



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE *CALONECTRIA*
(*CYLINDROCLADIUM*) Y *CYLINDROCLADIELLA* PRESENTES EN VIVEROS DE
EUCALIPTO DE PAYSANDÚ, URUGUAY

Pilar GASPARRI PITA

Orientador: Ing. Agr. Carlos A PÉREZ (MSc, PhD)
Departamento de Protección Vegetal
Facultad de Agronomía,
Universidad de la República

Tribunal: Lic. Biología Guillermo PÉREZ SUÁREZ (MSc, PhD)
Lic. Biología Raquel ALONSO ARIZTIA (MSc)

AGRADECIMIENTOS

A las autoridades de la Facultad de Agronomía, Estación Experimental Mario Cassinoni por permitirme desarrollar el trabajo final, requisito para la obtención del título de grado.

A las autoridades de UPM, Forestal Oriental, por motivarme y permitirme la finalización de mi trabajo final. Así como también, parte del financiamiento.

A los señores Jorge Dodera y Milton Arévalo por su amabilidad y disponibilidad en los respectivos establecimientos.

Mi mayor gratitud al Director de Tesis Dr. Carlos Perez, por su supervisión y tiempo dedicado en dicho trabajo. A todos los integrantes de los laboratorios tres y cuatro de la E.E.M.A.C por el tiempo compartido y los invaluables intercambios.

A mis familiares y amigos; sin ustedes, mi vida no sería tan maravillosa.

INTRODUCCION

La actividad forestal en Uruguay ha crecido en forma sostenida en los últimos 25 años. La superficie plantada se ha multiplicado por 30 en ese período, alcanzando aproximadamente las 1.000.000 de hectáreas afectadas. El 60% del total del área forestada del país corresponde al género *Eucalyptus*, con presencia mayoritaria de tres de sus especies, *E. globulus*, *E. dunnii* y *E. grandis* (Uruguay XXI).

Las exportaciones del sector forestal entre los años 2009 y 2012 crecieron a una tasa promedio anual de 15% y representaron el 12% del total exportado por Uruguay en el año 2012. El principal producto exportado es la pasta de celulosa. Además se exportan otros productos como: papel, cartón, chips, tableros de madera y madera aserrada (Uruguay XXI).

El sector forestal emplea aproximadamente 23.000 personas, entre empleos directos e indirectos. En la producción de madera y fabricación de productos de madera trabajan aproximadamente 5.000 personas y unas 2.700 en la fabricación de papel y de los productos de papel. A éstas se le suman los empleos indirectos de transporte, logística y los relacionados con la actividad de silvicultura (Uruguay XXI).

El aumento en el área forestada así como la inversión realizada para ello, requieren de medidas cada vez más importantes en materia de protección contra plagas y enfermedades que puedan afectar e impactar negativamente su valor actual y futuro (Baldini *et al.* 2006). Un aspecto clave de cualquier programa de plantación de *Eucalyptus* es la producción de plántulas o esquejes. En ese sentido las pérdidas de plantines *stock* en el vivero pueden afectar seriamente el programa de plantación (Brown *et al.* 2002).

Los daños en el vivero pueden ser causados por agentes bióticos y/o abióticos. Los viveros ofrecen condiciones particularmente favorables, espaciamiento reducido, riego regular, alta humedad y utilización de fertilizantes entre otras, para el desarrollo de epidemias (Alfenas *et al.* 2004). Estos patógenos pueden provenir de los montes

cercanos, del suelo, semillas o material de propagación vegetativa que se introduce en el vivero (Brown *et al.* 2002).

La mayoría de las enfermedades en viveros de eucaliptos son causadas por hongos. Estas enfermedades incluyen la muerte de las plántulas en germinación, enfermedades foliares y podredumbres radiculares (Alfenas *et al.* 2004). Entre los más importantes se encuentran damping-off causado por una variedad de hongos del suelo, el moho gris junto con el marchitamiento y senescencia de tejidos causado por *Botrytis cinerea*, especialmente en las zonas templadas y subtropicales (Brown *et al.* 2002). A esto le siguen el complejo de enfermedades que incluyen manchas foliares, tizón, cancro de tallo, pudrición de la raíz y la muerte de plántulas. Estas últimas enfermedades suelen ser producidas por varias especies de *Cylindrocladium* y *Cylindrocladiella*, que son particularmente prevalentes en las regiones tropicales (Crous 2002).

Otros patógenos, que afectan árboles maduros también pueden causar enfermedades en viveros, como *Colletotrichum gloeosporioides* y especies de *Coniella*, *Phaeophleospora* y *Teratosphaeria*. También es común en vivero la presencia de oídios, que rara vez se encuentran afectando árboles en el campo y la roya del eucalipto, *Puccinia psidii*, también presente en viveros y en campo si las condiciones ambientales son propicias (Brown *et al.* 2002).

Hongos del suelo, tales como algunas especies de *Phytophthora* y *Fusarium*, además de su papel en el damping-off, a menudo causan enfermedades de las raíces y en los tallos particularmente cerca de la superficie del suelo. *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) y *Sclerotium rolfsii* son patógenos del suelo que también pueden causar enfermedad de los tejidos aéreos de eucaliptos en vivero (Brown *et al.* 2002) (Alfenas *et al.* 2004). Si bien hay varias enfermedades destructivas potenciales de plantas de vivero, incluso los más graves pueden ser controlados adecuadamente por las estrategias de manejo (Brown *et al.* 2002).

El género *Calonectria* fue erigido en 1867 por De Notaris. El anamorfo, género *Cylindrocladium*, fue descrito por primera vez por Morgan (1892) en los EE.UU. Este hongo tiene una amplia distribución en las regiones sub-tropical y tropicales del mundo, y son especies patógenas de numerosas plantas. Es miembro de los euascomycete, orden *Hypocreales*. El estado teleomorfo se caracteriza por presentar un peritecio de color amarillo oscuro casi rojo. El ascocarpo presenta una pared escamosa-verrugosa y claviforme que produce ascosporas septadas o multiseptadas. El estado anamorfo, se caracteriza por presentar conidióforos ramificados y la presencia de una vesícula terminal. Los conidios son de forma cilíndrica, y pueden presentar una septa o ser multiseptados. Tienen la capacidad de formar estructuras de resistencia (clamidiosporas) permitiendo la supervivencia en el suelo. (Lombard *et al.* 2010c)

Las especies de *Calonectria* han sido descritas como causantes de enfermedades en varios cultivos de importancia económica en todo el mundo. Cerca de 100 familias y aproximadamente 335 especies de plantas han sido mencionadas como huéspedes para éstos dos géneros de hongos (Lombard *et al.* 2010c).

En la actualidad se reconocen, 37 especies de *Calonectria* y 52 especies de *Cylindrocladium*. Una búsqueda general realizada por Lombard en el año 2010, en MycoBank(<http://www.mycobank.org>) y el Índice Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>) dio lugar a un total de 291 y 261 registros de nombres para *Calonectria*, respectivamente. Para *Cylindrocladium*, indicó un total de 98 y 93 nombres respectivamente (Lombard *et al.* 2010c).

La mayoría de los reportes de enfermedad asociados con *Calonectria* en especies forestales han sido en cinco familias de plantas, de las cuales los más importantes están asociados con Fabaceae (*Acacia* spp.), Myrtaceae (*Eucalyptus* spp.) y Pinaceae (*Pinus* spp.). Hasta el momento se han identificado 57 especies de la familia Fabaceae, 31 especies de la familia Myrtaceae y 17 de la familia Pinaceae, susceptibles a *Calonectria* (Lombard *et al.* 2010c).

En *Eucalyptus*, diferentes síntomas suelen estar asociados a las especies patogénicas del género *Cylindrocladium*, incluyendo: mancha foliar, podredumbre de esquejes y

caída de plántulas. La podredumbre comienza en la región de la interfase sustrato-corte de la estaca. La lesión progresa en tejidos, oscureciendo por completo a los mismos, y posteriormente causando la muerte a la planta (Aparecido *et al.* 2012). Sobre la lesión se puede observar una esporulación blanquecina brillante que corresponde a la fase asexual del hongo. Menos frecuentemente, en condiciones favorables se pueden observar también estructuras globosas de color anaranjado-rojizo sobre el tejido muerto, que corresponde a la fase sexual. Las manchas foliares son generalmente pequeñas, circulares, aproximadamente 5mm de diámetro, de color morado-rojizo, distribuidas en el limbo de la hoja (Alfenas *et al.* 2004). Las principales fuentes de inóculo de este patógeno, son estacas con los síntomas, sustrato infectado, agua contaminada así como también bandejas y tubetes contaminados (Alfenas *et al.* 2004).

La mayoría de estas enfermedades están asociadas a plantines producidos en viveros, pero en algunos casos se ha reportado especies de *Cylindrocladium* en plantaciones comerciales adultas. En estos casos se ha reportado que estos patógenos producen enfermedades en hojas y tizón de tallo que resultan en la defoliación del árbol llevando a una pérdida de vigor del mismo (Lombard *et al.* 2010c). Los síntomas causados por la enfermedad dependerán de diversos factores tales como las especies de eucaliptos, especies de *Cylindrocladium* y también las condiciones ambientales. Las especies identificadas como causantes de dichas patologías en *Eucalyptus* son *C. candelabrum*, *C. floridanum*, *C. gracile*, *C. ovatum*, *C. parasiticum*, *C. pteridis*, *C. scoparium* (Alfenas *et al.* 2004).

Las especies de *Cylindrocladium* se distinguen en su mayoría en base a la morfología del conidióforo, forma y tamaño de las fiálides, así como el ancho y forma de sus vesículas terminales. En las especies que se les conoce el teleomorfo, *Calonectria*, se utilizan como caracteres taxonómicos útiles para la identificación a nivel de especie la morfología de ascos, de ascosporas y anatomía del peritecio (Crous *et al.* 2001). Pese a esto, la variación morfológica ha sido fuente de mucha confusión en el pasado, y ha dado lugar a la descripción de varias especies que posteriormente pasaron a sinonimia (Schoch *et al.* 2001b).

Los estudios filogenéticos en *Calonectria* y su anamorfo *Cylindrocladium* han incidido sustancialmente en la taxonomía de estos géneros. La aplicación de técnicas moleculares (RAPD, RFLP, proteínas totales, hibridación de ADN y comparación de secuencias ADN) para distinguir entre especies han permitido el reconocimiento de numerosas especies crípticas (Lombard *et al.* 2010c). La comparación de secuencias de ADN, asociada a la inferencia filogenética, ha tenido el impacto más dramático en la taxonomía de *Calonectria* siendo hoy en día la técnica más aplicada (Lombard *et al.* 2010c).

El género *Cylindrocladiella*, fue establecido por Boesewinkel (1982), y confirmado por Crous en el año 1994 (Lombard *et al.* 2012) como un género diferente a *Calonectria*. Se distingue del estado anamorfo de *Calonectria* por el patrón de ramificación de los conidióforos, forma y tamaño de conidios. Usualmente se trata de hongos de suelo y están considerados como patógenos o saprófitos de diversas plantas hospederas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Han sido asociados con una variedad de síntomas incluyendo manchas en hojas, y podredumbres de raíces, tallos y esquejes de productos agrícolas, forestales y hortícolas (Lombard *et al.* 2012).

Hasta el momento no existen antecedentes que cuantifiquen los daños, ni valoren la importancia de la enfermedad para las plantaciones ni para los viveros en Uruguay. Tampoco se encuentra registro sobre la identificación de las especies presentes en el país.

Dada la importancia de la identificación del patógeno como pilar fundamental para diseñar estrategias de manejo, y la falta de antecedentes nacionales respecto a las especies de estos patógenos, el objetivo del presente estudio fue la identificación de las especies de *Calonectria* y *Cylindrocladiella* presentes en viveros de eucalipto particularmente en la región de Paysandú, Uruguay, por ser el área de influencia de la E.E.M.A.C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

A inicios del 2013, se tomaron muestras de cuatro viveros ubicados en el departamento de Paysandú, tres de ellos cercanos a la ciudad de Paysandú (32°19'17"S, 58°04'32"W) y uno de ellos ubicado en las proximidades de Guichón (32°21'00"S, 57°12'00"W). Los Viveros A y D, producen específicamente *Eucalyptus*, el Vivero B incluye dentro de su producción, floricultura y leñosas y el Vivero C se dedica a varias leñosas, incluyendo *Eucalyptus* y *Pinus*. Con fines comparativos además se incluyeron muestras de hojas de plantines provenientes de Brasil. La recolección de las muestras se realizó en sitios donde la probabilidad de hallar el patógeno fuese mayor, por ejemplo en suelo, compost, plantines con síntomas, hojas con manchas foliares, lavado de bandejas y arena de mini jardines clonales (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de muestras colectadas en cada vivero según sustrato

Vivero	Compost	Arena	Planta	Suelo	Bandejas	Total
A	6	-	11	4	-	21
B	3	3	9	1	-	16
C	3	-	8	5	-	16
D	3	2	6	2	2	15
Brasil	-	-	3	-	-	3
Total						71

(-) no se encontró dicha combinación,

Aislamiento

Las muestras fueron colocadas en cámara húmeda e incubadas a temperatura ambiente para la inducción de esporulación del hongo. La esporulación se obtuvo de forma directa desde la muestra, hojas y tallos con síntomas, o mediante hojas trampa para sustrato, arena y suelo, siguiendo la metodología descrita por Gonçalves *et al.* (2001). De las fructificaciones observadas bajolupa, se realizó aislamiento directo mediante la transferencia de conidios con una aguja estéril y siembra en agar con extracto de malta (MEA) al 2%. Las placas sembradas fueron incubadas en cámara de crecimiento (Labotec 350), en condiciones controladas, a 25°C y oscuridad. De cada colonia obtenida, se realizó purificación de la cepa mediante el método de punta de hifa. Bajo lupa, se tomaron puntas de hifas individuales con aguja estéril y se sembró en una nueva placa, de forma de asegurar la pureza de la cepa.

Identificación de las cepas

De los cultivos obtenidos se realizó extracción de ADN. El micelio fue raspado de la superficie, se liofilizó y molió a polvo utilizando nitrógeno líquido. Se extrajo el ADN genómico de dicho pulverizado mediante el método CTAB (Murray & Thompson, 1980). Se cuantificó la concentración de ADN obtenido mediante el espectrofotómetro Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

La región ITS del ADN ribosomal fue amplificada y secuenciada utilizando los *primers* ITS1 e ITS 4 (White *et al.* 1990). La mezcla utilizada para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consistió en 2,5 µL de dNTPS 2mM, 2,5 µL de 10 × PCR Taq buffer + KCl, 1,5 µL de MgCl₂ 25mM, 0,5 µL de *primers reverse* y *forward* a 10 mM, 0,1 µL de Taq polimerasa (FERMENTAS) y ADN fúngico en un rango de 20-100 ng, llevado a un volumen total de 25 µL con agua libre de nucleasas, autoclavada. Se verificó la presencia de amplicón mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%, visualizada con GoodView™. La secuenciación del amplicón fue realizada por la empresa Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

Las secuencias ITS obtenidas fueron procesadas usando el programa ChromasPro versión 1.7.5 (Technelysium Pty. Ltd., Eden Prairie, MN), donde fueron corregidas manualmente por errores en la lectura de bases, cuando fue necesario. Posteriormente, fueron sometidas a búsqueda BLAST en NCBI GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, verificado 2 Set, 2013). Con esta búsqueda se descargaron las secuencias publicadas en revistas arbitradas, que presentaban hasta un 99% de similitud con la secuencia en estudio.

Las secuencias generadas fueron ensambladas junto a las secuencias de cepas tipo de las especies más cercanas obtenidas de la búsqueda BLAST antes mencionada y descargadas de GeneBank utilizando MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) y alineadas en MAFFT (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server/>, verificado 2 Set 2013) (Kato *et al.* 2005). Luego en PAUP (Swofford 2002) se realizó un análisis filogenético mediante Máxima Parsimonia con el método heurístico TBR (Tree Bisection and Recombination). Como soporte se realizó análisis por Bootstrap con 1000 repeticiones (Hillis & Bull 1993). Como taxón externo se utilizó la cepa tipo de *Ca. colombiensis* para ambos casos (Lombard *et al.* 2009).

RESULTADOS

Muestreo

En la prospección realizada se colectaron 71 muestras que fueron procesadas en el laboratorio de Fitopatología de la EEMAC (Cuadro 1). La intensidad de muestreo fue similar para cada vivero. Entre 15 y 21 muestras en cada uno. Del total de muestras analizadas provenientes de los cuatro viveros y de distintos sustratos se obtuvieron 65 cepas puras, de las cuales se tomaron 31 cepas al azar para continuar el estudio (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número de cepas tomadas al azar de cada vivero según sustrato del cual fue aislada.

Vivero	Compost	Arena	Planta	Suelo	Bandejas	Total
A	6	0	0	4	0	10
B	0	1	10	0	0	11
C	0	0	0	1	0	1
D	2	0	0	0	4	6
Brasil	0	0	3	0	0	3
Total	8	1	13	5	4	31

Identificación de las cepas

La amplificación de la región ITS del ADN ribosomal, produjo un amplicón de 500 pb aproximadamente el cual fue utilizado para su posterior secuenciación.

El análisis filogenético se realizó con las 31 secuencias obtenidas en el presente estudio y 31 secuencias de referencia de especies de *Calonectria* y *Cylindrocladiella* disponibles en GenBank (Cuadro 3).

El alineamiento final de las secuencias resultó en 476 sitios, de los cuales 391 caracteres fueron constantes, 7 caracteres fueron variables pero parsimoniosamente no informativos y 78 resultaron informativos. Se obtuvieron 1000 árboles más parsimoniosos con iguales índices de consistencia (IC) y retención (IR) de 0.88 y 0.97 respectivamente. La longitud de los mismos fue de 118 pasos (Figura 1).

Cuadro 3. Lista de cepas de referencia pertenecientes a especies de *Calonectria* y *Cylindrocladiella*

Especie	ID de cepa	N° accesión GeneBank ITS	Referencia
<i>Ca. cerciana</i>	CBS 123693 T	GQ280559	Lombard <i>et al.</i> (2010d)
	CBS 123695	GQ280560	Lombard <i>et al.</i> (2010d)
<i>Ca. colombiensis</i>	CBS 112220 T	GQ280566	Crous <i>et al.</i> (2004)
<i>Ca. densa</i>	CBS 125261 T	GQ280647	Lombard <i>et al.</i> (2010a)
	CBS125250	GQ280646	Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Ca. hawksworthii</i>	CBS 111870 T	GQ280580	Crous (2002)
<i>Ca. humicola</i>	CBS 125251 T	GQ280648	Lombard <i>et al.</i> (2010a)
	CBS 125269	GQ280650	Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Ca. insularis</i>	CBS114558 T	GQ280587	Crous (2002)
	CBS114559	GQ280588	Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Ca. pauciramosa</i>	CMW 5683 T	GQ280608	Crous (2002)
	CPC 416	GQ280607	Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Ca. pentaseptata</i>	VM3	JX855951	Lombard <i>et al.</i> *
	VM11	JX855953	Lombard <i>et al.</i> *
<i>Ca. pseudospathiphylli</i>	CBS 109165	GQ280615	Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Ca. reteaudii</i>	CBS 112143	GQ280621	Crous (2002)
	CBS 112144 T	GQ280620	Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Ca. scoparia</i>	CPC 1675	GQ280557	Lombard <i>et al.</i> (2010a)
	CPC 1679	GQ280558	Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Ca. spathiphylli</i>	CBS 116168 T	GQ280628	Lombard <i>et al.</i> (2010a)
	CBS 114540	GQ280627	Crous (2002)
<i>Ca. spathulata</i>	CBS 55592	GQ280630	Crous (2002)
	CBS 112689	GQ280629	Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Ca. sulawesiensis</i>	CBS 125277 T	GQ280637	Lombard <i>et al.</i> (2010a)
	CBS 125248	GQ280638	Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Cy. camelliae</i>	STE U234	AF220952	Schoch <i>et al.</i> (2002)
<i>Cy. langeriformis</i>	CBS 111061	JN100606	Lombard <i>et al.</i> (2012)
	CBS 34092 T	AF220959	Schoch <i>et al.</i> (2002)
<i>Cy. peruviana</i>	CBS 113022	JN100599	Lombard <i>et al.</i> (2012)
<i>Cy. natalensis</i>	CBS 114943	JN100588	Lombard <i>et al.</i> (2012)

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands;

CPC: colección de trabajo de Pedro Crous guardada en CBS;

CMW: colección de Forestry and AgriculturalBiotechnologyInstitute (FABI);

T: cepa tipo

(*): Artículo en espera de admisión.

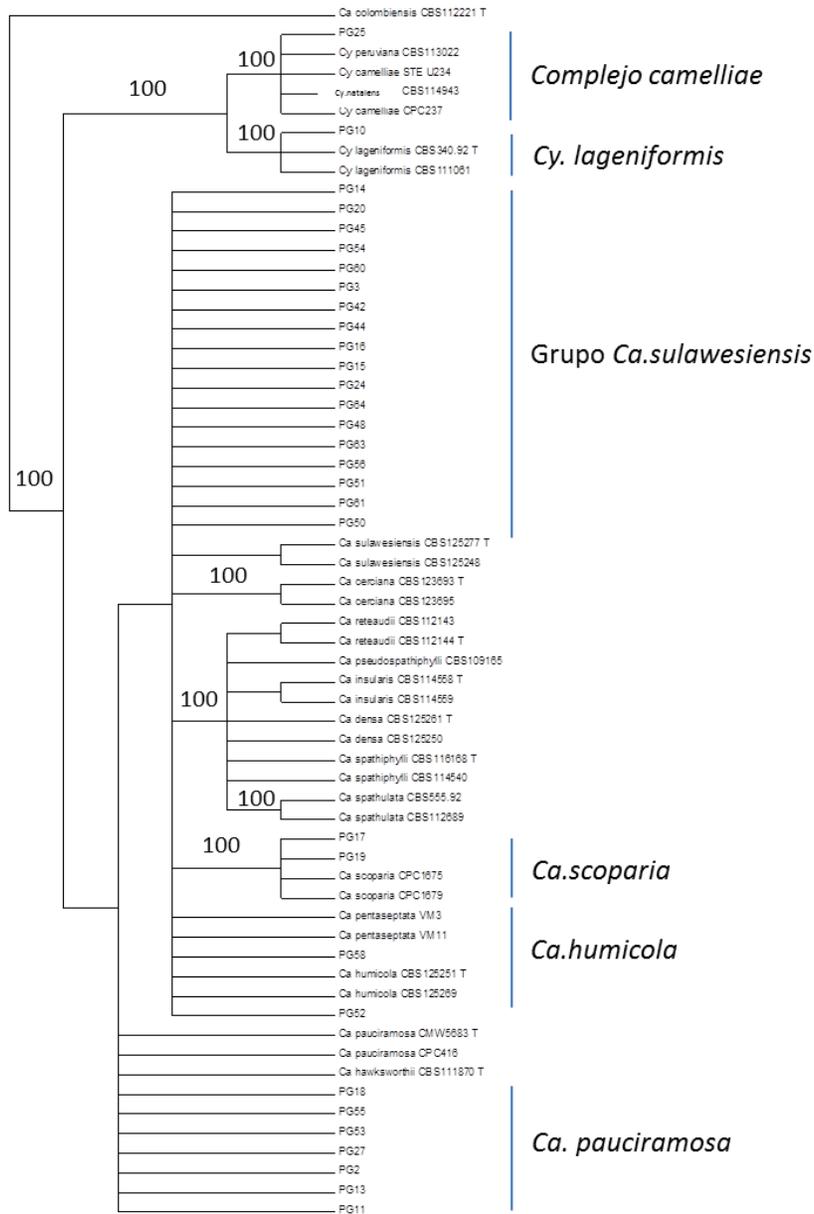


Figura 1. Uno de los 1000 árboles más parsimoniosos obtenidos de la búsqueda heurística con 1000 repeticiones de las secuencias de ITS del ADN ribosomal de las cepas en estudio y las más relacionadas según búsqueda de BLAST. Sobre las ramas se presentan los valores de Bootstrap mayores a 75. *Calonectria colombiensis* fue utilizado como taxón externo.

De acuerdo a dicho análisis se pudieron identificar tres cepas, dos pertenecientes a *Ca. scoparia* (PG 17 y PG 19) y una cepa (PG 10) a *Cy. langeriformis*. Veinte de las cepas se agruparon en el clado donde se encuentran *Ca. sulawesiensis* y *Ca. humicola*,

sin haberse logrado asociarse estrictamente a ninguna de estas especies. Sin embargo, mediante la búsqueda de BLAST 18 de las 20 secuencias tienen mayor similitud con *Ca. sulawesiensis* y dos de ellas con *Ca. humicola*. Esto fue posteriormente confirmado mediante la comparación de las secuencias donde se observó polimorfismo en nucleótidos simples (SNP por su sigla en inglés)(Cuadro 4).

Para el caso de las 18 cepas con mayor similitud a *Ca. sulawesiensis*, estas son idénticas a la cepa de referencia, con una única substitución de una base en la posición 421 del alineamiento. Mientras que para el caso de las dos cepas similares a *Ca. humicola*, sólo difieren en la posición 102 del alineamiento (Cuadro 4).

Debido a la falta de robustez del análisis filogenético para estos grupos, estas cepas se las nombra entre comillas, debido a que resta confirmar su identidad taxonómica. Siete cepas agruparon con *Ca. pauciramosa* y *Ca. hawksworthii*, siendo por BLAST más similares a *Ca. pauciramosa*, confirmado mediante el estudio de SNP. Donde presentan 4 substituciones, con referencia a la cepa tipo de *Ca. pauciramosa* y 5 con secuencia ITS de la cepa tipo de *Ca. hawksworthii* (Cuadro 4). La cepa restante agrupó en el complejo *camelliae*, teniendo en BLAST los mismos porcentajes de similitud con las especies *Cy. peruviana* y *Cy. camelliae* (Cuadro 4).

De las especies encontradas, "*Ca. sulawesiensis*" fue la que predominó, encontrándose en todos los viveros y en las muestras de Brasil (Cuadro 5). "*Ca. humicola*", *Cy. lageniformis* y la cepa perteneciente al grupo *Cy. camelliae* fueron aisladas en un único origen. La primera de ellas sólo en el vivero D y las siguientes sólo en el vivero A. Mientras que *Ca. scoparia*, se aisló únicamente de las muestras de plantines recibidas de Brasil. Por su parte, "*Ca. pauciramosa*" no se encontró en todos los sitios de muestreo, pero si fue encontrado en todos los sustratos analizados, suelo, compost, plantas y enjuague de bandejas (Cuadro 5 y 6). En el cuadro 7 se presenta una lista con las cepas aisladas en el presente estudio, así como su origen y su identificación.

Hubo una mayor variabilidad de especies en el compost analizado, de donde se aislaron 5 especies distintas, predominando "*Ca. pauciramosa*". Se lograron aislar 3 especies desde plantines con síntoma, de las cuales predominó "*Ca. sulawesiensis*".

Del suelo y del enjuague de bandejas, se logró aislar “*Ca. pauciramosa*” y “*Ca. sulawesiensis*”, con predominio de esta última (Figura 2).

Cuadro 4. Comparación de polimorfismos en nucleótidos simples de las secuencias de del ITS del ADNr.

Cepa	Sitios ITS							
	102	108	110	290	299	356	421	443
<i>Ca. sulawesiensis</i> T	A	A	C	T	T	A	G	T
PG 14	A	.
PG 20	A	.
PG 45	A	.
PG 54	A	.
PG 60	A	.
PG 3	A	.
PG 42	A	.
PG 44	A	.
PG 16	A	.
PG 15	A	.
PG 24	A	.
PG 64	A	.
PG 48	A	.
PG 63	A	.
PG 56	A	.
PG 51	A	.
PG 61	A	.
PG 50	A	.
PG 58	A	-
PG 52	A	-
<i>Ca. humicola</i> T	G	A	-
<i>Ca. pauciramosa</i> T	G	.	.	.	A	.	T	-
PG 2	.	C	-	.	A	T	T	-
PG 11	.	C	-	.	A	T	T	-
PG 13	.	C	-	.	A	T	T	-
PG 18	.	C	-	.	A	T	T	-
PG 27	.	C	-	.	A	T	T	-
PG 53	.	C	-	.	A	T	T	-
PG 55	.	C	-	.	A	T	T	-
<i>Ca. hawksworthii</i> T	G	.	.	C	A	T	A	-

Cepa	Sitios ITS			
	80	256	405	467
<i>Cy. camelliae</i> CPC 237	-	C	C	A
<i>Cy. camelliae</i> STE-U234	.	.	.	G
<i>Cy. peruviana</i> CBS 113022	.	.	.	G
PG 25	T	A	G	G

Cuadro 5. Número de cepas obtenidas de cada especie según el vivero de origen de la muestra.

Especie	Vivero A	Vivero B	Vivero C	Vivero D	Otros	N° cepas
" <i>Ca. humicola</i> "	-	-	-	2	-	2
" <i>Ca. pauciramosa</i> "	4	2	-	1	-	7
<i>Ca. scoparia</i>	-	-	-	-	2	2
" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	4	9	1	3	1	18
<i>Cy. lageniformis</i>	1	-	-	-	-	1
Complejo <i>camelliae</i>	1	-	-	-	-	1

(-) No se encontró la combinación.

Cuadro 6. Presencia/Ausencia de especies obtenidas en cada uno de los sustratos analizados.

Especie	Compost	Suelo	Plantin	Arena	Bandejas
" <i>Ca. humicola</i> "	Si	-	-	-	-
" <i>Ca. pauciramosa</i> "	Si	Si	Si	Si	Si
<i>Ca. scoparia</i>	-	-	Si	-	-
" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	Si	Si	Si	-	Si
<i>Cy. lageniformis</i>	Si	-	-	-	-
Complejo <i>camelliae</i>	Si	-	-	-	-

(-) No se encontró la combinación.

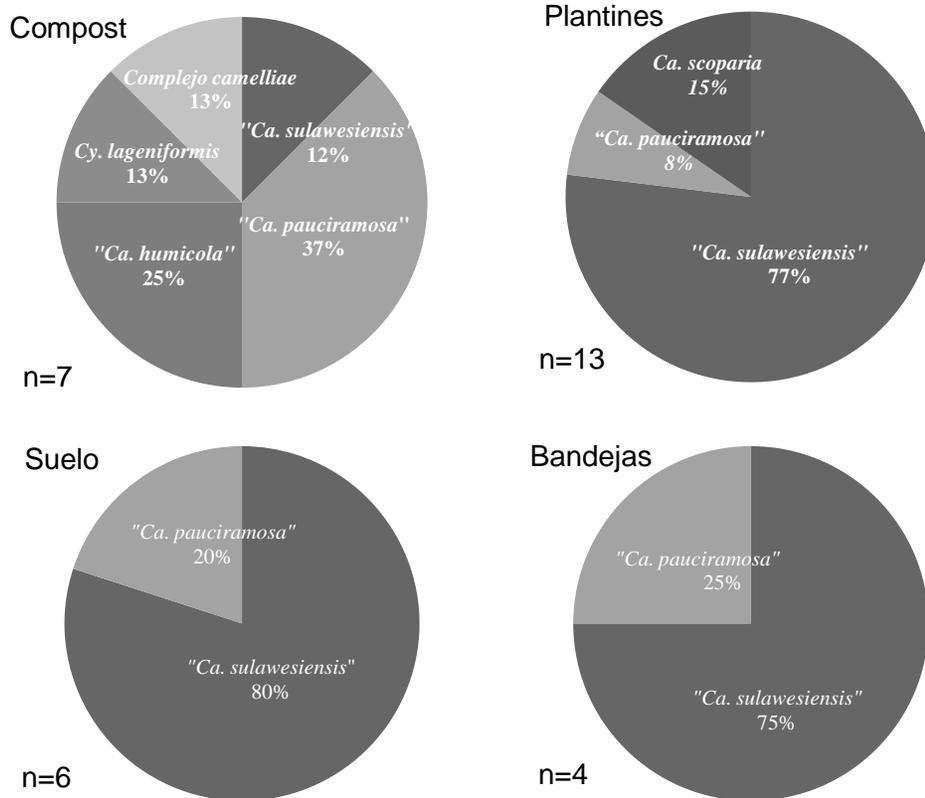


Figura 2. Presencia relativa de especies según sustrato. A) Porcentaje de especies presentes en las muestras de compost; B) porcentaje de especies en las muestras de plantines; C) porcentaje de especies en las muestras de suelo; D) porcentaje de especies en las muestras de bandeja.

Cuadro 7. Lista de cepas analizadas en este estudio.

Cepa	Especie	Vivero	Sustrato
PG52	" <i>Ca. humicola</i> "	D	Compost
PG58	" <i>Ca. humicola</i> "	D	Compost
PG11	" <i>Ca. pauciramosa</i> "	A	Compost
PG13	" <i>Ca. pauciramosa</i> "	A	Compost
PG 2	" <i>Ca. pauciramosa</i> "	A	Suelo
PG27	" <i>Ca. pauciramosa</i> "	A	Sustrato
PG18	" <i>Ca. pauciramosa</i> "	B	Arena
PG53	" <i>Ca. pauciramosa</i> "	B	Plantín
PG55	" <i>Ca. pauciramosa</i> "	D	Bandeja
PG17	<i>Ca. scoparia</i>	Brasil	Plantín
PG19	<i>Ca.scoparia</i>	Brasil	Plantín
PG16	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	A	Compost
PG 3	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	A	Suelo
PG14	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	A	Suelo
PG15	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	A	Suelo
PG42	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	B	Plantín
PG44	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	B	Plantín
PG45	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	B	Plantín
PG48	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	B	Plantín
PG50	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	B	Plantín
PG51	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	B	Plantín
PG61	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	B	Plantín
PG56	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	B	Plantín
PG64	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	B	Plantín
PG24	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	Brasil	Plantín
PG20	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	C	Suelo
PG54	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	D	Bandeja
PG63	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	D	Bandeja
PG60	" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	D	Bandeja
PG25	<i>Complejo camelliae</i>	A	Compost
PG10	<i>Cy. lageniformis</i>	A	Compost

DISCUSIÓN

El presente estudio representa la primera prospección de *Calonectria* y *Cylindrocladiella* realizada en viveros de eucalipto en Uruguay. Mediante la inferencia filogenética basada en la comparación de la región ITS del ADN ribosomal se pudo confirmar la presencia de cinco grupos taxonómicos en los viveros prospectados, y una especie en los plantines provenientes de Brasil muestreados. El método utilizado permitió confirmar la identidad de dos especies, *Ca. scoparia* asociada a las muestras de plantines provenientes de Brasil y *Cy. lageniformis* en una muestra de compost. No se pudo confirmar la identidad de las cepas restantes por la falta de resolución de la región ITS en las cepas en estudio, por lo que deberá continuarse el análisis con otros genes para realizar un análisis multigénico y obtener mayor resolución. Para esto se utilizan las regiones de β -tubulina e Histona H3, así como también TEF-1 α y la región que codifica para la calmodulina (Lombard *et al.* 2010c).

Cylindrocladiella peruviana, fue reportada por primera vez en 1982 como patógeno en *Eucalyptus camaldulensis*, *E. grandis*, *E. nitens*, *E. tereticornis* en Sudáfrica y en Brasil en *Eucalyptus* sp. (Crous 2002). Mientras que *Cy. camelliae*, fue reportada por primera vez por Boesew en 1982 (citado por Farr & Rossman, 2013), y hasta la fecha ha sido reportada en *E. camaldulensis*, *E. grandis*, *E. nitens*, *E. tereticornis* y *E. urophylla* en Sudáfrica; en suelo en Australia, Brasil, Nueva Zelanda y Sudáfrica (Farr & Rossman, 2013). Por otro lado, *Cy. lageniformis*, fue reportada por primera vez en 1993 por Crous, en Brasil y en Sudáfrica ha sido reportada en *Eucalyptus* sp. (Crous 2002). En el presente estudio la cepa asociada al complejo *Cy. camelliae* y *Cy. lageniformis* fueron aisladas únicamente de compost, no encontrándose asociada a plantines.

Calonectria pauciramosa ha sido reportada a nivel mundial en numerosas plantas huésped, incluso en Uruguay (Lombard *et al.* 2010 b). Esta especie ha estado asociada a enfermedades tales como damping-off, tizón foliar y pudrición de raíz y estacas. Tanto en África como en Australia se considera el patógeno dominante de viveros (Lombard *et al.* 2010b). En el presente estudio cepas pertenecientes al mismo clado que esta especie, fueron encontradas presente en todos los sustratos, en tres de los cuatro viveros muestreados, evidenciando la amplia distribución de esta especie en la región de Paysandú.

Calonectria sulawesiensis y *Ca. humicola* fueron descritas en el año 2010 por Lombard *et al.* (2010a), aisladas de *Eucalyptus* sp. en Indonesia y de suelo en Ecuador, respectivamente. En los sitios aquí analizados las cepas similares a *Ca. humicola* fueron poco frecuentes (sólo dos cepas), obtenidas de un único vivero y desde compost. Mientras que cepas similares a *Ca. sulawesiensis* fueron las más predominantes del muestreo, con presencia en todos los viveros y en la mayoría de los sustratos con excepción de la arena de los minijardines donde no fue recuperada en el muestreo realizado. Por lo tanto este estudio estaría evidenciando una mayor distribución geográfica de ambas especies.

Las muestras procesadas de Brasil, fueron las únicas de donde se aisló *Ca. scoparia*. Esta especie fue descrita en 1973 por Booth & Gibson (Crous *et al.* 1993). Éste es un patógeno de numerosos huéspedes y de distribución mundial. Se ha reportado que causa una amplia gama de síntomas de la enfermedad incluyendo pudrición de la raíz, putrefacción de estaca, cancro del tallo, manchas foliares, así como tizón en tallo y semillas (Crous *et al.* 1993).

Los resultados aquí presentados están acotados por lo limitado del muestreo, por lo cual permite un diagnóstico preliminar de la importancia de *Calonectria* y *Cylindrocladiella* como patógenos de viveros en Paysandú. Se deberán realizar más muestreos y en distintos momentos del año para verificar si estos resultados se confirman o si fueron apariciones puntuales del patógeno. De igual modo, el análisis molecular con la inclusión de más genes permitirá una identificación a nivel de especie para mejorar la resolución de aquellos grupos que aquí no se han podido confirmar.

Las cepas puras obtenidas pasaron a formar parte de la primera colección de cepas de *Calonectria* y *Cylindrocladiella* spp. de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República, Estación Experimental Mario Cassinoni, y constituyen el primer insumo disponibles para futuras investigaciones en el tema.

CONCLUSIONES

- Se encontró una gran riqueza de especies de *Calonectria* y *Cylindrocladiella* presentes en viveros de eucalipto, pese a lo acotado del muestreo (cuatro viveros de un mismo departamento, muestreados una única vez a fines del verano).
- Todas las especies identificadas han sido reportadas como patogénicas a excepción de *Cy. humicola* que ha sido reportada sólo en suelo.
- Este estudio representa la primera referencia nacional respecto a este grupo de patógenos en eucalipto. La completa identificación de las cepas aquí estudiadas deberá incluir otras regiones genómicas que permitan una mayor resolución. Sin embargo
- La ampliación del muestreo incluyendo distintas estaciones del año y otras regiones del país permitirá tener una mejor caracterización de la riqueza específica de estos patógenos a nivel nacional.
- El conocimiento de las especies presentes permiten una aproximación a la biología de las mismas y por consiguiente un acercamiento a un manejo más eficiente de las enfermedades causadas por estos patógenos.
- La colección de cepas conservadas en la EEMAC, permitirá estudios futuros que incluirán por ejemplo estudios de patogenicidad para caracterizar la capacidad de causar enfermedad de cada una y su respectiva agresividad, lo cual permitirá enfocar el manejo de esta enfermedad hacia las especies patógenas prioritarias.

BIBLIOGRAFIA

Alfenas, A.C, Valverde Zauza, E.A, Gonçalves Mafia, R, De Assis, T.F 2004. Clonagem e doenças do eucalipto. Ed. Universidade Federal de Viçosa. Brasil. Páginas 206-209 y 253-254

Aparecido, C.C, Finatti, D 2012. Impacto do gênero *Cylindrocladium* para diferentes culturas. Comunicados Técnicos. Governo estado do São Paulo

Baldini, A, Carballo, R, Telechea, N, Porcile, J 2006. Manual de campo. Plagas y enfermedades de Eucaliptos y pinos en el Uruguay. FAO/MGAP/Representación de FAO en Uruguay.

Brown B.N, Ferreira F.A. 2002. Disease during propagation of eucalypts. In: Keane, P.J, Kile, G.A, Podger, F.D, Brown B.N. (eds.). Diseases and pathogens of eucalypts. CISRO publishing. Australia. p:119-143

Crous, P.W 2002. Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota p. 278.

Crous, P.W, Alfenas, A.C, Wingfield, M.J 1993. *Calonectria scoparia* and *Calonectria morgani* sp.nov. and variation among isolates of their *cylindrocladium* anamorphs. *Mycology Research* 97:701:708.

Crous, P.W, Groenewald, J.Z, Hill, C.F 2002. *Cylindrocladium pseudonaviculatum* sp. nov. from New Zealand, and new *Cylindrocladium* records from Vietnam. *Sydowia* 54: 23–33.

Crous, P.W, Kang, J.C 2001. Phylogenetic of *Calonectria spathulata* and *Cylindrocladium leucothoes* based on morphology, and sequence data of the β -tubulin and ITS rRNA genes. *Mycoscience* 42: 57-57.

Crous, P.W, Groenewald, J.Z, Risède, J.M, Simoneau, P., Hywel-Jones, N.L 2004. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in Mycology* 50: 415–430.

Farr, D.F, Rossman, A.Y 2013. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved September 3, 2013, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>

Gonçalves, R.C, Alfenas, A, Maffia, L.A, Crous, P.W. 2001. Evaluation of bioassays to quantify *Cylindrocladium inocula* in soil. *Mycoscience* 42: 261-264.

Hillis, D.M, Bull, J.J 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42: 142e152.

Katoh, K, Kuma, K, Toh, H, Miyata, T 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33: 511-518.

Lombard, L, Crous, P.W, Wingfield, B.D, Wingfield, M.J. 2010a. Phylogeny and systematics of the genus *Calonectria*. *Studies in Mycology* 66: 31– 69.

Lombard, L, Crous, P.W, Wingfield, B.D, Wingfield, M.J 2010b. Multigene phylogeny and mating tests reveal three cryptic species related to *Calonectria pauciramosa*. *Studies in Mycology* 66: 15–30.

Lombard, L, Crous, P.W, Wingfield, M.J 2010c. Species concepts in *Calonectria (Cylindrocladium)*. *Studies in Mycology* 66: 1-14.

Lombard, L, Rodas, C.A, Crous, P.W, Wingfield, B.D, Wingfield, M.J 2009. *Calonectria (Cylindrocladium)* species associated with dying *Pinus* cuttings. *Persoonia* 23: 41-47

Lombard, L, Shivas, R.G, To-Anun, C, Crous, P. W 2012. Phylogeny and taxonomy of the genus *Cylindrocladiella*. *Mycological Progress* 11:835-868,

Lombard, L, Zhou, X.D, Crous, P.W, Wingfield, B.D, Wingfield, M.J 2010d. *Calonectria* species associated with cutting rot of *Eucalyptus*. *Persoonia* 24: 1–11.

Murry, M.G, Thompson, W.F 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321–4325.

Schoch, C.L, Crous, P.W, Polizzi, G, Koike, S.T 2001. Female fertility and single nucleotide polymorphism comparisons in *Cylindrocladium pauciramosum*. *Plant Disease* 85: 941–946

Schoch, C.L, Crous, P.W, Wingfield, B.D, Wingfield, M.J 2001b. Phylogeny of *Calonectria* based on comparisons of β -tubulin DNA sequences. *Mycological Research* 105: 1045-1052.

Schoch,C.L, Crous,P.W, Wingfield, M.J, Wingfield, B.D 2002. Phylogeny of *Calonectria* and selected hypocrealean species with cylindrical macroconidia. *Studies in Mycology*45, 45-62

Swofford, D.L2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10a. Sinauer Associates,Sunderland, MA.

Uruguay XXI. Promoción de inversiones y exportaciones. Sector Forestal.http://www.uruguayxxi.gub.uy/wp-content/uploads/2011/11/Sector-Forestal_UruguayXXI.pdf

White, T.J, Bruns, S, Lee, S, Taylor, J.W 1990. Amplification and direct sequencing of fungal genes for phylogenetics Pp 315–322 In: PCR protocols: a guide to methods and applications.Academic,eds. Innis, M.A., Gelfand,D.H., Sninsky, T.J White.Academic Press, Inc.,New York. .