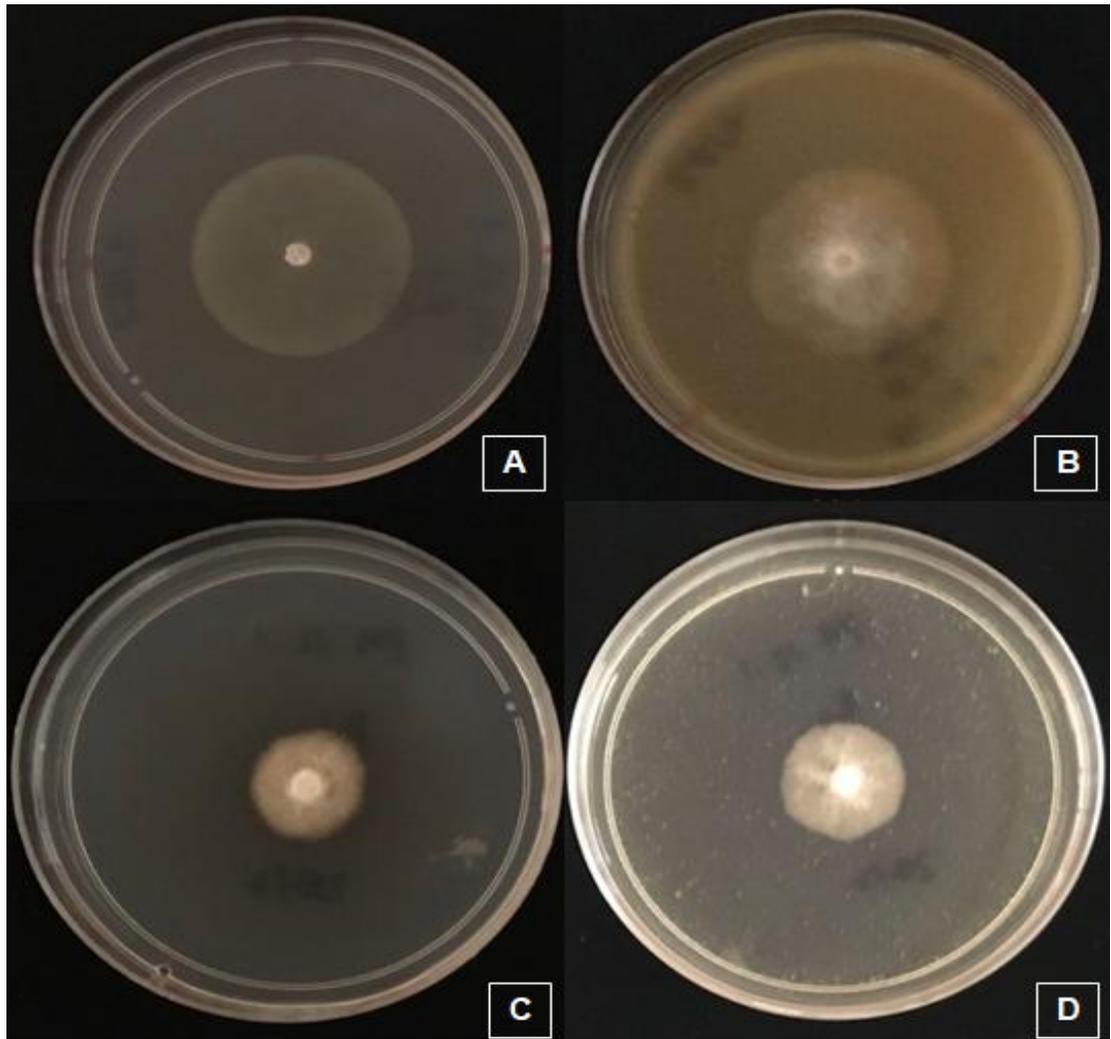
Los valores de Bootstrap de soporte en los nodos corresponden a los análisis de máxima parsimonia y máxima verosimilitud respectivamente. La barra representa el número de cambios.

Figura 7. Uno de los árboles obtenidos por máxima parsimonia generado a partir del análisis filogenético del alineamiento de la región ITS de los restantes tres aislados obtenidos de plantas de *Eucalyptus smithii* y aislados de especies identificadas obtenidas del GenBank.

4.2.4. Caracterización de los aislados de *Phytophthora alticola*

4.2.4.1. Morfología de las colonias en diferentes medios de cultivo

Luego de 7 días de incubación a 20°C y en condiciones de oscuridad, todas las colonias presentaron micelio de color blanco. En cuanto a su aspecto, fue ralo en el medio CA y más algodonoso en los demás medios. Respecto al margen de crecimiento, todas las colonias produjeron márgenes más bien enteros en los cuatro medios de cultivo.



(A) Carrot Agar, (B) V8Agar, (C) PDA y (D) Malt Extract Agar.

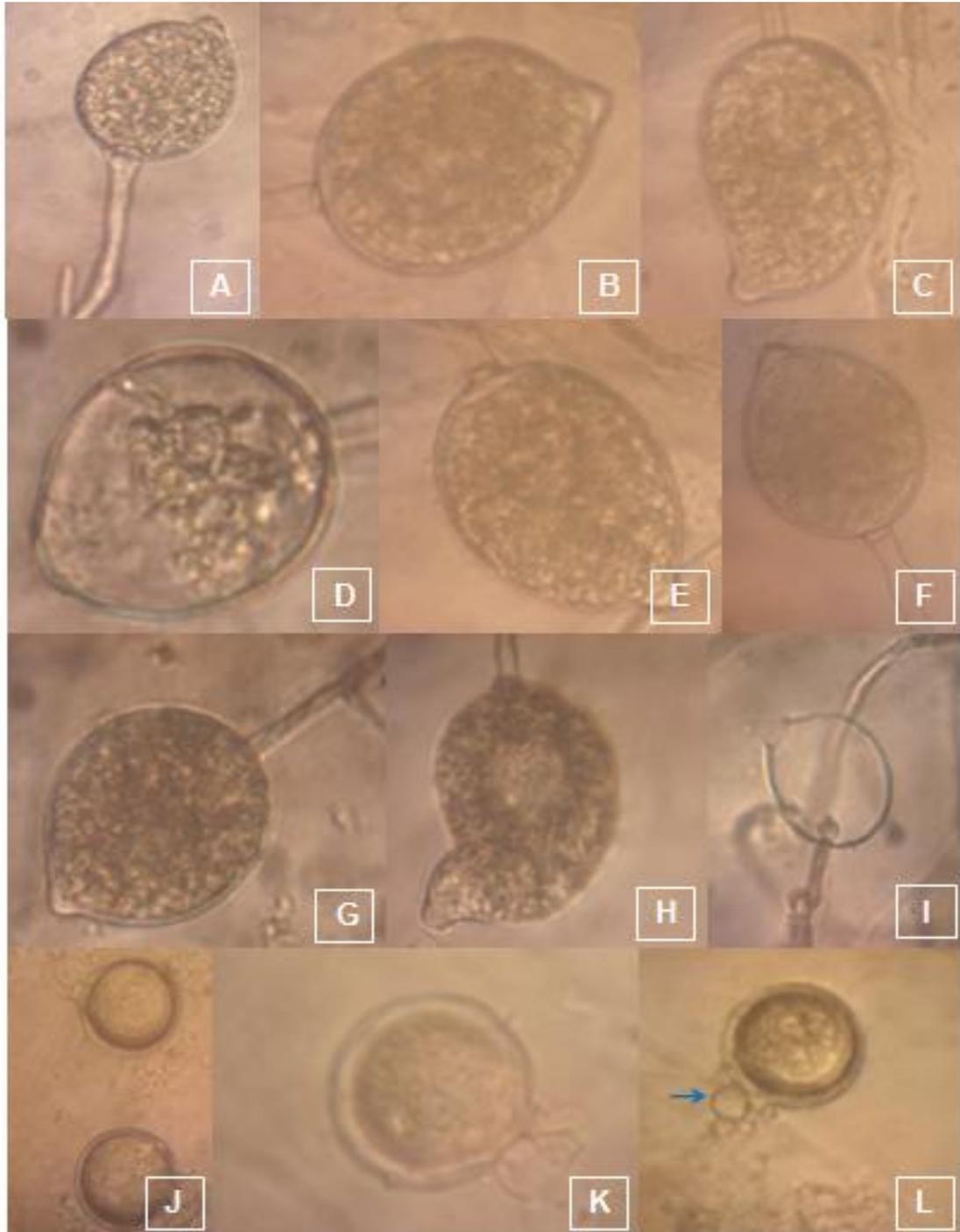
Figura 8. Aspecto del aislado 29.1 identificado como *P. alticola* a los 7 días de crecimiento a 20°C en diferentes medios de cultivo.

4.2.4.2. Caracterización de las estructuras reproductivas

Respecto a las estructuras reproductivas asexuales se observaron en su mayoría esporangios papilados y en escasas ocasiones bi-papilados, de inserción terminal y de carácter persistente. La forma fue variable, predominantemente ovoides (77%), globosos (13%) y limoniformes, (6%). En cuanto a su tamaño, los esporangios tuvieron una media de $42,9 \pm 5,94 \times 30,47 \pm 2,99$ micrómetros de largo y ancho respectivamente. La media del tamaño del poro de salida de los esporangios vacíos fue de $8,21 \pm 1,58$ micrómetros de ancho.

En cuanto a las estructuras reproductivas sexuales, los anteridios observados fueron paragíneos, mientras que las oosporas en su mayoría presentaron un desarrollo aplerótico (no ocupaban todo el espacio dentro de los oogonios). Los oogonios presentaron un diámetro medio de $30,16 \pm 2,37(\mu\text{m})$, mientras que las oosporas $24,65 \pm 2,03 (\mu\text{m})$. Por otra parte, los anteridios tuvieron una media de $11,34 \pm 1,54 \times 9,6 \pm 1,49 (\mu\text{m})$ de largo y ancho respectivamente. Respecto al grosor de la pared, tuvo una media de $2,92 \pm 0,6 (\mu\text{m})$ (Tabla 3). Esta especie presenta un tipo de reproducción homotálico (Figura 9).

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos en este trabajo respecto al estudio de caracteres morfológicos y la comparación entre los valores del trabajo realizado por Bose et al. (2017) con la misma especie (*P. alticola*) y los realizados por Rea et al. (2011), Simamora et al. (2015) con las especies *P. boodjera* y *P. arenaria* respectivamente, por ser las especies filogenéticamente relacionadas más cercanas entre sí (Figura 6).



(A-H) Esporangios persistentes y papilados; (I) esporangio vacío; (J-K) oogonios con oosporas en desarrollo; (L) oogonio con anteridio paragino indicado con una flecha azul.

Figura 9. Estructuras reproductivas asexuales y sexuales de *P. alticola*

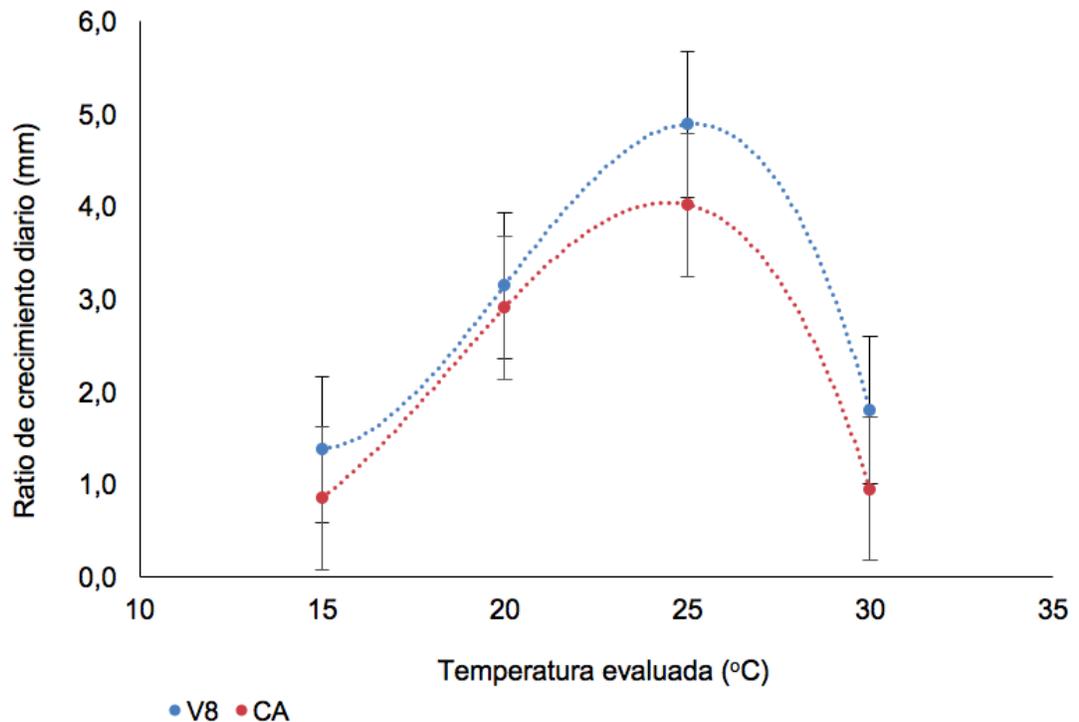
Tabla 3. Comparación de caracteres morfológicos y temperaturas de crecimiento entre *P. alticola*, *P. boodjera* y *P. arenaria*

Especie y fuente de datos	<i>P. alticola</i> (el presente trabajo)	<i>P. alticola</i> (Bose et al., 2017)	<i>P. boodjera</i> (Simamora et al., 2015)	<i>P. arenaria</i> (Rea et al., 2011)
No. de aislados	4	7	12	10
Esporangios (µm)				
Media LxA	42,9 ± 5,94 x 30,47 ± 2,99	37,6 ± 3,2 x 28,8 ± 4,5	39,2 ± 4,4 x 29,7 ± 3,4	31,8 ± 4,6 x 23,7 ± 3,5
Rango LxA	26,59-58,22 x 21,02-42,58	20,8-45,3 x 18,4-33,7	15,2-64,5 x 13,9-42,5	20,2-53,0 x 12,5-35,0
Ratio L/A	1,41 ± 0,13	1,28 ± 0,05	1,27 ± 0,16	1,40 ± 0,17
Características de los esporangios	Papilados, en ocasiones bipapilados, raramente bilobados	Papilados, frecuentemente bipapilados, raramente bilobados	Papilados, raramente bipapilados o bilobados	Papilados, raramente bi/tri-papilados o bilobados
Forma de los esporangios	Ovoides (77%), Globosos (13%), Limoniformes (6%), Distorsionados (2,5%), Piriformes (1,5%)	Ovoides (87%), Obpiriformes (9%), Distorsionados (4%)	Ovoides (66%), Limoniformes (14%), Forma de maní (8%), Obpiriformes (6%), Distorsionados (4%)	Usualmente ovoides, obpiriformes o distorsionados
Persistencia	Persistentes	Persistentes	Persistentes	Persistentes
Esporangióforos	Simplees o ramificados, simpodio a menudo con base bulbosa, muy a menudo se unen lateralmente	Simplees o ramificados, simpodio a menudo con base bulbosa, muy a menudo se unen lateralmente	Simplees o ramificados, simpodio a menudo con base bulbosa, muy a menudo se unen lateralmente	Simplees o ramificados, simpodio a menudo con base bulbosa
Proliferación	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Poros de salida (µm)				
Ancho (µm)	8,21 ± 1,58	6,53 ± 1,27	6,09 ± 1,02	6,0 ± 1,0
Rango del ancho (µm)	5,27-10,58	6,07-8,70	4,85-8,89	3,40-8,90

Especie y fuente de datos	<i>P. alticola</i> (el presente trabajo)	<i>P. alticola</i> (Bose et al., 2017)	<i>P. boodjera</i> (Simamora et al., 2015)	<i>P. arenaria</i> (Rea et al., 2011)
Sistema de reproducción	Homotálico	Homotálico	Homotálico	Homotálico
Oogonios (µm)				
Diámetro medio	30,16 ± 2,37	27,6 ± 1,7	29,4 ± 2,3	25,3 ± 2,2
Rango de diámetros	23,51-36,34	22,4-30,3	24,3-33,9	19,6-34,3
Clamidosporas	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
Oosporas (µm)				
Diámetro medio	24,65 ± 2,03	24,7 ± 1,9	25,5 ± 1,9	22,3 ± 1,8
Rango de diámetros	19,12-31,1	19,1-29,2	20,92-29,3	16,0-28,3
Grosor de la pared	2,92 ± 0,6	2,48 ± 0,14	2,47 ± 0,33	2,30 ± 0,34
Características	Oosporas apeleróticas, oogonios maduros con un ligero ondulado en la superficie y color marrón dorado	Oosporas apeleróticas, oogonios maduros con un ligero ondulado en la superficie y color marrón dorado	Oosporas apeleróticas, oogonios maduros con un ligero ondulado en la superficie y color marrón dorado	Oosporas apeleróticas, oogonios maduros con un ligero ondulado en la superficie y color marrón dorado
Anteridios (µm)				
Posición	Paraginos, a menudo con proyecciones con forma de dedos	Paraginos, a menudo con proyecciones con forma de dedos	Paraginos	Paraginos, a menudo con proyecciones con forma de dedos
Media de LxA	11,34 ± 1,54 x 9,6 ± 1,49	10,2 ± 1,2 x 8,2 ± 1,7	10,4 ± 1,9 x 8,3 ± 1,5	11,2 ± 1,7 x 8,4 ± 1,3
Rango de LxA	8,47-13,71 x 5,59-11,96	6,2-12,8 x 8,2 ± 1,7	7,9-16,4 x 6,0-10,5	7,9-16,4 x 6,0-10,5
Características de crecimiento				
Temp. máxima (°C)	30	30	35	32,5
Temp. óptima (°C)	25	25	25-30	30
Temp. mínima (°C)	>10<15	>10<15	>10<15	>10<15
Crecimiento a Temp. óptima (mm/día)	4,89 (V8A) 4,02 (CA)	3,5 (V8A) 7,42 (CA)	9,18 (V8A)	5,9-7,4 (V8A)
Crecimiento a 20°C (mm/día)	3,15 (V8A) 2,91 (CA)	2,33 (V8A) 3,75 (CA)	6,12 (V8A)	3,8-5,2 (V8A)

4.2.4.3. Crecimiento a diferentes temperaturas

Los aislados crecieron a todas las temperaturas evaluadas siendo superior en el medio V8A respecto al crecimiento registrado en el medio CA. La temperatura óptima de crecimiento en ambos medios se ubicó entorno a los 25°C, a esta temperatura los aislados crecieron en promedio 2,91 mm/día en CA y 3,15 mm/día en V8 (Figura 10).



Línea punteada azul corresponde a medio V8A y línea punteada roja a medio CA. Las barras sobre los puntos indican el error estándar.

Figura 10. Promedio de la tasa de crecimiento diario (mm/día) de los aislados 5.2, 12.1, 25.5 y 29.1 identificados como *P. alticola* en medio V8A y CA a 15, 20, 25 y 30 °C respectivamente.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se aborda por primera vez en Uruguay, el estudio de la etiología de la muerte de árboles jóvenes de *E. smithii* plantaciones comerciales ubicadas en la zona Sureste del país. La ocurrencia de muerte de árboles jóvenes de *E. smithii* en plantaciones jóvenes, genera gran preocupación en el sector forestal dado que esta especie de eucalipto se introdujo como el principal sustituto de *E. globulus* ssp. *globulus*.

Eucalyptus globulus ssp. *globulus* ha liderado la producción forestal en los últimos 15 años debido a su excelente calidad para elaborar pasta de celulosa. Sin embargo, la aparición de la enfermedad “Manchas por *Mycosphaerella*” en el 2007, afectó gravemente las plantaciones de eucalipto, en particular a *E. globulus* ssp. *globulus* la especie más susceptible a esta enfermedad (Soria et al., 2014).

Pocos meses después de ser trasladados del vivero al campo, los árboles infectados de *E. smithii* manifiestan una muerte súbita de la parte aérea asociados a lesiones necróticas a nivel del cuello y podredumbres en las raíces. La muerte de los árboles es el resultado final de este proceso. La sintomatología observada se asemeja con la producida por especies del género *Phytophthora* (Erwin 1983a, Erwin y Ribeiro 1996, Ferguson y Jeffers 1999, Drenth y Sendall 2001, Jung y Blaschke 2004, Agrios 2005, Pérez-Sierra et al. 2010, Fang y Ramasamy 2015, Bose et al. 2017).

Debido a la hipótesis de que el agente causal de este marchitamiento podría tratarse de un individuo perteneciente al género *Phytophthora*, se esperaba observar la mayor parte de las plantas afectadas en las zonas anegadas o de mayor humedad ya que estos patógenos ven favorecido su desarrollo ante la presencia de agua libre (Erwin y Ribeiro, 1996). Sin embargo, las plantas afectadas no mostraron un patrón claro de distribución en el campo, ya que no solo se encontraban en zonas de deposición de agua o suelos con problemas de drenaje, sino que su distribución era completamente al azar, incluso en zonas altas sin problemas graves de drenaje. Este patrón de distribución al azar de las plantas afectadas sugiere la posibilidad de que al menos algunas de las plantas quizás provinieron infectadas del vivero.

Por otra parte las plantas de *E. smithii* se producen a partir de semilla botánica por lo que existe diversidad genética entre los individuos. Es posible que algunos de estos genotipos se comporten como más susceptibles a *P. alticola* y por el contrario algunos con mayor grado de resistencia a este patógeno.

De las plantas afectadas se aislaron oomycetes desde la zona de avance de las lesiones necróticas de la base del cuello y raíces. Sin embargo, esto solo fue posible a partir de las plantas colectadas en los dos primeros campos (campos 1 y 2) que fueron muestreados a fines de marzo. De los restantes tres campos cuyos muestreos se efectuaron en los meses de abril y mayo, no fue posible aislar oomycetes. Este resultado fue sorprendente ya que la sintomatología presente en los árboles afectados fue similar en todos los campos visitados. Por otra parte, es sabido que algunas especies del género *Phytophthora* presentan estacionalidad lo largo del año; es decir su desarrollo es más activo en determinados períodos del año y se minimiza en otros, favoreciendo o dificultado su aislamiento (Erwin y Ribeiro, 1996). Es así que no se descarta la posibilidad de que esto esté ocurriendo en este caso.

Se obtuvieron individuos del orden peronosporales a partir de 12 plantas de eucalipto. Asimismo, fue posible aislar *P. alticola* en 8 de ellas, representando un 66,6 % y en una menor proporción, se obtuvieron 4 aislados de *Pythium* spp. representando el 33,4% restante. Por otra parte, la especie *P. alticola* fue aislada recientemente a partir de suelos con plantaciones de *E. grandis* y *Acacia mearnsii* en el Este de Sudáfrica (Bose et al., 2017), mientras que en el presente trabajo se aisló directamente de material vegetal afectado.

Respecto a la caracterización fenotípica de los aislados de *P. alticola*, la temperatura óptima de crecimiento de esta especie se encuentra en torno a los 25°C, lo cual no es lo habitual en la mayoría de las especies de *Phytophthora* que es cercana a los 20°C (Reyes-Amado, 2007). Este resultado contribuye a fundamentar porque solo fue posible aislar cepas de *Phytophthora* en el muestreo efectuado a fines de marzo. En esta época del año las temperaturas promedio aún son cálidas al contrario de los otros dos momentos (abril y mayo) en que las temperaturas promedio son menores.

Por otra parte, en el estudio de crecimiento de *P. alticola* a diferentes temperaturas efectuado por Bose et al. (2017) en los medios V8 y CA, al contrario de lo observado en el presente trabajo, se registran ratios de crecimiento diario superiores en el medio CA comparado con V8. Estas diferencias podrían atribuirse a que el medio CA se preparó de forma casera en ambos trabajos y quizás esto contribuyó a observar esta diferencia en el comportamiento.

En cuanto al aspecto de la colonia crecida en diferentes medios de cultivo, en general presentó los mismos aspectos que lo ya reportado por Bose et al. (2017). En cuanto a las estructuras reproductivas sexuales y asexuales se encontró que en general se corresponden con las publicadas por Bose et al., (2017). Asimismo, y coincidiendo con los resultados obtenidos por Maseko et al.

(2007), Bose et al. (2017), no se observaron clamidosporas producidas por esta especie.

En resumen, en este trabajo se identificó a la especie *P. alticola* asociada a plantas jóvenes de *E. smithii* con síntomas de marchitamiento aéreo y podredumbre de cuello y raíces. También se aisló e identificó otro oomicete asociado a esta sintomatología, *Pythium* spp. Por otra parte, si bien el origen de esta enfermedad aún se desconoce, no se descarta la posibilidad de que ésta pueda provenir de viveros debido a la dispersión errática de la misma en el campo. Es así que surge la necesidad de realizar visitas a los viveros que proveen de plantines de esta especie y realizar prospecciones para, descartar o no, la presencia de este patógeno en esa esta productiva.

Como futuros trabajos de investigación en esta temática, se propone verificar la patogenicidad de *P. alticola* en árboles jóvenes de *E. smithii*. También identificar a nivel de especie de las cepas de *Pythium* spp. a través del análisis de nuevas regiones génicas, así como también evaluar su patogenicidad en árboles jóvenes de *E. smithii*. Asimismo, también sería oportuno realizar muestreos en diferentes épocas del año para comprobar o no, un efecto de estacionalidad por parte de la especie *P. alticola*. Para ello se deberán realizar muestreos en un mismo campo, en diferentes estaciones del año.

6. CONCLUSIONES

1. *Phytophthora alticola* fue la especie de oomycete más frecuentemente encontrada asociada a plantas jóvenes de *E. smithii* y en segundo lugar *Pythium* spp. Se determina así que la enfermedad registrada en el Sureste de este país que causa la muerte del árbol presumiblemente es causada principalmente por especies de *Phytophthora*.

2. Es posible que ocurra estacionalidad para la recuperación de *P. alticola* dado que solo fue posible aislar oomycetes en el muestreo realizado en mes de marzo y no en los dos siguientes (abril y mayo), a pesar de que la sintomatología observada en los árboles afectados fue similar en todos los campos.

3. La temperatura óptima de crecimiento miceliar de la especie *P. alticola* se ubica en torno a 25°C, lo que contribuye a fundamentar la hipótesis de que las épocas del año con temperaturas cálidas son las más adecuados para aislar a esta especie.

4. El análisis de las secuencias de la región ITS del ADN ribosómico, fue suficiente para identificar con certeza a la especie *P. alticola*, pero no a las especies dentro del género *Pythium*, por lo que se sugiere la amplificación de diferentes regiones génicas para su identificación.

7. RESUMEN

Eucalyptus globulus era la especie forestal más plantada en Uruguay. A partir de la observación en el año 2007 del patógeno foliar *Teratosphaeria nubilosa*, esta situación ha cambiado. La madera de *E. globulus* es una materia prima de excelente calidad para la elaboración de pasta de celulosa. Este producto se puede comercializar en Uruguay tanto localmente como en el mercado internacional. Debido a la alta susceptibilidad de *E. globulus* a *T. nubilosa*, el área antes destinada a *E. globulus* está siendo reemplazada por otras especies de *Eucalyptus*, entre ellas *E. smithii* cuya madera también es potencialmente exportable debido a las propiedades que presenta. *E. smithii*, si bien tiene mayor tolerancia a este patógeno, es altamente susceptible a problemas radiculares. La mortandad de árboles en plantaciones comerciales hasta los dos años de edad se viene observando cada vez más frecuentemente. Esto ha generado alarma entre los pequeños productores de *E. smithii* que modificaron su producción con el objetivo de seguir disponiendo de un producto maderero exportable. La sintomatología observada se asemeja a la descrita para podredumbre radicular causada por *Phytophthora* spp., sin embargo, el/los agente(s) causal(es) de la misma no han sido determinados en Uruguay. El objetivo del presente trabajo fue identificar el agente etiológico de la muerte radicular de *E. smithii* en Uruguay. Para ello se realizaron colectas de material en cinco plantaciones de *E. smithii* de primer y segundo año en distintas regiones productivas que presentaron mortandad de plantas. A partir de material vegetal sintomático, se aislaron cepas de oomicetes, las que se identificaron utilizando técnicas micro morfológicas y moleculares utilizando la región ITS. Los análisis indican que los aislados colectados en Uruguay corresponden a la especie *Phytophthora alticola* en su mayoría y en menor medida *Pythium* spp. La especie *P. alticola* fue obtenida en Sudáfrica desde suelo circundante de plantaciones de eucalipto y *Acacia mearnsii* en el año 2017.

Palabras clave: *Eucalyptus smithii*; Podredumbre radicular; *Phytophthora alticola*.

8. SUMMARY

Eucalyptus globulus was the most planted forest species in Uruguay. Since the accidental introduction in 2007 of the leaf pathogen *Teratosphaeria nubilosa*, this situation has changed. The wood of *E. globulus* is a raw material of excellent quality to produce cellulose pulp. This product can be sold both locally and in the international market. Due to the high susceptibility of *E. globulus* to *T. nubilosa*, the area previously destined for *E. globulus* is being replaced by other species of *Eucalyptus*, among them *E. smithii*, whose wood is also potentially exportable due to its properties. Although *E. smithii* is more tolerant to this pathogen, it is highly susceptible to root problems. The mortality of plants in commercial plantations up to two years old has been observed more and more frequently. This has generated an alarm among the small producers of *E. smithii* that modified their production with the aim of continue having an exportable timber product. The observed symptomatology resembles the one described for root rot caused by *Phytophthora* spp. However, the causal agent (s) of this disease has not been determined in Uruguay yet. The objective of this assay was to identify the etiological agent of the radicular death of *E. smithii* in Uruguay. For this purpose, prospections and material collection were carried out in five plantations of *E. smithii* of one and two years old in different productive regions that presented plant mortality. From symptomatic material oomycetes were isolated, which were identified using micro morphological and molecular techniques using the ITS region. The analyses indicated that the isolates collected in Uruguay mainly belong to the species *Phytophthora alticola* and in lower amount to *Pythium* spp. The *P. alticola* species was isolated in South Africa in 2017 from surrounding soil of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mearnsii* plantations.

Keywords: *Eucalyptus smithii*; Root rot; *Phytophthora alticola*.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5th. ed. San Diego, Elsevier. 952 p.
2. Almaraz-Sánchez, A.; Alvarado-Rosales, D.; Saavedra-Romero, L. 2013. Trampeo de *Phytophthora cinnamomi* en bosque de encino con dos especies ornamentales e inducción de esporulación. Revista. Chapingo. Serie Ciencias Forestales y Ambiente. 19(1): 5-12.
3. Alonso, R.; Soria, S.; Lupo, S.; Bettucci, L.; Pérez, C. 2013. Alternativas de manejo de enfermedades foliares en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus*. In: Jornada Técnica de Protección Forestal (5^a., 2013, Tacuarembó, Uruguay). Alternativas químicas para el manejo de manchas foliares en *Eucalyptus globulus*. Montevideo, INIA. pp. 39-44 (Serie Técnica no. 703).
4. Bain, J.; Dick, M.; Jones, D. 2006. New species of *Phytophthora* causing crown dieback of *Eucalyptus*. (en línea). ENSIS. Forest Health News no. 162. 2 p. Consultado 21 mar. 2018. Disponible en https://www.scionresearch.com/_data/assets/pdf_file/0018/3870/fhnewsNo162May06.pdf
5. Baldini, A.; Carballo, R.; Telechea, N.; Porcile, J.; Alfnas, A. 2006. Manual de campo: plagas y enfermedades de eucaliptos y pinos en el Uruguay. (en línea). Roma, FAO. 167 p. Consultado 22 may. 2018. Disponible en <http://www.fagro.edu.uy/~forestal/cursos/proteccion/Fao%20Manual%20de%20Campo.pdf>
6. Balmelli, G.; Simeto, S.; Altier, N.; Marroni, V.; Diez, J. 2013. Long term losses caused by foliar diseases on growth and survival of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. New Forests. 44(2): 249-263.
7. _____.; _____.; Torres, D.; Hirigoyen, A.; Castillo, A.; Altier, N.; Pérez, G.; Diez, J. 2016. Impact of *Teratosphaeria nubilosa* over tree growth and survival of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus maidenii* in Uruguay. (en línea). New Forests. 47: 829–843. Consultado 23 may. Disponible en DOI 10.1007/s11056-016-9547-3
8. Blair, J. E.; Coffey, M. D.; Park, S. Y.; Geiser, D. M.; Kang, S. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived

from complete genome sequences. *Fungal Genetic and Biology*. 45(3): 266-277.

9. Bose, T.; Burgess, T. I.; Roux, J.; Wingfield, M. J. 2017. *Phytophthora alticola*; emended description based on new collections and a neotype. *Sydowia*. 69:161-170.
10. Brasier, C. M. 1991. Current questions in *Phytophthora* systematics: the role of the population approach. In: Lucas, J. A.; Shattock, R. C.; Shaw, D. S.; Cooke, L. R. eds. *Phytophthora*. Cambridge, UK, Cambridge University. pp. 104-128.
11. Coffey, M. D.; Bower, L. A. 1984. "In vitro" variability among isolates of six *Phytophthora* species in response to Metalaxyl. *The American Phytopathology Society*. 82(8): 502-506.
12. Cooke, D.; Drenth, A.; Duncan, J.; Wagels, G.; Brasier, C. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*. 30: 17–32.
13. Cuervo Usán, Y.; Espadas, M.; Zita, G. s.f. Fitopatología: manual de prácticas de ingeniería agrícola. (en línea). Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores. s.p. Consultado 22 may. 2018. Disponible en http://asesorias.cuautitlan2.unam.mx/fondo_editorial/comite_editorial/manuales/Fitopatologia.pdf
14. Dick, M. 1990. Keys to Pythium. Reading, UK, University of Reading. 64 p.
15. Domsch, H. K. 1980. Compendium of soil fungi. London, UK, Academic Press. 680 p.
16. Drenth, A.; Sendall, B. 2001. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. Indooroopilly, Queensland, CRC for Tropical Plant Protection. 41 p.
17. ENCE, ES. 2009. La gestión forestal sostenible y el eucalipto. (en línea). Madrid. 71 p. Consultado jun. 2018. Disponible en https://www.ence.es/pdf/EI_Eucalipto.pdf
18. Erwin, D. C. 1983a. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. St. Paul, MN, APS. 392 p.

19. _____. 1983b. Variability within and among species of *Phytophthora*.
In: Erwin, D. C.; Bartnicki-Garcia, S.; Tsao, P. H. eds.
Phytophthora: its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. St. Paul, MN, APS. pp.149-165.
20. _____.; Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. St. Paul, MN, APS. 562 p.
21. Fang, Y.; Ramasamy, R. P. 2015. Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors*. 5(3): 537-561.
22. Ferguson, A. J.; Jeffers, S. N. 1999. Detecting multiple species of *Phytophthora* in container mixes from ornamental crop nurseries. *Plant Disease*. 83(12):1129-1136.
23. Gallegly, M.; Hong, C. 2008. *Phytophthora*: identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints. St. Paul, MN, APS. 158 p.
24. Ghimire, S. R.; Richardson, P. A.; Moorman, G. W.; Lea-Cox, J. D.; Ross, D. S.; Hong, C. X. 2009. An *in-situ* baiting bioassay for detecting *Phytophthora* species in irrigation runoff containment basins. *Plant Pathology*. 58(3):577-583.
25. Hendrix, F. F.; Campbell, W. A. 1970. Distribution of *Phytophthora* and *Pythium* species in soils in the Continental United States. *Canadian Journal of Botany*. 48: 377-384.
26. Hong, C. X.; Richardson, P. A.; Kong, P.; Bush, E. A. 2003. Efficacy of chlorine on multiple species of *Phytophthora* in recycled nursery irrigation water. *Plant Disease*. 87(10):1183-1189.
27. Jacobs, R. 1981. El eucalipto en la repoblación forestal. Roma, FAO. 723 p. (Colección FAO. Montes no. 11).
28. Jeffers, S. N.; Martin, S. B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*. 70:1038-1043.
29. _____.; Aldwinckle, H. S. 1987. Enhancing Detection of *Phytophthora cactorum* in naturally infested soil. *Phytopathology*. 77:1475-1482.

30. Jung, T.; Blaschke, M. 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology*. 53(2):197-208.
31. _____.; Burgess, T. 2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. *Persoonia*. no. 22:95-110.
32. Kasuga, T.; Kozanitas, M.; Bui, M.; Hüberli, D.; Rizzo, D. M.; Garbelotto, M. 2012. Phenotypic diversification is associated with host-induced transposon derepression in the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum*. *PLoS One*. 7(4): 34-728.
33. Kile, G. 1983. Identification of genotypes and the clonal development of *Armillaria luteobubalina* Watling & Kile in eucalypt forests. *Australian Journal of Botany*. 31: 657-71.
34. Krall, J. 1970. Fundamentos para nuevas introducciones de *Eucalyptus* en el Uruguay. Facultad de Agronomía (Montevideo). Boletín no. 113. 22 p.
35. Larkin, M.; Blackshields, G.; Brown, N.; Chenna, R.; McGettigan, P.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.; Wilm, A.; López, R.; Thompson, J.; Gibson, T.; Higgings, D. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23:2947-2948.
36. Martin, F. N.; Tooley, P. W. 2003. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia*. 95:269–284.
37. _____.; Abad, Z. G.; Balci, Y.; Ivors, K. 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Disease*. 96(8):1080-1103.
38. Martínez, S. 2005. *Inocutis jamaicensis*, the causal agent of eucalypt stem rot in Uruguay. *Mycotaxon*. no. 91: 165-171.
39. Masago, H.; Yoshikawa, M.; Fukada, M.; Nakanishi, N. 1977. Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. *Phytopathology*. 67: 425–428.

40. Maseko, B.; Burgess, T.; Coutinho, T.; Wingfield, M. 2007. Two new *Phytophthora* species from South African Eucalyptus plantations. *Mycological Research*. 3:1321-1338.
41. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2017. Anuario estadístico agropecuario 2017. (en línea). Montevideo. 214 p. Consultado 11 may. 2018. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/diea-anuario2017web01a.pdf>
42. Miller, S. A.; Bhat, R. G.; Schmitthenner, A. F. 1994. Detection of *Phytophthora capsici* in pepper and cucurbit crops in Ohio with two commercial immunoassay kits. *Plant Disease*. 7(8):1042-1046.
43. Moralejo, E.; Pérez-Sierra, A.; Álvarez, L. A.; Belbahri, L.; Lefort, F.; Descals, E. 2009. Multiple alien *Phytophthora* taxa discovered on diseased ornamental plants in Spain. *Plant Pathology*. 58(1):100-110.
44. Newhook, F. J.; Podger, F. D. 1972. The role of *Phytophthora cinnamomi* in Australian and New Zealand forests. *Annual Review of Phytopathology*. 10: 299-326.
45. Pérez, C.; Wingfield, M.J.; Altier, N.A.; Blanchette, R.A. 2009. Mycosphaerellaceae associated with Eucalyptus leaf diseases and stem cankers in Uruguay. *Forest Pathology*. 39:349-360.
46. Pérez Arrarte, C. 2000. Plantaciones forestales en la pradera uruguaya. (en línea). Montevideo, Grupo Guayubirá. s.p. Consultado 22 may. 2018. Disponible en <http://www.guayubira.org.uy/plantaciones/CP/pradera1.html>
47. Pérez-Sierra, A.; León, M.; Álvarez, L. A.; Alaniz, S.; Berbegal, M.; García-Jiménez, J.; Abad-Campos, P. 2010. Outbreak of a new *Phytophthora* sp. associated with severe decline of almond trees in Eastern Spain. *Plant Disease*. 94:534–541.
48. Podger, F. D. 1975. The role of *Phytophthora cinnamomi* in dieback diseases of Australian eucalypt forests. In: Bruehl, G. W. ed. *Biology and Control of Soil Borne Pathogens*. St. Paul, MN, APS. pp. 27-36.

49. Rea, A. J.; Jung, T.; Burgess, T. I.; Stukeley, M. J. C.; Giles E.; Hardy, J. 2010. *Phytophthora elongata* sp. nov., a novel pathogen from the *Eucalyptus marginata* forest of Western Australia. Murdoch, Australia. Australasian Plant Pathology. (39):477-491.
50. _____; Burgess, T.; Hardy, G. S. J.; Stukely M.; Jung, T. 2011. Two novel and potentially endemic species of *Phytophthora* associated with episodic dieback of Kwongan vegetation in the south-west of Western Australia. Plant Pathology. 60: 1055–1068.
51. Reyes-Amado, C. 2007. Determinación de la temperatura óptima de desarrollo in vitro de *Phytophthora parasitica* en Aguacate “hass”, en la zona aguacatera de Michoacán, México. In: Congreso Mundial del Aguacate (6th, 2007, Viña Del Mar, Chile). Actas. Michoacán, México, UMSNH. Facultad de Agrobiología. pp. 1-7.
52. Rodríguez-Padrón, C.; Siverio, F.; Pérez-Sierra, A.; Rodríguez, A. 2018. Isolation and pathogenicity of *Phytophthora* species and *Phytophthora vexans* recovered from avocado orchards in the Canary Islands, including *Phytophthora niederhauserii* as a new pathogen of avocado. Phytopathologia Mediterranea. 57(1): 89–106.
53. Rosario Pou y Asociados. 2016. Uruguay forestal: principales tendencias del año 2016. (en línea). Montevideo. pp. 1 - 5. Consultado 11 may. 2018. Disponible en <http://www.uruguayforestal.com/informes/uruguayforestal16.pdf>
54. Ruperez, A.; Muñoz, C. 1980. Enfermedades de los eucaliptos en España. (en línea). Boletín de Sanidad Vegetal. 6:193-217. Consultado 20 may. 2018. Disponible en <http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/plagas/BSV/P-06-02-193-217.pdf>
55. Scott, P. M.; Jung, T.; Shearer, B. L.; Barber, P. A.; Calver, M.; Hardy, G. 2011. Pathogenicity of *Phytophthora multivora* to *Eucalyptus gomphocephala* and *Eucalyptus marginata*. Forest Pathology. 42: 289 - 298.
56. Simamora, A.; Stukely, M.; Hardy, G.; Burgess, T. 2015. *Phytophthora boodjera* sp. nov. A damping-off pathogen in production nurseries

and from urban and natural landscapes, with an update in the status of *P. alticola*. IMA Fungus Journal. 6: 319-335.

57. _____.; _____.; Barber, P. A.; Hardy, G.; Burgess, T. I. 2016. Age-related susceptibility of *Eucalyptus* species to *Phytophthora boodjera*. Plant Pathology. 66(3): 501-512.
58. Simeto, S.; Balmelli, G. 2014. Reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales: canchros por *Coniothyrium*. (en línea). INIA. Cartilla forestal no. 2. 2 p. Consultado 20 jun. 2018. Disponible en <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/Cartilla-32-Forestacion-2014.pdf>
59. Soria, S.; Alonso, R.; Bettucci, L.; Lupo, S. 2014. First report of *Teratosphaeria pseudoecalypti* in Uruguay. (en línea). Australasian Plant Disease Notes. 9(1): 146-151. Consultado 20 jun. 2018. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/271662320_First_report_of_Teratosphaeria_pseudoecalypti_in_Uruguay.
60. Soto Plancarte, A.; Rodríguez Alvarado, G.; Fernández Pavía, Y.; Pedraza Santos, M.; López Pérez, L.; Díaz Celaya, M.; Fernández Pavía, S. 2017. Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 8(8):1867-1880.
61. SPF (Sociedad de Productores Forestales, UY). 2016. Manual de apoyo. (en línea). Montevideo. 20 p. Consultado oct. 2017. Disponible en http://www.spf.com.uy/data/paginas/MANUAL_DE_APOYO_2016.pdf
62. Streito, J. C.; Jarnouen de Villartay, G.; Tabary, F. 2002. Methods for isolating the alder *Phytophthora*. Forest Pathology. 32(3):193-196.
63. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipowski, A.; Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 28:2725-2729.
64. Thompson, L. 2012. Possible high pulping alternative to *E. smithii*. (en línea). News and Views. Forestry facts. Aug.:15-18. Consultado 2 jul. 2018. Disponible en

<http://www.nctforest.com/upload/Publications/News%20n%20Views%20August%202012%20Forestry%20Facts.pdf>

65. Tsao, P. H. 1983. Factors affecting isolation and quantitation of *Phytophthora* from soil. In: Erwin, D. C.; Bartnicki-García, S.; Tsao, P. H. eds. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. St. Paul, MN, APS. pp. 219-236.
66. Waterhouse, G. M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Common Wealth Mycological Institute. *Mycological Papers*. 92:1-22 pp.
67. White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. eds. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. San Diego, Academic Press. pp. 315–322.

10. ANEXOS

10.1. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Medio NARPBH (modificado de Jeffers y Martin, 1986)

Materiales

60 g de maíz
17 g de Agar (Oxoid™, Hampshire, Inglaterra)
1 L de agua destilada

0,1g de Natamicina (en vez de piramicina)
0,101g de PCNB
0,125g de Ampicilina
0,01g de Rifampicina
0,02g de Benomil
0,12 ml de Hymexazol líquido

Preparación del medio base

Hervir los 60 g de maíz en 1 L de agua destilada por 1h a partir del momento de ebullición. Dejar reposar unos minutos, colar utilizando una tela o colador y autoclavar a 121°C por 15 min. Agregar agua destilada hasta alcanzar nuevamente 1 L y agregar 17 g de Agar, autoclavar nuevamente a 121°C por 15 min.

Agregado de antibióticos y fungicidas

Diluir el PCNB en 25 ml de una solución de Etanol 95% y agua destilada estéril (1:1 v/v). Diluir por separado en 25 ml de agua destilada estéril la ampicilina, la rifampicina, la natamicina y el benomilo. Inmediatamente agregar paulatinamente todas las soluciones al medio base (el cual debe encontrarse entre 45 y 50°C). Por último, incorporar el Hymexazol líquido. Para alcanzar la homogeneización del medio y sus componentes, utilizar un agitador magnético.

Medio Carrot Agar 10% (Bose et al., 2017)

Materiales

10 ml de jugo de zanahorias frescas
1 L de agua destilada
15 g de agar

Preparación

Rallar dos o tres zanahorias frescas y con un paño de tela apretar para escurrir el jugo. Tomar 10 ml del jugo fresco, agregar el agar y enrasar a 1 L la solución agregando agua destilada. Autoclavar por 15 min a 121°C.

Medio Malt Extract Agar 2% (Erwin y Ribeiro 1996, Bose et al. 2017)

Materiales

20 g de extracto de malta (Oxoid™, Hampshire, Inglaterra)
15 g de agar
1 L de agua destilada

Preparación

Colocar en un Erlenmeyer el extracto de malta junto con el agar y enrasar a 1 L la solución agregando agua destilada. Esterilizar por 15 min a 121°C.

Medio V8-Agar (Tsao 1983, Erwin y Ribeiro 1996)

Materiales

200 ml de zumo de verduras V8 (Campbell's™, USA)
15 g de agar
800 ml de agua destilada
3 g de CaCO₃

Preparación

Agregar al agua destilada previamente entibiecida, el zumo de verduras, el agar y el carbonato de calcio. Enrasar la solución a 1 L agregando el agua destilada. Autoclavar por 15 min a 121°C. Verificar que el pH se encuentre entre 6 y 6,5 previo a su uso.

Solución de agua extracto de suelo estéril (Tsao 1983, Erwin y Ribeiro 1996, Pérez-Sierra et al. 2010)

Materiales

100g de suelo sin esterilizar
Agua destilada

Preparación

Colocar en un Erlenmeyer 100 g de suelo agrícola y 900 ml de agua destilada. Agitar y dejar reposar por 24 hs. Extraer 50 ml del sobrenadante de la solución anterior y agregarla a otro Erlenmeyer conteniendo 950 ml de agua destilada. Esterilizar su contenido a 121°C por 15 min.