

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ETIOLOGÍA DE PATÓGENOS CAUSANTES DE MANCHAS FOLIARES  
EN GUAYABO DEL PAÍS (*ACCA SELLOWIANA* (BERG.) BURRET) EN  
EL PAISAJE PROTEGIDO QUEBRADA DE LOS CUERVOS

por

Soledad DELGADO JORGE

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

MONTEVIDEO

URUGUAY

2015

Tesis aprobada por:

Directores: -----

Ing. Agr. PhD. Pedro Emilio Mondino Hintz

-----

Ing. Agr. PhD. Sandra María Alaniz Ferro

-----

Ing. Agr. MSc. Vivienne Nerina Gepp Ward

Fecha: 26 de marzo de 2015

Autora: -----

Soledad Andrea Delgado Jorge

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis directores Pedro Mondino y Sandra Alaniz por la dedicación, los aprendizajes, el apoyo y la paciencia en todo momento.

A Alejandra Calvete por transmitirme su cariño por el guayabo del país y la Quebrada de los Cuervos, su gente y su paisaje, además de la confianza y el apoyo imprescindibles que me permitieron realizar este trabajo.

A Mercedes Rivas, Margarita García, Beatriz Bellenda, Roberto Zoppolo y María Puppo por el apoyo y por darme la oportunidad inicial de trabajar en estos temas tan apasionantes para mí.

A todo el equipo del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, en especial a Laura Hernández por su paciencia e imprescindible colaboración.

A la gente de la Quebrada de los Cuervos por su haber abierto sus casas a las “muchachas de las guayabas” con tanta buena voluntad. Sin ellos este trabajo no hubiese sido posible.

Al productor Ricardo Masculiate por la colaboración a este trabajo.

A Beatriz Scatoni, Victoria Calvo, Leticia Bao y Felicia Duarte por el apoyo académico y emocional en todas las etapas de este trabajo.

A mi madre Raquel, mi compañero Nicolás y mi hermana Verónica por todo lo que ellos saben que han hecho para ayudarme a cumplir con este objetivo.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
1.1. OBJETIVO.....	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	3
2.1. EL GUAYABO DEL PAÍS.....	3
2.2. PRINCIPALES ENFERMEDADES QUE AFECTAN AL GUAYABO DEL PAÍS.....	3
2.3. PATÓGENOS ASOCIADOS AL GUAYABO DEL PAÍS EN EL URUGUAY.....	5
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	6
3.1. TOMA DE MUESTRAS.....	6
3.2. MANCHAS CON RELIEVE.....	8
3.2.1. <u>Observación al microscopio</u> .....	8
3.2.2. <u>Identificación fenotípica</u> .....	8
3.3. MANCHAS SIN RELIEVE.....	9
3.3.1. <u>Aislamiento</u> .....	9

3.3.2. <u>Identificación fenotípica</u> .....	10
3.3.3. <u>Identificación molecular</u> .....	10
3.3.3.1. Extracción de ADN.....	10
3.3.3.1. Amplificación por PCR y secuenciación.....	11
3.3.4. <u>Pruebas de patogenicidad</u> .....	12
3.3.4.1. Inoculación en hojas desprendidas.....	12
3.3.4.2. Inoculación en plantas de vivero.....	14
4. <u>RESULTADOS</u> .....	16
4.1. DESCRIPCIÓN DE MANCHAS FOLIARES.....	16
4.2. MANCHAS CON RELIEVE.....	17
4.3. MANCHAS SIN RELIEVE.....	18
4.3.1. <u>Aislamiento</u> .....	18
4.3.2. <u>Identificación fenotípica</u> .....	20
4.3.3. <u>Identificación molecular</u> .....	20
4.3.4. <u>Pruebas de patogenicidad</u> .....	21
4.3.4.1. Inoculación en hojas desprendidas.....	21
4.3.4.2. Inoculación en plantas de vivero.....	23
5. <u>DISCUSIÓN</u> .....	24
6. <u>CONCLUSIONES</u> .....	28
7. <u>RESUMEN</u> .....	29
8. <u>SUMMARY</u> .....	30
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	31

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Figura No.	Página
1. Área del Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos.....	7
2. Sitios de muestreo. A: plantas aisladas o en islas de árboles. B: plantas asociadas a envira, arrayán y canelón. C: plantas en el monte ribereño. D: plantas en laderas altas de suelos superficiales.....	7
3. Hojas desprendidas con y sin heridas, inoculadas, en cajas plásticas de Petri con algodón humedecido en el pecíolo para preservarlas de la desecación.....	14
4. Inoculación de plantas de vivero. A: Planta asperjada hasta punto de goteo. B: Plantas embolsadas luego de la inoculación.....	15
5. Tipos de manchas foliares observadas. A: Manchas de color pardo oscuro a negro, borde difuso, con relieve. B: Manchas de color pardo oscuro a rojizo, borde difuso, sin relieve.....	16

6. Estructuras del hongo <i>Phyllachora feijoa</i> . A: Asca con ascosporas (40X). B: Ascosporas (40X). C: $\beta$ -conidios (40X). D: peritecio (10X).....	17
7. Tipos de colonias observadas. A: colonia con abundantes masas de esporas de color negro (aislados 48 y 197). B: colonia con producción de conidios escasa e inmersos en el micelio (aislado 69). C: Detalle de la colonia típica de los aislados 48 y 197. D: detalle de la colonia típica del aislado 69.....	19
8. Cirros de conidios de <i>Pestalotiopsis clavispora</i> observados en las hojas puestas en cámara húmeda. A: hoja tierna con cirros de conidios y micelio. B: detalle de los cirros de conidios sobre hoja.....	20
9. Resultados de la inoculación en hojas desprendidas. Colonias monospóricas originales, síntomas observados en las hojas inoculadas y colonias reaisladas de las hojas inoculadas artificialmente.....	22
10. Resultados de la inoculación en plantas de vivero. A: aislamiento 48. B: aislamiento 69. C: aislamiento 197.....	23

## 1. INTRODUCCIÓN

El guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret) es un frutal nativo de mediano porte, originario del sureste de Brasil y noroeste de Uruguay (Thorp y Bielecki, 2002). Sus frutos son bayas de color verde y tamaño variable, de pulpa acidulada con sabor agradable y aroma característicos. Existen numerosos estudios acerca de sus excelentes propiedades nutraceuticas tanto en el Uruguay (Feippe et al., 2008) como en el resto del mundo (Bontempo et al. 2007, Weston 2010, Beyhan 2010). A pesar de que es un frutal conocido en las zonas rurales de Uruguay, su consumo y conocimiento en las ciudades es escaso, aunque recientemente ha sido promovido y nuevos estudios son llevadas a cabo por instituciones de investigación como el INIA, Facultad de Agronomía, LATU, y Facultad de Química (Cabrera et al. 2010, Lombardo et al. 2010, Santos et al. 2010, Vignale et al. 2010, Rivas et al. 2010, Mara 2012).

La “Quebrada de los Cuervos”, ubicada en el Departamento de Treinta y Tres, Uruguay, es un área caracterizada por presentar relieve ondulado dominado por praderas naturales que rodean un valle encajonado o “quebrada” propiamente dicha (Calvete, 2013). Se trata de un área de destacada belleza paisajística, que conecta los diferentes ambientes serranos del este del Uruguay con los bosques subtropicales de Río Grande del Sur (URUGUAY. MVOTMA. DINAMA, 2010). Fue declarada Paisaje Protegido por el Sistema Nacional de Áreas Protegidas en 2008. Conforman unas 4400 hectáreas, donde habitan pobladores dedicados principalmente a la ganadería ovina pero también con interés en la elaboración de productos artesanales y en el sector servicios. En esta área se encuentra la población natural de guayabos del país con mayor diversidad fenotípica (Puppo, 2008) y con presencia de materiales de sumo interés para el mejoramiento genético, el desarrollo del cultivo y el desarrollo de productos innovadores (Calvete, 2013).



Entre los años 2010 y 2013 se llevó a cabo en el departamento de Treinta y Tres el proyecto “Valorización de los recursos genéticos del guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret) como alternativa para el desarrollo local sostenible en la Quebrada de los Cuervos”, ejecutado por Facultad de Agronomía junto a otras instituciones (INIA, Facultad de Química, LATU) y financiado por CSIC y ANII. El objetivo principal de dicho proyecto consistió en realizar actividades de fitomejoramiento participativo con el fin de mejorar las poblaciones de guayabos, asegurando su uso y conservación (Rivas et al., 2010). A su vez, dadas las condiciones en la zona, propicias para comenzar a cultivar el guayabo del país de manera semi-comercial, surgió la necesidad de conocer los principales problemas sanitarios que se enfrentarían en el futuro. Por esto se planteó realizar una prospección de enfermedades presentes en las plantas silvestres de guayabo del país en la zona de estudio como objetivo secundario de dicho proyecto. Como resultado de la misma se pudo constatar que el principal problema sanitario es la presencia de manchas foliares en las plantas.

### 1.1. OBJETIVO

Como forma de dar continuidad a las investigaciones mencionadas, se propuso como objetivo de este trabajo de tesis:

Determinar la etiología de las enfermedades que causan manchas foliares en *Acca sellowiana* en el Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. EL GUAYABO DEL PAÍS

La especie *Acca sellowiana* (Berg) Burret conocida vulgarmente como guayabo del país, pertenece al orden Myrtales, familia Myrtaceae, subfamilia Mirtoideae, tribu Myrtae, género *Acca* (Berg) (Cronquist, 1981). Es un arbusto frutal de entre 2 y 4 metros de altura, con follaje perenne y tronco tortuoso de color castaño rojizo. Sus hojas son coriáceas con haz glabro y envés tomentoso. Sus flores son muy vistosas, hermafroditas y solitarias, y se encuentran en las axilas de las hojas de las ramas del año. Los pétalos son carnosos, pubescentes y comestibles. Es una especie predominantemente alógama, cuya polinización se da mediante insectos (Hymenoptera: Apoidea) y algunas aves. En el Uruguay el período de floración va desde octubre a fines de noviembre y el período de cosecha se extiende desde fines de febrero a mediados de mayo, dependiendo del origen del material vegetal (Vignale y Bisio, 2005).

### 2.2. PRINCIPALES ENFERMEDADES QUE AFECTAN AL GUAYABO DEL PAÍS

Existen diversas enfermedades que afectan al cultivo de guayabo del país. La mayoría de ellas es causada por hongos y su importancia relativa varía de una región a otra. Según Thorp y Bielecki (2002) en Nueva Zelanda las enfermedades foliares del guayabo del país son de poca importancia. Menciona la presencia de *Sphaceloma psidii*, patógeno restringido a muy pocos cultivares sensibles. También menciona la presencia de la fumagina (*Capnodium* sp.), pero ésta no constituye una verdadera enfermedad, sino que se trata de un hongo saprófito asociado a la presencia de algunos homópteros. En pre y poscosecha pueden darse problemas de pudriciones de frutos causados por diversos hongos, tales como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea* y

*Penicillium expansum.*

En Florida, EEUU, se ha reportado la presencia de *Pseudocercospora feijoa* ocasionando manchas foliares (El-Gholl et al., 1993). Mientras que en Colombia el hongo *Pestalotia* sp. ha sido citado como agente causal de la llamada “costra del fruto”. Esta enfermedad se caracteriza por producir en frutos manchas de color marrón claro, que a medida que envejecen, se transforman en costras (ubicadas en áreas deprimidas del fruto) de color oscuro (Campos, citado por Fischer et al., 2003). En hojas causa necrosis de las nervaduras hasta el pecíolo, llegando a causar defoliaciones en ataques importantes (Fischer et al., 2003). Según el mismo trabajo, otros patógenos destacados por su importancia en el guayabo son *Phytophthora* sp. (causando problemas de vigor y productividad), *Botrytis cinerea* y *Glomerella cingulata* (causando podredumbres de frutos), y *Alternaria* sp. (causando manchas necróticas en hojas y tallos).

En Brasil se mencionan los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea* y *Pseudocercospora feijoa* (Andrade y Ducroquet 1992, Bohneberger 2009, Katsuruyama y Boneti 2009) como los principales patógenos de este cultivo, siendo el primero el que ocasiona las mayores pérdidas. Por su parte, Costa et al. (2012) reportaron la presencia de *Phyllachora feijoa* produciendo manchas foliares.

### 2.3. PATÓGENOS ASOCIADOS AL GUAYABO DEL PAÍS EN URUGUAY

En nuestro país, al tratarse de un árbol nativo de escasa explotación comercial, no existen antecedentes de investigación acerca de las enfermedades y plagas que afectan al guayabo del país. El único antecedente encontrado es el trabajo de Pérez et al. (2009) quienes incluyeron al guayabo del país en una prospección y caracterización de los patógenos presentes en las especies de mirtáceas nativas y exóticas del país. Su objetivo no se centró en el guayabo en sí mismo, sino en la búsqueda de potenciales patógenos de eucaliptus presentes en las poblaciones de mirtáceas nativas. En dicho trabajo se detectó la presencia de *Pseudocercospora norchiensis* y *Passalora loranthi*, ambos hongos asociados a síntomas de manchas foliares en guayabo del país. A su vez, estos mismos autores encontraron el hongo *Diplodia pseudoseriata* como endófito.

Es de esperarse que el incremento del área cultivada con guayabo del país en el Uruguay implique la aparición de nuevas plagas y enfermedades o el incremento en importancia de las ya presentes. En especial los patógenos causantes de manchas foliares que afectan los rendimientos al reducir el área foliar fotosintética, pueden verse favorecidos con la concentración de su huésped en áreas de cultivo comercial.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. TOMA DE MUESTRAS

El muestreo se realizó en marzo de 2013 dentro de la población silvestre de guayabos del país en el Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos y su área adyacente (Figura 1) (Departamento de Treinta y Tres). La mayoría de las plantas se encontraron en islas de árboles más o menos compactas en campo natural y laderas medias (Figura 2.A), en general asociadas estrechamente a plantas de “envira” (*Daphnopsis racemosa*), “arrayán” (*Blepharocalix salicifolia*) y “canelón” (*Myrsine laetevirens*) (Figura 2.B). En menor proporción fueron muestreadas plantas que se encontraban en el monte ribereño (Figura 2.C) y en laderas altas de suelos superficiales (Figura 2.D).

A partir de un grupo de 96 plantas identificadas previamente, se seleccionaron 17 que presentaban síntomas severos de manchas foliares. De estas 17 plantas se extrajeron las muestras (brotes con hojas afectadas) procurando incluir los dos tipos de síntomas predominantes, manchas foliares con y sin relieve.

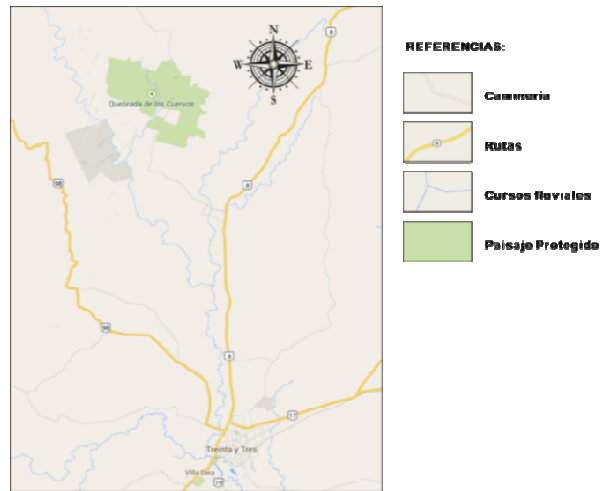


Figura 1. Área del Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos



Figura 2. Sitios de muestreo. A: plantas aisladas o en islas de árboles. B: plantas asociadas a envira, arrayán y canelón. C: plantas en el monte ribereño. D: plantas en laderas altas de suelos superficiales

Las muestras fueron identificadas y guardadas individualmente en bolsas de papel, colocadas en conservadora y llevadas al Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, donde se mantuvieron en heladera (5°C) hasta su procesamiento.

Las hojas con síntomas fueron separadas mediante observación visual y bajo microscopio estereoscópico en dos grupos de síntomas, correspondientes a los dos tipos de manchas predominantes: manchas con relieve y sin relieve.

## 3.2. MANCHAS CON RELIEVE

### 3.2.1. Observación al microscopio

En el caso de las manchas con relieve se realizaron cortes con micrótopo de mano y se hicieron observaciones bajo microscopio estereoscópico. Las estructuras fúngicas fueron observadas luego con microscopio óptico.

No se realizaron aislamientos en medio de cultivo a partir de las manchas con relieve, debido a que la observación de las estructuras fúngicas permitió reconocer la presencia de *Phyllachora feijoa*, un parásito obligado.

### 3.2.2. Identificación fenotípica

En el caso de las manchas con relieve se registró tamaño, color y forma de las estructuras fúngicas encontradas bajo microscopio a 400X de amplificación y utilizando una cámara digital (Dino-Eye, Taiwan) con el programa DinoCapture 2.0. Se observaron un total 10 peritecios, 10 ascas maduras con ascosporas, 50 ascosporas y 50  $\beta$ -conidios, provenientes de 10 hojas distintas elegidas al azar.

### 3.3. MANCHAS SIN RELIEVE

#### 3.3.1. Aislamiento

En este caso se procedió a aislar el agente causal. Adicionalmente, hojas con este tipo de manchas fueron colocadas en cámaras húmedas para inducir la aparición de signo del patógeno.

Las hojas con manchas sin relieve fueron desinfestadas superficialmente con alcohol 70% durante 20 segundos, luego con bisturí se cortaron pequeños trozos (aproximadamente 4 mm<sup>2</sup> cada uno) de la zonas de avance de las manchas. Estos trozos fueron desinfestados superficialmente sumergiéndolos en hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto. Posteriormente fueron enjuagados dos veces con agua destilada estéril. Luego de secados en papel de filtro estéril fueron sembrados en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) enmendado con antibiótico (Sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich, China) (0,2 gL<sup>-1</sup>).

Las placas fueron selladas con parafilm e incubadas en estufa a 25°C en oscuridad. Luego de 4 días de incubación las colonias desarrolladas a partir de los trozos sembrados fueron repicadas a otras placas de PDA. Las placas se mantuvieron en estufa a 25°C con 12 horas de fotoperíodo de luz cercana al ultravioleta (T8 BLB de 220V) y luz fluorescente (LUZ DO DIA, OSRAM UNIVERSAL 20W, k8a8 C.6, Brasil) para favorecer su esporulación.

Para asegurar la pureza genética de los aislados, de las colonias originales se obtuvieron cultivos monospóricos. Para ello a partir de la zona esporulada se tomó una porción del hongo con asa y se colocó en tubos éppendorf de 2 mL que contenían 2 mL de agua destilada estéril. La concentración de esporas se contó con cámara de Neubauer y se ajustó a 1x10<sup>3</sup> esporas por mL mediante diluciones. Luego se sembraron 100µL de



dicha suspensión en placas con medio PDA esparciendo con asa de Drigalski. Transcurridas 24 horas y con el uso de aguja hipodérmica, se seleccionó bajo lupa y microscopio una espora germinada aislada de las demás y se repicó a una nueva placa con medio PDA.

### 3.3.2. Identificación fenotípica

En el caso de las manchas sin relieve, luego de 7 días de crecimiento en medio PDA a 25°C y en oscuridad, se registró en todos los aislados coloración de las colonias y aspecto del micelio. De cada aislado se observaron bajo microscopio a 400X de amplificación 50 conidios y se registró la forma y tamaño (largo y ancho) de cada uno utilizando la cámara digital (Dino-Eye, Taiwan) con el programa DinoCapture 2.0. En el caso de la forma se consideraron tres elementos: número de células del conidio, color y número de apéndices.

Los aislados fueron inicialmente separados en dos grupos de acuerdo a la apariencia de las colonias (diferente color y apariencia del micelio). Tres aislados representativos (48, 69 y 197) fueron seleccionados para realizar la identificación molecular y las pruebas de patogenicidad.

### 3.3.3. Identificación molecular

#### 3.3.3.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN de los tres aislados monospóricos seleccionados fue realizada a partir de micelio de colonias crecidas durante diez días en medio PDA a 25°C en oscuridad, siguiendo el protocolo de extracción descrito en Delgado (2013).

### 3.3.3.2. Amplificación por PCR y secuenciación

Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó la región 5,8S-ITS que comprende las secuencias de los espaciadores transcriptos internos ITS1 e ITS2 y el gen 5,8S que codifica para el ARNr, con los cebadores universales ITS1/ITS4 (White et al., 1990). La mezcla de reacción contenía 1X de tampón (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 de ADN extraído. La mezcla se ajustó con agua mQ (EASYpure™ LF, BARNSTEAD THERMOLYNE CORPORATION) a un volumen final de 40 μL. Las amplificaciones se efectuaron utilizando un termociclador MultiGene™ Mini (Labnet Internacional Inc., Estados Unidos). El programa consistió en un primer paso a 94°C durante 3 minutos para la desnaturalización, seguido por 34 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 57°C durante 30 segundos y 72°C por 45 segundos y, finalmente, 72°C durante 10 minutos para completar las extensiones.

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (AMRESCO®, Estados Unidos) al 1,5%, preparado con tampón TBE 0,5X (TBE 1X = tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH=8,0). El marcador de peso molecular utilizado fue una mezcla de bandas de ADN de 100 pb de diferencia (Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder Plus, Fermentas, Alemania). Para la visualización de las bandas, los geles se tiñeron en solución acuosa con GelRed™ (Biotium, Estados Unidos) (5 μL GelRed, 2 ml NaCl 2,5 M y 48 mL de agua) y se expusieron en el trans-iluminador (DyNA Light Dual Intensity UV Transiluminator, Labnet Internacional Inc., Estados Unidos). Se tomaron registros fotográficos con un sistema de fotodocumentación DigiDoc-It™ (Ultra-VioletProducts Ltd., Reino Unido).

Los productos amplificados fueron secuenciados en el Instituto Pasteur de Montevideo. Una vez obtenidas las secuencias, éstas fueron alineadas en el programa Clustal W (Larkin et al., 2007) que se encuentra implementado dentro del programa MEGA5 (Tamura et al., 2011), Posteriormente fueron editadas utilizando como apoyo los cromatogramas. Finalmente fueron comparadas con las depositadas en la base de datos del GenBank utilizando el recurso BLAST.

#### 3.3.4. Pruebas de patogenicidad

Con los tres aislados seleccionados se realizaron pruebas de patogenicidad tanto en hojas desprendidas como en plantas de vivero.

##### 3.3.4.1. Inoculación en hojas desprendidas

Se seleccionaron hojas sin síntomas visibles de guayabo del país, procedentes de plantas sanas y vigorosas del parque de Facultad de Agronomía (Sayago). Las hojas fueron clasificadas de acuerdo a su edad en tres grupos: hojas jóvenes (HJ) de brotes tiernos, hojas de mediana edad (HM) provenientes de ramas de crecimiento del año y hojas totalmente desarrolladas (HA). Se agruparon por edad de la hoja ante la eventualidad de que existiese algún tipo de resistencia ontogénica y se evaluaron dos métodos de inoculación: sin heridas y con heridas en las hojas previo a la inoculación.

Preparación de inóculo: a partir de colonias crecidas durante 7 días en medio PDA, en oscuridad y a 25°C de cada uno de los aislados, se obtuvieron suspensiones de esporas. Para ello 10mL de agua destilada estéril se volcaron en cada placa sobre la colonia esporulada. Mediante raspado con asa y posterior filtrado con gasa estéril se obtuvo la suspensión inicial de conidios cuya concentración fue ajustada a  $1,0 \times 10^6$  conidios.mL<sup>-1</sup> mediante diluciones. El conteo de los conidios se efectuó en microscopio óptico usando una cámara de Neubauer.

#### Inoculación de hojas sin heridas

Cinco hojas de cada edad fueron inoculadas con cada uno de los tres aislados. En cada hoja se aplicó una gota de 10 $\mu$ L de la suspensión ajustada. Adicionalmente cinco hojas de cada edad fueron inoculadas en forma similar pero con agua destilada estéril, las que fueron utilizadas como control.

Posteriormente a la inoculación, todas las hojas fueron colocadas en placas de Petri sobre papel humedecido con 100 $\mu$ L de agua estéril y con un trozo de algodón humedecido envolviendo el pecíolo para evitar su desecación. Las placas conteniendo las hojas se mantuvieron en el laboratorio a temperatura ambiente durante 10 días (Figura 3).

#### Inoculación de hojas con heridas

Cinco hojas de cada edad fueron heridas con aguja estéril (4 perforaciones por hoja en la zona media) y luego inoculadas con cada uno de los tres aislamientos como fue explicado anteriormente. Adicionalmente cinco hojas de cada edad fueron inoculadas con agua destilada estéril, las que fueron utilizadas como control.

Posteriormente a la inoculación, todas las hojas fueron colocadas en placas de Petri sobre papel humedecido con 100 $\mu$ L de agua estéril y con un trozo de algodón humedecido envolviendo el pecíolo para evitar su desecación. Las placas conteniendo las hojas se mantuvieron en el laboratorio a temperatura ambiente durante 10 días (Figura 3).

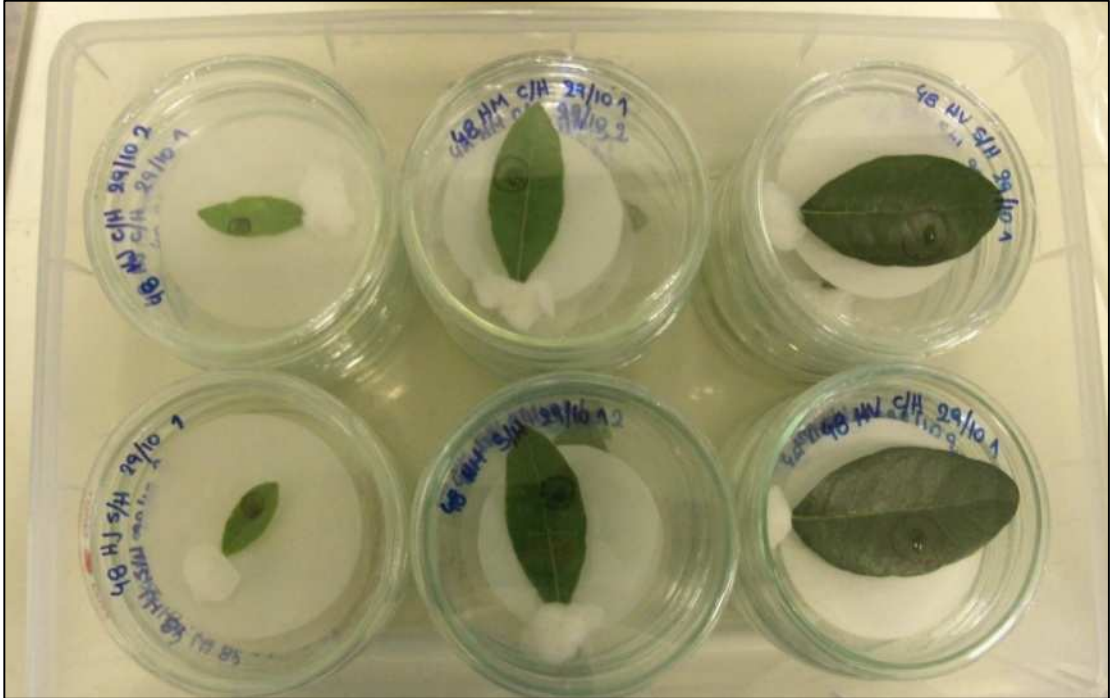


Figura 3. Hojas desprendidas con y sin heridas, inoculadas, en cajas plásticas de Petri con algodón humedecido en el pecíolo para preservarlas de la desecación.

#### 3.3.4.2. Inoculación de plantas de vivero

Se utilizaron plantas de guayabo del país de seis meses de edad y aproximadamente 40 cm de altura, provenientes de un vivero de la ciudad de San Carlos, departamento de Maldonado. Las mismas se podaron de modo de dejar un solo tallo principal y de ese modo facilitar tanto la inoculación como la observación de los síntomas. Se marcó un brote joven por planta y en todas las hojas del mismo se practicaron cuatro heridas con aguja en la mitad derecha del haz.

Se preparó una suspensión de conidios de  $1,0 \times 10^6$  conidios.mL<sup>-1</sup> como fue descrito anteriormente. Las plantas fueron asperjadas con 5 mL de la suspensión de conidios utilizando un aspersor manual. La aspersion se realizó

desde la parte superior hasta punto de goteo y dando prioridad a las primeras 15 hojas del tallo desde el ápice (Figura 4.A). Por cada aislamiento se realizaron tres repeticiones. Plantas control fueron asperjadas con agua destilada estéril.

Luego de la inoculación cada planta fue cubierta con una bolsa plástica transparente, de modo de mantener elevada la humedad relativa y facilitar así la penetración del hongo en el tejido vegetal (Figura 4.B). Las bolsas fueron retiradas 48 horas después y las plantas se mantuvieron a una temperatura ambiente por 20 días.

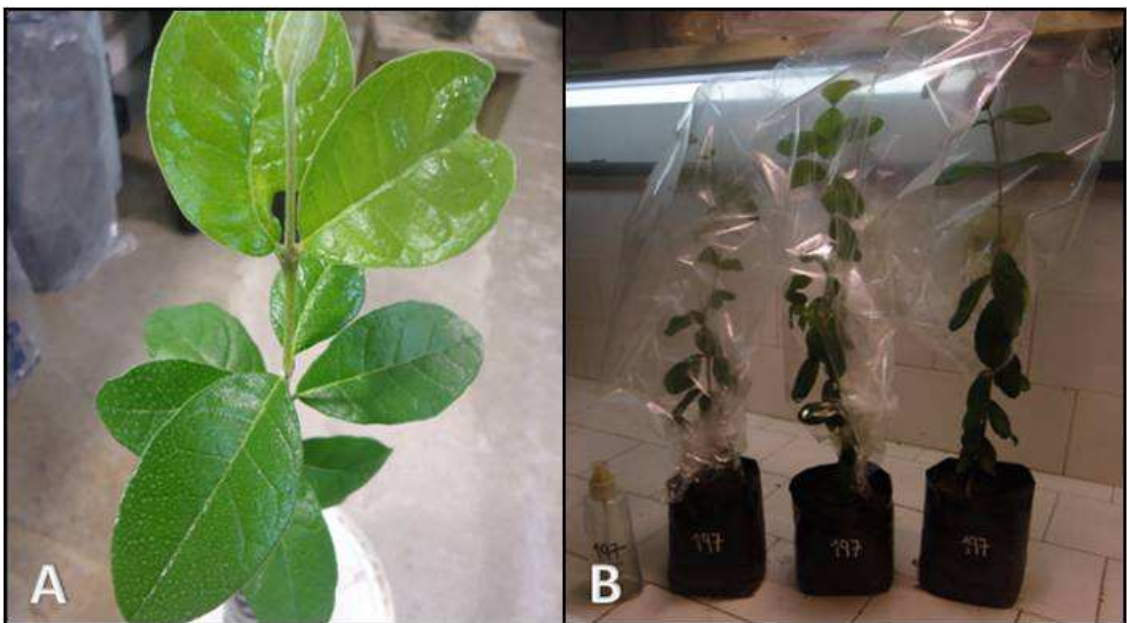
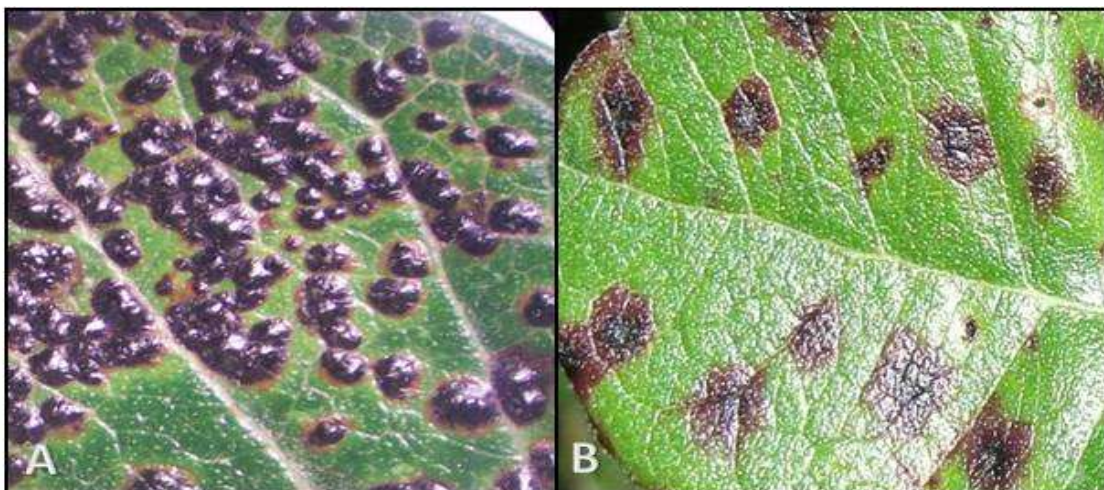


Figura 4. Inoculación en plantas de vivero. A: planta asperjada hasta punto de goteo. B: plantas embolsadas luego de la inoculación.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. DESCRIPCIÓN DE MANCHAS FOLIARES

Se pudo comprobar la existencia de manchas foliares en las plantas de guayabo del país que crecen naturalmente en la zona objeto de este estudio. Su presencia fue generalizada y en la mayoría de los casos presentando altos niveles de severidad. La observación visual y bajo lupa permitió distinguir dos tipos de síntomas predominantes (Figura 5). El primer tipo de síntoma consistió en manchas de color pardo oscuro a negro, borde difuso, color marrón claro, con relieve y generalmente presente en hojas viejas (Figura 5.A). El segundo tipo de síntoma consistió en manchas de color pardo oscuro a rojizo, borde difuso de color rojizo, sin relieve y presente en todos los estadios de madurez de las hojas (Figura 5.B). Ambos tipos de manchas se observan en el haz de las hojas y no son perceptibles desde el envés. Figura 5. Tipos de manchas



foliares observadas. A: manchas de color pardo oscuro a negro, borde difuso, con relieve, de entre 2 y 5 mm de ancho. B: manchas de color pardo oscuro a rojizo, borde difuso, sin relieve, de entre 2 y 8 mm de ancho



## 4.2. MANCHAS CON RELIEVE

La observación bajo microscopio estereoscópico de las manchas con relieve permitió detectar la presencia de estructuras fúngicas sobresaliendo en el centro de las mismas.

La observación al microscopio óptico de las estructuras extraídas de las manchas permitió detectar la presencia de peritecios con ascas conteniendo ascosporas y de  $\beta$ -conidios característicos de *Phyllachora feijoa* (Figura 6).

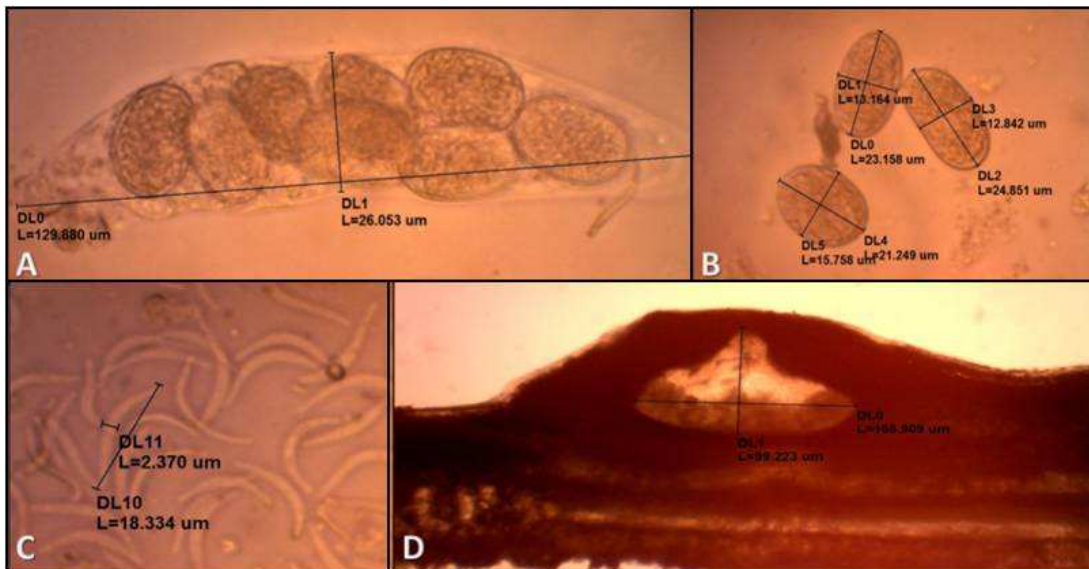


Figura 6. Estructuras del hongo *Phyllachora feijoa*. A: Asca con ascosporas (400X). B: Ascosporas (400X). C:  $\beta$ -conidios (400X). D: peritecio (100X).

Los peritecios observados fueron solitarios y agrupados, de forma esférica a subsférica; en promedio midieron 245  $\mu$ m de alto por 418  $\mu$ m de ancho (n=10). Las ascas fueron unitunicadas, cilíndricas a clavadas, de paredes finas, con 8 ascosporas, de 108  $\mu$ m de largo por 25  $\mu$ m de ancho en promedio (n=20). Las ascosporas fueron elipsoidales a cilíndricas, aseptadas, hialinas, de 23  $\mu$ m de largo por 14  $\mu$ m de ancho en promedio (n=30).



Los  $\beta$ -conidios presentaron forma curva, aseptados, con paredes delgadas, hialinos, de 16  $\mu\text{m}$  de largo por 2  $\mu\text{m}$  de ancho en promedio (n=30).

### 4.3. MANCHAS SIN RELIEVE

#### 4.3.1. Aislamiento

A partir de las manchas sin relieve se aislaron colonias fúngicas, blancas, algodonosas y de rápido crecimiento (cubriendo toda la placa en aproximadamente 10 días) (Figura 7). Luego de 15 días de incubación a 23°C, se produjo abundante masas de esporas de color negro sobre algunas de las colonias (Figura 7.A y 7.C). En otras la producción de conidios fue escasa e inmersa en el micelio (Figura 7.B y 7.D).

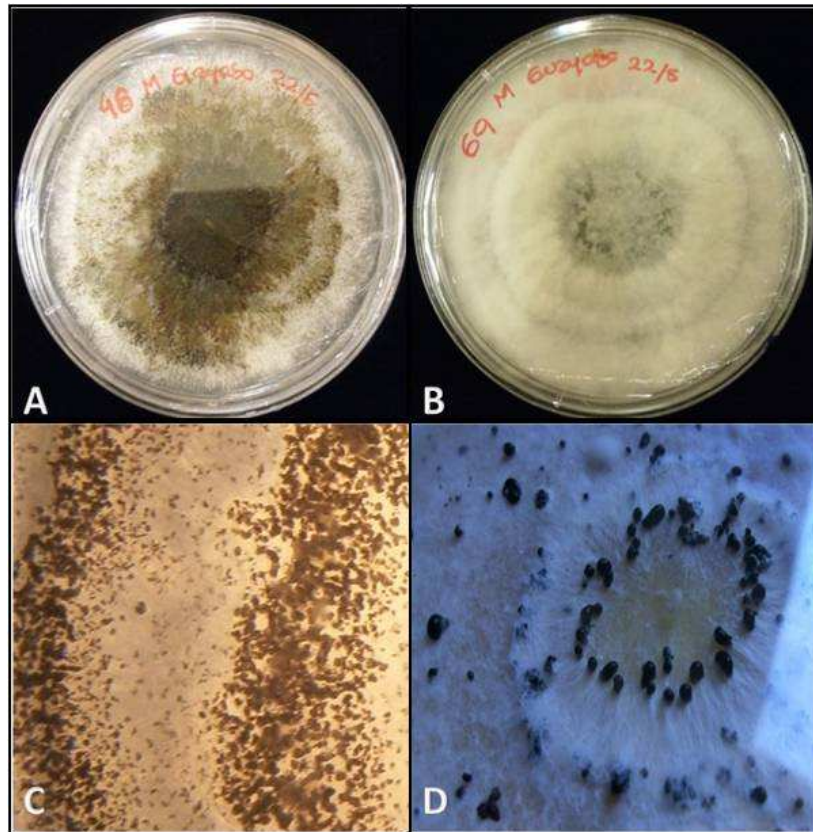


Figura 7. Tipos de colonias observadas. A: colonia con abundante masas de esporas de color negro (aislados 48 y 197). B: colonia con producción de conidios escasa e inmersos en el micelio (aislado 69). C: detalle de la colonia típica de los aislados 48 y 197. D: detalle de la colonia típica del aislado 69.

Luego de 7 días en cámara húmeda fue posible observar sobre las hojas abundantes cirros de conidios de color oscuro (Figura 8).

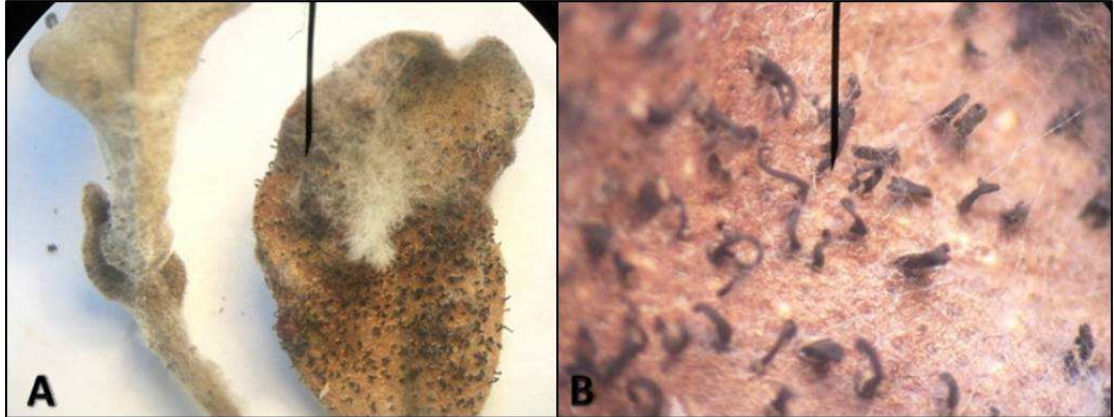


Figura 8. Cirros de conidios observados en las hojas puestas en cámara húmeda. A: hoja tierna con cirros de conidios y micelio. B: detalle de los cirros de conidios sobre hoja.

#### 4.3.2. Identificación fenotípica

Mediante la observación de caracteres culturales y de la forma y tamaño de los conidios, ambos tipos de colonia se identificaron como *Pestalotiopsis* sp. (Keith et al., 2006). Estas presentaron conidios fusiformes, con 5 células, la célula basal y la apical hialinas, las células medias de color marrón oscuro; con un apéndice basal corto y 2 a 4 apéndices apicales largos.

#### 4.3.3. Identificación molecular

El alineamiento indicó que las secuencias de la región ITS del ADNr de los tres aislados estudiados eran idénticas. La comparación de las secuencias con las depositadas en el GenBank presento 99 % de homología con las secuencias AY682927 y KJ921777 pertenecientes a dos aislados identificados como *Pestalotiopsis clavispora*. En base a estos resultados podemos afirmar que los tres aislados obtenidos de guayabo del país pertenecen a la especie *P. clavispora*.

#### 4.3.4. Pruebas de patogenicidad

##### 4.3.4.1. Inoculación en hojas desprendidas

Los tres aislados evaluados causaron enfermedad tanto en hojas jóvenes como en hojas de mediana edad con y sin heridas. Las hojas adultas no se enfermaron en ningún caso, así como tampoco las hojas testigo inoculadas solamente con agua. El desarrollo de los síntomas comenzó 7 días luego de la inoculación y consistió en manchas necróticas redondeadas. No se apreciaron diferencias entre los aislados en la severidad de los síntomas ocasionados. Las colonias reaisladas a partir de las hojas enfermas tuvieron las mismas características morfológicas que las colonias originales (Figura 9).





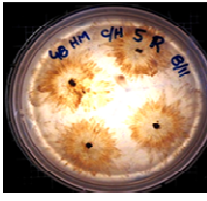




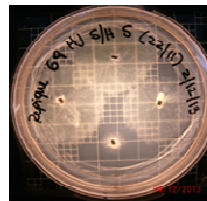
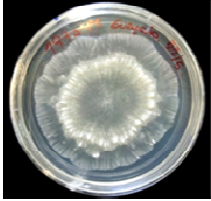


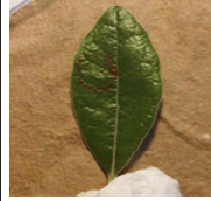

	Colonias monospóricas elegidas a los 7 días	Infección en hojas desprendidas			Colonia reaislada
		Con heridas	Sin heridas	Testigo	
48					
69					
197					

Figura 9. Resultados de la inoculación en hojas desprendidas. Colonias monospóricas originales, síntomas observados en las hojas inoculadas y colonias reaisladas de las hojas inoculadas artificialmente.

#### 4.3.4.2. Inoculación en plantas de vivero

Al igual que en las hojas desprendidas, los tres aislados evaluados causaron enfermedad en las plantas de vivero. En ningún caso se observaron síntomas en las hojas que no fueron previamente heridas, así como tampoco en ninguna de las hojas de las plantas testigo. Los primeros síntomas se observaron a partir de los 30 días de realizada la inoculación, haciéndose progresivamente más evidente, avanzando desde el centro hacia el borde de las hojas (Figura 10). No se apreciaron diferencias en la severidad entre los inóculos probados.

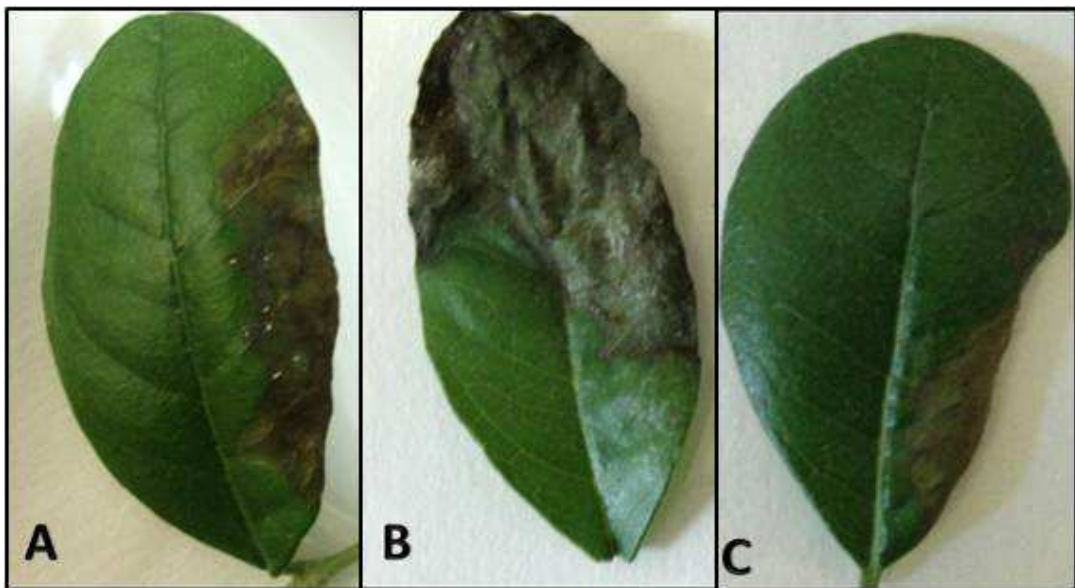


Figura 10. Resultados de la inoculación en plantas de vivero. A: aislamiento 48. B: aislamiento 69. C: aislamiento 197.

## 5. DISCUSIÓN

Dado que el cultivo comercial del guayabo del país se encuentra aún en un estado incipiente de desarrollo, no existen antecedentes nacionales de estudios sobre la sanidad de este cultivo. Las manchas foliares constituyen el principal problema sanitario en plantas de guayabo del país que crecen naturalmente en la zona del Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos. Su presencia es generalizada y con altos niveles de severidad. Las condiciones climáticas de nuestro país (caracterizado por primaveras lluviosas) favorecen la evolución de los patógenos foliares en general.

En este trabajo se pudo confirmar la presencia de los hongos *Phyllachora feijoa* y *Pestalotiopsis clavispora* causando manchas foliares.

La presencia de *Phyllachora feijoa* no es un hecho sorprendente ya que este hongo ha sido reportado produciendo la enfermedad conocida como mancha de asfalto en guayabos del país en el sur de Brasil por Costa et al. (2012), en una zona de vegetación natural que podría asemejarse a la de la zona muestreada en el presente trabajo. Además, según el mismo autor, la mayoría de las accesiones de hongos pertenecientes a este género, parásitos obligados de mirtáceas nativas de Brasil, se han hecho con materiales provenientes del “cerrado” brasileño, un área rica en organismos endémicos de todo tipo.

Todos los miembros del género *Phyllachora*, que engloba unas 1000 especies, son parásitos obligados de muchas familias de angiospermas (Parbery y Langdon, 1964), especialmente de fabáceas (Cannon, 1991) y poáceas (Parbery, 1971). Algunas de sus especies son consideradas patógenos importantes, por ejemplo del cultivo de maíz, como pasa con *Phyllachora maydis* Maubl en ciertas zonas productivas de México (Pereyda-Hernández et al., 2009). Unas 70 especies están asociadas a mirtáceas en todo

el mundo (Farr y Rossman, citados por Costa et al., 2012). Hasta nuestro conocimiento este es el primer reporte de este patógeno produciendo enfermedad en *Acca sellowiana* en Uruguay.

En nuestro trabajo se pudo observar la producción de ascosporas y de  $\beta$ -conidios sobre las hojas afectadas por lo que probablemente este hongo se valga de ambos tipos de esporas para producir infecciones.

De todas las hojas con síntomas de manchas foliares sin relieve pudo aislarse consistentemente colonias del género *Pestalotiopsis* e identificadas molecularmente como *Pestalotiopsis clavispora*. La presencia de este patógeno afectando guayabo del país en Uruguay no es extraña ya que especies de *Pestalotiopsis* son comunes en climas tropicales y templados y pueden causar enfermedades (Das et al., 2010). Wright et al. (1998) plantearon que especies de *Pestalotiopsis* sólo infectan plantas heridas o estresadas, por lo que la generación de heridas juega un rol importante en el desarrollo de la enfermedad. Este hecho se pudo confirmar en este trabajo ya que solo cuando las hojas fueron heridas antes de ser inoculadas fue posible infectar plantas sanas.

Hongos de este género antiguamente fueron considerados patógenos débiles u oportunistas que causan poco daño a algunas plantas de escasa importancia económica, pero en los últimos años han aumentado considerablemente los reportes de enfermedades causadas por ellos (Keith et al., 2006).

*Pestalotiopsis clavispora* es un patógeno conocido en Uruguay, donde ha sido reportado como agente causal de la muerte de brotes y ramitas de arándano (*Vaccinium corymbosum*) (González et al., 2013). El presente trabajo se limitó al estudio de los patógenos causantes de manchas foliares, sin embargo la presencia de *Pestalotiopsis* sp. causando costras en fruto ha sido



constatada por investigadores de INIA LAS BRUJAS en frutos del sur<sup>1</sup>. Tampoco descartamos que este patógeno pueda afectar ramitas y brotes como está citado en arándano. A su vez, este mismo patógeno ha sido reportado causando daños en frutos de guayaba brasilera (*Psidium guajava*), otra mirtácea emparentada con el guayabo del país, en Hawaii (Keith et al., 2006).

A pesar de que los aislados seleccionados presentaron diferencias fenotípicas, fue posible mediante el análisis molecular de las regiones ITS determinar que todos pertenecen a la misma especie. Esto destaca la importancia del uso de herramientas moleculares en la identificación de hongos fitopatógenos.

Ambos patógenos pueden llegar a ser un problema de entidad si el cultivo de guayabo del país se desarrolla comercialmente por lo que serán necesarios estudios epidemiológicos que sirvan de base para el manejo de estas enfermedades. En el mismo sentido, sería interesante incluir la resistencia a este tipo de manchas foliares en los programas de selección y mejoramiento de guayabo del país.

En este trabajo no fue posible detectar la presencia de *Pseudocercospora norchiensis* ni de *Passalora loranthei*, ambos patógenos citados por Pérez et al. (2009) como causantes de manchas foliares en guayabo del país en Uruguay. En el caso del presente trabajo, los muestreos fueron realizados en un período del año (marzo) y el muestreo se limitó al área Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos. Por esto no se puede descartar su presencia en otras épocas del año ni en otras zonas con condiciones microclimáticas diferentes.

Este trabajo constituye una base para futuros estudios epidemiológicos

---

<sup>1</sup> Leoni, C. 2014. Com. personal.

así como la evaluación de medidas de control de ambos patógenos si se pretende continuar el desarrollo comercial de este cultivo en Uruguay.

## 6. CONCLUSIONES

Las manchas foliares causadas por hongos constituyen uno de los principales problemas sanitarios de las plantas silvestres de guayabo del país en la zona del área de Paisaje Protegido Quebrada de los cuervos.

*Pestalotiopsis clavispora* y *Phyllachora feijoa* son los patógenos responsables de producir manchas foliares en las plantas silvestres de *Acca sellowiana* de la zona de la Quebrada de los Cuervos, causando manchas sin relieve y con relieve respectivamente.

Hasta donde hemos podido conocer, este es el primer reporte de la presencia de ambos patógenos causando enfermedad en guayabo del país en Uruguay.

Serán necesarios futuros estudios epidemiológicos y de control de estas enfermedades si se pretende desarrollar áreas de cultivo comercial de guayabo del país en Uruguay.

La resistencia a ambas enfermedades debería considerarse en los programas de mejoramiento genético de este cultivo.

## 7. RESUMEN

El guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret) es un frutal nativo de mediano porte, originario del sureste de Brasil y noroeste de Uruguay. Sus frutos presentan un sabor y aroma característico, además de tener muy buenas propiedades nutraceuticas. Si bien su producción comercial en la zona de origen aún es escasa, tiene un gran potencial. Durante el año 2013 se observaron en el Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos (Treinta y Tres) numerosas plantas silvestres con abundantes síntomas de manchas foliares. Este trabajo tuvo como objetivo determinar la etiología de los agentes causales de manchas foliares en guayabo del país. Se detectaron dos tipos de manchas predominantes. Una de ellas consistió en manchas de 3 a 10 mm de diámetro, borde difuso, color marrón claro, con relieve debido a la presencia de estructuras fúngicas y generalmente presente en las hojas más viejas. El otro tipo consistió en manchas del mismo tamaño y también borde difuso pero de color pardo oscuro a rojizo, sin relieve y presente en hojas de diferentes estados de desarrollo. La observación bajo lupa y microscopio de las estructuras presentes en el primer tipo de mancha permitió detectar la presencia de peritecios con ascas y ascosporas que se identificaron como correspondientes al hongo biotrofo *Phyllachora feijoa*. Del segundo tipo de síntoma se realizaron aislamientos en medio de cultivo obteniéndose consistentemente colonias que por sus características morfológicas y culturales se identificaron como pertenecientes al género *Pestalotiopsis*. El análisis de la región ITS permitió determinar molecularmente que pertenecen a la especie *Pestalotiopsis clavispora*. Mediante inoculación de estos aislados en hojas desprendidas fue posible reproducir los mismos síntomas observados en el campo. Asimismo el patógeno fue reaislado y caracterizado nuevamente, cumpliendo con los postulados de Koch.

Palabras clave: Guayabo del país; *Acca sellowiana*; Enfermedad; *Pestalotiopsis clavispora*; *Phyllachora feijoa*.

## 8. SUMMARY

The pineapple guava (*Acca sellowiana* (Berg.)Burret) is a native fruit of medium size, from south-eastern Brazil, and northwestern Uruguay. Its fruits have a characteristic flavor and aroma, as well as having very good nutraceutical properties. While commercial production in the area of origin is still low, has great potential. During the 2013 many wild plants with abundant leaf spot symptoms were observed in the Protected Landscape Quebrada de los Cuervos (Treinta y Tres). This study aimed to determine the etiology of the causative agents of pineapple guava leaf spots in the country. Two types of spots predominated. One was light brown, had a diameter of 3-10 mm, a diffuse edges, embossed due to the presence of fungal structures and generally present in older leaves. The other consisted of spots of the same size and diffuse edges but dark brown to reddish, without relief and present in leaves of different developmental stages. The observation under the stereoscopic and optical microscope of the structures present in the first type of leaf spot showed the presence of perithecia with asci and ascospores that were identified as corresponding to the biotrophic fungus *Phyllachora feijoa*. From the second type of symptom isolations in culture medium consistently yielded colonies that by their morphological and cultural characteristics were identified as belonging to the genus *Pestalotiopsis*. The analysis of the ITS region showed that the isolates belonged to the species *Pestalotiopsis clavispora*. By inoculation of these isolates on detached leaves it was possible to reproduce the same symptoms observed in the field. The pathogen was reisolated and characterized again, fulfilling Koch's postulates.

Key words: Pineapple guava; *Acca sellowiana*; Disease; *Pestalotiopsis*

*clavispora*; *Phyllachora feijoa*.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. ANDRADE, E. R.; DUCROQUET, J. P. H. J. 1992. Antracnose em goiabeira serrana. In: Congreso Nacional de Horticultura (4º, 1992, Montevideo). Resúmenes. Montevideo, Sociedad Uruguaya de Horticultura. p.31.
2. BEYHAN, O.; ELMASTAS, M.; GEDIKLI, F. 2010. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of leaf, dry fruit and fresh fruit of feijoa (*Acca sellowiana*, Myrtaceae) J. Med. Plants Res. 4(11): 1065-1072.
3. BOHNEBERGER, A. L. 2009. Ocorrência do gorgulho *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae) e manejo das principais doenças e pragas na goiabeira serrana (*Acca sellowiana*) com ênfase na homeopatia. Maestría en Ciencias Agroveterinarias. Lages, Brasil. UDESC. 93 p.
4. BONTEMPO, P.; MITA, L.; MICELI, M.; DOTO, A.; NEBBIOSO, A.; DE BELLIS, F.; CONTE, M.; MINICHIELLO, A.; MANZO, F.; CARAFA, V.; BASILE, A.; RIGANO, D.; SORBO, S.; CASTALDO, R.; SCHIAVONE, E. M.; FERRERA, F.; DE SIMONE, M.; VIETRI, M. T.; CIOFFI, M.; SICA, V.; BRESCIANI, F.; LERA, A.; ALTUCCI, L.; MOLINARI, A. M. 2007. *Feijoa sellowiana* derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39: 1902-1914.
5. CABRERA, D.; RODRÍGUEZ, P.; VIGNALE, B.; MARA, V. 2010. Avances en la propagación por enraizamiento de estacas semi□leñosas de guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). In: Encuentro Nacional sobre Frutas Nativas (5º, 2010, Salto). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp 43-47. (Actividades de Difusión

no. 602).

6. CALVETE, A. 2013. Contribución al mejoramiento genético participativo de guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg. Burret)) en el paisaje protegido Quebrada de los Cuervos. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 86 p.
7. CANNON, P. F. 1991. A revision of *Phyllachora* and some similar genera of the host family *Leguminosae*. Mycol. Paper. 163: 1-302.
8. COSTA, L. C.; MACEDO, D. M.; BARRETO, R. W. 2012. Reappraisal and neotypification of *Phyllachora feijoa*. IMA FUNGUS. 3 (1): 9-14.
9. CRONQUIST, A. 1981. An integrate system of classification of flowering plants. New York, Columbia University. 1262 p.
10. DAS RANJANA, C. M.; DAS K, J. 2010. Factors affecting sporulation of *Pestalotiopsis disseminata* causing grey blight disease of *Persea bombycina* Kost., the primary food plant of muga silkworm. Crop Prot. 29:963–968.
11. DELGADO, L. M. 2013. Caracterización de especies de *Botryosphaeriaceae* asociadas al cultivo de manzano en Uruguay. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas –Microbiología. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias. 78 p.
12. EL-GHOLL, N. E., ALFIERI JR., S. A.; SCHUBERT, T. S.; SCHOULTIES, C. L. 1988. *Pseudocercospora feijoa* sp. nov. causing a leaf spot disease on *Feijoa sellowiana*. Florida Myc. 80 (6): 769-775.
13. \_\_\_\_\_; SCHUBERT, T. S.; ALFIERI Jr., S. A. 1993. *Pseudocercospora* leaf spot of feijoa. Florida Department of Agriculture and Consumer Service. Division of Plant Industries. Pathology Circular no. 358. 2 p.

14. FEIPPE, A.; PERALTA ALTIER. G.; IBÁÑEZ. F.; VIGNALE. B.; CABRERA, D.; ZOPPOLO. R. 2008. Valor nutricional de los frutos nativos del Uruguay; *Eugenia uniflora* (Pitanga); *Psidium cattleianum* (Arazá); *Acca sellowiana* (Guayabo del país) y *Myrcianthes pungens* (Guaviyú). Revista INIA. no. 15: 33-35.
15. FISCHER, G.; MIRANDA LASPRILLA, D.; CAYÓN SALINAS, G.; MAZORRA AGUDELO, M. 2003. Cultivo, poscosecha y exportación de la Feijoa (*Acca sellowiana* Berg.). Bogotá, PRODUMEDIOS. 152 p.
16. GONZÁLEZ, P.; ALANIZ, S.; MONTELONGO, M. J.; RAUDUVINICHE, L.; REBELLATO, J.; SILVERA-PÉREZ, E.; MONDINO, P. 2013. First Report of *Pestalotiopsis clavispora* causing dieback on Blueberry in Uruguay. Plant Dis. 96 (6): 914.
17. KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. 2009. Antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*): principal doença da goiabeira serrana (*Acca sellowiana*) no sul do Brasil. In: Workshop Sudamericano sobre *Acca sellowiana* (1º, 2009, São Joaquim). Resúmenes. Florianópolis, SC, s.e. 1 disco compacto.
18. KEITH, L. M.; VELASQUEZ, M. E.; ZEE, F. T. 2006. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. Plant Dis. 90:16-23.
19. LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LÓPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON T. J.; HIGGINS, D. G. 2007. ClustalW and ClustalX versión 2. Bioinformatics. 23(21): 2947-2948.
20. LOMBARDO P., VIGNALE B., CABRERA D., RODRÍGUEZ P. 2010.



Fenología reproductiva y autocompatibilidad en Guayabo del país, *Acca sellowiana* (Berg) Burret. In: Encuentro Nacional sobre Frutas Nativas (5º, 2010, Salto). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 41-42 (Actividades de Difusión no. 602).

21. MARA, V. 2012. Aportes al conocimiento de la biología floral y reproductiva y caracterización del Guayabo del País (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 64 p.
22. PARBERY, D. G.; LANGDON, R. F. N. 1964. Studies on graminicolous species of *Phyllachora* Fckl. IV. Evaluation of the criteria of species. *Aus. J. Botany*. 12: 265-281.
23. \_\_\_\_\_. 1971. Studies on graminicolous species of *Phyllachora* Nke. *In*Fckl. *Aus. J. Botany*. 19: 207-235.
24. PEREYDA-HERNÁNDEZ, J.; HERNÁNDEZ-MORALES, J.; SANDOVAL-ISLAS, S.; ARANDA-OCAMPO, S.; DE LEÓN, C.; GÓMEZ-MONTIEL, N. 2009. Etiología y manejo de la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* Maubl.) del maíz en Guerrero, México. *Agrociencia*. 43: 511-519.
25. PÉREZ, C. A.; WINGFIELD, M. J.; SLIPPERS, B.; ALTIER, N.; SIMETO, S.; BLANCHETTE, R. A. 2009. Interacción biológica del monte nativo y las plantaciones exóticas; el caso de las enfermedades en mirtáceas. In: Seminario Técnico de Sanidad Forestal (2009, Tacuarembó). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 21-34 (Actividades de Difusión no. 594).
26. PUPPO, M. 2008. Prospección y caracterización de poblaciones silvestres de *Acca sellowiana* (Guayabo del país). Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 123 p.

27. RIVAS, M.; AYRES, C.; ZOPPOLO, R.; CABRERA, D.; DELLACASSA, E.; BELLENDIA, B.; GARCÍA, M.; SILVEIRA, A.; VIGNALE, B.; ZÁCCARI, F.; PUPPO, M.; MARTÍNEZ, N.; IRISITY, M.; CALVETE, A. 2010. Valorización de los recursos genéticos del guayabo del país. Revista INIA. no. 23: 38 – 41.
28. SANTOS, E.; VERA, M.; MENDOZA, Y.; DÍAS CETI, S.; CABRERA, D.; VIGNALE, B. 2010. Polinizadores de *Acca sellowiana* (Berg) Burret – Guayabo del País. In: Encuentro Nacional sobre Frutas Nativas (5º, 2010, Salto). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 16-21 (Actividades de Difusión no. 602).
29. TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. 2011. MEGA5; Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. and Evol. 28: 2731-2739.
30. THORP, G.; BIELESKI, R. 2002. Feijoas; origins, cultivation and uses. Auckland, New Zealand, David Bateman. 87 p.
31. URUGUAY. MINISTERIO DE VIVIENDA, ORDENAMIENTO TERRITORIAL Y MEDIO AMBIENTE. DIRECCIÓN NACIONAL DE MEDIO AMBIENTE. 2010. Plan de manejo del paisaje protegido Quebrada de los Cuervos. Montevideo. 85 p.
32. VIGNALE, B.; BISIO, L. 2005. Selección de frutales nativos en Uruguay. Agrociencia (Montevideo). 9 (1-2): 35-39.
33. \_\_\_\_\_; CABRERA, D.; NEBEL, J. P.; LOMBARDO, P. 2010. Selección de frutas nativas. In: Seminario Biodiversidad (2010, Piriápolis). Resúmenes. Piriápolis, PPR. MGAP. pp. 17-20.

34. WESTON, R. J. 2010. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae); a review. *Food Chem.* 121: 923-926.
35. WRIGHT, E. R.; RIVERA, M. C.; FLYNN, M. J. 1998. First report of *Pestalotiopsis guepinii* and *Glomerella cingulata* on blueberry in Buenos Aires (Argentina). *Boletín OEPP/EPPO.* 28:219–220.