IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES FÚNGICAS ASOCIADAS A MANCHAS FOLIARES Y CANCROS EN *EUCALYPTUS*

Carlos Pérez[4], Darío Fros[4], Nora Altier[5], Guillermo Pérez[6], Michael Wingfield[6] y Robert Blanchette[7]

Introducción

En los últimos 15 años en el sector forestal de Uruguay han coincidido dos factores que generalmente se asocian a incrementos en el riesgo de ocurrencia de epifitias: i) el incremento explosivo en el área plantada con *Eucalyptus* y ii) la gran concentración del área con básicamente dos especies *E. grandis* y *E. globulus* (las cuales en el 2005 componían el 90% del área). Ambos factores resultan en una gran disponibilidad de sustrato para los patógenos presentes. Paralelamente, la expansión en el área vino de la mano de la introducción de gran cantidad de germoplasma con el consiguiente riesgo de introducir microorganismos asociados al mismo. Así, se ha observado un incremento relativo de los problemas sanitarios observados en las plantaciones, y ha quedado en evidencia que se conoce muy poco acerca de la identidad de estos patógenos en Uruguay.

Un importante número de especies fúngicas tienen la capacidad de causar enfermedades en plantaciones de *Eucalyptus*, entre las cuales, especies de "*Botryosphaeria"* y "*Mycosphaerella"* (entre comillas porque actualmente se sabe que a estos grupos lo integran otros géneros además de los dos originalmente identificados) conforman dos de los principales grupos de patógenos que afectan actualmente las plantaciones de eucalipto, especialmente plantaciones jóvenes.

La principal medida de manejo para minimizar el impacto de las enfermedades es la utilización de genotipos resistentes o tolerantes a las mismas. Así, las empresas forestales en busca de minimizar el impacto de las enfermedades sobre la producción deben caracterizar la resistencia de los distintos genotipos de eucalipto y realizar selección o caracterización de los materiales a plantar. Para dicha evaluación, no solo es necesario tener un correcto conocimiento de las especies de patógenos presentes en el país, sino además, tener una caracterización genética y fenotípica de las poblaciones de los mismos. Dicha información es aún muy preliminar en Uruguay. Por tal motivo, en el 2005 la Facultad de Agronomía inició un trabajo de investigación interinstitucional con alianzas con el INIA, la Facultad de Ciencias, la Universidad de Minnesota (EUA) y la Universidad de Pretoria (Sudáfrica) con el objetivo de identificar las especies fúngicas asociadas a manchas foliares y cancros en las plantaciones de *Eucalyptus* del país. Desde el 2005 se están visitando plantaciones comerciales de *Eucalyptus* en todo el país, tomándose muestras de hojas, ramas y fuste con y sin síntomas, procediéndose al aislamiento e identificación de los hongos asociados a dichos órganos.

En este artículo se presenta un resumen de los resultados más relevantes encontrados en dicho estudio respecto a las especies fúngicas presentes, sus hospederos y su distribución geográfica. El proyecto ha sido parcialmente financiado por Forestal Oriental, Stora Enso, Weyerhaeuser Uruguay, la Universidad de Minnesota, la Universidad de Pretoria, el INIA (modalidad FPTA 221) y la Universidad de la República.

Especies fúngicas asociadas a cancros

Los antecedentes indican que distintas especies de "*Botryosphaeria"* han sido encontradas como endófitos en eucalipto, habitando en los tejidos del mismo sin causar enfermedad (Bettucci y Saravay, 1993; Bettucci y Alonso, 1997; Bettucci et al. 1999; Bettucci *et al*., 2004; Pavlic *et al.*, 2004, Slippers *et al.*, 2004). Esto ha llevado a considerar a dichas especies como patógenos oportunistas, con limitada capacidad de matar tejidos sanos. Sin embargo, al encontrarse como endófito, cuando el árbol se encuentra en condiciones de estrés, "*Botryosphaeria"* encuentra un nicho favorable para desarrollar la enfermedad y causar perjuicios económicos

[4] Departamento Protección Vegetal, EEMAC, Fac. de Agronomía.
[5] Protección Vegetal, INIA-Las Brujas.
[6] FABI, Universidad de Pretoria, Sudáfrica
[7] Departamento de Patología Vegetal, Universidad de Minnesota, EUA.

(Old y Davison, 2000; Slippers y Wingfield, 2007). Esta característica ha posicionado a "*Botryosphaeria"* como un patógeno de consideración, principalmente para aquellas plantaciones fuera de sitio, o plantaciones sujetas a estrés ambiental severo como por ejemplo la falta o exceso de agua.

La expansión del cultivo de *Eucalyptus* en Uruguay ha llevado a seleccionar sitios de plantación que muchas veces no son adecuados para la especie a plantar, resultando en una situación de estrés que muchas veces se ve agravada ante excesos o déficit hídrico y/o la ocurrencia de temperaturas extremas. El calentamiento global estima que más importante que el incremento de la temperatura media, es el aumento de la frecuencia de ocurrencia de condiciones extremas, lo que hace pensar que una elección de un correcto sitio de plantación junto con una correcta elección del material genético a plantar, se tornarán fundamentales al momento de planificar el manejo sanitario de las plantaciones.

En Uruguay, es común observar cancros en el fuste en las plantaciones forestales, principalmente en plantaciones de *E. globulus*. Dichos cancros raramente matan al árbol, pero se han observado efectos significativos sobre el volumen y la calidad de la madera producida. A su vez, un fuste con cancros dificulta el descortezado y la acumulación de kino afecta al proceso de blanqueado de las fibras. Sumado a esto, Balmelli y Resquín (2005) encontraron un efecto significativo de los cancros sobre la sobrevivencia y rebrote de las cepas. Aquellos árboles con mayor nivel de infección presentaron menor capacidad de rebrote y menor sobrevivencia de la cepa.

En el presente estudio luego de analizar muestras provenientes de distintas especies de *Eucalyptus* y de distintas regiones del país, se puede concluir que hay al menos tres especies de Botryosphaeriaceae asociadas a *Eucalyptus*: *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum eucalyptorum*, y un grupo de aislamientos que fueron identificados dentro del complejo de especies *Neofusicoccum parvum-N. ribis* (Cuadro 1).

Cuadro 1: Listado de especies de Botryosphaeriaceae aisladas de muestras con y sin síntomas en las distintas especies de *Eucalyptus* por departamento incluidas en la prospección.

	N. eucalyptorum	*N. parvum-N.ribis*	*B. dothidea*
E. camaldulensis	Treinta y Tres	-	-
E. cinerea	Río Negro	Tacuarembó	Tacuarembó
E. dunnii	Florida Tacuarembó	-	-
E. ficifolia	-	Paysandú	-
E. globulus	Durazno Lavalleja Rio Negro Rocha	Durazno Rocha Tacuarembó	-
E. grandis	Durazno Lavalleja	Tacuarembó	Tacuarembó
E. maidenii	Durazno Lavalleja Río Negro	Durazno	Durazno
E. robusta	-	Tacuarembó	Tacuarembó
E. tereticornis	Paysandú	-	-
E. viminalis	Lavalleja	-	-

Neofusicoccum eucalyptorum ha sido aislado en una amplia zona geográfica, al igual que *N. parvum-N. ribis*, por el contrario, *B. dothidea* sólo ha podido aislarse de muestras de *Eucalyptus* provenientes de Tacuarembó y Durazno (Cuadro 1). Estos resultados no indican que *B. dothidea* no esté presente en el resto de las regiones, sino que debido a lo exhaustivo del muestreo y su escasa aparición, se puede concluir que de estar

presente, la frecuencia relativa de la misma es muy baja. En este mismo sentido, del total de aislamientos obtenidos, *N. eucalyptorum* ha sido la especie predominante, seguida por *N. parvum-N. ribis*.

Si bien gran parte de los aislamientos han sido obtenidos a partir de muestras asintomáticas, algunos aislamientos de *N. parvum-N.ribis* y *B. dothidea* han sido aislados de cancros, no así *N. eucalyptorum*.

Actualmente se está evaluando la patogenicidad de estos aislamientos en ensayos de inoculación artificial con el objetivo de identificar aquellas especies y genotipos más agresivos y así poder brindar a los programas de mejoramiento la posibilidad de testear los materiales a plantar frente a los genotipos más agresivos del patógeno.

Especies fúngicas asociadas a manchas foliares

En Uruguay, las principales manchas foliares observadas en *Eucalyptus* están asociadas a las llamadas "manchas por *Mycosphaerella*". Sin embargo, es bien conocido que existe un amplio rango de especies capaces de causar dicha enfermedad, más allá del género *Mycosphaerella*. Actualmente se conocen más de 120 especies de hongos pertenecientes a las familias Mycosphaerellaceae y Teratosphaeriaceae como especies asociadas a manchas foliares del *Eucalyptus*.

Este grupo de patógenos puede causar manchas foliares, tizón foliar y/o cancros en ramas y fuste, afectando el normal crecimiento del árbol (Park et al. 2000). Carnegie et al. (1994) analizó el efecto de las "*manchas por Mycosphaerella*" en *E. globulus* y encontró una correlación negativa entre la severidad de la enfermedad y la altura y diámetro del árbol. En otro estudio se han encontrado efectos tan severos como que un 10% de infección resultó en un 17% de reducción en la altura de *E. globulus* en plantaciones comerciales (Carnegie *et* al. 1998). Otras investigaciones concluyen que el crecimiento del árbol fue significativamente reducido cuando mas del 25% del follaje juvenil de *E. nitens* fue perdido por causa de las "manchas por *Mycosphaerella*" (Lundquist and Purnell 1987). Estos resultados, conjuntamente con los ataques observados en Uruguay desde principios del 2007 permiten tener una aproximación a la importancia de esta enfermedad para el rubro forestal, y la necesidad de generar información que permita al sector forestal contar con herramientas para minimizar su impacto en la producción.

En Uruguay, cuatro especies habían sido reportadas, *M. marksii, M. walkeri, T. pseudosuberosa, T. suberosa* y *T. molleriana* (sin. de *T. vespa*) (Balmelli *et al*., 2004; Crous et al. 2006), sin embargo hay evidencias que indican que otras especies podrían estar presentes. Por tal motivo, en el año 2005 se iniciaron prospecciones en plantaciones de *Eucalyptus* en todo el país para lograr identificar las especies de "*Mycosphaerella*" presentes, su asociación con las especies de *Eucalyptus* y su distribución geográfica.

Cuadro 2: Listado de especies aisladas de manchas foliares en las distintas especies de *Eucalyptus* por departamento incluidas en la prospección.

	Eucalyptus dunnii	*E. globulus*	*E. grandis*	*E. maidenii*	*E. tereticornis*	*E. viminalis*
Kirramyces gauchensis	-	Paysandú	Tacuarembó	Florida	Paysandú Rivera	-
Mycosphaerella aurantia	-	-	Río Negro	-	-	-
M. heimii	Río Negro	-	-	-	-	-
M. lateralis	Río Negro	-	-	-	-	-
M. marksii	Durazno Río Negro	Durazno Florida	Río Negro	Florida	-	-
M. scytalidii	Río Negro	Durazno	Río Negro	-	-	-
Pseudocercospora norchiensis	Río Negro Rivera	Paysandú	Río Negro	-	-	-
Teratosphaeria	-	Durazno	-	-	-	-

molleriana						
T. nubilosa	-	Colonia Lavalleja Paysandú Rocha	-	Paysandú	-	-
T. ohnowa	-	-	-	-	-	Lavalleja
T. pluritubularis	-	Durazno	-	-	-	-

Los resultados obtenidos confirman la presencia de una gran diversidad de especies asociadas a manchas foliares en *Eucalyptus*. Algunas de dichas especies aparecen como más específicas asociadas a un determinado hospedero, como el caso de *M. aurantia, M. heimii, M. lateralis, T. ohnowa* y *T. pluritubularis*, mientras otras parecen ser menos específicas como por ejemplo *K. gauchensis* y *M. marksii.*

Al igual que lo anteriormente mencionado para las Botryosphaeriaceae, el Cuadro 2 no es conclusivo, y no se puede afirmar de que por ejemplo *M. lateralis* no está presente en *E. tereticornis*, pero es claro que aquellas especies que se encuentren en una mayor frecuencia en las plantaciones son más fácilmente detectadas. Bajo ese supuesto, este cuadro permite tener una estimación de cuales son las especies fúngicas más frecuentemente asociadas a manchas foliares en cada especie de *Eucalyptus*.

Cabe mencionar que además de las especies mencionadas en el Cuadro 2, durante las prospecciones se observaron síntomas y signos de *Kirramyces epicoccoides* en hojas viejas de *E. grandis* y *E. dunnii*, en distintas zonas del país. Por consiguiente, en el presente estudio se encontraron 12 especies fúngicas distintas asociadas a manchas foliares en distintas especies de *Eucalyptus*. La no detección de *T. pseudosuberosa, T. suberosa* y *M. walkeri*, previamente reportadas en Uruguay pero no encontradas en nuestro estudio, podría indicar una baja frecuencia de ocurrencia de dichas especies en las plantaciones del país.

A las 12 especies encontradas asociadas a manchas foliares del *Eucalyptus* se le deben sumar *T. parva* reportada por Lupo et al. (2008) asociada a manchas foliares en *E. globulus* en el departamento de Río Negro.

Un comentario especial merece la reciente aparición de *T. nubilosa* atacando severamente las plantaciones de *E. globulus* en la totalidad del país. La sintomatología característica de esta enfermedad fue primeramente observada en el litoral oeste en enero del 2007 en plantaciones de *E. globulus* (Carlos Pérez, com. pers; Bettucci et al 2007) sin embargo la confirmación de la identidad del agente causal fue posterior (Lupo et al., 2008; Pérez et al., 2009).

En dicho estudio, además de confirmarse por primera vez la ocurrencia de *T. nubilosa* en Uruguay, lo cual fue a su vez el primer reporte de *T. nubilosa* en el continente americano, se realizó un estudio molecular basado en la caracterización genética de la población presente en Uruguay y se encontró que la totalidad de los aislamientos pertenecen a un único genotipo (población clonal) y que dicho genotipo es el único genotipo presente también en España y Portugal de acuerdo con Hunter et al. (2008) y Pérez et al. (2009).

La no observación de la sintomatología característica causada por este patógeno con anterioridad al 2007 junto con los resultados moleculares obtenidos por Pérez et al. (2009) estarían sugiriendo una reciente introducción del patógeno al país y probablemente desde un mismo origen, debido a la homogeneidad genética de la población. Asimismo, *T. nubilosa* ha sido recientemente reportada en Río Grande do Sul, Brasil causando defoliaciones severas en plantaciones jóvenes de *E. globulus*, no solo atacando hojas juveniles sino que también hojas adultas (Guillermo Pérez, com. pers.).

Cuando se analizan las condiciones climáticas del 2007, es claro que la ocurrencia de un otoño y una primavera lluviosa, junto con la presencia de una especie hospedera altamente susceptible como lo es *E. globulus*, resultaron en una severa epifitia que resultó en el compromiso no solo del crecimiento de dichas plantaciones, sino que en algunos caso también se vio comprometida la supervivencia de las mismas.

Actualmente se continúan los estudios de identificación de especies asociadas a manchas foliares y se tienen evidencias que indican que la diversidad de especies presentes es aún mayor y que resta por identificar otras especies. Paralelamente la Facultad de Agronomía está trabajando en conjunto con el INIA y la Facultad de Ciencias, para desarrollar y ajustar un método de diagnóstico molecular que permita facilitar la identificación de las especies fúngicas asociadas a manchas foliares. Sin lugar a dudas esto permitirá no sólo mejorar el diagnóstico, sino que además será una herramienta importante para realizar estudios de epidemiología que permitan detectar enfermedades emergentes en las plantaciones.

Consideraciones finales

Es claro que aún restan varias preguntas sin respuesta y resta mucho trabajo por realizar, pero trabajos de este tipo permiten avanzar hacia un manejo sustentable de las plantaciones. Conocer la correcta identidad de las amenazas que tiene el sector es el paso primordial para el desarrollo de medidas de manejo acertadas. Información como la generada en este trabajo permitirá al sector forestal conocer qué especies están presentes en las plantaciones y definir cuales de ellas merecen mayor importancia relativa. A su vez, la caracterización genética y fenotípica de los aislamientos permitirá brindarle al sector productivo la posibilidad de testear frente a los aislamientos más agresivos los materiales a plantar, o incluso incluir la selección por resistencia dentro del índice de selección de los distintos programas de mejoramiento.

Paralelamente, estudios de este tipo también permiten saber cuales son los patógenos que aún no han sido observados en las plantaciones y tomar los recaudos necesarios para evitar su introducción al país, evitando así los devastadores efectos que ciertos patógenos pueden tener sobre la producción.

Referencias bibliográficas

Balmelli, G., Marroni, V., Altier, N., García, R. 2004. Potencial del mejoramiento genético para el manejo de enfermedades en *Eucalyptus globulus*. Serie Técnica 143. INIA Tacuarembo 44 p.

Balmelli, G., Resquín, F. 2005. Efecto de enfermedades del fuste en *Eucalyptus globulus*. Forestal 27:9-14.

Bettucci, L., Alonso, R. 1997. A comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs of *Eucalyptus grandis* in Uruguay. Mycological Research 101:1060-1064.

Bettucci, L., Alonso, R., Tiscornia, S. 1999. Endophytic mycobiota of healthy twigs and the assemblage of species associated with twig lesions of *Eucalyptus globulus* and *E. grandis* in Uruguay. Mycol. Res. 103:468-472.

Bettucci, L., Saravay, M. 1993. Endophytic fungi of *Eucalyptus globulus*: a preliminary study. Mycol. Res. 97:679-682.

Bettucci, L., Simeto, S., Alonso, R., Lupo, S. 2004. Endophytic fungi of twigs and leaves of three native species of Myrtaceae in Uruguay. Sydowia 56:8-23.

Carnegie, A.J.; Keane, P.J., 1994: Further *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of *Eucalyptus*. Mycol. Res. 98:413-418.

Carnegie, A.J.; Keane, P.J., 1998: *Mycosphaerella vespa* sp. nov. from diseased *Eucalyptus* leaves in Australia. Mycol. Res. 102:1274-1276.

Crous, P.W.; Wingfield, M.J.; Mansilla, J.P.; Alfenas, A.C.; Groenewald, J.Z., 2006: Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. II. Stud. Mycol. 55:99-131.

Lundquist, J.E.; Purnell, R.C., 1987: Effects of *Mycosphaerella* leaf spot on growth of *Eucalyptus nitens*. Plant Dis. 71:1025-1029.

Lupo, S., Navarrete, F., Alonso, R., Carrau, D. Betucci, L. 2008. Especies de *Mycosphaerella* presentes en plantaciones de *Eucalyptus* en Uruguay. VI Congreso Latinoamericano de Micología, 10-13 de noviembre 2008, Mar del Plata- Argentina.

Park, R.F.; Keane, P.J.; Wingfield, M.J.; Crous, P.W., 2000: Fungal diseases of eucalypt foliage. In: Diseases of pathogens of eucalypts. Ed. by Keane, P.J.; Kile, G.A.; Podger, F.D.; Brown, B.N. Melbourne, Australia: CSIRO Publishing. pp. 153-240.

Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T., Venter, M., Wingfield, M. 2004. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. Nov, a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. Studies in Mycology 50:313-322.

Pérez, G., Hunter, G.C., Slippers, B., Pérez, C., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. 2009. *Teratosphaeria (Mycosphaerella) nubilosa*, the causal agent of *Mycosphaerella* Leaf Disease (MLD), recently introduced into Uruguay. European Journal of Plant Pathology. DOI 10.1007/s10658-009-9463-x.

Slippers, B., Fourie, G., Crous, P., Coutinho, T., Wingfield, B., Carnegie, A., Wingfield, M. 2004. Speciation and distribution of *Bortyosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South Africa. Studies in Mycology 50:343-358.

Old, K., Davison, E. 2000. Canker diseases of Eucalypts. In: Keane, P.; Kile, G.; Podger, F., Brown, B. (Eds) 2000. Diseases and Pathogens of Eucalypts. CSIRO Publishing. Australia. pp. 241-257.

Slippers, B., Wingfield, M.J. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. Fungal Biology Reviews 21:90-106.