



**VI JORNADA TÉCNICA DE  
PROTECCIÓN FORESTAL**

Agosto, 2014

SERIE  
TÉCNICA

**213**

INIA

# VI JORNADA TÉCNICA DE PROTECCIÓN FORESTAL.

**Editores:** Gustavo Balmelli\*  
Sofía Simeto\*\*  
Gonzalo Martínez\*\*\*  
Demian Gómez\*\*\*\*

\* Ing. Agr., M.Sc., Genética Vegetal y Fitomejoramiento, Programa Nacional de Investigación en Producción Forestal. INIA Tacuarembó.

\*\* Lic. en Cs. Biol., Fitopatología, Programa Nacional de Investigación en Producción Forestal. INIA Tacuarembó.

\*\*\*Lic. en Cs. Biol., M.Sc. Entomología, Programa Nacional de Investigación en Producción Forestal. INIA Tacuarembó.

\*\*\*\*Lic. en Cs. Biol., Entomología, Programa Nacional de Investigación en Producción Forestal. INIA Tacuarembó.

**Título:** VI JORNADA TÉCNICA DE PROTECCIÓN FORESTAL

**Editores:** Gustavo Balmelli  
Sofía Simeto  
Gonzalo Martínez  
Demian Gómez

Serie Técnica N° 213

© 2014, INIA

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA  
Andes 1365, Piso 12. Montevideo, Uruguay.  
<http://www.inia.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

# Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

## Integración de la Junta Directiva

**Ing. Agr., MSc., PhD. Álvaro Roel - Presidente**

**D.M.T.V., PhD. José Luis Repetto - Vicepresidente**



**D.M.V. Álvaro Bentancur**

**D.M.V., MSc. Pablo Zerbino**



**Ing. Agr. Joaquín Mangado**

**Ing. Agr. Pablo Gorriti**





## CONTENIDO

### Página

1. LA AVISPA AGALLADORA DEL EUCALIPTO *Leptocybe invasa*:  
RECONOCIMIENTO, DAÑOS Y POSIBLES ESTRATEGIAS DE MANEJO. .... 1
2. ESTACIONALIDAD DEL VUELO EN ESCARABAJOS DE CORTEZA DE PINO  
EN URUGUAY..... 9
3. IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PATOGENICIDAD DEL HONGO  
ENTOMOPATÓGENO *Paecilomyces cateniannulatus* AISLADO DE  
*Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE) EN EL  
ESTADO DE RÍO GRANDE DEL SUR – BRASIL. .... 17
4. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE LA CHINCHE DEL  
EUCALIPTO *Thaumastocoris peregrinus*: RESULTADOS PRELIMINARES..... 27
5. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *Calonectria* PRESENTES EN  
VIVEROS FORESTALES EN PAYSANDÚ. .... 39
6. ENFERMEDADES BACTERIANAS EN EUCALIPTO: ESTADO DEL  
CONOCIMIENTO A NIVEL NACIONAL..... 53
7. RESPUESTA DE *Eucalyptus grandis* INOCULADO CON *Teratosphaeria*  
*gauchensis*. .... 65
8. EFECTO DE *Teratosphaeria nubilosa* SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Eucalyptus*  
*globulus* Y *Eucalyptus maidenii* AL AÑO DE INICIADA LA INFECCIÓN. .... 73
9. VARIABILIDAD GENÉTICA EN SUSCEPTIBILIDAD A *Teratosphaeria*  
*pseudoeucalypti* EN EUCALIPTOS COLORADOS. .... 85



---

## PRESENTACIÓN

El sector forestal se está transformando en uno de los principales sectores de la economía nacional. Sin embargo, el rápido crecimiento del área forestada ocurrido en los últimos años, así como la concentración de las plantaciones en determinadas zonas y la escasa diversidad de especies utilizadas han generado condiciones propicias para el aumento de enfermedades y plagas, lo que es esperable en la mayoría de los sistemas productivos. A su vez, el aumento en el comercio internacional y en el turismo incrementa el riesgo del ingreso accidental de plagas y enfermedades forestales al país.

Dada la gran importancia que tiene la sanidad forestal, tanto en la productividad de las plantaciones como en la calidad de la madera producida, en los últimos años se han incrementado los esfuerzos de varias instituciones y empresas nacionales en investigación y en capacitación en la temática. También se ha reconocido la importancia de la cooperación entre las distintas instituciones como base para la generación de sinergias a nivel nacional e internacional. En este marco, las Jornadas Técnicas de Protección Forestal, organizadas por INIA desde el 2007, constituyen hoy por hoy un ámbito consolidado para que instituciones y empresas den a conocer los proyectos de investigación en curso y los resultados obtenidos en los mismos.

Con el fin de contribuir a la difusión de la información generada, la presente publicación reúne la mayor parte de los trabajos de investigación presentados durante la VI Jornada Técnica de Protección Forestal realizada en INIA-Tacuarembó en los días 14 y 15 de noviembre de 2013. El Programa Nacional de Investigación en Producción Forestal del INIA agradece a los autores de los trabajos aquí presentados.

**Roberto Scoz.**  
Director del Programa Nacional de  
Investigación en Producción Forestal.



# CAPÍTULO I.

## LA AVISPA AGALLADORA DEL EUCALIPTO

### *Leptocybe invasa*: RECONOCIMIENTO, DAÑOS Y POSIBLES ESTRATEGIAS DE MANEJO

Carolina Jorge<sup>1</sup>, Demian Gómez<sup>2</sup>, Gonzalo Martínez-Crosa<sup>2</sup>

#### 1. INTRODUCCIÓN

El género *Eucalyptus* representa en la producción forestal de Uruguay el 80% de la superficie forestada, equivalente a unas 800.000 ha (MGAP, 2014). Las especies que presentan un mayor número de hectáreas plantadas con fines comerciales son *Eucalyptus globulus* Labill. y *E. grandis* W. Hill ex Maiden, mientras que los eucaliptos colorados (*E. tereticornis* y *E. camaldulensis* Dehnh.) son las más utilizadas en predios ganaderos como cortinas y montes de abrigo. El aumento del área plantada con *Eucalyptus* spp. ha sido acompañado por un aumento en la ocurrencia e ingreso de nuevas plagas y enfermedades al país (Martínez, 2010), tendencia que también ha sido observada a nivel mundial (Paine, 2010; Paine *et al.*, 2011).

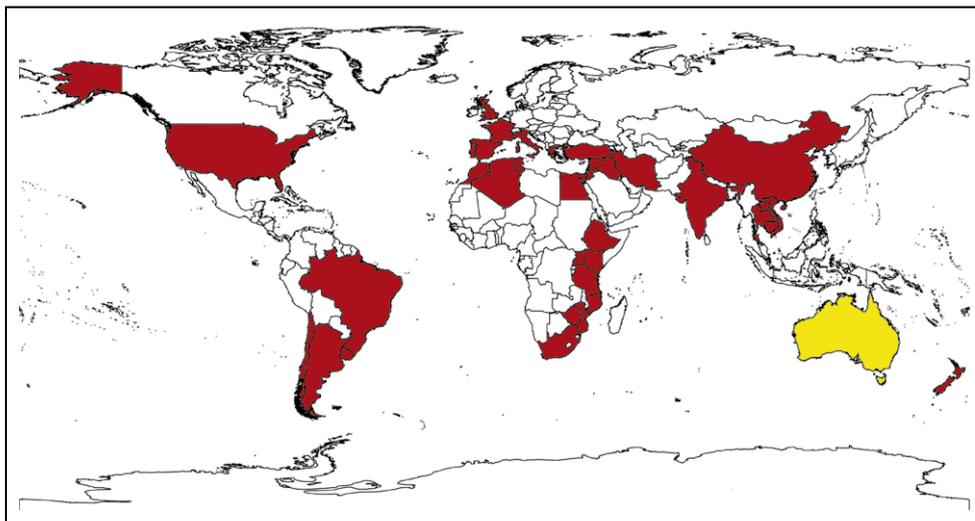
En los últimos años los insectos inductores de agallas han causado graves problemas sanitarios en eucaliptos plantados a nivel mundial, ocasionando en casos extremos la detención de la actividad forestal en zonas de gran infestación (Mendel *et al.*, 2004). Estos insectos generan daño principalmente a nivel del follaje en eucaliptos, pudiendo llegar a causar la muerte en árboles jóvenes o debilitados (Mendel *et al.*, 2004; Dittrich-Schroder *et al.*, 2012). Hasta el momento se conocen tres especies de agalladores que atacan el follaje de los eucaliptos: *Ophelymus maskelli* Ashmead, 1900; *Selitrichodes globulus* La Salle & Gates, 2009 y *Leptocybe*

*invasa* Fischer & La Salle, 2004. Considerada una plaga primaria por su capacidad de atacar indistintamente árboles débiles como sanos, *L. invasa* es una de las más dañinas. *L. invasa* es originaria de Australia. Fue detectada en el año 2000 en Israel asociada a una elevada mortandad en plantaciones jóvenes y viveros de *E. camaldulensis* en oriente medio, norte de África y la región mediterránea, describiéndose como género y especie nuevos en el año 2004 (Mendel *et al.*, 2004; Wilken y Berti-Filho, 2008; Dittrich-Schröder *et al.*, 2012). Desde su detección en Israel se ha dispersado rápidamente, reportándose su presencia en pocos años en países de Europa, Asia, África y América (Figura 1). Fue detectada en el continente americano en el año 2008 en el noreste de Brasil y en el año 2010 en Argentina; en Uruguay fue detectada en 2011 y formalmente reportada en marzo de 2013.

En Brasil se extendió rápidamente; al presente ha sido reportada en los estados de Bahía, São Paulo, Minas Gerais, Matto Grosso do Sul, Paraná, Tocantins, Maranhão, Pernambuco (Barboza *et al.*, 2012; Wilken *et al.*, 2012) y más recientemente en Rio Grande do Sul (Garlet *et al.*, 2013). En Argentina se está viendo una situación similar, declarándose desde su detección como emergencia fitosanitaria por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA, 2011, 2012). En concordancia a los antecedentes existentes en la región, el 2 de diciembre de 2013 el Comité Ejecutivo de Coordinación en

<sup>1</sup> Polo de Desarrollo Universitario Forestal. Centro Universitario de Tacuarembó. Joaquín Suárez 215, Tacuarembó.

<sup>2</sup> Programa Nacional de Producción Forestal. INIA Tacuarembó. Ruta 5 Km 386, Tacuarembó.



**Figura 1.** Distribución mundial de *L. invasa*. Amarillo: sitio de origen, rojo: países donde ha sido reportada.

materia de Plagas y Enfermedades (CECOPE) declaró a *L. invasa* tema prioritario a nivel fitosanitario para el sector forestal nacional. El objetivo de este trabajo consiste en presentar el estado actual del conocimiento de *L. invasa* en Uruguay, características diagnósticas de la especie, síntomas, signos, daño y perspectivas a futuro.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las fotografías de agallas y de los ejemplares fueron obtenidas durante salidas puntuales próximas a la estación experimental de INIA Tacuarembó. Los registros de la presencia de *L. invasa* en los diferentes departamentos se obtuvieron en recorridos puntuales del equipo de trabajo en sitios con *Eucalyptus* spp., por datos del Departamento de Protección vegetal de la Facultad de Agronomía y por relevamientos realizados por algunas empresas forestales. También se obtuvieron algunos registros en la revisión de las trampas amarillas del Monitoreo Nacional de la Chinche del Eucalipto (*Thaumastocoris peregrinus*) de la empresa UPM. Se realizaron disecciones de agallas para evaluar el estadio de desarrollo de las avispas dentro de las mismas. Las observaciones de los ejemplares se realizaron bajo lupas estereoscópicas Nikon.

## 3. RESULTADOS

### *Ubicación taxonómica*

*Leptocybe invasa* Fisher & La Salle es una micro-avispa del orden Hymenoptera, superfamilia Chalcidoidea, familia Eulophidae, subfamilia Tetrastichinae, siendo hasta el momento la única especie del género.

### *Caracteres morfológicos utilizados para la identificación de L. invasa*

*Leptocybe invasa* se puede distinguir principalmente de las otras especies de avispas agalladoras que atacan *Eucalyptus* por caracteres morfológicos presentes en las regiones cefálica y torácica. Algunos caracteres son únicamente apreciables en vista dorsal, lo que puede dificultar su identificación en trampas amarillas pegajosas. Hasta el momento hemos encontrado solamente ejemplares hembras, el sexo más común de observar (Aquino *et al.*, 2011). Los machos descritos solo han sido registrados para Turquía (Doganlar, 2005; Aquino *et al.*, 2011). Por tanto los caracteres diagnósticos presentados a continuación corresponden a hembras en base a la descripción original de Mendel *et al.* (2004).

**Tamaño:** Es una avispa muy pequeña cuyo cuerpo puede alcanzar los 1.1-1.4 mm de largo.

**Coloración:** El cuerpo en general es castaño-oscuro, con un leve tornasol azul-verdoso en el tórax que le confiere un aspecto metalizado. El abdomen suele presentar bandas castaño-claras. Base de las antenas (escapo) castaño claro, funículo y clava (maza) castaños (Figura 2A).

**Cabeza:** Las antenas presentan el escapo más largo que el pedicelo (a diferencia de *S. globulus* en que ambos son de similar tamaño), el cual se ensancha en su porción media (diferenciándose de *O. maskelli* que presenta el mismo ancho en toda su longitud). Antenas con cuatro anelli (anillos), tres segmentos funiculares y clava (maza) formada por tres segmentos de igual tamaño (Figuras 2B y 2C).

**Tórax:** Protórax corto, mesotórax bien desarrollado, cuya porción distal en vista dorsal (escutelo) se encuentra dividida en tres zonas separadas por estrías o surcos sublaterales (Figura 2D). Las alas son hialinas, con pequeñas setas en toda su extensión y nervaduras levemente marcadas de coloración castaño claras. La vena post marginal es más corta que la vena estigmal (Figura 2A). La vena submarginal presenta

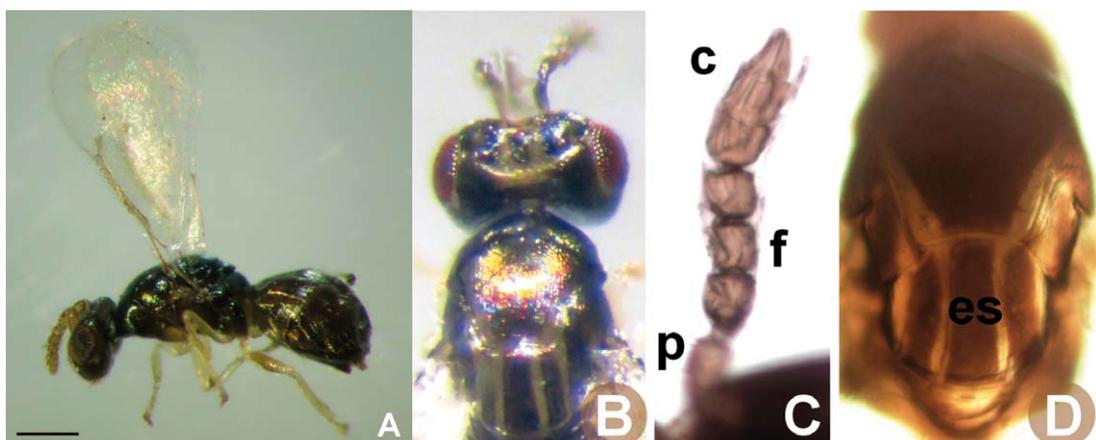
un número variable de 2 a 5 setas visibles en vista dorsal.

**Abdomen:** El ovipositor presenta un mayor desarrollo interno, se puede ver externamente que las valvas son cortas (Figura 2A).

### **Biología y ciclo de vida**

Conocer la historia natural de un insecto plaga es vital para poder desarrollar estrategias de control adecuadas y disminuir así su densidad poblacional y con ello el daño que éste pudiera ocasionar sobre el cultivo. Como suele suceder cuando una especie plaga ha sido recientemente reportada para un país, se cuenta con escasa información acerca de la biología de *L. invasa*. Presenta partenogénesis telitoca; hasta el momento sólo se han registrado machos en Turquía (Aquino *et al.*, 2011; Doganlar, 2005). Este tipo de reproducción se puede observar en especies en las que los machos no existen o son muy escasos, por lo que los huevos producidos por las hembras van a generar hembras diploides (Bentancourt, 2009).

El desarrollo postembrionario se realiza íntegramente dentro de la agalla inducida por el insecto. El primer síntoma de ataque es la presencia de pequeñas líneas a ambos lados de la nervadura central ocasionadas por el raspaje de la epidermis con el ovipositor



**Figura 2.** Morfología corporal y caracteres diagnósticos de *L. invasa*. A. Aspecto general. B. Cabeza y tórax en vista dorsal, C. detalle de las antenas. D. Mesotórax, donde se aprecia el escutelo trisegmentado. Referencias: p: pedicelo; f: flagelo; c: clava y es: escapo. Escala: 0.2 mm.



**Figura 3.** Diferentes estadios de desarrollo de las larvas dentro de las agallas. A. marcas de oviposición, B y C. larvas en los primeros estadios, D. larva madurando, E. estadio entre pupa-adulto, F. orificio de emergencia del adulto.

por parte de la hembra durante la oviposición (Figura 3A). Se ha propuesto que la formación de las agallas se iniciaría por acción de secreciones químicas de la larva liberadas durante la alimentación. Ambas acciones podrían ser las causantes de la hiperplasia ocasionada en el tejido vegetal, que culmina en la formación de la agalla característica de todos los insectos pertenecientes a este gremio. Por tanto, los cambios morfológicos a nivel de forma, tamaño y coloración observados en las agallas de los órganos vegetales atacados, son concordantes con la evolución de los estadios de desarrollo del insecto dentro de las mismas (Figura 3). Cuando las agallas comienzan a formarse presentan una coloración verde clara; a medida que las larvas se van desarrollando van adquiriendo una tonalidad rojiza que culmina en un color que varía de rojo oscuro a bordó cuando están maduras (el insecto ha pupado y esta pronto para emerger como adulto) (Figura 3B-E). En el momento de mudar a adulto el insecto perfora la agalla para salir (Figura 3F).

Estudios en vivero realizados por Mendel *et al.* (2004) indicaron que para Israel *L. invasa* presentaría un ciclo de aproximadamente

130 días de duración con dos o tres generaciones al año solapadas. Por otro lado, en Argentina si bien el ciclo también fue de aproximadamente 130 días, observaron la presencia de 2 generaciones anuales no solapadas (Aquino *et al.*, 2011; Botto *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta que el ingreso al Uruguay es todavía muy reciente, carecemos de información acerca de la duración del ciclo y del número de generaciones anuales.

### **Síntomas y signos**

A campo se la puede diferenciar de otras especies de insectos agalladores por la forma, tamaño y ubicación de las agallas. Las agallas de *Leptocybe invasa* siempre se ubican sobre la nervadura central y/o en el pecíolo, también se pueden encontrar en ramas o tallos en plantas jóvenes (Figura 4). En ataques recientes se pueden observar raspaduras a modo de líneas rectas sobre el tejido afectado ocasionadas por el ovipositor de la hembra durante la oviposición (Figura 3A). En casos en que el tamaño poblacional es muy grande, pueden llegar a observarse hembras sobre las hojas en busca de sitios para depositar sus huevos.



**Figura 4:** Forma y posición típica de agallas de *L. invasa*. A. sobre peciolo de *E. benthamii*. B. sobre nervadura central y peciolo en eucalipto colorado.

### **Daños**

El daño ocasionado por el ataque de esta especie se caracteriza por el curvado y deformación de hojas y brotes que se traduce en una reducción del área fotosintética de la planta (Figura 5). A su vez, la planta puede experimentar estrés general a consecuencia del bloqueo del flujo normal de savia ocasionado por la desviación de nutrientes hacia las agallas. Un efecto secundario de la formación de la agalla es el aumento en la susceptibilidad frente al ataque de otras plagas, en especial aquellas que se sienten atraídas por árboles debilitados (plagas secundarias). En caso de daño severo se produce defoliación y con niveles altos de infestación se podría llegar a la muerte de plantas jóvenes.

### **Distribución conocida en Uruguay**

Se ha detectado la presencia de *L. invasa* en trampas amarillas procedentes de

plantaciones comerciales de Soriano, Río Negro y norte de Paysandú, aunque hasta el momento no se ha observado la formación de agallas en los rodales. A su vez se han encontrado agallas en árboles aislados o en cortinas de Tacuarembó, Montevideo, Salto y Paysandú.

### **Estrategias de Manejo**

Hasta el momento no se cuenta con una metodología de manejo adecuada para mitigar el daño ocasionado por el ataque de esta especie. En países de la región se ha decretado que ante síntomas de la presencia de *L. invasa* se debe proceder a la destrucción inmediata de todos los plantines u árboles afectados (Senasa, 2011, 2012). En Brasil y Argentina se realizan monitoreos estrictos mediante la colocación de trampas amarillas pegajosas e inspección a nivel de viveros forestales y en plantaciones (SENASA en Argentina y EMBRAPA e IPEF en Brasil).



**Figura 5.** Arqueamiento de las hojas en dos especies de eucalipto ocasionado por el crecimiento de las agallas sobre la nervadura central. A y B: en eucaliptos colorados, C: en plantas jóvenes de *E. globulus*.

A nivel internacional se encuentran bajo evaluación varias alternativas para el manejo de la avispa agalladora del eucalipto relacionadas con técnicas de mejoramiento genético, control biológico y control químico.

**Mejoramiento genético:** En varios países de Asia (India, Vietnam, China, Israel) y África (Kenia, Uganda y Sudáfrica) se vienen realizando estudios para evaluar la resistencia de diferentes genotipos de *Eucalyptus* frente al ataque de esta especie (Kumari, 2009; Thua *et al.*, 2009; Dittrich-Schröder *et al.*, 2012; Fang-Li *et al.*, 2012). Las especies más susceptibles serían *E. tereticornis*, *E. camaldulensis* y sus híbridos.

**Control biológico:** En los últimos años se han publicado varios trabajos donde se reportan especies de los géneros *Megastigmus*, *Aprotocetus*, *Selitrichodes* y *Quadrastichus* emergiendo de agallas de *L. invasa* (Doganlar *et al.*, 2013; Kelly *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2008). En Israel se han realizado experiencias para evaluar la efectividad de dos parasitoides: *Quadrastichus mendeli* Kim & La Salle, 2008 y *Selitrichodes kryceri* Kim & La Salle, 2008, aunque estas especies no presentan niveles altos de parasitismo (Kim *et al.*, 2008). Recientemente, Doganlar *et al.* (2013) describieron la especie *Megastigmus brasiliensis*, un parasitoide nativo de *L. invasa* en Brasil, también encontrado en Argentina (Eduardo Botto, comunicación personal). En Brasil se han comenzado estudios para evaluar el potencial de *M. brasiliensis* como agente de control biológico de la avispa agalladora del eucalipto (Leonardo Barbosa, comunicación personal).

**Control químico:** En India se han realizado algunos ensayos con diferentes insecticidas sistémicos, aunque su efectividad no ha sido comprobada (Kumari, 2009). A nivel regional se vienen probando diferentes compuestos químicos para ser utilizados en viveros de Brasil (Wilken y Berti-Filho, 2008; Wilken *et al.*, 2012) y en Argentina (Sergio Ramos y Eduardo Botto, comunicación personal). En este último país el SENASA ha autorizado la aplicación de insecticidas sistémicos como medidas paliativas para controlar a esta especie.

## 4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Debido a la regionalización de los cultivos forestales (con grandes extensiones ocupadas por una sola especie o por especies del mismo género) y la ausencia de barreras geográficas que impidan el ingreso de nuevas plagas al país, se hace necesario mantener una adecuada vigilancia sanitaria. En el caso de *L. invasa*, que ya está presente en el país, el uso de agentes de control biológico y de genotipos resistentes son considerados a nivel internacional como alternativas promisorias para el manejo a largo plazo de esta plaga (Dittrich-Schröder *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta que el control químico en vivero no es efectivo en su totalidad y que las normas de eco-certificación forestal cuentan con impedimentos para utilizar insecticidas químicos a campo, el desarrollo de un sistema de control sostenible y compatible con los ecosistemas es vital en los cultivos forestales.

*Leptocybe invasa* ha generado importantes pérdidas económicas a nivel mundial, no habiendo hasta el momento medidas efectivas para su control. Por tal motivo, se hace necesaria la realización de estudios de bioecología y distribución de *L. invasa* en Uruguay para generar información que pueda ser utilizada en la generación de estrategias de prevención y control.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a UPM por los registros de presencia de *L. invasa* en el litoral y al Dr. Leonardo Barbosa de Embrapa Florestas, por la información aportada acerca de la situación de la avispa en Brasil.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

**AQUINO, A.D.; BOTTO, E.D.; LOIACONO, M.S.; PATHAUER, P.** 2011. Avispa de la agalla del eucalipto, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae), en Argentina. Revista INTA.

- BARBOSA, L.; WILKEN, C.F.; COLA, J.; NOGUEIRA, L.A.; ZACHÉ, B.** 2012. Vespa do galha do eucalipto: *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera, Eulophidae). Embrapa Florestas. 6 p.
- BENTANCOURT, C.; SCATONI, I.B.; MORELLI, E.** 2009. Insectos del Uruguay. Facultad de Agronomía - Facultad de Ciencias. Editorial Hemisferio Sur S.R.L. 658 p.
- BOTTO, E.; MALY, L.; KLASMER, P.** 2012. Plagas forestales introducidas en la Argentina: análisis de su situación actual. En actas de: Seminário Internacional sobre pragas quarentenárias Florestais. Curitiba, Paraná, Brasil, 44-50.
- DITTRICH-SCHRODER, G.; WINGFIELD, M.J.; HURLEY, B.P.; SLIPPERS, B.** 2012. Diversity in *Eucalyptus* susceptibility to the gall-forming wasp *Leptocybe invasa*. Agricultural and Forest Entomology 14(4): 419-427.
- DOGANLAR, O.** 2005. Occurrence of *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle, 2004 (Hymenoptera: Chalcidoidea) on *Eucalyptus camaldulensis* in Turkey, with a description of the male sex. Zoology in the Middle East 35: 112-114.
- DOGANLAR, M.; ZACHÉ, B.; WILCKEN, C.F.** 2013. A new species of *Megastigmus* (Hymenoptera: Torymidae: Megastigminae) from Brazil. Florida Entomologist 96(1): 196-199.
- FANG-LI, Z.; SHUN-XIANG, R.; BAO-LI, Q.; ZHEN, H.; ZHENG-QIANG, P.** 2012. The Abundance and Population Dynamics of *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) Galls on *Eucalyptus* spp. in China. Journal of Integrative Agriculture 11(12): 2116-2123.
- GARLET, J.; CORRÊA COSTA, E.; BOSCARDIN, J.; DEPONTI, G.; SHWENGBER, C.B.; MORTARI MACHADO, L.** 2013. *Leptocybe invasa* em *Eucalyptus* sp. no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Ciência Rural 43(12): 2175-2177.
- KELLY, J.; LA SALLE, J.; HARNEY, M.; DITTRICH-SCHRÖDER, G.; HURLEY, B.** 2012. *Selitrichodes neseri* n. sp., a new parasitoid of the *eucalyptus* gall wasp *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae). Zootaxa 3333: 50-57.
- KIM I, K.; MENDEL, Z.; PROTASOV, A.; BLUMBERG, D.; LA SALLE, J.** 2008. Taxonomy, biology, and efficacy of two Australian parasitoids of the *eucalyptus* gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae). Zootaxa 1910: 1-20.
- KUMARI, K.** 2009. Bioecology and Management of *Eucalyptus* gall-wasp, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae). Thesis Master of Science (Agriculture Entomology) of the University of Agricultural Sciences, Dharwad. 78 p.
- MARTÍNEZ, G.** 2010. Insectos plaga en plantaciones jóvenes de eucalipto: hacia un modelo. Serie Actividades de Difusión INIA 629: 9-24.
- MENDEL, Z.; PROTASOV, A.; FISHER, N.; LA SALLE, J.** 2004. Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* gen. & sp.n. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on *Eucalyptus*. Australian Journal of Entomology 43(2): 51-63.
- MGAP.** 2014. Dirección General Forestal, Bosques plantados registrados. Acceso online: <http://www.mgap.org.uy>.
- PAINE, T.D.; STEINBAUER, M.J.; LAWSON, S.A.** 2011. Native and Exotic Pests of *Eucalyptus*: A Worldwide Perspective. Annual Review of Entomology 56: 181-201.
- PAINE, T.D.** 2010. Global patterns of Australian eucalypt insect movement. En: The International Forestry Review. Vol. 12. Seoul. p. 359.

**SENASA.** 2011. Resolución 322/2011: Declárase la emergencia fitosanitaria con respecto a la plaga *Leptocybe invasa* "avispa de la agalla" en todo el Territorio Nacional.

**SENASA.** 2012. Sanidad vegetal: Resolución 180/2012. Acceso on-line: [http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File5943-Res\\_180-2012.pdf](http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File5943-Res_180-2012.pdf).

**THUA, P.Q.; DELL, B.; BURGESS, T.I.** 2009. Susceptibility of 18 eucalypt species to the gall wasp *Leptocybe invasa* in the nursery and young plantations in Vietnam. *Science Asia* 35: 113-117.

**WILKEN, C.; BERTI FILHO, E.** 2008. Vespa-da-galha do eucalipto (*Leptocybe invasa*) (Hymenoptera: Eulophidae): nova praga de florestas de Eucalipto no Brasil. *Alerta PROTEF. Programa de Proteção Florestal- PROTEF / IPEF.* 11 p.

**WILKEN, C.; FERREIRA FILHO, P.J.; LIMA, A.C.V.; ZACHÉ, B.; BARBOSA, L.; MASSON, M.R.; DE SÁ, L.A.; ZANUNCIO, J.C.** 2012. Introdução de *Glycaspis brimblecombei* e *Leptocybe invasa* em eucalipto no Brasil. En actas del: Seminário Internacional sobre pragas quarentenárias Florestais. Curitiba, Paraná, Brasil, 30-33.

# CAPÍTULO II

## ESTACIONALIDAD DEL VUELO EN ESCARABAJOS DE CORTEZA EN PINO EN URUGUAY

Demian Gómez<sup>1</sup>

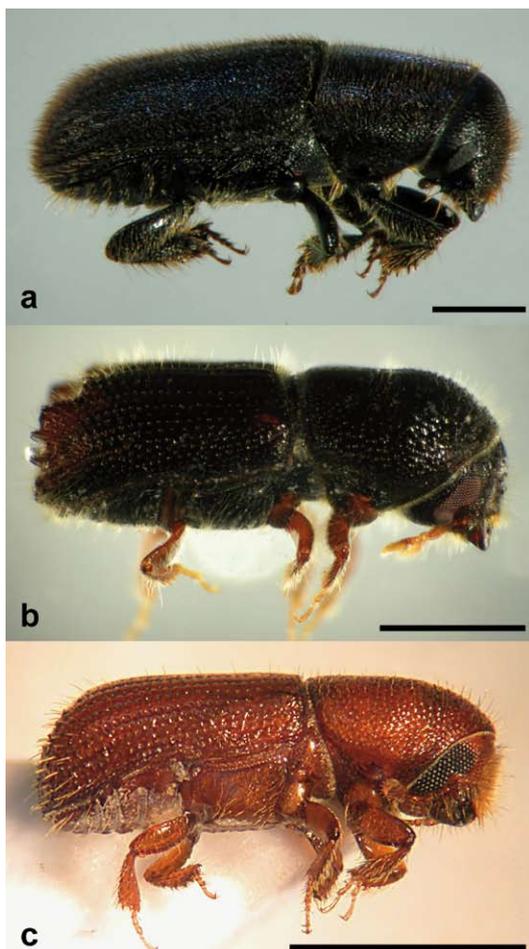
### 1. INTRODUCCIÓN

Los escarabajos barrenadores de corteza son plagas notorias que causan daños extensivos a bosques, tanto naturales como plantados. A nivel mundial son considerados como una de las plagas más importantes que afectan a los bosques de coníferas y, en forma secundaria, a latifoliadas (López *et al.*, 2007). Son coleópteros de pequeño tamaño y forma cilíndrica, con más de 6000 especies descritas. El número de generaciones anuales es variable y está determinado por la temperatura; presentan ciclos cortos en climas templados o cálidos y ciclos largos en climas fríos (López *et al.*, 2007; Rangel *et al.*, 2012). Existen especies univoltinas, bivoltinas y multivoltinas con sistemas de apareamiento muy variados. El ciclo de los escolítidos, como el de otros muchos perforadores, pasa por dos fases de desigual duración: una subcortical y otra aérea. Los estados preimaginal e imaginal transcurren en la fase subcortical, ya que el imago deposita los huevos directamente en el floema que va a ser su medio de alimentación hasta el estado adulto (Coulson, 1979). En el momento de la reproducción los adultos emergen e inician su período de vuelo, el cual constituye la fase aérea (McNee *et al.*, 2000). Los principales indicadores del ataque son pequeños grumos de resina y aserrín fino, de color marrón rojizo, en la superficie de la corteza (Ciesla, 2011). Además de barrenar floema, los escolítidos son el principal vector de propagación de hongos de la mancha azul (Ophiostomatales). Un ataque en masa

de varios individuos, en combinación con los hongos manchadores, fatiga anatómica y bioquímicamente la resistencia del árbol hospedero, generando así la muerte del mismo (Kirisits, 2004). Los árboles atractivos son aquellos que se encuentran en estado de deficiencia fisiológica debido a heridas, sequía, incendio, derribados por viento o recién cortados. La mayoría de las especies de escolítidos dependen de árboles debilitados o muertos, pero durante brotes epidémicos, pueden también establecerse en árboles sanos (Rossi *et al.*, 2009).

Durante el verano 2008-2009 se registró el primer brote epidémico de escolítidos de pino en Uruguay por parte de empresas forestales y técnicos de INIA. Ante el riesgo de introducción de nuevas especies de escolítidos en el territorio y la necesidad de conocer la extensión del problema, el Comité Ejecutivo de Coordinación en materia de Plagas y Enfermedades que afectan a las plantaciones forestales (CECOPE) realizó un relevamiento en establecimientos pineros. La detección de especies no identificadas planteó la necesidad de establecer un Sistema Nacional de Monitoreo de Escolítidos. Las seis estaciones de monitoreo distribuidas en el país desde fines de 2009 detectaron principalmente tres especies (Figura 1): *Hylurgus ligniperda*, previamente citada para Uruguay como introducción desde Europa (Ruffinelli Rey, 1967); *Cyrtogenius luteus*, introducida desde Asia (Gómez *et al.*, 2012) y *Orthotomicus erosus*, introducida desde Europa (Gómez y Martínez, 2013).

<sup>1</sup> Programa Nacional de Producción Forestal. INIA Tacuarembó. Ruta 5 Km 386, Tacuarembó.



**Figura 1.** Escarabajos de corteza de pino de Uruguay: **a)** *Hylurgus ligniperda*, **b)** *Orthotomicus erosus*, **c)** *Cyrtogenius luteus*. La barra corresponde a 1 mm.

Actualmente, las tres especies de escolítidos están distribuidas en todo el territorio nacional, asociadas a desechos de explotación, con altos niveles poblacionales. Los focos existentes de árboles atacados en pie ponen de manifiesto el gran potencial de dispersión y establecimiento de dichos escarabajos. Su comportamiento críptico, su capacidad de dispersión (que lleva a una redistribución poblacional en cada generación), su alta capacidad reproductiva, y consecuentemente, su habilidad para desarrollar explosiones poblacionales repentinas, han sido los puntos clave en el éxito de los escolítidos. Por lo tanto, a la hora de desarrollar estrategias de manejo, debemos

pensar tanto en un manejo preventivo como en medidas de mitigación.

Conocer la actividad de vuelo de las diferentes especies y estudiar cómo se relaciona con variables climáticas se convierte en una herramienta imprescindible a la hora de disminuir los ataques en árboles en pie, permitiendo planificar los calendarios de intervenciones silvícolas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la variación estacional de la actividad de vuelo de los escarabajos de corteza de pino y la relación de los picos de actividad de vuelo con la temperatura.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### *Variación estacional de la actividad de vuelo*

Para determinar el período de vuelo de cada una de las especies se realizó un estudio en parcelas de *Pinus taeda* en el predio “La Corona”, ubicado en Tacuarembó, perteneciente a la empresa forestal Cambium. Se realizaron muestreos quincenales en el período de un año: julio de 2012 a julio de 2013. El predio “La Corona” representa uno de los puntos previamente instalados del Sistema de Monitoreo de Escolítidos desarrollado por INIA, SPF y MGAP, luego del brote epidémico de escarabajos de corteza en el sur del país en 2009. Se utilizaron tres trampas ventana de intercepción distanciadas por 1 km (Soto *et al.*, 2002). Cada trampa ventana consiste de un marco de madera de 50 cm x 120 cm, con una ventana de acrílico o vidrio de 50 x 50 cm. A ambos lados de la misma se colocaron recipientes rectangulares de 50 cm x 15 cm x 15 cm a modo de colectores, los cuales contenían una solución de agua con detergente líquido y etilenglicol. Se colocaron cuatro trozas frescas de *Pinus taeda* de 1 m de largo con un diámetro mínimo de 5 cm, a los pies de la trampa ventana como material atrayente. Cada dos semanas se retiró el material capturado y las trozas fueron reemplazadas por nuevas trozas frescas. Los individuos colectados fueron depositados en recipientes plásticos herméticos con etanol al 70%, con su respectiva etiqueta indicando localidad,

número de trampa ventana y fecha de retiro. El material fue procesado en el Laboratorio de Entomología de INIA en Tacuarembó. Se utilizaron bandejas plásticas blancas para separar los escolítidos de interés: *Hylurgus ligniperda*, *Orthotomicus erosus* y *Cyrtogenius luteus*. La identificación final se realizó bajo lupa estereoscópica. Una vez cuantificada la abundancia relativa de las tres especies, el material fue depositado en la Colección de Entomología Forestal de INIA Tacuarembó en frascos plásticos con etanol al 70% con su respectiva etiqueta.

### **Estudio de temperatura como determinante de la actividad estacional**

Para estudiar la relación de la actividad de vuelo de los escarabajos con la temperatura es necesario utilizar un período de tiempo mayor a un año. Por esta razón se utilizó la información generada en cuatro años por el Sistema Nacional de Monitoreo en "La Corona" utilizando trampas ventanas de intercepción con la metodología descrita en el punto anterior. Debido a que la introducción de una gran parte de las especies de escolítidos en Uruguay es reciente, su dinámica podría fluctuar levemente en los primeros años. Los datos meteorológicos diarios fueron suministrados por la Unidad Experimental La Magnolia de INIA, la estación meteorológica más cercana a la plantación monitoreada. Los registros diarios de temperatura se prepararon como medias quincenales. Para cada año se determinaron los eventos que representan el 80% del total de las capturas, desde el

evento de mayor captura hasta completar el porcentaje mencionado (Tribe, 1990, 1991). Para el total de eventos se calculó la media de temperatura y el desvío estándar.

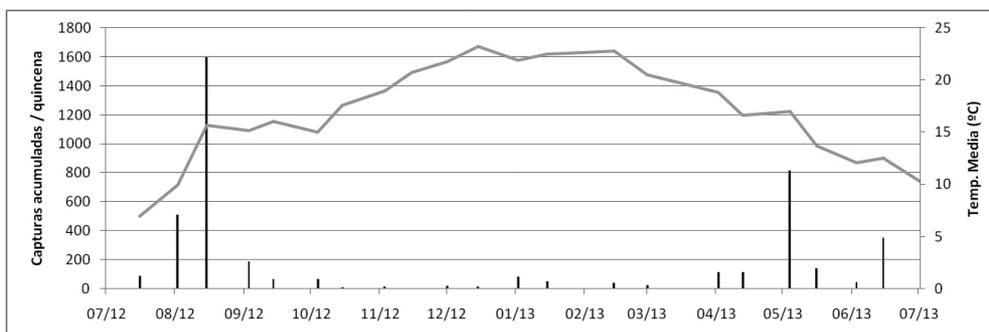
## **3. RESULTADOS**

### **Variación estacional de la actividad de vuelo**

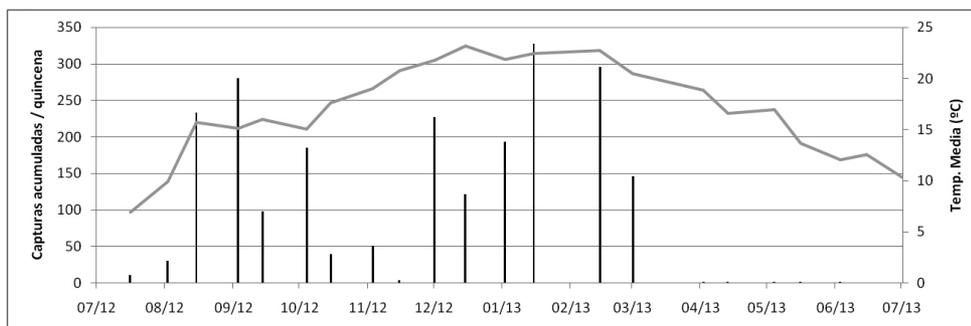
Se colectó un total de 7573 escarabajos de corteza en el período de un año. *Hylurgus ligniperda* presenta la mayor abundancia relativa para la localidad monitoreada, con 4400 individuos capturados (58% del total). El 30% de los organismos capturados en el año corresponden a *Orthotomicus erosus* (2251 individuos) y el 12% restante a *Cyrtogenius luteus* (922 individuos).

Las capturas obtenidas sugieren que las tres especies de escolítidos difieren en su dinámica poblacional (Figuras 2, 3 y 4). Si bien se registran capturas de *H. ligniperda* a lo largo de todo el año, esta especie presenta dos máximos poblacionales, correspondientes a los meses de mayo y agosto (Figura 2). Estos picos, que corresponden al 75 % de las capturas, ocurren con temperaturas medias entre 14 y 20 °C y coinciden con períodos de alta humedad para Uruguay. Esta especie presentó menor actividad en los meses de mayor temperatura (entre octubre y abril), registrándose pequeños picos en el verano.

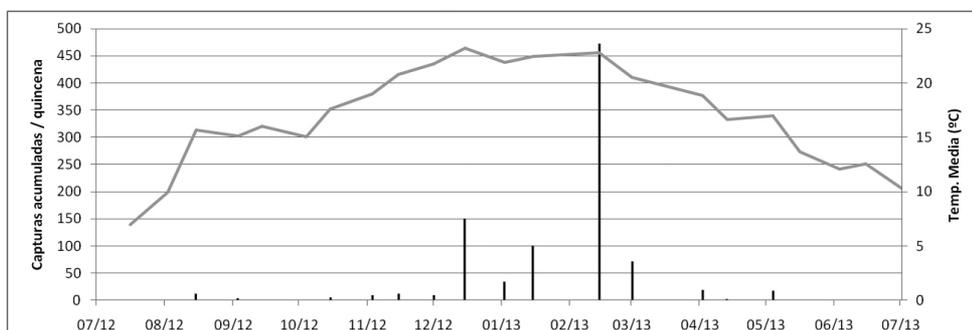
*Orthotomicus erosus* presenta mayor actividad de vuelo durante los meses de primavera y verano, principalmente entre agosto y



**Figura 2.** Capturas quincenales de *Hylurgus ligniperda* en "La Corona", Tacuarembó desde julio de 2012 a julio de 2013.



**Figura 3.** Capturas quincenales de *Orthotomicus erosus* en "La Corona", Tacuarembó desde julio de 2012 a julio de 2013.



**Figura 4.** Capturas quincenales de *Cyrtogenius luteus* en "La Corona", Tacuarembó desde julio de 2012 a julio de 2013.

febrero. Durante este período se registró el 91% de las capturas (Figura 3).

*Cyrtogenius luteus* presenta mayor actividad de vuelo en los meses de mayor temperatura. Si bien el mayor pico poblacional fue registrado en febrero (con temperaturas medias mayores a 22 °C), *C. luteus* presenta actividad de vuelo entre diciembre y febrero, registrándose el 90% de las capturas en ese período (Figura 4).

### **Estudio de temperatura como determinante en la actividad estacional**

En la Tabla 1 se presenta la relación existente entre la temperatura y la actividad de vuelo de las tres especies de escolítidos durante un período de cuatro años en la localidad "La Corona" (16 dic. 2009 hasta 02 feb. 2014). Los diferentes picos poblacionales de *H. ligniperda*, *O. erosus* y *C. luteus* reflejan

**Tabla 1.** Condiciones climáticas donde se registró el 80% de la actividad de vuelo de *Hylurgus ligniperda* (n=14), *Orthotomicus erosus* (n=13) y *Cyrtogenius luteus* (n=10); siendo n el n° de eventos de muestreo que registraron el 80% de las capturas. Período de cuatro años para la localidad "La Corona" (16 dic. 2009 hasta 02 feb. 2014).

	Temp. Media	Temp. Máxima	Temp. Mínima
<i>H. ligniperda</i>	15,02 ± 1,95	20,86 ± 1,66	9,68 ± 2,48
<i>O. erosus</i>	19,65 ± 2,93	25,56 ± 3,55	14,12 ± 2,56
<i>C. luteus</i>	22,07 ± 1,82	27,84 ± 2,16	16,64 ± 1,89

diferentes condiciones climáticas óptimas. *H. ligniperda* presenta picos poblacionales en los meses de menor temperatura. Por otro lado, *O. erosus* y *C. luteus* presentan mayor actividad de vuelo en meses de alta temperatura. Las temperaturas máximas y mínimas en que se registraron capturas se presentan en la Tabla 1.

Las condiciones climáticas existentes durante los cuatro años de monitoreo cuando el 80% de *H. ligniperda* estaba activo se observan en la Tabla 1. Más del 80% de los individuos estuvieron activos entre una temperatura media de 13.1 °C y 16.9 °C (calculado del desvío estándar de una media de 15.1 °C). Para *O. erosus*, las condiciones climáticas donde se registró más del 80% de la actividad de vuelo coinciden con una temperatura media semanal entre 16.7°C y 22.5 °C (calculado del desvío estándar de una media de 19.6 °C) (Tabla 1). En el caso de *C. luteus* la mayor actividad de vuelo también se da en meses de alta temperatura y más del 80% de los individuos estuvieron activos entre una temperatura media de 20.3°C y 23.9 °C (calculado en base a la media de 22.07 °C ± el desvío estándar).

#### 4. DISCUSIÓN

La evaluación de los diferentes picos poblacionales de las especies de escoltídeos en Tacuarembó permitió establecer los meses de mayor actividad para cada especie. La variación en la actividad de vuelo para *H. ligniperda*, *O. erosus* y *C. luteus* reflejan diferentes condiciones climáticas óptimas.

Para *H. ligniperda* se registraron capturas durante todo el año, destacándose picos la actividad en meses de baja temperatura (entre 13.1 °C y 16.9 °C). Los dos grandes picos de *H. ligniperda* registrados en Uruguay en mayo y agosto coinciden con lo observado en Francia y Nueva Zelanda, con adultos de primera generación oviponiendo en invierno y primavera y una segunda generación oviponiendo en otoño (Reay y Walsh, 2001; Tribe 1991). Para Uruguay, el mayor pico de actividad para *H. ligniperda* coinci-

de con la primera generación producida a fines del invierno / primavera. El segundo pico, más corto, ocurre en otoño, previo al período de hibernación, no coincidiendo necesariamente con una segunda generación. Esto se debe a que las hembras pueden no abandonar el material donde se desarrollaron si las condiciones lo permiten, es decir, si existe aun floema fresco para alimentarse y reproducirse. Debido a que *H. ligniperda* presenta además pequeños picos de actividad en verano y basándose en el período de desarrollo de entre 10 y 11 semanas (Tribe, 1991), se sugiere que *H. ligniperda* podría tener entre dos y cuatro generaciones por año en Uruguay. Esta estimación se realiza teniendo en cuenta que en los meses de verano se podría cumplir más de una generación sin generarse dispersión. En Sudáfrica se registraron capturas a lo largo de todo el año, con la mayor actividad registrada en otoño y picos de menor tamaño en primavera y verano, sugiriéndose de 4 a 5 generaciones. En Chile se observan 1 o 2 picos poblacionales, dependiendo de la localidad, con 3 o 4 generaciones anuales (Mausel *et al.*, 2007).

El largo período observado de actividad de vuelo para *Orthotomicus erosus* (invierno tardío, primavera y verano) es producto de la gran amplitud térmica de la actividad que presenta (entre 16.7°C y 22.5 °C). La mayor actividad en estos meses coincide con lo observado en Europa, Israel, Sudáfrica y Túnez (Mendel, 1983; Tribe, 1990). Mendel y Halperin (1982) plantean que las hembras oviponen entre 18 °C y 42°C. En Francia, *O. erosus* presenta la temperatura óptima para el vuelo entre 18 °C y 19 °C (Tribe, 1990). Estos datos son comparables con la temperatura media de 19.6 °C observada para *O. erosus* en Uruguay. Mendel (1983) sugiere que *O. erosus* presenta hasta 7 generaciones anuales en Israel, con un promedio de duración generacional de 30 días en verano. Debido a la continua actividad durante los meses de primavera y verano en Uruguay, se sugieren al menos 5 generaciones de *O. erosus* para el país.

*Cyrtogenius luteus* presenta mayor actividad en los meses de mayor temperatura acotado principalmente al verano (entre 20.3°C y 23.9 °C). Debido a que la mayoría de los aspectos de la biología de *C. luteus* son desconocidos, no es posible inferir el número de generaciones presentes para Uruguay.

El manejo de los escolítidos debe orientarse a reducir y mantener las poblaciones en niveles bajos, considerando tanto medidas preventivas como medidas de mitigación. Dado que el principal factor limitante para todos los escarabajos de corteza es la disponibilidad de sitios de cría, el manejo de los mismos es esencial. La información generada de la actividad de vuelo de las especies presentes en el país permitirá ajustar los calendarios de actividad silvícola de las empresas forestales, evitando generar residuos en períodos de gran actividad de escolítidos. Debido a que no todas las especies cuentan con investigación a nivel mundial, se encuentran en curso estudios para determinar la variación estacional de la duración generacional para las tres especies.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece especialmente a las empresas forestales Cambium y Fibra por el apoyo logístico en lo referente al monitoreo de escolítidos y a Sofía Simeto, Gonzalo Martínez y Andrés Hirigoyen por sus valiosos aportes al trabajo.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

**CIESLA, W.M.** 2011. Forest Entomology: A Global Perspective. Wiley-Blackwell. 400 p.

**COULSON, R.N.** 1979. Population dynamics of bark beetles. Annual Review of Entomology 24: 417-447.

**GÓMEZ, D.; MARTÍNEZ, G; BEAVER, R.A.** 2012. First record of *Cyrtogenius luteus* (Blanford) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in the Americas and its distribution in Uruguay. The Coleopterists Bulletin 66(4): 362–364.

**GÓMEZ, D.; MARTÍNEZ, G.** 2013. Bark beetles in pine tree plantations in Uruguay: First record of *Orthotomicus erosus* Wollaston (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). The Coleopterists Bulletin 67(4): 470–472.

**KIRISITS, T.** 2004. Fungal Associates of European Bark Beetles with Special Emphasis on the Ophiostomatoid Fungi. En: LIEUTIER, F.; DAY, K.R.; BATTISTI, A.; GRÉGOIRE, J. C.; EVANS, H. F. (Eds.). Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 569 p.

**LÓPEZ, S.; ROMÓN, P.; ITURRONDOBEITA, J.; GOLDARAZENA, A.** 2007. Los escolítidos de las coníferas del País Vasco. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. Vitoria. 198 p.

**MAUSEL, D.; GARA, R.; RUIZ, C.; IDE, S.; AZAT, R.** 2007. The introduced bark beetles *Hylurgus ligniperda* and *Hylastes ater* (Coleoptera: Scolytidae) in Chile: seasonal flight and effect of *Pinus radiata* log placement on colonization. Canadian Journal of Forest Research 37: 156–169.

**MCNEE, W.R.; WOOD; D.L.; STORER, A.J.** 2000. Pre-emergence feeding in bark beetles (Coleoptera: Scolytidae). Environmental Entomology 29: 495-501.

**MENDEL, Z.** 1983. Seasonal History of *Orthotomicus erosus* (Coleoptera: Scolytidae) in Israel. Phytoparasitica 11:13-24.

**MENDEL, Z.; HALPERIN, J.** 1982. The Biology and Behaviour of *Orthotomicus erosus* in Israel. Phytoparasitica 10:169-181.

**RANGEL, R.; PÉREZ, M.; SÁNCHEZ, S.; CAPELLO, S.** 2012. Fluctuación poblacional de *Xyleborus ferrugineus* y *X. affinis* (Coleoptera: Curculionidae) en ecosistemas de Tabasco, México. Revista de Biología Tropical 60: 1577–1588.

**REAY, S.; WALSH, P.** 2001. Observations of the flight activity of *Hylastes ater* and *Hylurgus ligniperda* (Curculionidae: Scolytinae) in *Pinus radiata* forests in the central North Island, New Zealand. *New Zealand Entomologist* 85: 79–85.

**ROSSI, J.P.; SAMALENS, J.C.; GUYON, D.; VAN HALDER, I.; JACTEL, H.; MENASIEU, P.; PIOUS, D.** 2009. Multiscale Spatial Variation of the Bark Beetle *Ips sexdentatus* Damage in a Pine Plantation Forest (Landes De Gascogne, Southwestern France). *Forest Ecology and Management* 257(7): 1551–1557.

**RUFFINELLI REY, A.** 1967. Insectos y otros invertebrados de interés forestal. *Silvicultura*, Uruguay 17: 5–79.

**SOTO, A.; ORENGO, L.; ESTRELA, A.** 2002. Estudio de poblaciones de insectos escolítidos (Coleoptera: Scolytidae) en las masas de *Pinus halepensis* Miller del Parque Natural del Montgó (Alicante). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 28: 445–456.

**TRIBE, G.D.** 1990. Phenology of *Pinus radiata* log colonization and reproduction by the European bark beetle *Orthotomicus erosus* (Wollaston) (Coleoptera: Scolytidae) in the south-western Cape Province. *Journal of the Entomological Society of Southern Africa* 53(2): 117–126.

**TRIBE, G.D.** 1991. Phenology of *Pinus radiata* log colonization by the red-haired pine bark beetle *Hylurgus ligniperda* (Fabricius) (Coleoptera: Scolytidae) in the south-western Cape Province. *Journal of the Entomological Society of Southern Africa* 54 (1): 1-7.



# CAPÍTULO III IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PATOGENICIDAD DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Paecilomyces cateniannulatus* AISLADO DE *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE) EN EL ESTADO DE RÍO GRANDE DEL SUR - BRASIL

María L. San Román<sup>1</sup>; Carlos F. Wilcken<sup>1</sup>; Ana C. Firmino<sup>1</sup>; Edson L. Furtado<sup>1</sup>

## 1. INTRODUCCIÓN

El área de plantación de eucalipto en Brasil ha alcanzado las 5.102.103 ha en 2012 según la Asociación Brasileira de Forestadores (ABRAF, 2013). En los últimos años, nuevas plagas han sido detectadas, amenazando la productividad de las plantaciones. Entre éstas se encuentra la chinche del eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). Esta plaga es considerada especie invasora en varios países, estando presente en África (Sudáfrica y Zimbawe), América del Sur (Argentina, Uruguay, Brasil, Chile y Paraguay) y Europa (Italia) (Jacobs y Nesar, 2005; Carpintero y Dellapé, 2006; Wilcken *et al.*, 2010; Martínez y Bianchi, 2010; Laudonia y Sasso, 2012).

En Brasil *T. peregrinus* fue detectado por primera vez en el 2008 y rápidamente se transformó en un problema. Este insecto cuando ataca plantas de eucalipto reduce su productividad, disminuyendo el área foliar. Las ninfas y adultos se alimentan succionando savia, provocando el plateado de las hojas, que evoluciona a clorosis o bronceado, llevando finalmente a la defoliación de los árboles. Entre las estrategias para su control se encuentra el control químico, generalmente utilizado cuando ocurren brotes poblacionales de esta plaga. Sin embargo su uso es limitado, no siendo recomendado por el riesgo ambiental, la falta de ingre-

dientes activos registrados y las restricciones de uso de plaguicidas no permitidos por las certificadoras nacionales e internacionales. Dentro del control biológico con enemigos naturales, fue reportada la ocurrencia de *Cleruchoidea noackae* Lin & Huber (Hymenoptera: Mymaridae) parasitando huevos de este insecto, en Sydney (Australia) (Lin *et al.*, 2007). *Cleruchoidea noackae* fue introducido por primera vez en Brasil en noviembre de 2011. Otra alternativa es el control microbiano utilizando organismos entomopatógenos. En Brasil fue reportada la ocurrencia del hongo *Zoopthora radicans* (Entomophthorales) afectando ninfas y adultos de *T. peregrinus* en plantaciones clonales de eucalipto en el estado de San Pablo en 2009 (Mascarin *et al.*, 2012). Más allá del hallazgo, este grupo de hongos resulta difícil de multiplicar a escala comercial para su uso a campo (Alves, 1998). Entre los principales hongos entomopatógenos empleados para el control de insectos se encuentran los hongos pertenecientes a la subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, con géneros tales como *Paecilomyces*, *Beauveria*, *Metarhizium* y *Lecanicillium* (Alves, 1998). Los hongos del género *Paecilomyces* penetran normalmente vía tegumento, usando la presión física y la acción química a través del apresorio de penetración. Han sido observados afectando lepidópteros, coleópteros, hemípteros y ortópteros. Existen reportes de aislamientos de *Paecilomyces* spp. en *Stenoma decora*

<sup>1</sup> Departamento de Producción Vegetal / Defensa Fitosanitaria, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad Estadual de San Pablo (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

(Lepidoptera: Stenomidae) en Bahía, *Eupseudosoma* spp. (Lepidoptera: Arctiidae) en San Pablo y en adultos de *Lagriia villosa* (Coleoptera: Lagriidae), en Mato Grosso (Alves, 1998).

En estudios realizados en áreas afectadas por *T. peregrinus* fueron observadas ocurrencias epizooticas en plantaciones de eucaliptos en la región de Alegrete, Rio Grande do Sul. A partir de insectos muertos en esa epizootia, se aislaron algunos hongos potencialmente entomopatógenos, siendo uno de ellos identificado como del género *Paecilomyces*, todavía no registrado como patógeno de *T. peregrinus*. Este trabajo tuvo como objetivo realizar la caracterización morfológica, biológica, patogénica y molecular de *Paecilomyces* spp. aislado de *T. peregrinus*. También se realizó un estudio de infección del insecto, visualizado por medio del uso de microscopía electrónica de barrido.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### *Colecta de insectos y aislamiento del hongo*

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Control Biológico de Plagas Forestales de la Facultad de Ciencias Agronómicas (FCA), Universidad Estadual Paulista - Campus de Botucatu. Fueron colectados individuos de *T. peregrinus* muertos en epizootia en las plantaciones de eucaliptos de la empresa Stora Enso, en la región de Alegrete, Río Grande do Sul. La colecta de insectos fue realizada en noviembre de 2011, directamente de la copa de los árboles. Se colectaron individuos muertos y moribundos con presencia de micelio sobre el cuerpo, siendo ésta la principal característica para la selección de las muestras (Figuras 1 y 2). Para determinar el agente patógeno causante de mortalidad en los insectos se siguió la metodología basada



**Figura 1.** A. *T. peregrinus* sobre hoja de eucalipto en el campo. B. *T. peregrinus* enfermos (1) y sanos (2), colectados en epizootias a campo.



**Figura 2.** *T. peregrinus* con extrusión de micelio de *Paecilomyces* sp. por las articulaciones y orificio anal.

en los postulados de Koch. Los insectos colectados fueron acondicionados en cámaras húmedas para propiciar la esporulación de los hongos. Después de 24 horas los insectos fueron sometidos a esterilización con solución de hipoclorito de sodio al 2%, alcohol al 70%, agua esterilizada y posteriormente colocados en medio agar-agua en placas de Petri. Después de la observación del crecimiento de la colonia, ésta fue repicada en medio PDA (papa-dextrosa-agar) para su posterior identificación.

### **Obtención de cultivos monospóricos**

Para la obtención de cultivos monospóricos, las colonias obtenidas de los aislamientos fueron lavadas con agua destilada esterilizada y la concentración de las suspensiones de esporas fue estandarizada en  $10^2$  esporas/mL. Se colocaron 100  $\mu$ l de la suspensión de esporas en placas conteniendo medio agua/agar enriquecido con 0,005% de oxitetraciclina. Las esporas fueron individualizadas y visualizadas en microscopio óptico, utilizando cámara de Neubauer para el conteo y posterior dilución a la concentración padrón ( $10^2$  esporas/mL). Posteriormente, las esporas individuales fueron transferidas a medio PDA para la formación de las colonias.

### **Test de patogenicidad en *T. peregrinus***

El objetivo del test fue evaluar el potencial entomopatogénico de los hongos aislados. Para la realización de los bioensayos se utilizaron insectos sanos de *T. peregrinus*, obtenidos de la cría en laboratorio. A partir del aislamiento puro del hongo, obtenido a partir de los insectos, se escogieron algunas placas para hacer los test de patogenicidad. Se utilizó un diseño experimental enteramente al azar con dos tratamientos (patógeno y testigo) y 4 repeticiones. Cada repetición estaba compuesta por una placa de Petri conteniendo gel estéril y un disco de hoja de *Eucalyptus camaldulensis*, en el cual se colocaban 10 insectos (ninfas y adultos) de *T. peregrinus*.

El hongo fue pulverizado con una Torre de Potter con un volumen de 3 mL de suspensión de esporas para cada aislamiento aplicada a 15 lb/pul<sup>2</sup> de presión y con una concentración de  $10^6$  esporas/mL (diluido con agua estéril y coadyuvante Tween 20 al 0,02%). Para el testigo fue realizada la aspersion utilizando agua destilada estéril con Tween al 0,02%. Después de la inoculación las placas fueron colocadas en cámara BOD a 25°C y un fotoperíodo de 12 horas de luz/oscuridad. Se realizaron evaluaciones diarias del experimento contando y retirando los insectos muertos hasta 6 días o hasta alcanzar la mortalidad total en el tratamiento. Los insectos muertos fueron colocados en cámara húmeda para reaislar el hongo causante de la mortalidad y para confirmar que se trató del aislamiento inicialmente aplicado.

### **Proceso de colonización del hongo en el insecto**

Para complementar los estudios de patogenicidad se realizó un seguimiento de la colonización del hongo sobre el cuerpo del insecto. Para esto fue pulverizada una suspensión conteniendo  $10^6$  esporas/mL directamente sobre los insectos vivos. Como testigo la pulverización fue hecha con agua destilada estéril.

Después de la inoculación, conforme a la metodología descrita para el test de patogenicidad, los insectos tratados fueron colectados en intervalos de tiempo predeterminados (2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 horas) y fijados en solución de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampón fosfato 0,05M, pH 7,2), por un período mínimo de 24 horas a partir de la muerte de los insectos. Posteriormente, las muestras fueron preparadas y analizadas en un microscopio electrónico de barrido LEO435-VP. Se evaluaron cinco insectos para cada intervalo de tiempo predeterminado. La preparación y observación de las muestras fue realizada en el Centro de Microscopía Electrónica, localizada en la ESALQ/USP.

### **Caracterización biológica del crecimiento**

La caracterización cultural de los aislamientos se basó en la velocidad de crecimiento micelial, color de la colonia y estructuras producidas en medio de cultivo PDA. A partir de los cultivos, se obtuvieron discos de 6 mm de diámetro de los bordes de la colonia cultivada por 10 días en medio PDA y los mismos fueron transferidos al centro de nuevas placas de Petri utilizando el mismo medio. Posteriormente al repique, las cepas aisladas fueron incubadas a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  y un fotoperíodo de 12 h luz/oscuridad. La evaluación del crecimiento de la colonia fue realizada a diario, midiendo el diámetro de la misma en la placa Petri con regla milimetrada. La velocidad media de crecimiento micelial fue utilizada para los análisis estadísticos. El experimento fue conducido siguiendo un diseño al azar con cinco repeticiones por tratamiento, donde cada unidad experimental comprendía una placa.

### **Caracterización morfológica**

Se determinó el tamaño de las esporas producidas por los aislamientos mediante el sistema de video cámara Opton, modelo TA-0124XS, instalada en microscopio óptico. La imagen fue transmitida a un computador y analizada por medio del programa EDN-2. Para la calibración del equipamiento se utilizó una lámina micrografada (Carl Zeiss®). Se evaluaron 30 esporas de cada aislamiento.

### **Caracterización molecular**

La extracción de ADN del aislamiento seleccionado en el experimento de patogenicidad se realizó conforme a una adaptación del método desarrollado por Murray y Thompson (1980). Para la caracterización molecular se estudió la región ITS del ADN ribosomal y parte del gen del factor de elongación (EF-1 $\alpha$ ). La amplificación de la región ITS del ADN ribosomal del hongo seleccionado se realizó utilizando los pares de primers

ITS 1 e ITS 4 que generan un fragmento de aproximadamente 750 pares de bases. Para la PCR, se emplearon 3  $\mu\text{l}$  del ADN total extraído (30 ng), tampón 1X de la enzima GoTaq ADN polimerasa (Promega®), 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTP, 0,2  $\mu\text{M}$  de cada primer y 1,25 U de GoTaq DNA polimerasa (Promega®), ajustando el volumen de la reacción para 50  $\mu\text{l}$  con agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC). En el caso del PCR relacionado con el factor de elongación fue usado el primer EF1, que genera un fragmento de aproximadamente 1300 pares de bases. Para el PCR se emplearon 3  $\mu\text{l}$  de ADN total extraído (30 ng), tampón 1X de la enzima GoTaq DNA polimerasa (Promega®), 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTP, 1  $\mu\text{M}$  del primer y 1,25 U de GoTaq DNA polimerasa (Promega®), ajustando el volumen de reacción para 50  $\mu\text{l}$  con agua tratada con DEPC.

Los fragmentos de ADN amplificados fueron visualizados en gel de agarosa coloreado con bromuro de etidio y observados bajo luz UV. Previo a su secuenciación los fragmentos amplificados fueron purificados utilizando 100  $\mu\text{l}$  del producto de SV Gel y PCR Clean Up Sistem (Promega®). Las secuencias obtenidas fueron alineadas y procesadas con el programa Mega 5.05 para posteriormente construir árboles filogenéticos de los aislamientos de *Paecilomyces*, utilizando el método "p-distance" (Tamura, 1992). En cada caso fue realizado un "bootstrap" con 10.000 réplicas.

Los resultados de PCR fueron comparados con las secuencias depositadas en el GenBank, códigos de acceso BankIt1525016 *Paecilomyces* JQ957848 (región ITS); BankIt1525018 *Paecilomyces* JQ957849 ( $\alpha$ -elongase).

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

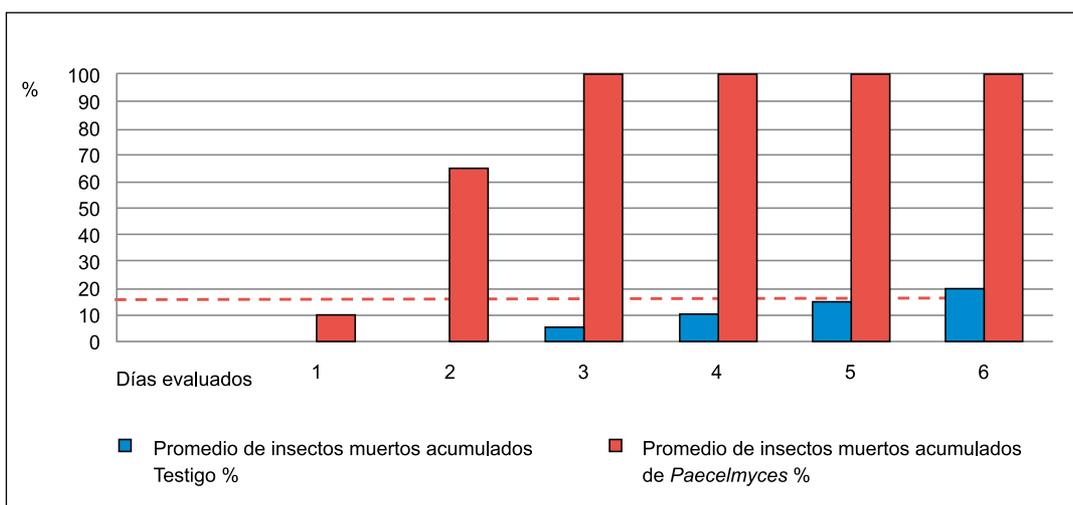
A partir de los insectos colectados se obtuvo una colonia con características típicas de *Paecilomyces* spp., que al ser inoculada en insectos sanos se mostró altamente patogénica a la chinche del eucalipto. En

los bioensayos realizados en los test de patogenicidad se verificó su capacidad de causar mortalidad por encima del 50% de los insectos en dos días posteriormente a la inoculación, en tanto que a partir de los tres días fue observada la mortalidad del 100% de los insectos inoculados (Figura 3). A pesar de observarse mortalidad de insectos 24 horas después de la inoculación, la observación en microscopio electrónico de barrido permitió comprobar que las esporas del hongo inician su germinación y penetración sobre el cuerpo del insecto a las 4 horas después de la inoculación (Figura 4). A las 24 horas de la inoculación, fue posible observar la colonización del cuerpo del insecto en casi su totalidad, corroborando los datos de los bioensayos de patogenicidad (Figura 4).

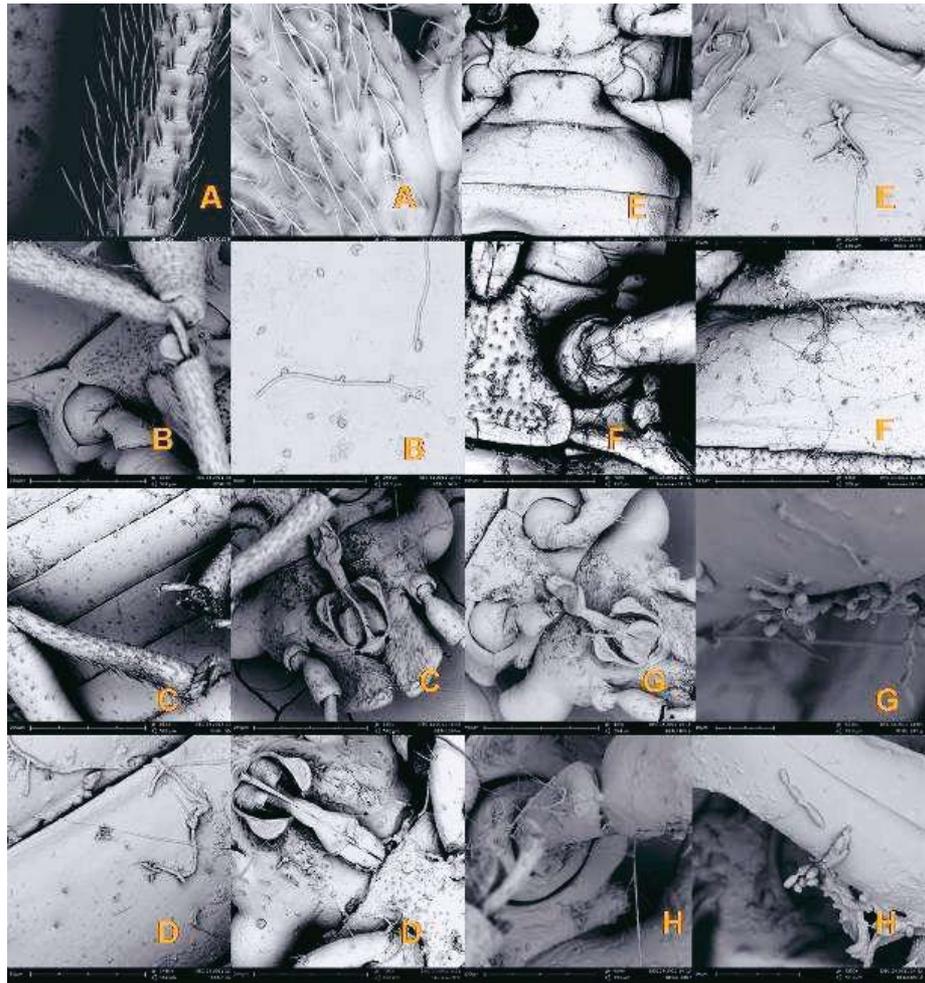
Según la literatura, la patogenicidad de algunas especies de *Paecilomyces* puede variar conforme a la forma de propágulo usada en la inoculación de este hongo (Fragues *et al.*, 1994). Estos autores, estudiando la capacidad de infección de los propágulos de *P. fumosoroseus* sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) observaron que cuando la suspen-

sión de esporas usadas para la inoculación se basa en fragmentos de hifas, conidios germinados y conidios no germinados, existen diferencias en el número de insectos muertos, ya que las inoculaciones con esporas germinadas y con hifas del hongo fueron más agresivas que con conidios no germinados. Comparando la bioactividad de blastosporas de *P. fumosoroseus* y conidios de *Beauveria bassiana*, Fragues *et al.* (1994) mostraron que las blastosporas fueron 4 veces más eficaces en infectar y matar ninfas de la mosca blanca *Bemisia argentifolli* (Hemiptera: Aleyrodidae). En base a estos resultados se podría asumir que la cantidad de individuos de *T. peregrinus* muertos a las 24 h podría ser mayor si éstos fueran inoculados con esporas germinadas e hifas del hongo.

En base a las características biológicas y morfológicas de los cultivos y a las secuencias de ADN extraídas del hongo, éste fue identificado como *Paecilomyces cateniannulatus* Liang. El hongo estudiado mostró un crecimiento micelial de 10,7 mm/día. La colonia tenía coloración blanca en la parte superior y levemente rosada en la cara posterior de la placa en medio de cultura PDA (Figura 5). El



**Figura 3.** Mortalidad de ninfas y adultos de *T. peregrinus* a lo largo del tiempo después de la inoculación con esporas de *Paecilomyces* spp. en laboratorio (temperatura 25 ± 1 oC, fotoperiodo de 12 h luz/oscuridad).



**Figura 4.** Evolución de la colonización del hongo *Paecilomyces cateniannulatus* en el cuerpo de *T. peregrinus* (A = 2 hs, B = 4 hs, C = 8 hs, D = 12 hs, E = 24 hs, F = 48 hs, G = 72 hs, H = 96 hs).

hongo presentó fiálides agrupadas y globosas en posición basal, comprimidas y alargadas al final, donde se pudieron observar los conidios

(Figura 5). Los conidios son pequeños y ova-les con dimensiones de 2,6 (2,0-3,5  $\mu\text{m}$ ) x 1,6 (0,8-2,5  $\mu\text{m}$ ) largo y ancho respectivamente.



**Figura 5.** Fiálides y conidios de *P. cateniannulatus* (A) y colonia de *P. cateniannulatus* (B).

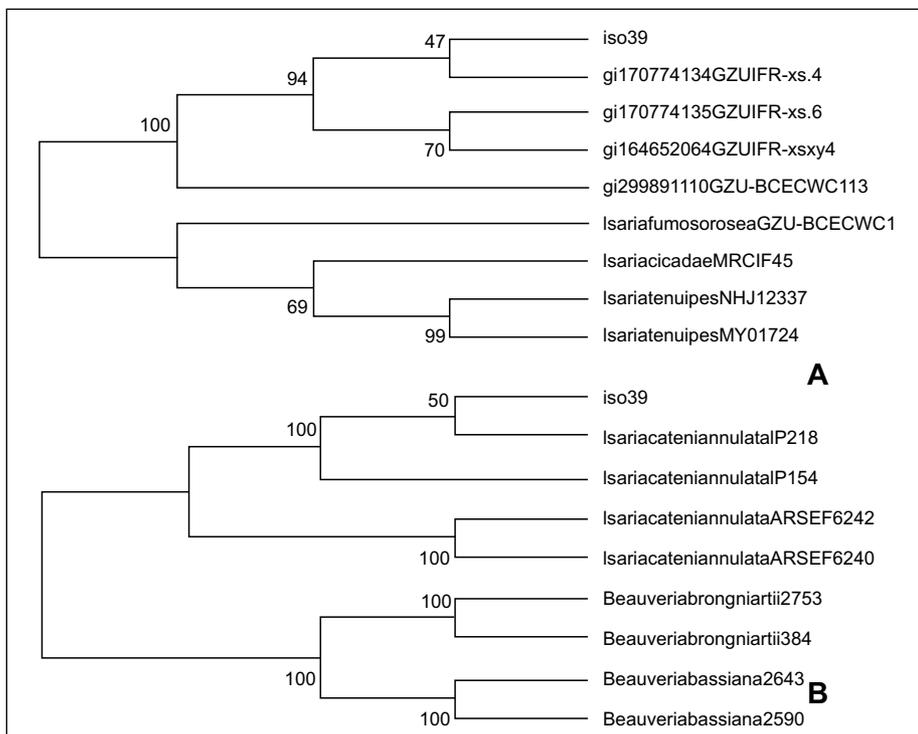
Liang *et al.* (2005), en un trabajo realizado en China donde caracterizaron morfológicamente y molecularmente especies de *Paecilomyces*, describen a *P. cateniannulatus* con características similares a las obtenidas en este trabajo, donde las colonias típicas tienen coloración blanca e hifas aéreas. Las fiáldes poseen una porción basal globosa o elipsoidal y una proyección fina y larga. Presenta así mismo conidios pequeños, ovales a elipsoidales de 2 a 3,5 µm × 1-2,5 µm. En ese estudio los autores reportan además a *P. cateniannulatus* como entomopatógeno para algunos lepidópteros.

El presente trabajo constituye el primer reporte de *P. cateniannulatus* para Brasil como entomopatógeno de *T. peregrinus*.

*Paecilomyces cateniannulatus* puede ser fácilmente distinguido de especies estrechamente relacionadas, tales como *P. fumosoroseus* y *P. farinosus*, por la coloración blanca de la colonia y cadenas de conidios imbricados. La variación genética

de 12 especies de *Paecilomyces* por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ha sido relatada por Huang *et al.* (2002). Los resultados experimentales muestran que las semejanzas entre *P. cateniannulatus* y *P. farinosus* son apenas de 26 a 38%. Los test de laboratorio apuntan a la existencia de algunas razas de *P. cateniannulatus* que tienen alta patogenicidad cuando fueron inoculadas en pulgones, nematodos y especies de lepidópteros (Liang *et al.*, 2005).

En base a las secuencias de ADN (Figura 6) el aislamiento de *P. cateniannulatus* (ISO 39) obtenido de *T. peregrinus* presentó 99% de homología de la región ITS de su ADN ribosomal con el de *Isaria cateniannulata* (= *P. cateniannulatus*) GZUIFR-xs.4 (GI170774134) reportado en China. Así mismo la secuenciación de la región del factor de elongación de este mismo aislamiento presentó 99% de homología con *Isaria cateniannulata* (= *P. cateniannulatus*) raza IP 218 (GI323145657) de Brasil.



**Figura 6. A)** Árbol filogenético de *P. cateniannulatus* basado en la región ITS-5.8S rDNA. **B)** Árbol filogenético de *P. cateniannulatus* basado en el factor de elongación.

Los análisis filogenéticos apuntan valores de "bootstrap" significativos, encima del 50%, que confirman la identidad de este hongo, separando de manera clara *P. cateniannulatus* de otras especies de *Paecilomyces* (Figura 6). Como se observa en el árbol filogenético montado en base a las secuencias del factor de elongación, los aislamientos brasileros (IP) formaron un grupo bien definido y diferente de los aislamientos de *P. cateniannulatus* de China (ARSEF).

#### 4. CONCLUSIONES

- Fue identificada la especie de *Paecilomyces cateniannulatus* infectando *T. peregrinus*, siendo ésta la primera ocurrencia de este hongo entomopatógeno sobre esta plaga forestal exótica en Brasil.
- *P. cateniannulatus* es capaz de penetrar el cuerpo del insecto a partir de las 4 horas posteriores a la inoculación, principalmente por las aberturas naturales del insecto.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

**ABRAF.** 2013. Anuário estatístico da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas: ano base 2011. Brasília Df., 80 p.

**ALVES, S.B.** 1998. Controle microbiano de insetos. Piracicaba. FEALQ. 1163 p.

**CARPINTERO, D.L.; DELLAPÉ, P.M.** 2006. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). *Zootaxa* 1228: 61-68.

**FRAGUES, J.; MANIANINA, N.K.; DELAMAS, J.C.** 1994. Infectivity of propagules of *Paecilomyces fumosus* during *in vitro* Spodoptera frugiperda. *Journal of Invertebrate Pathology* 64: 1973-1978.

**HUANG, B.; YU, C.X.; CHEN, X.L.; FAN, L.I.; MZAND, Z.Z.** 2002. Classification and Identification of species and strains in *Paecilomyces* using RAPD. *Mycosystema* 21: 33-38.

**INGLIS, P.W.; TIGANO, M.S.** 2006. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS Sequences. *Genetics and Molecular Biology* 29: 132-136.

**JACOBS, D.H.; NESER, S.** 2005. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to *Eucalyptus trees*: research in action. *South African Journal of Science* 101: 233-236.

**LAUDONIA, S.; SASSO, R.** 2012. The bronze bug *Thaumastocoris peregrinus*: a new insect recorded in Italy, damaging to *Eucalyptus trees*. *Bulletin of Insectology* 65(1): 89-93.

**LIN, N.Q.; HUBER, J.T.; LA SALLE, J.** 2007. The Australian genera of Mymaridae (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Zootaxa* 1596: 1-111.

**LIANG, Z.Q.; HAN, Y.F.; CHU, H.L.; LIU, A.Y.** 2005. Studies on genus *Paecilomyces* in China I. *Fungal Diversity* 20: 83-101.

**MARTÍNEZ, G.; BIANCHI, M.** 2010. Primer registro para Uruguay de la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Delappé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae). *Agrociencia* 14(1): 15-18.

**MASCARIN, G.M.; DUARTE, V.S.; BRAN-DÃO, M.M.; DELALIBERA Jr, I.** 2012. Natural occurrence of *Zoophtora radicans* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) on *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) an invasive pest recently found in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 110(3): 401-404.

**MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F.** 1980. *Nucleic acids research*, Oxford University Press, United Kingdom.

**TAMURA, K.** 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9: 678-687.

**WILCKEN, C.F.; SOLIMAN, E.P; SÁ, L.A.N.; BARBOSA, L.B.; DIAS; T.K.R.; FERREIRA-FILHO, J.P.; RODRIGUES, R.J.** 2010. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpenter and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. *Journal of Plant Protection Research* 50(2): 201-205.



# CAPÍTULO IV

## HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE LA CHINCHE DEL EUCALIPTO

### *Thaumastocoris peregrinus*

## RESULTADOS PRELIMINARES

Sofía Simeto<sup>1</sup>, Sandra Lupo<sup>2</sup>, Lina Bettucci<sup>2</sup>, Belén Corallo<sup>2</sup>, Carlos Pérez<sup>3</sup>, Demian Gómez<sup>1</sup>, Paula González<sup>1</sup>, Diego Torres<sup>1</sup>, Gonzalo Martínez<sup>1</sup>, Eduardo Abreo<sup>4</sup>, Federico Rivas<sup>4</sup>, Nora Altier<sup>4</sup>

### 1. INTRODUCCIÓN

La chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellappé 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae), es una de las plagas emergentes más importantes para las plantaciones de eucaliptos en el Hemisferio Sur debido a su gran capacidad invasora y a la ausencia de enemigos naturales (Martínez y Bianchi, 2010; Wilcken *et al.*, 2010; Ide *et al.*, 2011). Se alimenta por succión provocando amarillamiento del follaje, defoliación y en casos muy severos, muerte de árboles (Martínez *et al.*, 2009). Los primeros brotes epidémicos se registraron en Australia (de donde es originaria), a fines de la década de 1990 (Noack y Rose, 2007). A partir de ese entonces *T. peregrinus* ha tenido una rápida dispersión, encontrándose presente actualmente en Sudáfrica, Malawi, Zimbawe, Italia, Portugal, Nueva Zelanda, Argentina, Chile, Brasil, Paraguay y Uruguay (Jacobs y Neser, 2005; Nadel *et al.*, 2009; Laudonia y Sasso, 2012; García *et al.*, 2013; Sopow y Bader, 2013; Carpintero y Dellapé, 2006; Ide *et al.*, 2011; Wilcken, 2008; Wilcken *et al.*, 2010; Martínez y Bianchi, 2010). En Uruguay está presente en las principales especies de eucaliptos plantadas comercialmente (Martínez *et al.*, 2009) y, desde su detección en 2008, se han observado importantes picos poblacionales en los años 2008, 2009, 2010 y 2011.

Al igual que para muchas otras plagas forestales, el control químico es escasamente aplica-

do debido a sus desventajas tanto ambientales como económicas (Martínez *et al.*, 2009). En el caso de *T. peregrinus*, su presencia durante todo el año (lo que permitiría un reingreso de la plaga desde una plantación vecina) y su alta movilidad hacia zonas de la hoja no expuestas a un eventual producto, hacen que el control químico parezca a priori una opción inviable. A su vez, los productos químicos podrían impactar sobre enemigos naturales de otras plagas y sobre el ambiente. Por otra parte, para aquellas plantaciones certificadas por FSC (Forest Stewardship Council) existen grandes restricciones al uso de determinados productos químicos. Como alternativa, el control biológico con enemigos naturales o patógenos ha sido relativamente exitoso en el manejo de plagas en el sector forestal (Martínez *et al.*, 2009).

Los hongos entomopatógenos están presentes naturalmente en el ambiente y son responsables del control de las poblaciones de muchos insectos. El interés por el uso de hongos para el control de insectos plaga se ha puesto en evidencia por el gran número de productos comerciales disponibles y en desarrollo (Butt *et al.*, 2001). La seguridad de su uso para la salud humana, el ambiente y los organismos no-blanco debe ser estrictamente analizada caso a caso, sin embargo, existen estudios que sugieren que los efectos de los hongos entomopatógenos sobre organismos no-blanco son mínimos y que ofrecen una alternativa segura para su inclusión en medidas de Manejo Integrado

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Programa de Producción Forestal, E.E. del Norte, Tacuarembó.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias/Ingeniería, Laboratorio de Micología, Universidad de la República, Montevideo.

<sup>3</sup> Facultad de Agronomía, Departamento de Protección Vegetal, EEMAC, Universidad de la República, Paysandú.

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Programa de Sustentabilidad Ambiental, Sección Bioinsumos, E.E. Wilson Ferreira Aldunate, Las Brujas, Canelones.

de Plagas (MIP), utilizados en conjunto con otras medidas de manejo sustentable (Shah y Pell, 2003). En el contexto de programas de Manejo Integrado de Plagas son vistos como alternativas reales al control químico en la forestación (Ahmeda y Leatherb, 1994).

En plantaciones comerciales de *Eucalyptus* en nuestro país se han observado epizootias en *T. peregrinus* debidas a hongos entomopatógenos lo cual evidencia el potencial de éstos para reducir las poblaciones del insecto. A su vez, equipos de investigación del INIA y la Universidad de la República cuentan con cepas de hongos entomopatógenos aisladas de plagas agrícolas y otras plagas forestales, caracterizadas y en algunos casos semiformuladas, las cuales podrían aportar al manejo de esta plaga. Actualmente se encuentra en ejecución el proyecto INIA “Desarrollo de bioinsecticidas (hongos entomopatógenos) para el control de la chinche del eucalipto *Thaumastocoris peregrinus*”, ejecutado en conjunto con la UdelaR. El principal objetivo de este proyecto es el desarrollo de bioinsecticidas a partir de la búsqueda, evaluación y bioproducción de hongos entomopatógenos para el control de la chinche del eucalipto. A continuación se presentan resultados preliminares del primer año del proyecto.

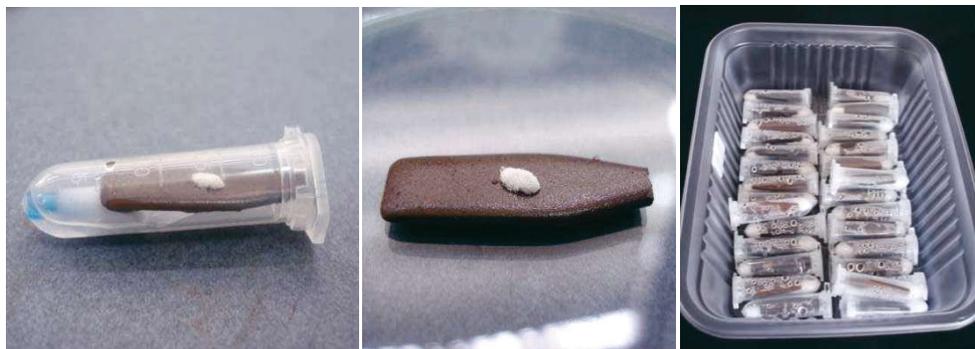
## 2. METODOLOGÍA

La metodología del proyecto comprende varias etapas y si bien en el presente artículo se presentan sólo resultados preliminares de las primeras, se comentará brevemente la metodología de las restantes.

### **Colecta de *Thaumastocoris peregrinus*, aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos**

Durante el otoño y principios de invierno de 2013 se colectaron ejemplares de *T. peregrinus* en las regiones Sureste, Litoral y Centro – Norte. Para la colecta se eligieron plantaciones de las especies de *Eucalyptus* más apetecidas por la plaga (*E. viminalis*; *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. tereticornis* y *E. camaldulensis*), pero también se realizaron colectas en plantaciones con reportes de ataque reciente (*E. smithii* y *E. globulus*). En cada sitio se colectaron 10 ramas (en las que se observaban chinches) de 10 árboles diferentes de aproximadamente 50 cm de largo. Cada rama se colocó en bolsa de nylon debidamente rotulada y se transportaron en una conservadora hasta su almacenamiento y procesamiento en laboratorio.

Se analizaron todos los individuos muertos (con y sin síntoma de micosis) y 5 adultos vivos por rama. Se colocó cada insecto en una cámara húmeda compuesta por un tubo Eppendorf de 2 mL con un fragmento de algodón humedecido con agua (Figura 1). Se incubaron durante 7 días a 25°C y bajo un régimen de 12 hs de luz/oscuridad para estimular el desarrollo de estructuras reproductoras. Finalmente se observaron bajo lupa y microscopio y se aislaron solamente los hongos entomopatógenos. Los medios de cultivo utilizados fueron MEA (Malt Extract Agar), PDA (Potato Dextrose Agar) y SDA (Sabouraud Dextrose Agar). La identificación primaria de



**Figura 1.** Cámaras húmedas con *Thaumastocoris peregrinus*.

los entomopatógenos se realizó en base a las características macro y micromorfológicas de las colonias. La confirmación de la identidad se realizará mediante técnicas moleculares (amplificación y secuenciación de la región ITS del ADNr y análisis filogenético).

### **Ensayos de inoculación de *Thaumastocoris peregrinus* in vitro; selección de cepas según su virulencia**

Para los ensayos de inoculación *in vitro* se elaboró y ajustó previamente un protocolo de inoculación de hongos entomopatógenos sobre *T. peregrinus* bajo condiciones controladas en cámara de inoculación. Se determinaron las condiciones óptimas de temperatura y humedad para el desarrollo de los hongos así como el número óptimo de

individuos (chinchas) a ser evaluados, considerando la mortalidad natural. El protocolo probó ser efectivo para el desarrollo de la infección por parte de los entomopatógenos y para discriminar su patogenicidad y virulencia. Se entiende por patogenicidad la capacidad de infectar y producir la enfermedad y por virulencia el grado de dicha patogenicidad (Shapiro-Ilan *et al.*, 2005).

En base al protocolo desarrollado, para los primeros ensayos se trabajó con cepas de hongos entomopatógenos aislados de diferentes plagas agrícolas y forestales, pertenecientes a las colecciones del Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias – Ingeniería y del Laboratorio de Bioinsumos de INIA Las Brujas (Tabla 1). Más adelante se prevé también utilizar las cepas de entomopatógenos provenientes de las chinchas colectadas a campo.

**Tabla 1.** Cepas de hongos entomopatógenos de las colecciones del Laboratorio de Micología de Facultad de Ciencias – Ingeniería (FI) y del Laboratorio de Bioinsumos de INIA Las Brujas (ILB).

Código	Especie
FI 2122	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
FI 2067	<i>Beauveria</i> sp.
FI 2044	<i>Lecanicillium</i> sp.
FI 2243	<i>Beauveria</i> sp.
FI 2240	<i>Lecanicillium psalliotae</i>
FI 2121	<i>Beauveria bassiana</i>
FI 1728	<i>Beauveria bassiana</i>
FI 922	<i>Paecilomyces farinosus</i>
FI 1878	<i>Metarhizium anisopliae</i>
FI 2242	<i>Metarhizium anisopliae</i>
ILB 151	<i>Paecilomyces farinosus</i>
ILB 161	<i>Lecanicillium longisporum</i>
ILB 174	<i>Metarhizium anisopliae</i>
ILB 198	<i>Lecanicillium</i> sp.
ILB 200	<i>Paecilomyces</i> sp.
ILB 205	<i>Beauveria bassiana</i>
ILB 256	<i>Beauveria bassiana</i>
ILB 257	<i>Lecanicillium attenuatum</i>
ILB 264	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>

Para cada cepa, la inoculación se realizó sobre 50 chinches adultas (igual proporción de machos y hembras) criadas en jaula de voile sobre un ramo de hojas frescas de *E. tereticornis*, según Martínez y Scoz (2012). Cada ramo, armado sobre un matraz Erlenmeyer de 500 ml con agua, fue colocado en una jaula de voile en forma individual (Figura 2b). Como inóculo se utilizaron suspensiones de esporas en agua + Tween 20 al 0,02% con una concentración de  $10^7$  conidios/ml. Las mismas fueron obtenidas a partir de colonias de entomopatógenos crecidas sobre PDA y SDA de entre 15 y 20 días de edad y se aplicaron con aspersor manual sobre los ramos con los insectos (Figura 2a). En cada caso se determinó el porcentaje de germinación de las esporas. Para cada ensayo de inoculación, además de las cepas a ser evaluadas se incluyó un testigo (ramo con chinches asperjado con agua + Tween) y una cepa de referencia (considerada muy virulenta) de manera que los diferentes ensayos fueran comparables entre sí. Cada tratamiento (una cepa) se repitió al menos dos veces.

A partir del momento de infección, durante 10 días se realizaron inspecciones diarias, registrándose la mortandad de insectos (Figura 2c). Los individuos muertos fueron removidos de las jaulas, desinfectados superficialmente (etanol 70° durante 5 segundos y dos enjuagues en agua destilada estéril), colocados individualmente en cámaras húmedas e incubados a 23°C, para realizar el aislamiento e identificación del hongo y comprobar así la recuperación del inóculo.

Para seleccionar cepas con alta virulencia sobre *T. peregrinus* se las clasificó en cuatro grupos en base al número de días en los que se alcanzó el 90% de mortalidad (adaptación de Ihara *et al.*, 2001):

- Clase I (4 días o menos)
- Clase II (5 a 7 días)
- Clase III (8 a 10 días)
- Clase IV (más de 10 días)

Una vez evaluadas todas las cepas de entomopatógenos (las cepas de colecciones y las aisladas de chinches colectados a campo), se realizará una primera selección de los aislamientos más virulentos pertenecientes a las Clase I y II.

Si bien las siguientes actividades aún no se han realizado, se describe brevemente su metodología.

### **Ensayos de inoculación de *Thaumastocoris peregrinus* en invernáculo; selección de cepas según su virulencia**

Para los ensayos de inoculación en invernáculo se trabajará bajo condiciones semicontroladas y las inoculaciones se realizarán sobre chinches criadas sobre clones de *Eucalyptus* con hoja adulta en maceta (plantas de aprox. 80 cm de altura). Cada árbol se ubicará dentro de una estructura de voile y las plantas del ensayo se localizarán en un invernáculo (se evitará la caída de lluvia sobre las mismas pero la temperatura



**Figura 2.** A: Inoculación de un ramo de *E. tereticornis* con 50 individuos de *Thaumastocoris peregrinus* con suspensión de esporas; B: Incubación de los ramos inoculados en jaulas de voile; C: revisión diaria de los ramos inoculados y remoción de individuos muertos.

será bastante similar a la del ambiente). Las cepas a ser utilizadas en estos ensayos serán las seleccionadas previamente en los ensayos *in vitro*. La producción de inóculo, su concentración y modo de aplicación serán iguales a los de la etapa anterior. En base a los resultados obtenidos, se realizará una selección de los 10 aislamientos más virulentos pertenecientes a las Clase I y en caso de no ser suficientes, también a la Clase II. A partir de este momento, las 10 cepas seleccionadas pasarán a la etapa de bioproducción.

En forma paralela a la etapa de bioproducción se comparará la virulencia de las 10 cepas seleccionadas determinando para cada una de ellas la concentración letal 50 (LC50) y el tiempo letal 50 (LT50). La LC50 es la concentración que causa la mortalidad del 50% de la población blanco en un tiempo determinado y el LT50 es el tiempo en el que se alcanza la mortalidad del 50% de la población blanco para una concentración determinada. A su vez, para comparar la virulencia de las cepas seleccionadas sobre diferentes estadios de desarrollo de *T. peregrinus*, se realizarán ensayos de inoculación *in vitro* sobre adultos (igual proporción de machos y hembras), sobre ninfas en estadio de desarrollo 3 y sobre huevos en caja de Petri. Para estas inoculaciones se utilizará una concentración de  $10^7$  conidios/ml de inóculo.

### **Actividades de bioproducción; selección de 2 cepas finales**

Las actividades de bioproducción constarán de las siguientes etapas:

- I. Caracterización fisiológica de las cepas para la optimización de la producción masiva: sustratos con distintos contenidos C/N y O<sub>2</sub> (nivel de agitación de los medios líquidos).
- II. Fermentación sobre sustrato sólido y líquido evaluando la cantidad y calidad (germinabilidad y virulencia) de las unidades infectivas producidas en los distintos sustratos. Se determinará el sistema de producción y se seleccionará un máximo de dos cepas que pasarán a las siguientes etapas.
- III. Ajuste de las condiciones para mejorar el rendimiento del sistema de producción.
- IV. Agregado de componentes para la formulación y estudio del incremento de volúmenes de producción (escalado).
- V. Formulación y escalado.

### **Ensayos de inoculación de *Thaumastocoris peregrinus* con cepas formuladas y productos comerciales**

Finalmente, se realizarán ensayos de inoculación de *T. peregrinus* con las dos cepas formuladas, sobre plantas en invernáculo y a su vez se incluirán en los ensayos dos productos comerciales en base a hongos entomopatógenos.

## **4. RESULTADOS**

### **Colecta de *Thaumastocoris peregrinus*, aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos**

En la región Sureste se realizaron colectas en 8 sitios, sobre *E. globulus*, *E. smithii* y *E. viminalis*, en los departamentos de Rocha, Maldonado y Florida (sur). En las regiones Litoral y Centro – Norte se realizaron colectas en 9 sitios sobre *E. dunnii*, *E. benthamii*, *E. grandis*, *E. camaldulensis* y *E. camaldulensis* x *E. terebratornis*, en los departamentos de Paysandú, Tacuarembó, Durazno y Florida (norte). En las Tablas 2 y 3 se resumen las especies y géneros de hongos que se aislaron asociados a *T. peregrinus*. Para la región SE se procesaron 1283 insectos en base a los cuales se identificaron 1692 cepas fúngicas. El 1,8% de éstas corresponde a géneros de hongos entomopatógenos (aproximadamente 31 cepas). Para las regiones Litoral y Centro - Norte se procesaron 827 insectos y se identificaron 246 cepas (esta etapa aún se encuentra en proceso). El 11,8% de los hongos identificados correspondió a géneros de entomopatógenos (aproximadamente 29 cepas).

**Tabla 2.** Hongos asociados a *Thaumastocoris peregrinus*, región SE. En gris las especies con mayor frecuencia, en verde los géneros y especies entomopatogénicas.

<b>Especie</b>	<b>% de hongos identificados</b>
<i>Acremonium</i> sp.	3,24
<i>Acrodictys</i> sp.	0,20
<i>Acrodontium crateriforme</i>	12,65
<i>Acrodontium</i> spp.	2,45
<i>Alternaria alternata</i>	42,65
<i>Arthrinium</i> sp.	0,10
Basidiomycete	0,10
<b><i>Beauveria</i> spp.</b>	<b>0,39</b>
<i>Cladosporium</i> spp.	79,71
<i>Curvularia</i> sp.	0,10
<i>Drechslera</i> sp.	0,49
<i>Epicoccum</i> sp.	6,67
<b><i>Fusarium</i> sp.</b>	<b>0,59</b>
<i>Gilmaniella</i> sp.	0,10
<i>Gliocladium roseum</i>	0,10
<i>Humicola</i> sp.	0,39
<i>Microesferopsis</i> sp.	0,10
<i>Nigrospora</i> sp.	0,49
<i>Ophiostoma</i> sp.	0,29
<b><i>Paecilomyces</i> spp.</b>	<b>1,08</b>
<i>Penicillium</i> spp.	3,53
<i>Periconia</i> sp.	2,06
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	0,69
<i>Phoma sorghina</i>	0,59
<i>Phialophora verrucosa</i>	0,10
<i>Rinocladiella</i> sp.	0,59
<i>Sporotrix</i> spp.	1,37
<i>Staphylotrichum</i> sp.	1,76
<i>Trichoderma</i> spp.	0,88
<b><i>Verticillium</i> spp.</b>	<b>0,98</b>
Sin identificar	1,47

**Tabla 3.** Hongos asociados a *Thaumastocoris peregrinus*, regiones Litoral y Centro-Norte. En gris las especies con mayor frecuencia, en verde los géneros y especies entomopatogénicas.

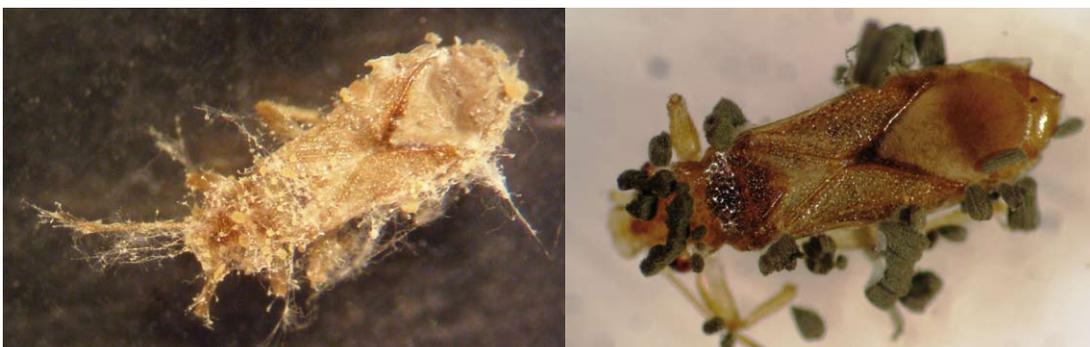
Especie	% de hongos identificados
<i>Aspergillus</i> sp.	0,60
<i>Alternaria</i> spp.	14,20
<b><i>Beauveria</i> spp.</b>	10,80
<i>Cladosporium</i> spp.	70,50
<i>Curvularia</i> sp.	1,70
<i>Drechslera</i> sp.	1,10
<i>Epicoccum</i> sp.	1,10
<b><i>Fusarium</i> sp.</b>	4,60
<i>Nigrospora</i> sp.	1,70
<b><i>Paecilomyces</i> spp.</b>	1,10
<i>Penicillium</i> spp.	4,60
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	1,10

### Ensayos de inoculación de *Thaumastocoris peregrinus* *in vitro*; selección preliminar de cepas según su virulencia

A la fecha, el 95% de las cepas de entomopatógenos de las colecciones del Laboratorio de Micología y del Laboratorio de Bioinsumos de INIA Las Brujas han sido probadas al menos dos veces en los ensayos de inoculación *in vitro*. La mayoría de las cepas demostró ser patogénica para *T. peregrinus* con diferentes grados de virulencia (Figura 3 y Tabla 4). En general, se obtuvieron altos porcentajes de recuperación de inóculo en los individuos muertos. En la Figura 4 se muestra que el porcentaje de recuperación para las cepas ILB 198, ILB 200, ILB 205, ILB 257 e ILB 264 varió entre 86% y

100%. Cabe destacar que aún en los casos en que las cepas no alcanzaron el 100% de mortalidad al décimo día (ILB 198, ILB 200 e ILB 264, datos no mostrados), todos los individuos que aún estaban vivos al finalizar el ensayo desarrollaron micosis debida a las cepas inoculadas, tras su incubación en cámaras húmedas.

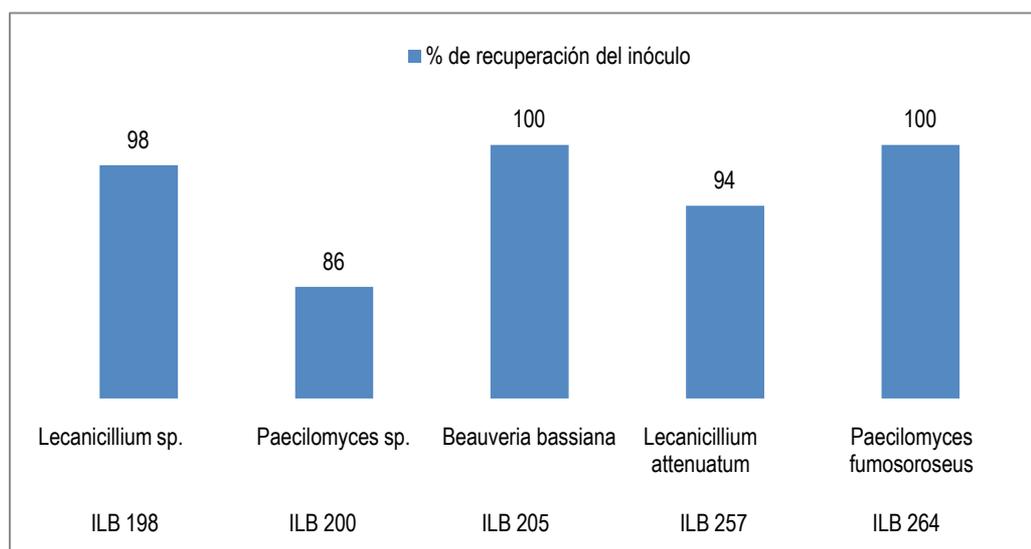
Para la totalidad de las inoculaciones *in vitro*, la mortalidad de los testigos al décimo día alcanzó valores de entre 0% y 24%. Según Butt y Goettel (2000), la mortalidad observada en el testigo de este tipo de ensayos debe ser menor a 20% para que los resultados del ensayo sean confiables. En los casos en que la mortalidad del testigo al décimo día superó un 20%, los resultados de esa inoculación fueron tomados con precaución.



**Figura 3.** *Thaumastocoris peregrinus* con esporulación de hongos entomopatogénicos en un ensayo de inoculación *in vitro*. A: cepa ILB 151 (*Paecilomyces farinosus*); B: cepa ILB 174 (*Metarhizium anisopliae*).

**Tabla 4.** Categorización preliminar de las cepas utilizadas según su virulencia.

Cepa	Nº de días en alcanzar el 90 % de la mortalidad	Categoría
FI 1728	8 días	III
FI 1878	5 días	II
FI 2044	más de 10 días	IV
FI 2067	6 días	II
FI 2121	7 días	II
FI 2122	8 días	III
FI 2243	8 días	III
FI 922	más de 10 días	IV
ILB 151	más de 10 días	IV
ILB 161	más de 10 días	IV
ILB 174	más de 10 días	IV
ILB 198	más de 10 días	IV
ILB 200	más de 10 días	IV
ILB 205	6 días	II
ILB 256	más de 10 días	IV
ILB 257	7 días	II
ILB 264	6 días	II



**Figura 4.** Porcentaje de recuperación de inóculo de las cepas ILB 198, ILB 200, ILB 205, ILB 257 e ILB 264 durante un ensayo de inoculación *in vitro*.

## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Si bien en el año 2013 no se observaron altos picos poblacionales de *T. peregrinus*, igualmente fue posible aislar, en todas las regiones de colecta, cepas pertenecientes a géneros de hongos entomopatógenos: *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium* y *Leucanicillium*. Las diferencias en el porcentaje de entomopatógenos aislados entre las regiones Sureste y Litoral / Centro-Norte se deben probablemente a la época de colecta, ya que algunas se realizaron temprano en el otoño, época en que las condiciones para el desarrollo de los hongos son más favorables. Durante el otoño del 2014 se prevé realizar nuevas colectas de chinches en el campo para el posterior aislamiento de entomopatógenos. Además de la obtención de cepas promisorias para el control biológico de la chinche del eucalipto, es de interés del proyecto estudiar cuáles son los agentes causales de las epizootias observadas a campo.

El protocolo de inoculación desarrollado y las condiciones de temperatura y humedad seleccionadas fueron adecuados para promover el desarrollo de los hongos entomopatógenos sobre *T. peregrinus*. La mayoría de las cepas evaluadas fueron patogénicas para *T. peregrinus* con diferente grado de virulencia, permitiendo su categorización. En general el porcentaje de recuperación de inóculo es muy alto y la mortalidad de los testigos se encuentra dentro de niveles aceptables por lo que los resultados de los ensayos fueron confiables.

Es importante recordar que los resultados presentados en este trabajo son avances de un proyecto en curso y que aún resta realizar varios ensayos de inoculación *in vitro*, por lo que la categorización de las cepas de colección debe tomarse como un resultado preliminar. A su vez, en breve se comenzarán los ensayos *in vitro* con las cepas aisladas de *T. peregrinus* colectados en el campo.

En la actualidad no existen medidas de manejo para la chinche del eucalipto a nivel

mundial, si bien en Australia se ha identificado una avispa parasitoide de huevos de *T. peregrinus*, *Cleruchoides noackae* (Lin and Huber) y su desempeño como controlador está siendo evaluado en varios países. En nuestro país este parasitoide fue introducido a fines de febrero del 2013 y las primeras liberaciones a campo se realizaron en marzo (INIA, 2013). A pesar de que la eficiencia de este parasitoide aún no ha sido determinada, este enfoque constituye un primer acercamiento a una posible medida de manejo de esta plaga. Si bien será necesario investigar exhaustivamente la interacción que tendrá este parasitoide con los hongos entomopatógenos seleccionados en el presente proyecto, existen antecedentes exitosos sobre el uso combinado de ambos tipos de controladores en el marco de programas de Manejo Integrado de Plagas (Roy y Pell, 2000). Cabe destacar a su vez que la duración del estado adulto de *C. noackae* es de 2 a 4 días (Mutitu *et al.*, 2013) por lo que la exposición del parasitoide a los hongos entomopatógenos sería mínima.

Al finalizar el proyecto (a fines del 2015) se espera contar con cepas formuladas de entomopatógenos, seleccionadas por su alta virulencia sobre *T. peregrinus* y por su capacidad de ser escaladas sin perder sus propiedades. A partir de ese momento será necesario establecer lineamientos para el análisis de riesgo y posibles métodos de aplicación a campo. En referencia a esto último, resultan interesantes los resultados obtenidos por González *et al.* (2012), quienes a través de la ejecución de un proyecto INNOVAGRO (Facultad de Química-INIA) lograron identificar y sintetizar una feromona de agregación entre machos de *T. peregrinus*. Si bien aún no se tienen resultados finales sobre el desempeño de la feromona sintetizada, su potencial uso en forma conjunta con hongos entomopatógenos bajo el formato de trampa autodiseminante se presenta como una alternativa sumamente interesante.

### Agradecimientos

Se agradece especialmente a las empresas Montes del Plata, Weyerhaeuser, UPM

- Forestal Oriental, a Alejandro Venturino, Rafael Sosa y Marcelo Fredes y a Juan Andrés San Román (Viplantex – Nemesur) por el apoyo logístico y por permitir la entrada a sus predios. A su vez, agradecemos a todo el plantel del Laboratorio de Entomología de INIA Tacuarembó por su dedicación y esfuerzo para la provisión de chinches para los ensayos, así como a Beatriz Dini y Natalia Mattos por su trabajo en el Laboratorio de Bioinsumos de INIA Las Brujas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- AHMEDA, S. I.; LEATHERB, S. R.** 1994. Suitability and potential of entomopathogenic microorganisms for forest pest management—some points for consideration. *International Journal of Pest Management* 40: 287-292.
- BUTT, T. M., GOETTEL, M. S.** 2000. Bioassays of entomogenous fungi. En: Navon, A., Ascher, K.R.S. (Eds.), *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 141-196.
- BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N.** 2001. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CABI International, Wallingford.
- CARPINTERO, D. L.; DELLAPÉ, P. M.** 2006. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). *Zootaxa* 1228: 61-68.
- GARCIA, A.; FIGUEIREDO, E.; VALENTE, C.; MONSERRAT, V. J.; BRANCO, M.** 2013. First record of *Thaumastocoris peregrinus* in Portugal and of the neotropical predator *Hemerobius bolivari* in Europe. *Bulletin of Insectology* 66: 251-256.
- GONZÁLEZ, A.; CALVO, M. V.; CAL, V.; HERNÁNDEZ, V.; DOÑO, F.; ALVES, L.; GAMENARA, D.; ROSSINI, C.; MARTÍNEZ, G.** 2012. A Male Aggregation Pheromone in the Bronze Bug, *Thaumastocoris peregrinus* (Thaumastocoridae). *Psyche: A Journal of Entomology* 2012: 1-7.
- IDE, S.; RUIZ, M. C.; SANDOVAL, A.; VALENZUELA, J.** 2011. Detección de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) asociado a *Eucalyptus* spp. en Chile. *Bosque* 32: 309-313.
- INIA.** 2013. Lanzamiento de importante herramienta para combatir plagas forestales: avispa parasitoide. *Revista INIA*, 33: 59.
- IHARA, F.; YANIGUMA, K.; KOBAYASHI, N.; MISHIRO, K.; SATO, T.** 2001. Screening of entomopathogenic fungi against the brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae). *Applied Entomology and Zoology* 36: 495-500.
- JACOBS, D. H.; NESER, S.** 2005. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to *Eucalyptus* trees. *South African Journal of Science* 101: 233-236.
- LAUDONIA, S.; SASSO, R.** 2012. The bronze bug *Thaumastocoris peregrinus*: a new insect recorded in Italy, damaging to *Eucalyptus* trees. *Bulletin of Insectology* 65: 89-93.
- MARTÍNEZ, G.; BIANCHI, M.** 2010. Primer registro para Uruguay de la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellappé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae). *Agrociencia* 14: 15-18.
- MARTÍNEZ, G.; SCOZ, R.** 2012. INIA diseñó un sistema exitoso para la producción de huevos de la chinche del eucalipto. *Revista INIA* 29: 43-46.
- MARTÍNEZ, G.; SIMETO, S.; BALMELLI, G.** 2009. La chinche del Eucalipto en Uruguay: Panorama de la Investigación a un Año de su Detección Oficial. *Revista INIA* 18: 33-35.
- MUTITU, E. K.; GARNAS, J. R.; HURLEY, B. P.; WINGFIELD, M. J.; HARNEY, M.; BUSH, S. J.; SLIPPERS, B.** 2013. Biology and Rea-

- ring of *Cleruchooides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid for the Biological Control of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Journal of Economic Entomology* 106: 1979-1985.
- NADEL, R.L.; SLIPPERS, B.; SCHOLES, M. C.; LAWSON, S. A; NOACK, A. E.; WILCKEN, C. F.; BOUVET, J. P.; WINGFIELD, M. J.** 2009. DNA bar-coding reveals source and patterns of *Thaumastocoris peregrinus* invasions in South Africa and South America. *Biological Invasions* 12: 1067-1077.
- NOACK, A. E.; ROSE, H. A.** 2007. Life-history of *Thaumastocoris peregrinus* and *Thaumastocoris* sp. in the laboratory with some observations on behaviour. *General and Applied Entomology* 36: 27-33.
- ROY, H. E.; PELL, J. K.** 2000. Interactions Between Entomopathogenic Fungi and Other Natural Enemies: Implications for Biological Control. *Biocontrol Science and Technology* 10: 737-752.
- SHAH, P. A.; PELL, J. K.** 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 413-423.
- SHAPIRO-ILAN, D. I.; FUXA, J. R.; LACEY, L. A.; ONSTAD, D.; KAYA, H. K.** 2004. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology* 88: 1-7.
- SOPOW, S.; BADER, M.** 2013. Distribution and host list for *Thaumastocoris peregrinus*. *SCION- Forest Health News* 233: 2.
- WILCKEN, C.** 2008. Percevejo bronzeado do eucalipto (*Thaumastocoris peregrinus*) (Hemiptera: Thaumastocoridae): Ameaça às florestas de Eucalipto brasileiras. *Alerta PROTEF, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, Brasil.* 11 p.
- WILCKEN, C.; SOLIMAN, E.; NOGUEIRA, L.; RODRIGUES, L.; RIBEIRO, T.; FERREIRA, P.; RODRIGUES, R.** 2010. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. *Journal of Plant Protection Research* 50:201-205."



# CAPÍTULO V

## IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *Calonectria* PRESENTES EN VIVEROS FORESTALES EN PAYSANDÚ

Pilar Gasparri<sup>1</sup>, Guillermo Pérez<sup>2</sup>, Raquel Alonso<sup>3</sup>, Carlos A. Pérez<sup>1</sup>

### INTRODUCCIÓN

El sector forestal ha crecido de manera sostenida en nuestro país en los últimos 25 años. Aproximadamente 1.000.000 hectáreas están forestadas principalmente con especies de *Eucalyptus*, representando el 60% del total, con predominancia de *E. globulus*, *E. dunnii* y *E. grandis* (Uruguay XXI, 2013).

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 plantines de calidad. En ese sentido las pérdidas de plantines en el vivero pueden afectar seriamente el programa de plantación (Brown *et al.*, 2002).

Los viveros ofrecen condiciones particularmente favorables para el desarrollo de epidemias como son el espaciamiento reducido, riego regular, alta humedad y utilización de fertilizantes (Alfenas *et al.*, 2004). La mayoría de las enfermedades en viveros de eucaliptos son causadas por hongos. Entre los más importantes se encuentran las manchas foliares, tizón, cancro de tallo, podredumbre de la raíz y la muerte de plántulas (Figura 1). Estas enfermedades pueden ser producidas por varios patógenos entre los que predominan especies de *Cylindrocladium* (estado sexual *Calonectria*) y *Cylindrocladiella*,

que son particularmente prevalentes en las regiones tropicales y subtropicales (Crous, 2002).

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 las bases de datos de hongos MycoBank (<http://www.mycobank.org>), y en 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 registros en las respectivas bases de datos (Lombard *et al.*, 2010c).

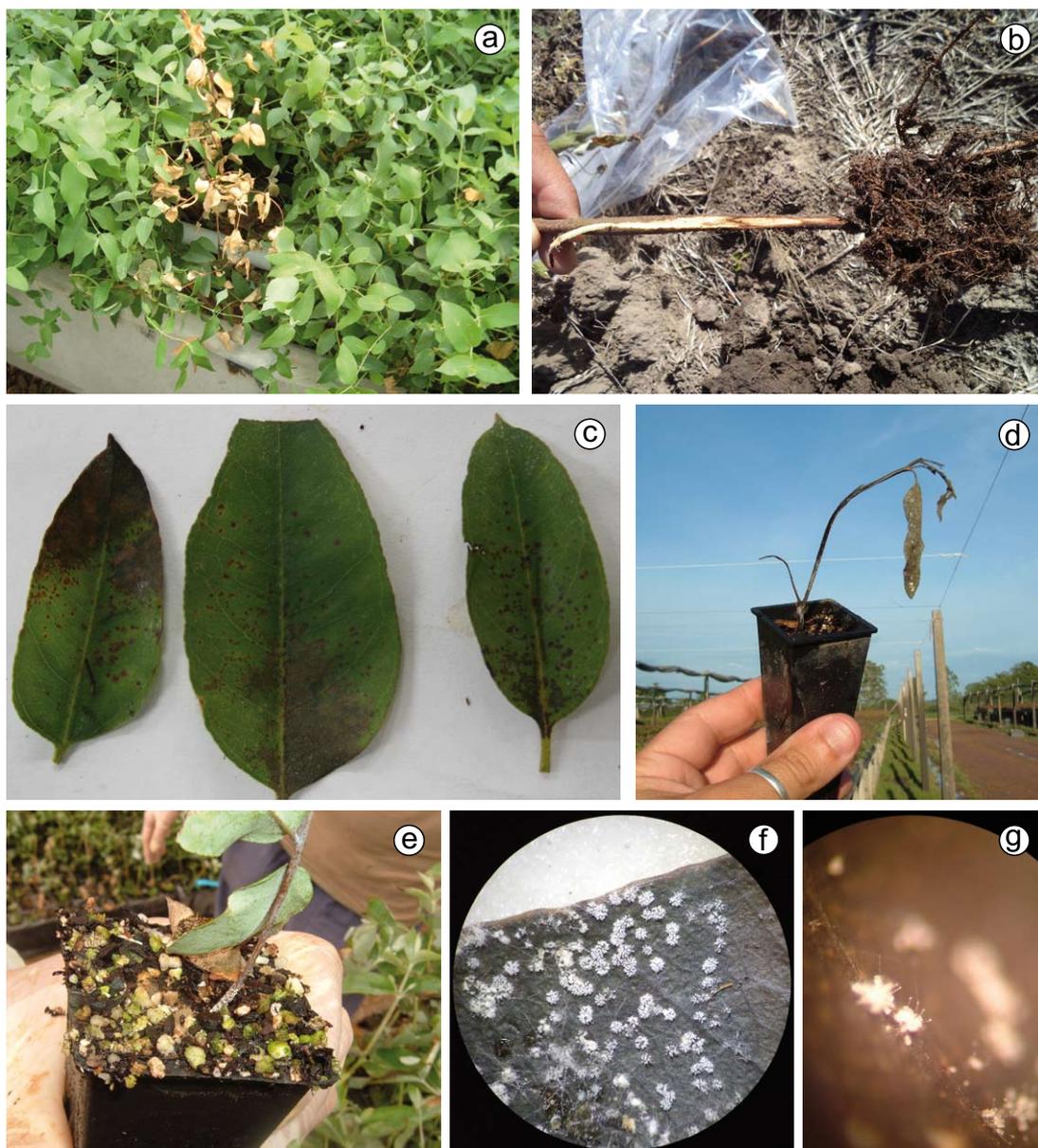
La mayoría de los reportes de enfermedad asociados con *Calonectria* en especies forestales han sido en cinco familias de plantas, de las cuales los más importantes están asociados con Fabaceae (*Acacia* spp.), Myrtaceae (*Eucalyptus* spp.) y Pinaceae (*Pinus* spp.). Hasta el momento se han identificado 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

<sup>1</sup> Departamento de Protección Vegetal, EEMAC, Facultad de Agronomía, UdelaR. EEMAC. Ruta 3, Km 363, Paysandú, Uruguay. Correo electrónico: caperez@fagro.edu.uy

<sup>2</sup> Polo de Desarrollo Universitario Forestal, Centro Universitario de Tacuarembó, UdelaR. Tacuarembó.

<sup>3</sup> Laboratorio de Micología. Facultad de Ciencias - Facultad de Ingeniería. UdelaR, Julio Herrera y Reissig 565, Montevideo.



**Figura 1:** Síntomas y signos de *Calonectria* spp. en vivero. **a)** marchitamiento de plantas por podredumbre radicular, **b)** decoloración de los tejidos de la raíz evidenciando podredumbre radicular, **c)** manchas foliares, **d)** anillamiento de plantines, **e)** esporulación del patógeno en la base del plantín, **f)** esporulación del patógeno sobre hoja de eucalipto, **g)** esporulación del hongo sobre la hoja, con detalle del aparato donde se observan las estructuras típicas del patógeno (“candelabros”) constituidos por conidióforos, conidios y vesículas estériles.

posteriormente causando la muerte a la planta (Aparecido y Finatti, 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 obser-

var 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 5 mm 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, agua, 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 dependen de diversos factores, tales como las especies de eucaliptos, especies de *Cylindrocladium* y también de las condiciones ambientales. Las especies identificadas como causantes de 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 fiáldes, 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 y Kang, 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.*, 2001).

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, citado por Lombard *et al.*, 2010c), 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 estacas de cultivos agrícolas, forestales y hortícolas (Lombard *et al.*, 2012).

Hasta la fecha no existen antecedentes que cuantifiquen los daños, ni valoren la importancia de esta enfermedad para las plantaciones ni para los viveros en Uruguay. Tampoco se encuentra registro 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 el Departamento de Paysandú.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### *Muestreo*

A inicios del año 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

**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
Total	15	5	34	12	2	68

(-) no se encontró dicha combinación.

dentro de su producción, floricultura y leñosas y el Vivero C se dedica a varias leñosas, incluyendo *Eucalyptus* y *Pinus*. 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).

### **Aislamiento de cepas fúngicas**

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 bajo la lupa, 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 la 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 y 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 MgCl<sub>2</sub> 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.

**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
Total	8	1	10	5	4	28

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 GenBank 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 y Bull, 1993). Como taxón externo se utilizó la cepa tipo de *Ca. colombiensis* para ambos casos (Lombard *et al.*, 2009).

### 3. 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, las cuales fueron agrupadas por morfología de colonia, tomándose 28 cepas representando los distintos grupos para continuar el estudio de identificación utilizando técnicas moleculares (Cuadro 2).

#### 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 28 secuencias obtenidas en el presente estudio (Cuadro 3) y 31 secuencias de referencia de especies de *Calonectria* y *Cylindrocladia* disponibles en GenBank (Cuadro 4).

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 2).

**Cuadro 3.** 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
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
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

**Cuadro 4.** 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 CBS 123695	GQ280559 GQ280560	Lombard <i>et al.</i> (2010d) 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 CBS125250	GQ280647 GQ280646	Lombard <i>et al.</i> (2010a) Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Ca. hawksworthii</i>	CBS 111870 T	GQ280580	Crous (2002)
<i>Ca. humicola</i>	CBS 125251 T CBS 125269	GQ280648 GQ280650	Lombard <i>et al.</i> (2010a) Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Ca. insularis</i>	CBS114558 T CBS114559	GQ280587 GQ280588	Crous (2002) Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Ca. pauciramosa</i>	CMW 5683 T CPC 416	GQ280608 GQ280607	Crous (2002) Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Ca. pentaseptata</i>	VM3 VM11	JX855951 JX855953	Lombard <i>et al.</i> * Lombard <i>et al.</i> *
<i>Ca. pseudospathiphylli</i>	CBS 109165	GQ280615	Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Ca. reteaudii</i>	CBS 112143 CBS 112144 T	GQ280621 GQ280620	Crous (2002) Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Ca. scoparia</i>	CPC 1675 CPC 1679	GQ280557 GQ280558	Lombard <i>et al.</i> (2010a) Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Ca. spathiphylli</i>	CBS 116168 T CBS 114540	GQ280628 GQ280627	Lombard <i>et al.</i> (2010a) Crous (2002)
<i>Ca. spathulata</i>	CBS 55592 CBS 112689	GQ280630 GQ280629	Crous (2002) Lombard <i>et al.</i> (2010a)
<i>Ca. sulawesiensis</i>	CBS 125277 T CBS 125248	GQ280637 GQ280638	Lombard <i>et al.</i> (2010a) 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 CBS 34092 T	JN100606 AF220959	Lombard <i>et al.</i> (2012) 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)

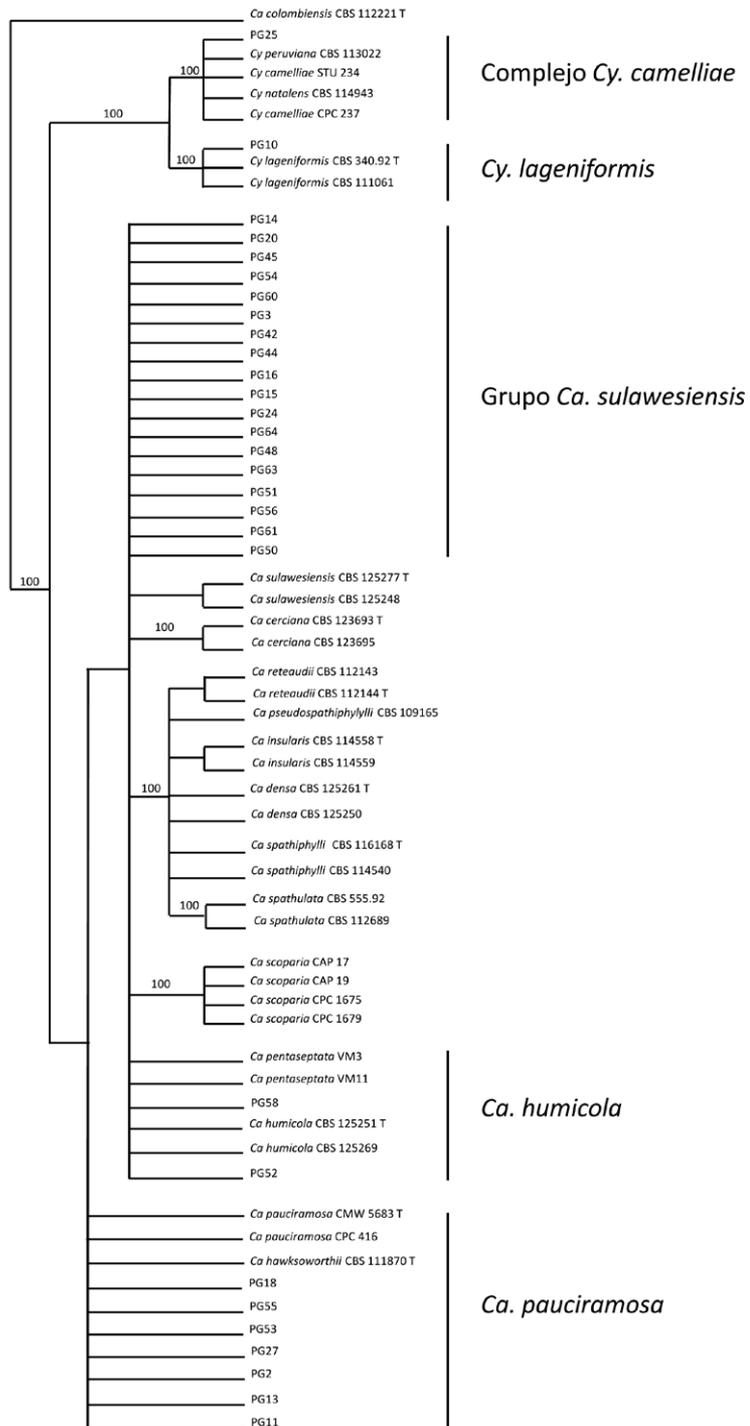
CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands;

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

CMW: colección de Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI);

T: cepa tipo

(\*): Artículo en espera de admisión.



**Figura 2.** 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 la secuencia correspondiente a la cepa PG10 agrupó con *Cy. langeriformis*. Diecinueve 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, 17 de las 19 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 5).

Para el caso de las 17 cepas con mayor similitud a *Ca. sulawesiensis*, estas son idénticas a la cepa de referencia (cepa tipo de la especie), 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 5). 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 5). 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 5).

De las especies encontradas, "*Ca. sulawesiensis*" fue la que predominó, encontrándose en todos los viveros (Cuadro 6). "*Calonectria humicola*", *Cy. lageniformis* y la cepa perteneciente al grupo *Cy. camelliae* fueron aisladas en un único vivero. La primera de ellas sólo en el vivero D y las siguientes sólo en el vivero A. 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 6 y Figura 3). En el Cuadro 3 se presenta una lista con las cepas aisladas en el presente estudio, así como su origen y su identificación.

Hubo una mayor riqueza 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 3).

**Cuadro 5.** Comparación de polimorfismos en nucleótidos simples de las secuencias de del ITS del ADNr. Las secuencias de las especies seguidas por una "T" corresponden a la secuencia de la cepa tipo de la especie.

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 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 6.** Número de cepas obtenidas de cada especie según el vivero de origen de la muestra.

Especie	Vivero A	Vivero B	Vivero C	Vivero D	N° cepas
" <i>Ca. humicola</i> "	0	0	0	2	2
" <i>Ca. pauciramosa</i> "	4	2	0	1	7
" <i>Ca. sulawesiensis</i> "	4	9	1	3	17
<i>Cy. lageniformis</i>	1	0	0	0	1
Complejo <i>camelliae</i>	1	0	0	0	1

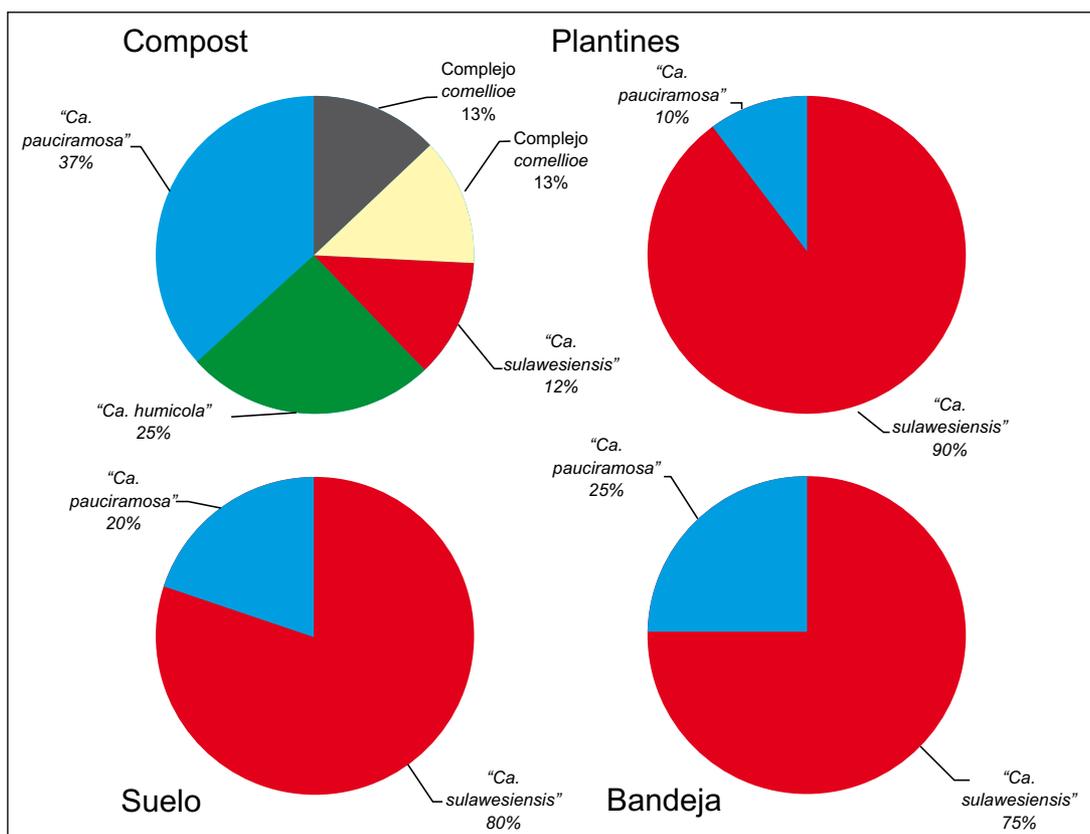


Figura 3. Presencia relativa de especies según sustrato: Compost (n=7), Plantines (n=10), Suelo (n=6), y Bandeja (n=4).

#### 4. DISCUSIÓN

El presente estudio representa la primera prospección de *Calonectria* y *Cylindrocladia* 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 pre-

sencia de cinco grupos taxonómicos en los viveros estudiados. El método utilizado permitió confirmar la presencia de *Cy. lageniformis* en una muestra de compost pero no permitió discernir a que especies corresponden las cepas restantes. Esto probablemente se deba a la falta de resolución de la región ITS para este grupo de hongos por lo que se

deberá realizar un análisis multigénico para obtener mayor resolución. Lombard *et al.*, (2010c) utilizaron las regiones de  $\beta$ -tubulina e Histona H3, así como también TEF-1 $\alpha$  y la región que codifica para la calmodulina.

*Cylindrocladiella peruviana*, fue citada 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 y 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 y Rossman, 2013). Por otro lado, *Cy. lageniformis*, fue reportada por primera vez en 1993 por Crous (2002) en Brasil, y en Sudáfrica ha sido asociada a *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 numerosos hospederos, incluso en Uruguay (Lombard *et al.*, 2010b). Esta especie ha estado asociada a enfermedades tales como damping-off, tizón foliar y podredumbre 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 en todos los sustratos, en tres de los cuatro viveros muestreados, evidenciando unapresencia generalizada 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 que agruparon con *Ca. sulawesiensis* fueron las más predominantes del muestreo, con presencia en todos los viveros y en la mayoría de los sustratos. Por lo tanto este estudio estaría evidenciando una mayor distribución geográfica de ambas especies.

Los resultados aquí presentados están acotados por lo limitado del muestreo, por lo cual sólo permiten 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. 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 disponible para futuras investigaciones en el tema.

## 5. CONCLUSIONES

- Se encontró una gran diversidad 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.

- 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 permite 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 patogenidad para caracterizar la capacidad de causar enfermedad de cada una y su respectiva agresividad, lo cual permitirá enfocar el manejo hacia las especies patógenas prioritarias.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Este estudio constituyó el trabajo final de grado de Pilar Gasparri como requisito para la obtención del grado de Licenciada en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UdelaR.

El trabajo fue financiado por Forestal Oriental-UPM – FAGRO-UdelaR. Se agradece la colaboración y buena disposición de los viveros participantes, sin los cuales el estudio hubiera sido imposible de realizar.

## 7. BIBLIOGRAFIA

**ALFENAS, A.C.; VALVERDE ZAUZA, E.A.; GONCALVES 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. En: 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 morganii* 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  $\beta$ -tubulin and ITS rRNA genes. Mycoscience 42: 57-57.

**CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; RISÈ-DE, 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. Verificado 3/9/2013, en <http://nt.ars-grin.gov/fungal-databases>.

- GONÇALVES, R.C.; ALFENAS, A.; MAFIA, 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: 142-152.
- 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.
- MURRAY, 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.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J.** 2001. Phylogeny of *Calonectria* based on comparisons of  $\beta$ -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.L.** 2002. PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.0b10a. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- URUGUAY XXI.** 2013. Promoción de inversiones y exportaciones. Sector Forestal. [http://www.uruguayxxi.gub.uy/wp-content/uploads/2011/11/Sector-Forestal\\_UruguayXXI.pdf](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. En: PCR protocols: a guide to methods and applications. (eds.) Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. Academic Press, Inc., New York.

# CAPÍTULO VI

## ENFERMEDADES BACTERIANAS EN EUCALIPTO: ESTADO DEL CONOCIMIENTO A NIVEL NACIONAL

Cintia Palladino<sup>1</sup>, Guillermo Pérez<sup>2</sup>, Raquel Alonso<sup>3</sup>, Oscar Bentancur<sup>4</sup>, Carlos A. Pérez<sup>1</sup>

### 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente hay dos tipos de enfermedades bacterianas afectando al cultivo de eucalipto; el tizón apical y las manchas foliares (Figura 1). El tizón apical es causado por *Erwinia psidii* y *Pantoea ananatis*. *Erwinia psidii* fue reportada en Uruguay en el año 2011 por Coutinho *et al.* (2011). Los primeros síntomas de la enfermedad se evidencian como lesiones necróticas en hojas recién formadas. Frecuentemente se puede observar un “esmalgado” que corresponde a la zooglea (células bacterianas y contenido celular de la planta que emerge de las lesiones). La infección avanza por el peciolo hacia las ramas y forma pequeños

cancros. Por su parte, *Pantoea ananatis* ha sido citada afectando plantaciones jóvenes y viveros de *Eucalyptus grandis* (FAO, 2006), provocando muerte de hojas y formando ampollas que evolucionan a lesiones necróticas, lo cual en ataques severos pueden ocasionar la muerte de la planta.

Respecto a las manchas foliares causadas por bacterias, en Uruguay aún no se ha identificado la etiología de esta enfermedad, pero en Brasil han sido asociadas a especies como *Xanthomonas axonopodis*, *X. campestris*, *Pseudomonas syringae*, *P. putida*, *P. cichorii*, *Erwinia* sp. y *Rhizobiaceae*, siendo *X. axonopodis* la especie predominante



**Figura 1.** A. Síntoma típico de tizón apical y B. mancha foliar bacteriana en *Eucalyptus grandis*.

<sup>1</sup> Departamento de Protección Vegetal, EEMAC, Facultad de Agronomía, UdelaR. EEMAC. Ruta 3, Km 363, Paysandú, Uruguay. caperez@fagro.edu.uy

<sup>2</sup> Polo de Desarrollo Universitario Forestal. Centro Universitario de Tacuarembó, UdelaR. Tacuarembó.

<sup>3</sup> Laboratorio de Micología. Facultad de Ciencias – Facultad de Ingeniería. UdelaR, Julio Herrera y Reissig 565, Montevideo.

<sup>4</sup> Departamento de Biometría, Estadística y Computación, EEMAC, Facultad de Agronomía, UdelaR. EEMAC. Ruta 3, Km 363, Paysandú, Uruguay.

**Cuadro 1.** Ubicación de la red de experimentos y parcelas de observación.

Experimento	Plantación	Especie	Ubicación	Fecha Plantación	Empresa
1	Las Yucas	<i>E. dunnii</i>	Soriano	26/09/2011	Montes del Plata
2	Santo Tomás	<i>E. dunnii</i>	Río Negro	12/10/2011	Montes del Plata
3	Ingral*	<i>E. dunnii</i>	Río Negro	02/04/2013	Montes del Plata
4	La Lucha	<i>E. dunnii</i>	Paysandú	19/10/2012	Montes del Plata
5	La Celeste	<i>E. dunnii</i>	Paysandú	21/10/2011	Forestal Oriental
6	San José	<i>E. dunnii</i>	Río Negro	28/10/2011	Forestal Oriental
7	San Antonio	<i>E. dunnii</i>	Paysandú	12/11/2013	Forestal Oriental
8	Las Marías*	<i>E. dunnii</i>	Paysandú	15/03/2013	Forestal Oriental
9	Teresa Abdala*&	<i>E. dunnii</i>	Soriano	15/04/2013	Forestal Oriental
10	Vetorelo	<i>E. grandis</i>	Rivera	05/10/2011	COFUSA
11	Moreira	<i>E. grandis</i>	Rivera	22/11/2013	COFUSA
12	Peñarosa	<i>E. grandis</i>	Cerro Largo	09/05/2013	Weyerhaeuser
13	Santa Sofía	<i>E. grandis</i>	Cerro Largo	04/10/2013	Forestal Atlántico Sur

(\*) Plantaciones que incluyen parcelas de observación.

(&) En esta plantación una de las parcelas de observación fue en un rodal con *E. benthamii*.

(Gonçalves *et al.*, 2008). Estas manchas son angulares, húmedas y translúcidas, provocan una intensa defoliación y muerte de los ápices de los árboles (Alfenas *et al.*, 2004).

Debido a la falta de información nacional sobre la epidemiología de estas enfermedades, en el año 2011 se inició un proyecto conjunto con la Sociedad de Productores Forestales denominado "Alternativas de manejo de enfermedades foliares en plantaciones jóvenes de eucalipto".

Con el objetivo de generar información nacional respecto a estas enfermedades, se instaló una red de 13 experimentos localizados en el litoral oeste y región noreste del Uruguay, con dos especies, *Eucalyptus dunnii* y *E. grandis* (Cuadro 1). El diseño experimental fue de bloques completos con tratamientos aleatorizados, con cuatro repeticiones. Cada tratamiento correspondió a una alternativa química para controlar estas enfermedades, aplicado a la dosis recomendada por el fabricante (Cuadro 2). Se tuvo

**Cuadro 2.** Detalle de los productos y dosis utilizadas en cada tratamiento evaluado.

Tratamiento	Grupo Químico	Producto comercial	Empresa	Dosis cc/100L
1	-	Testigo enfermo	-	-
2	Extracto de algas	Wuxal Ascofol + Wuxal Doble	Maisor	1000 + 1000
3	Quitosano	Biorend o Fosfirend	Marwald	150 o 2000
4	Fosfito Zn	Afital Zinc	Enfoque	300
5	Fosfito K	Fanafos K	Fanaproqui	400
6	Oxicloruro de cobre	Fanavid Flowable	Fanaproqui	400
7	Oxicloruro de cobre	Fanavid Flowable (Testigo protegido)	Fanaproqui	400

además un tratamiento "Testigo", el cual no tenía aplicaciones y un tratamiento "Protegido" el cual tenía aplicaciones mensuales de oxiclورو de cobre.

Las aplicaciones foliares de los productos fueron en vivero a los 21, 15 y 0 días antes del despacho; y en la plantación a los 3, 6 y 12 meses. Las dosis aplicadas fueron las recomendadas por las empresas de agroquímicos (Cuadro 2).

A los 3, 6, 12, 18 y 24 meses de plantación se determinó el crecimiento (altura y diámetro a la altura del pecho) y la sanidad de cada árbol. Para el caso de manchas foliares se determinó incidencia y severidad mediante una adaptación de la escala visual de Stone *et al.* (2003). En cuanto a tizón bacteriano se cuantificó la incidencia de la enfermedad evaluando el porcentaje de ápices afectados en cada árbol.

Además de los experimentos se instalaron parcelas de observación. Estas consistieron en transectas localizadas fuera de los experimentos pero en los mismos rodales de los experimentos de Las Marías, Ingral y Teresa Abdala (Cuadro 1). En estas parcelas se identificó individualmente cada árbol para poder cuantificar el crecimiento y la sanidad de cada uno de ellos en forma mensual. La cuantificación de la enfermedad se realizó de forma cualitativa en cuatro categorías: "0" árboles sin síntomas, "1" árboles con hasta 4 ápices laterales afectados, "2" árboles con más de 4 ápices afectados y "3" árboles con el ápice principal afectado.

Tanto para el caso de tizón como de manchas foliares, además de las muestras tomadas en los experimentos y parcelas de observación, se incluyeron en el estudio muestras obtenidas de plantaciones de *E. globulus*, *E. grandis* x *E. urophylla* y *E. saligna*, enviadas por las empresa participantes.

### **Respuesta a diferentes interrogantes del sector productivo**

*¿En qué especies de eucalipto se observan enfermedades bacterianas?*

El tizón apical se ha observado en *Eucalyptus benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* y *E. maidenii*. Las dos primeras especies de eucalipto parecen ser las más susceptibles de acuerdo a los niveles de infección observados.

Las manchas foliares se han observado principalmente en *E. grandis*, y con menor frecuencia en *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* x *E. urophylla* y *E. saligna*.

*¿En qué regiones del país se observan?*

El tizón apical se ha observado en todo el país, mientras que las manchas foliares principalmente en la zona noreste, pero también se han observado en la zona litoral y centro del país.

*¿A qué edad se han observado las epifitias?*

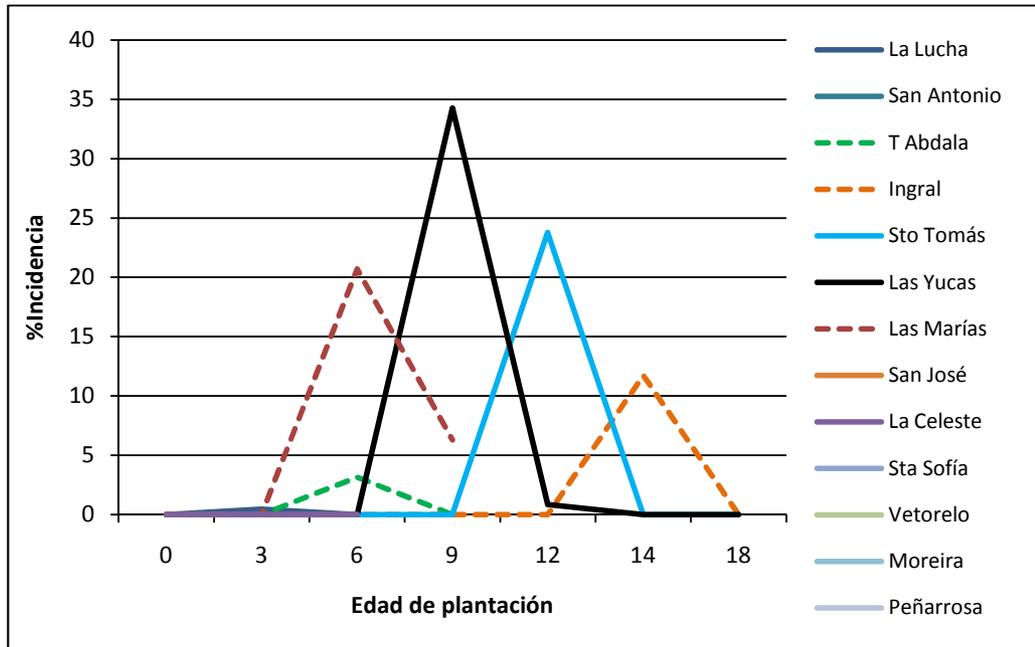
Se han observado epifitias de tizón apical en 5 de los 13 experimentos, y las mismas han ocurrido en distintas edades, desde los 3 meses hasta los 14 meses de edad (Figura 2). Esto indicaría que no hay una clara asociación entre la edad de la plantación y el desarrollo de las epifitias durante los primeros 2 años de edad en que las plantaciones fueron evaluadas.

Respecto a las manchas foliares, sólo se observó epifita en un experimento de *E. grandis* instalado en Rivera (Moreira). La misma comenzó a los 3 meses de edad y continuó aumentando hacia los 6 meses de edad, momento en que se realizó la segunda evaluación.

*¿En qué época del año se han observado las epifitias?*

Respecto al tizón apical, se han observado epifitias en las cuatro estaciones del año (Invierno en Las Yucas, Primavera en Santo

**Edad de los árboles en relación a la enfermedad**

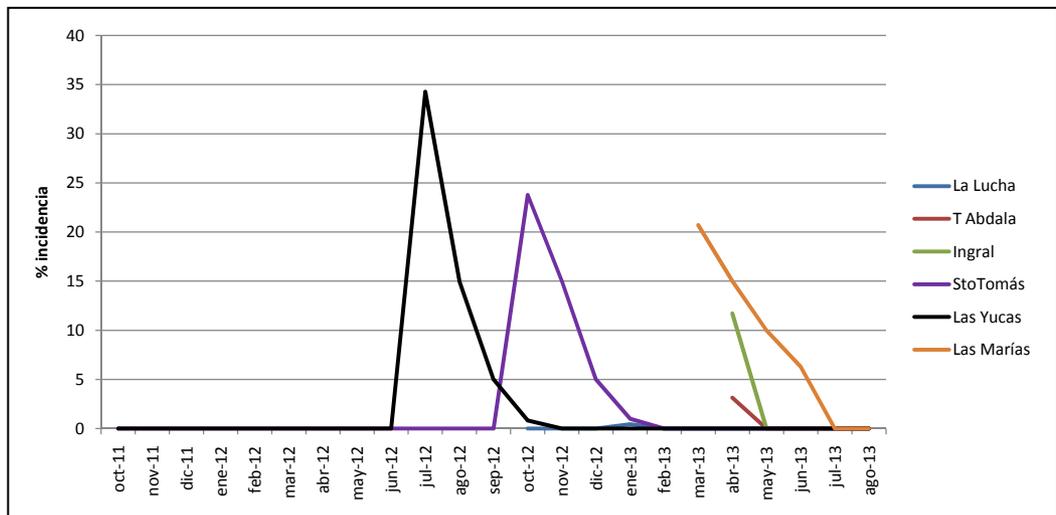


**Figura 2.** Evolución de la incidencia (% de brotes afectados) del tizón apical en el testigo, según la edad de la plantación, para cada uno de los experimentos.

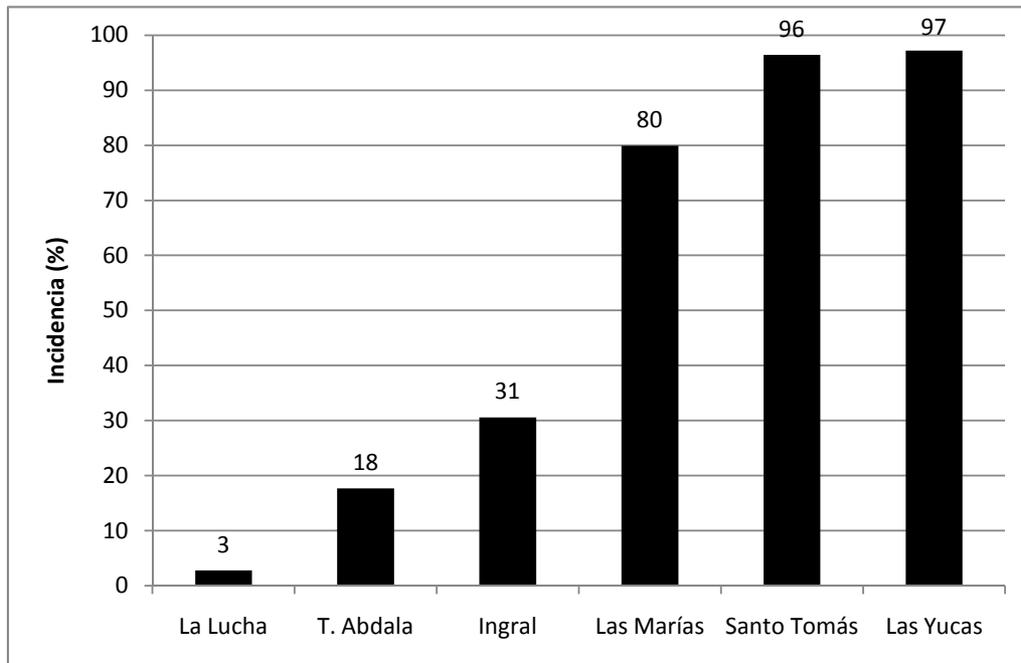
Tomás, Verano-Otoño en Teresa Abdala, en Ingral y en Las Marías) (Figura 3).

Respecto al análisis de la relación entre las epifitas y el clima, no se encontró una asociación clara entre la enfermedad y la temperatura. De acuerdo a los datos obtenidos, tanto el tizón apical como las manchas foliares se desarrollaron tanto con las altas

La epifita de manchas foliares comenzó en el experimento Moreira en marzo, y continuó aumentando aún en otoño (Figura 8).



**Figura 3.** Evolución de la incidencia (% de brotes afectados) del tizón apical en el testigo de cada experimento a lo largo del periodo evaluado.



**Figura 4.** Porcentaje de árboles enfermos en el momento de mayor incidencia del tizón apical, en cada experimento.

temperaturas del verano como con las bajas temperaturas del invierno. A su vez tampoco hubo una asociación clara con las precipitaciones.

*¿Qué tan generalizadas fueron las epifitas en la población en estudio?*

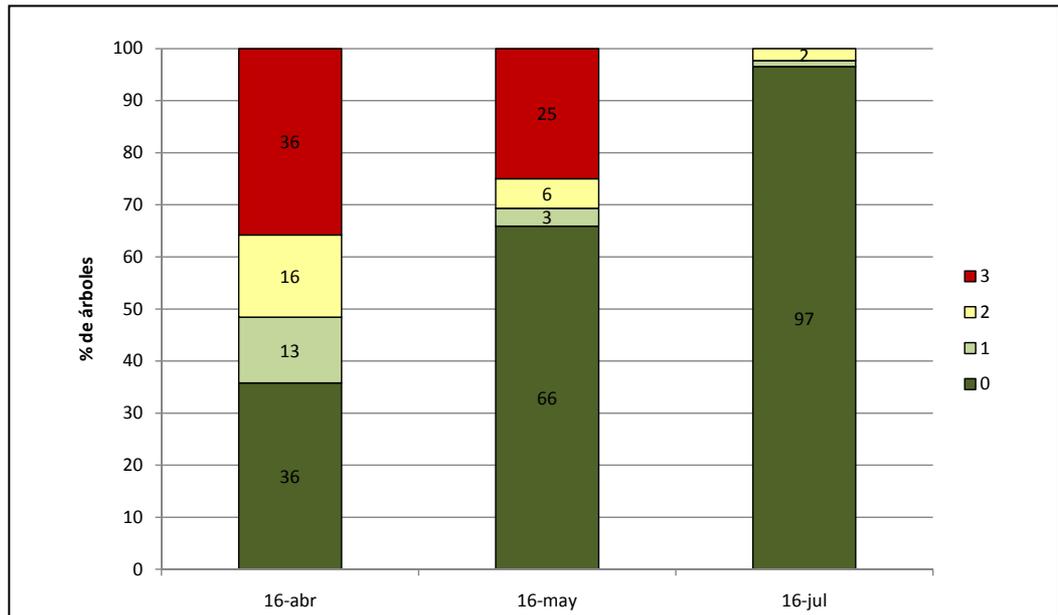
En epifitas severas de tizón apical la mayoría de los árboles fueron atacados, evidenciando una epifita generalizada en la población (Figura 4). Esto podría indicar que con alta presión de inóculo y condiciones ambientales favorables, en las fuentes de semilla de *E. dunnii* evaluadas, la mayoría de los árboles fueron susceptibles.

*¿Cómo evoluciona la epifita? ¿Cómo se recupera la plantación?*

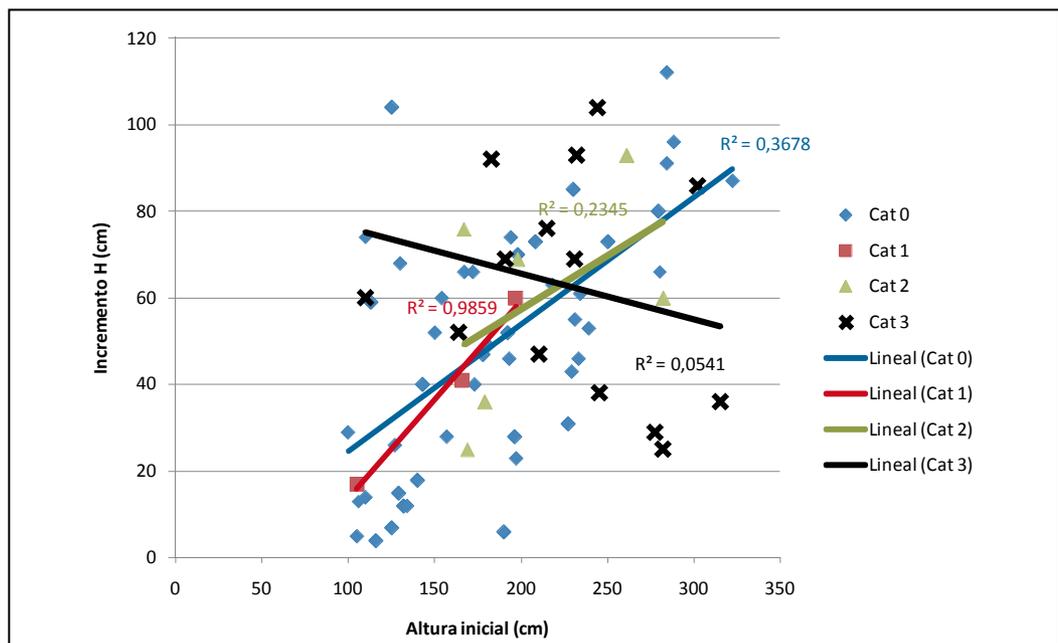
Los resultados obtenidos a partir de la lectura de transectas en una de las parcelas de observación indican un severo ataque de tizón apical en abril, con el 36 % de los árboles en categoría 3, y una progresiva recuperación

en los meses siguientes donde solamente un 3% de los árboles presentó síntomas tres meses después de ocurrida la epifita (Figura 5). Estos resultados indican que cuando cesan las condiciones favorables para la infección, el árbol comienza a rebrotar, reemplazando el ápice afectado por un nuevo ápice, diluyendo gradualmente la incidencia de la enfermedad.

Se analizó el crecimiento de los árboles de cada categoría en el período de abril a julio 2013. Para tener una estimación del daño que causa el tizón apical sobre el crecimiento, se relacionó la altura inicial de cada árbol con el incremento en altura en el período en estudio, considerando cada una de las categorías de severidad utilizada. Los resultados indican una estrecha relación entre la altura al inicio del período y el incremento, sugiriendo que los árboles más grandes tienen mayores tasas de crecimiento. Esta relación fue corroborada para los árboles en las categorías "0", "1", y "2", pero fue alterada para el caso de los árboles en la categoría "3", indicando que en



**Figura 5.** Porcentaje de árboles en cada categoría de la escala de severidad desarrollada para el tizón apical en este estudio, donde "0" indica árbol sin síntomas, y "3" árbol con el ápice terminal afectado. Datos obtenidos de la parcela de observación en Ingral en el otoño 2013.



**Figura 6.** Relación entre altura inicial e incremento en altura según categoría de daño. Transecta realizada en plantación de *E. dunnii* - T. Abdala – Soriano.

los árboles que tuvieron afectado su ápice terminal, el crecimiento no estuvo asociado a la altura inicial, sino que la muerte del ápice terminal afectó el crecimiento en dicho período (Figura 6).

*¿Qué efecto tiene el tizón apical y las manchas foliares sobre el crecimiento?*

Para contestar esta pregunta se comparó el tratamiento protegido vs. el tratamiento testigo

sin aplicación. En el caso del tizón apical, no fue posible mantener el tratamiento protegido libre de enfermedad. En ninguno de los experimentos fue posible disminuir el nivel de enfermedad que presentaba el testigo (Figura 7). De esta forma, al no tener un tratamiento libre de la enfermedad, no fue posible estimar el impacto de la misma sobre el crecimiento del cultivo. Sin dudas esta es una limitante importante

para cuantificar el daño debido a la falta de una herramienta de control que permita mantener plantas sanas, libres de enfermedad.

Para el caso de las manchas foliares, la aplicación periódica de oxiclورو si bien no logró evitar la enfermedad, permitió reducir los niveles de la misma en el experimento de Moreira (Figura 8). Al evaluar el crecimiento

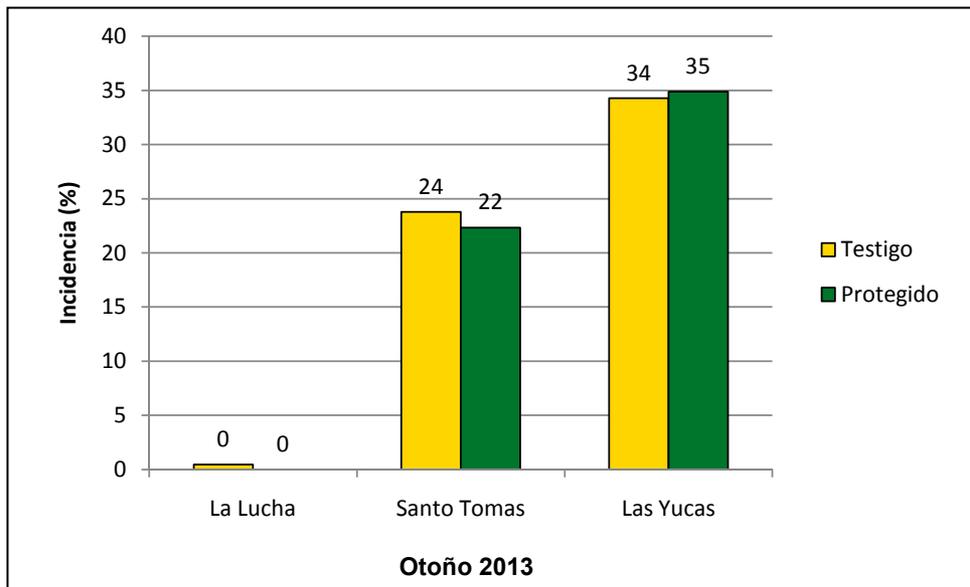


Figura 7. Incidencia del tizón apical en el tratamiento testigo y en el protegido en el momento de mayor enfermedad en cada experimento.

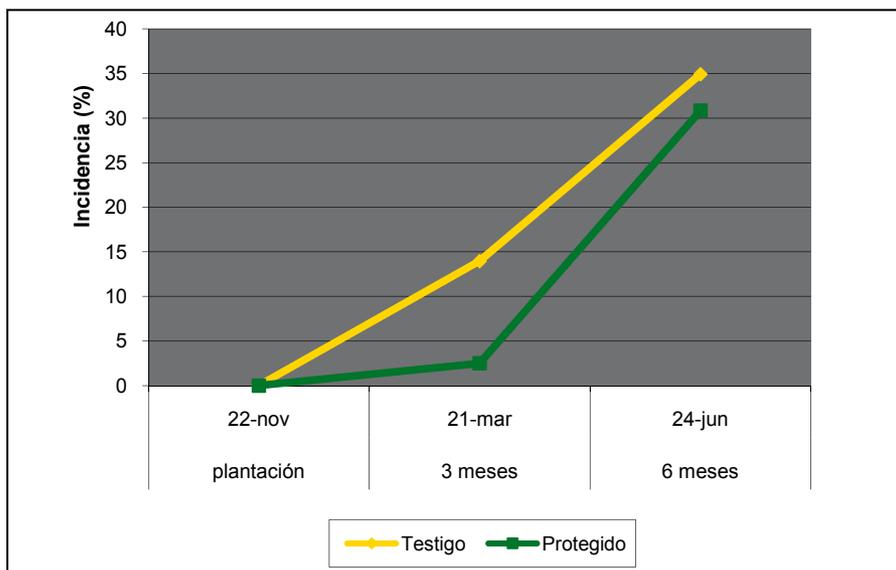
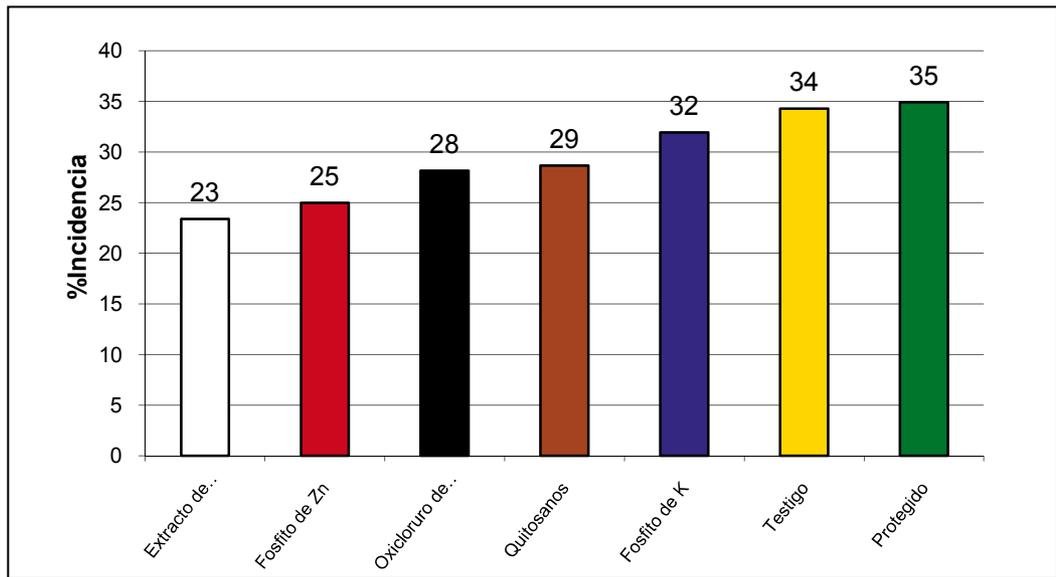
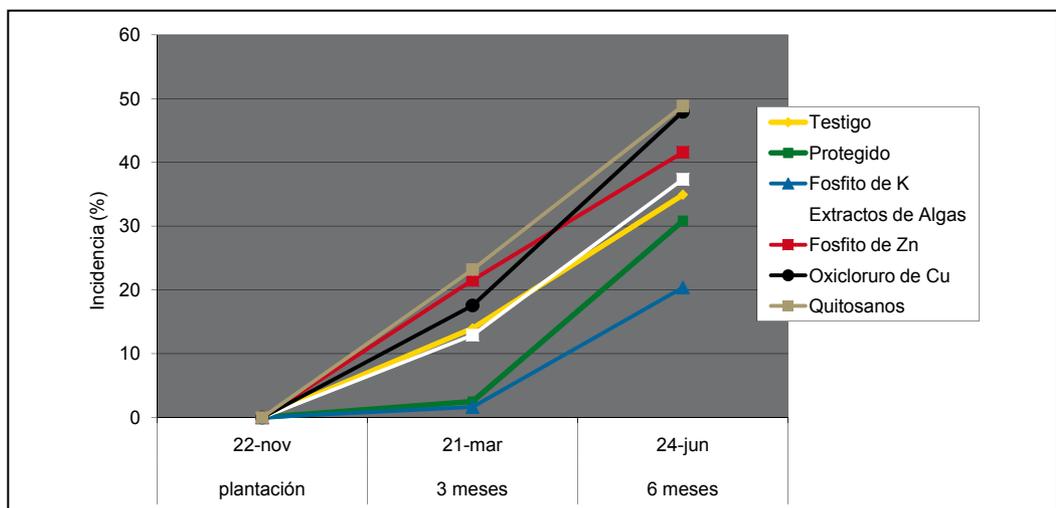


Figura 8. Evolución del porcentaje de árboles con mancha foliar (incidencia) en el testigo y en el protegido. Experimento Moreira - Rivera.



**Figura 9.** Efecto del tratamiento sobre la incidencia del tizón bacteriano. Experimento Las Yucas - Soriano. Lectura realizada en julio del 2012, momento del pico epidémico.



**Figura 10.** Evolución de la incidencia de manchas foliares según tratamiento. Experimento Moreira - Rivera.

en altura entre los 3 y 6 meses se observó un crecimiento 36% mayor en los árboles protegidos, aunque aún no se realizó el análisis estadístico que confirme que estas diferencias están asociadas al factor en estudio.

*¿Existen alternativas químicas para minimizar el efecto de las epifitas?*

Para contestar esta pregunta se comparó la incidencia de cada enfermedad en los diferentes tratamientos implementados en los

experimentos. En relación al tizón apical, no hubo un efecto claro del tratamiento sobre la enfermedad. Si bien resta realizar el análisis estadístico, las alternativas evaluadas no mostraron una reducción importante de la enfermedad (Figura 9).

En el caso de las manchas foliares, los tratamientos "Protegido" y "Fosfito de K" mostraron menores niveles de enfermedad que el testigo (Figura 10), a pesar de que resta un análisis estadístico que confirme el efecto del factor analizado.

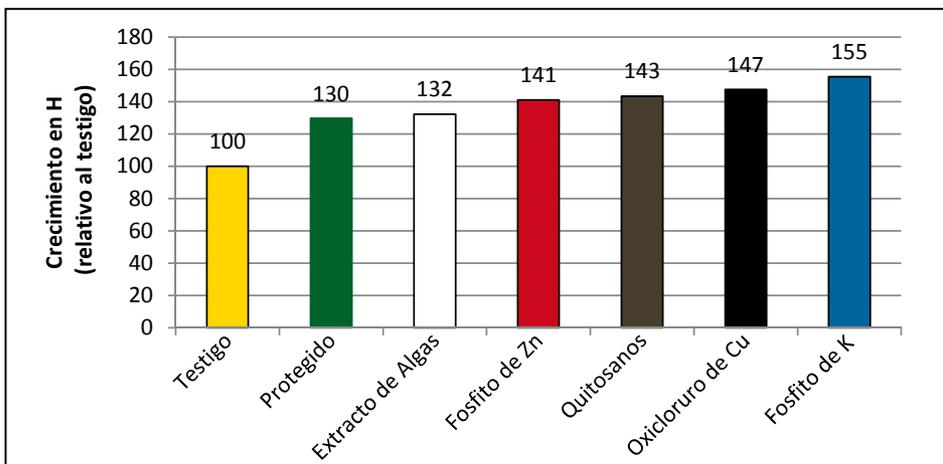
¿Existe algún efecto de los productos químicos sobre el crecimiento y la supervivencia de los árboles?

Las enfermedades evaluadas no mostraron efecto sobre la sobrevivencia de los árboles, ya que no se encontraron árboles muertos como resultado de las epifitas observadas.

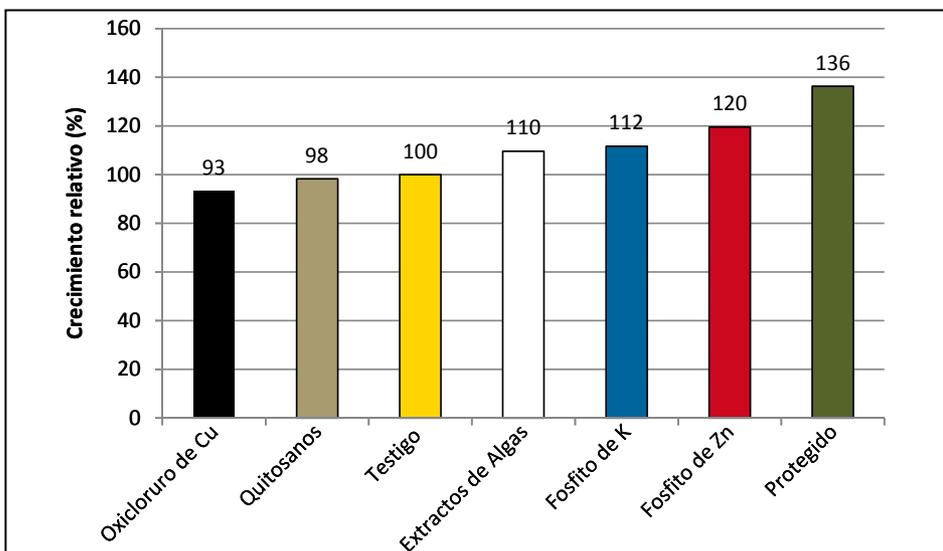
Respecto al efecto de los tratamientos sobre el crecimiento, en el caso de los experimentos con epifitas por tizón apical, se observaron diferencias (Figura 11), pero también se observó

una gran variabilidad asociada a la variabilidad individual dentro de cada tratamiento, seguramente explicado por tratarse de plantación seminal, con diversidad genética entre árboles. El análisis estadístico permitirá dilucidar si estas diferencias pueden ser atribuidas al tratamiento o corresponden a error experimental.

Para el caso de manchas foliares, se observaron también diferencias en el crecimiento, que deberán ser respaldadas por el análisis estadístico debido también a la variación individual (Figura 12).



**Figura 11.** Crecimiento en altura entre los 6 y los 12 meses de la plantación en el experimento Las Yucas, con epifita de tizón apical. El crecimiento se expresa en términos relativos al testigo. Testigo base 100 = 49 cm.



**Figura 12.** Crecimiento en altura entre los 3 y los 6 meses de la plantación en el experimento Moreira - Rivera, con epifita de manchas foliares. El crecimiento se expresa en términos relativos al testigo. Testigo base 100 = 44 cm.

## 2. CONCLUSIONES

Las enfermedades bacterianas de manchas foliares están más asociadas a la zona noroeste del país y a *Eucalyptus grandis*, mientras que tizón apical se ha observado en todo el país, y las especies que han mostrado niveles epidémicos mayores han sido *E. dunnii* y *E. benthamii*, en las cuales en epifitas severas la mayoría de los árboles se ven afectados.

Las epifitas de tizón apical han sido observadas esporádicamente y han mostrado un desencadenamiento explosivo, llegando en poco tiempo a epifitas severas. Aunque la recuperación se da de forma gradual, es rápida, en un mes se puede observar la recuperación de la plantación si las condiciones ambientales no permiten que la enfermedad siga evolucionando. En el caso de epifitas severas el mayor daño se observa en árboles en los cuales se ha afectado el ápice principal, reduciendo el crecimiento en altura.

Para el caso de las manchas foliares se observó una única epifita, la cual comenzó en verano y continuó a lo largo de todo el año.

Para ambas enfermedades no existe una clara asociación de la edad de los árboles con las epifitas, ya que se observaron en los primeros 2 años de edad. Tampoco hay una asociación clara con volumen y frecuencia de lluvias, pero podría haber una asociación con ocurrencia de tormentas, por los cambios bruscos de temperatura, vientos fuertes, y lluvias. Sin embargo, si bien se conoce que ocurrieron estos eventos durante el período en estudio, los mismos no fueron registrados y por consiguiente no se pudo confirmar esta hipótesis.

Las alternativas químicas no mostraron una reducción importante de la enfermedad, para el caso de tizón apical, sin embargo para el

caso de las manchas foliares, los tratamientos “Protegido” y “Fosfito de K” mostraron menores niveles de enfermedad que el testigo.

Tanto para tizón apical como para manchas foliares las alternativas químicas mostraron un efecto sobre el crecimiento, aunque los experimentos aún están siendo evaluados y resta realizar análisis estadísticos.

Las enfermedades evaluadas no mostraron efecto sobre la sobrevivencia de los árboles, ya que no se encontraron árboles muertos como resultado de las epifitas observadas. No fue posible estimar el daño causado por estas enfermedades, debido a que no se pudo mantener sano al tratamiento “Protegido”, lo cual es una limitante importante que hay que intentar salvar.

La continuidad de las mediciones de estos experimentos, junto a la identificación de las bacterias involucradas, tanto a las manchas foliares como al tizón apical bacteriano, serán el camino a seguir para poder responder otras preguntas generadas por el sector productivo. Una vez identificadas las especies involucradas y generadas las colecciones bacterianas, se podrá realizar un ajuste de métodos para la realización de inoculación artificial que permita caracterizar la resistencia genética de distintos genotipos.

## 3. AGRADECIMIENTOS

Se agradece la financiación del proyecto por la Sociedad de Productores Forestales (SPF) y CSIC-UdelaR en su programa VUSP. También se agradece especialmente a las empresas de agroquímicos Maisor, Marwald, Enfoque y Fanaproqui por brindar los productos a evaluar y a las empresas forestales COFUSA, Forestal Atlántico Sur, Forestal Oriental, Montes del Plata, y Weyerhaeuser Uruguay, por ceder el área experimental y apoyar la logística de los experimentos.

#### 4. BIBLIOGRAFÍA

**ALFENAS, A.; ZAUZA, E.A.; MAFIA, R.; ASSIS, T.** 2004. Clonagem e Doenças do Eucalipto. Viçosa, BR: Editorial UFV. 500 p

**COUTINHO, T.A.; BRADY, C.L.; VAN DER VAART, M.M.; VENTER, S.N.; TELECHEA, N.; ROLFO, M.; PÉREZ, C.; WINGFIELD, M.J.** 2011. A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. Australasian Plant Pathology 40:55-60.

**FAO.** 2006. Manual de campo de plagas y enfermedades de Eucaliptos y Pinos en el Uruguay: «Apoyo a la defensa y protección de las plantaciones forestales en el Uruguay» MGAP. Dirección General Forestal.

**GONÇALVES, R.C.; LAU, D.; OLIVEIRA, J.R.; MAFFIA, L.A.; CASCARDO, J.C.M.; ALFENAS, A.C.** 2008. Etiology of bacterial leaf blight of *Eucalyptus* in Brazil. Tropical Plant Pathology 33: 180-188.



# CAPÍTULO VII

## RESPUESTA DE *Eucalyptus grandis* INOCULADO CON *Teratosphaeria gauchensis*

Sergio Ramos<sup>1</sup>, Azucena del Carmen Ridao<sup>2</sup>

### 1. INTRODUCCIÓN

Eucaliptos y pinos son los principales recursos madereros cultivados en Argentina, ambos representan el 88% de la superficie forestal (MINAGRI, 2009). El eucalipto es una especie exótica que se ha adaptado a las condiciones ambientales similares a su región de origen y se ha visto favorecido por la ausencia de plagas y enfermedades. Sin embargo, en los últimos años se han reportado plagas y enfermedades en donde los eucaliptos son cultivados, algunos provenientes de su área de origen y otros que adoptaron al eucalipto como nuevo huésped. *Teratosphaeria gauchensis* es un celomicete que produce una enfermedad conocida como "Coniothyrium canker". Son lesiones necróticas en los tejidos verdes del tallo y ramas que eventualmente se desarrollan en pequeñas canchales. Las lesiones más profundas alcanzan el cambium provocando bolsas de kino que devalúan la madera. En los casos graves hay deformación del tallo, brotes epicórmicos e incluso la muerte del árbol (Nichols, 1992; Old *et al.*, 2003). Las bolsas de kino dificultan el proceso de pulpado (Cortinas *et al.*, 2004).

En América del Sur la enfermedad se encuentra en los principales países productores de eucalipto: Argentina, Brasil y Uruguay (Gezahgne *et al.*, 2003; Alfenas *et al.*, 2004; Marraro Acuña y Garran, 2004; Cortinas *et al.*, 2006). Una de las estrategias más importantes para el manejo de esta enfermedad es a través de genotipos resistentes o tolerantes. La resistencia genética ha sido utilizada con éxito en Brasil y Sudáfrica contra el "can-

cro del eucalipto", producido por *Chrysoporthe cubensis* (= *Cryphonectria cubensis*), por selección de clones e híbridos *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* resistentes (van Heerden *et al.*, 2005; Alfenas *et al.*, 1983).

El objetivo de este trabajo fue comparar métodos de inoculación de *T. gauchensis*. Esta herramienta es útil para programas de mejoramiento (Barber, 2004), especialmente en el caso de la propagación de clones (Wingfield *et al.*, 1991).

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos ensayos: inoculación asistida e inoculación en el campo.

#### *Inoculación asistida (IA)*

Se utilizó el aislamiento BII12 de *T. gauchensis* como inóculo y se compararon dos métodos, el primero (M1) fue utilizado por van Zyl *et al.* (2002). Las inoculaciones se realizaron mediante la remoción de una porción de corteza de 10 mm de diámetro, y reemplazando esto con un disco de agar APD que lleva el hongo, o con un disco no inoculado en el caso de los controles. El segundo (M2) es una adaptación de la técnica de Cruz Avilés *et al.* (2001) que se utiliza con otros patógenos de eucalipto (*Lasiodiopodia theobromae*, *Fusicoccum* sp y *Cryphonectria cubensis*). Esta técnica es similar a la anterior, pero en lugar de extraer una parte de la corteza se realizan punciones con el fin de provocar pequeñas heridas. En ambas técnicas la zona tratada se selló con polietileno para prevenir la desecación y contaminación. Se midió

<sup>1</sup> Protección Forestal. Estación Experimental Agropecuaria Concordia, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. CC N° 34 (E3200AQK), Concordia, Entre Ríos, Argentina. sramos@correo.inta.gov.ar

<sup>2</sup> Patología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. UIB. CC 276 (B7620BKL) Balcarce, Buenos Aires, Argentina. ridaoaz@balcarce.inta.gov.ar

longitud, ancho y se determinó el área de la lesión (mm<sup>2</sup>) a los dos meses. Las pruebas se realizaron en invernáculo. Se utilizaron plantines de *E. grandis* seleccionados de diferentes orígenes: 40 plantines considerados como clon resistente (clon 36), 40 plantines de un clon considerado susceptible (clon F) y un tercer grupo de 40 plantines de origen seminal (semilla comercial), de cuatro meses de edad. Se dispuso un diseño de bloques completos al azar con factorial 3 (orígenes) x 2 (métodos de inoculación), con 4 bloques y 5 plantas por bloque. Se realizó un ANOVA para la severidad (mm<sup>2</sup>) y una prueba de comparaciones múltiples de medias Tukey (5 % nivel de significación).

### Inoculación en el campo (IC)

Plantines de *E. grandis* de cuatro meses de edad de los mismos orígenes que los utilizados en la IA fueron colocados bajo el dosel de un lote de *E. grandis* fuertemente afectado por *T. gauchensis*. Se configuró un diseño de BCA con 3 tratamientos, 10 bloques y 2 plantas por bloque. La severidad se evaluó a los 105 días en base al número y tamaño

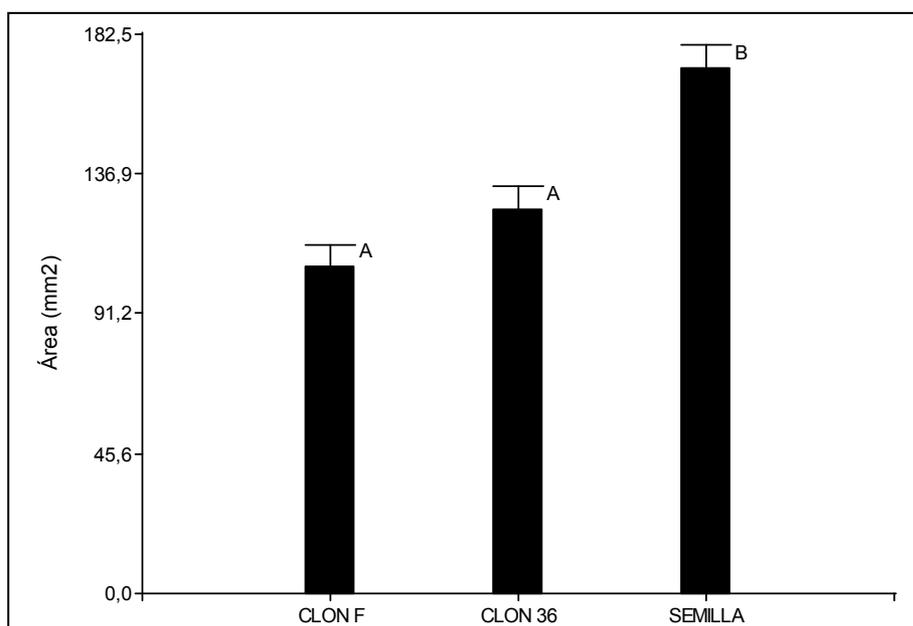
de las lesiones en una porción de tallo de 20 cm por encima de la mitad de la altura total. Se determinó la frecuencia de lesiones de acuerdo al tamaño, el número de lesiones por cm<sup>2</sup> y la severidad como porcentaje de tejido enfermo (PTE). Para la evaluación del tamaño de la lesión se elaboró una escala ad hoc. Se realizó un ANOVA para la severidad (PTE) y una prueba de comparaciones múltiples (Tukey, nivel de significación del 5 %)

Los ensayos se llevaron a cabo en el INTA EEA Concordia, Entre Ríos. Los resultados se evaluaron mediante el software estadístico Infostat (2009).

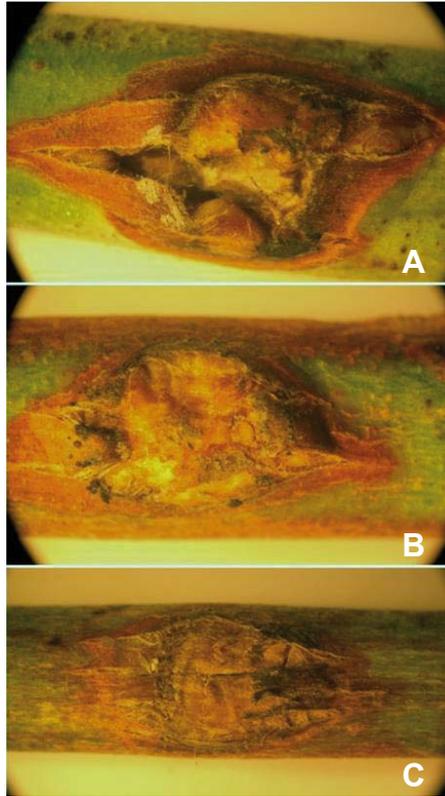
## 3. RESULTADOS

### Inoculación asistida

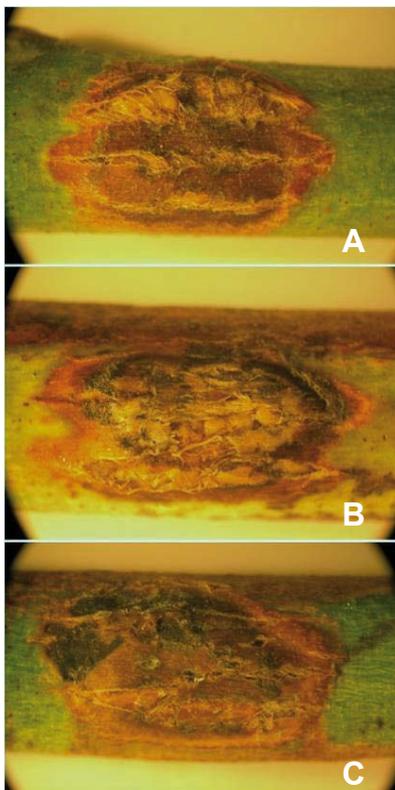
Los resultados con los métodos de IA, M1 y M2, fueron similares y no hubo interacción significativa genotipo-método. La semilla comercial mostró mayor desarrollo de la zona afectada y fue estadísticamente diferente de los clones 36 y F. No se observaron diferencias significativas entre clones (Figuras 1, 2 y 3) ( $Pr > F < 0.0001$ ).



**Figura 1.** Área promedio de la lesión (mm<sup>2</sup>) desarrollada por métodos de inoculación asistida M1 y M2, con aislamiento BII12 de *Teratosphaeria gauchensis* en plantines de *Eucalyptus grandis*. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, 0,05).



**Figura 2.** Tallos de plantines de *Eucalyptus grandis* 60 días después de la inoculación, método de inoculación 1 (M1), con el aislamiento BII12 de *Teratosphaeria gauchensis*. A) Clon 36, B) clon F y C) semilla comercial.



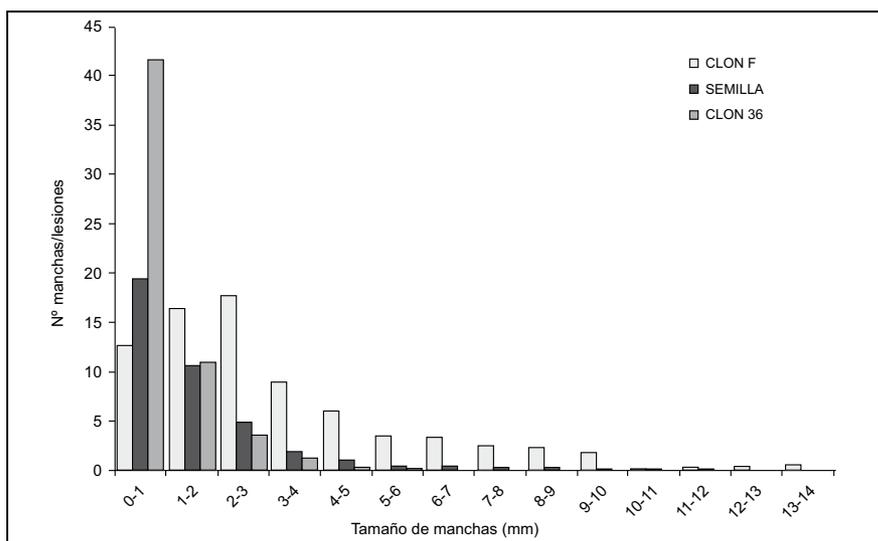
**Figura 3.** Tallos de plantines de *Eucalyptus grandis* 60 días después de la inoculación, método de inoculación 2 (M2), con el aislamiento BII12 de *Teratosphaeria gauchensis*. A) Clon 36, B) clon F y C) semilla comercial.

### Inoculación en el campo

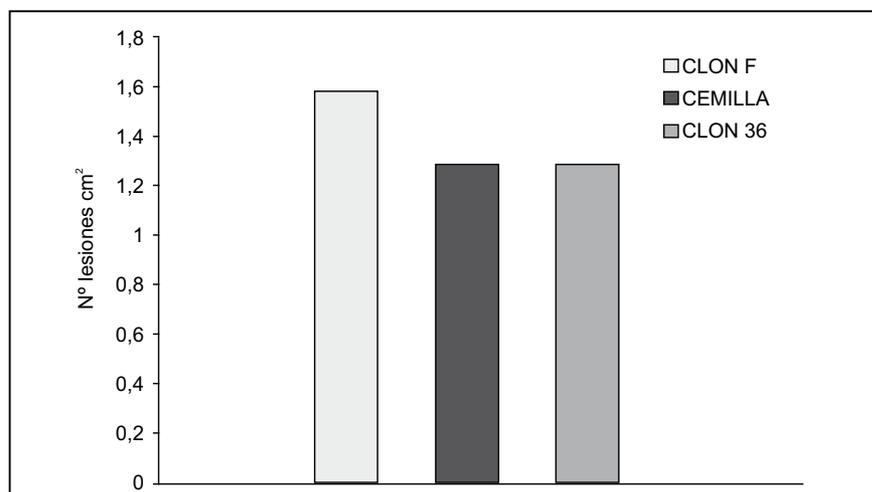
El tamaño medio de las lesiones en los tallos de las tres fuentes probadas (semilla comercial, clones F y 36) varió de 0 a 10 mm. La frecuencia en función del tamaño promedio de lesión mostró una situación contrastante entre los dos clones. Mientras que el clon 36 tenía lesiones predominantemente pequeñas, tamaños de 0,6 a 2,5 mm de diámetro, el clon F presentó lesiones

de mayor tamaño, 3-6,5 mm de diámetro, que las otras dos fuentes. El origen semilla comercial mostró un comportamiento intermedio (Figura 4).

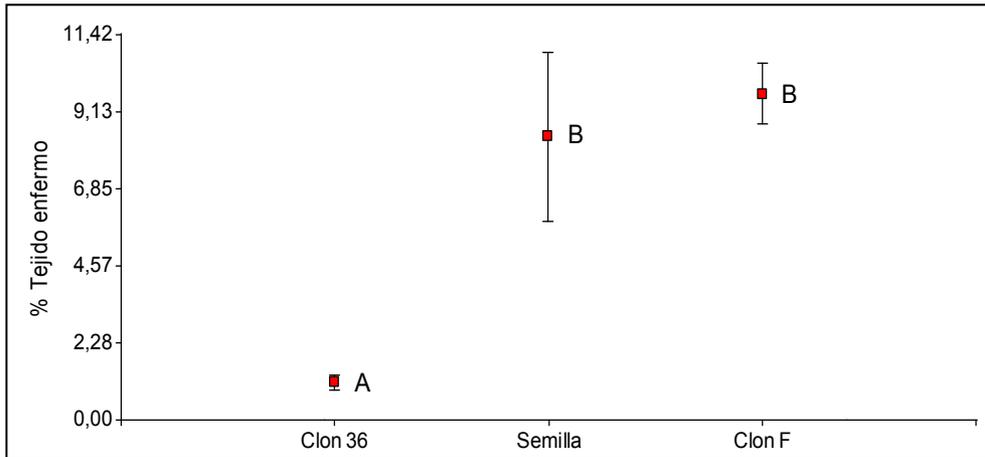
El número de lesiones por cm<sup>2</sup> se ubicó entre 1,28 y 1,58. El origen semilla comercial y el clon 36 mostraron casi la misma cantidad de lesiones por cm<sup>2</sup>, mientras que para el clon F fue más alto, pero no estadísticamente diferente (Figura 5).



**Figura 4.** Número medio de lesiones según su tamaño (mm) registrado en los tallos de los plantines de *Eucalyptus grandis* de 4 meses de edad mantenidos en una parcela de eucalipto gravemente afectada por *Teratosphaeria gauchensis*.



**Figura 5.** Promedio de lesiones por cm<sup>2</sup> en los tallos de *Eucalyptus grandis*. Plantines de 4 meses edad mantenidos en una parcela de eucalipto fuertemente afectada por *Teratosphaeria gauchensis*.



**Figura 6.** Porcentaje de tejido enfermo en *Eucalyptus grandis*. Plantas evaluadas después de 105 días en una parcela de la misma especie altamente infestada con *Teratosphaeria gauchensis*. Las barras laterales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 0,05).

El porcentaje de tejido enfermo (PTE) fue mayor en las plantas del clon F. El PTE de las plantines de origen semilla comercial fue muy cercano al del clon F, sin embargo, los valores fueron más variables en

el primero como era de esperar (Figuras 6 y 7). El PTE fue más bajo para el clon 36, confirmando la menor susceptibilidad de este clon a *T. gauchensis*. ( $P > F$ : 0,0005).



**Figura 7.** Rama de *Eucalyptus grandis* evaluado después de 105 días en un lote de *E. grandis* fuertemente afectado por *Teratosphaeria gauchensis*. A) Clon 36, B) Semilla comercial y C) clon F.

#### 4. DISCUSIÓN

El resultado de la prueba de inoculación natural y asistida mostró una diferencia en la susceptibilidad de los distintos materiales de *E. grandis*. En la inoculación asistida, de mayor a menor susceptibilidad fueron: semilla comercial, clon 36 y clon F, mientras que para la prueba de campo fueron: clon F, semilla comercial y clon 36. Si se toma la prueba en el campo como la manifestación de la sensibilidad natural de diferentes materiales bajo alta presión de inóculo, se podría explicar la discrepancia entre los resultados de IC y los obtenidos en las dos pruebas de IA porque en M1 el hongo se pone en contacto directo con el cambium y en M2 el hongo penetra a través del agujero hecho por la aguja, ambas situaciones son muy diferentes al proceso de infección que ocurre en la naturaleza, donde la penetración es aparentemente directa (Old *et al.*, 2003). La corteza puede desempeñar una función importante en la contención del desarrollo de la lesión.

Los graves daños causados por el procedimiento de IA dejan tejidos expuestos que de otra manera no se verían afectados, por lo que la prueba puede no estar reproduciendo fielmente la susceptibilidad de los distintos orígenes. Algo similar fue sugerido por Wingfield *et al.* (2002) en los experimentos de Hodge (1999) para determinar la susceptibilidad intraespecífica de *Pinus radiata* y *P. patula* al "cancro del pino" por *Fusarium circinatum*.

La diferencia en el tamaño de las lesiones para los distintos orígenes (Figura 4) y la escasa diferencia observada en la cantidad de lesiones por cm<sup>2</sup> (Figura 5) podría indicar un mecanismo de defensa que frena o que reduce la invasión (desarrollo y colonización) de los tejidos por el hongo.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

**ALFENAS, A.C.; JENG, R.; HUBBES, M.** 1983. Virulence of *Cryphonectria cubensis* on *Eucalyptus* species differing in resistance. *European Journal of Forest Pathology* 13: 179-205.

**ALFENAS, A.C.; VALVERDE ZAUZA, E.A.; GONÇALVES MAFIA, R.; DE ASSIS, T.F.** 2004. Clonagem e doenças do eucalipto. Ed. Universidad Federal de Viçosa. Viçosa, Brasil. 442 p.

**BARBER, P.A.** 2004. Forest Pathology: The Threat of Disease to Plantation Forest in Indonesia. *Plant Pathology Journal* 3(2): 97-104.

**CORTINAS, M.N.; KOSCH, N.; THAIN, J.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J.** 2004. First record of *Eucalyptus* stem canker pathogen, *Coniothyrium zuluense* from Hawaii. *Australasian Plant Pathology* 33: 309-312.

**CORTINAS, M.N.; CROUS, P.W.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J.** 2006. Multi-gene phylogenies and phenotypic characters distinguish two species within *Colletogloeopsis zuluensis* complex associated with *Eucalyptus* stem canker. *Studies in Mycology* 55: 133-146.

**CRUZ AVILÉS, J.; CIBRIÁN TOVAR, D.; RAMÍREZ MALDONADO, H.; GARCÍA DÍAZ, S.E.** 2001. Etiología y síndrome de los cancros *Cryphonectria*, *Lasioidiplodia* y *Fusicoccum* en Eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh). *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente* 7(1): 27-37.

**GEZAHGNE, A.; ROUX, J.; THU, P.Q.; WINGFIELD, M.J.** 2003. *Coniothyrium* stem canker of *Eucalyptus*, new to Argentina and Vietnam. *South African Journal of Science* 99: 587-588.

**HODGE, G.** 1999. Screening of Mexican pines for pitch canker resistance. In: Devey M.; Matheson C.; Gordon T. (eds.) "Current and potential impacts of pitch canker in Radiata pine". Proceedings of the IMPACT Meeting on Pitch Canker, California, USA, CSIRO, Australia.

**INFOSTAT.** 2009. InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

- MARRARO ACUÑA, F.; GARRÁN, S.M.** 2004. Detección de *Kirramyces epicocoides*, *Puccinia psidii* y *Coniothyrium zuluense*. Agentes causales de enfermedades en *Eucalyptus* spp. En la zona de Concordia, Entre Ríos, Argentina. RIA 33(3): 135-148.
- MINAGRI.** 2009. Elaboración de un mapa de plantaciones forestales (MPF) de la República Argentina de actualización permanente. Dirección de Producción Forestal. Ministerio de Agricultura, Argentina.
- NICHOLS, N.** 1992. Plantation pathology: Notes for identification of common pathological problems in South African Forestry. Institute for Commercial Forestry Research. Bulletin Series N° 23/92. South Africa. 20 p.
- OLD, K.M.; WINGFIELD, M.J.; YUAN, Z.Q.** 2003. A Manual of Diseases of Eucalypts in South-East Asia. Center for International Forestry Research (CIFOR). 98 p.
- VAN HEERDEN, S.W.; AMERSON, H.V.; PREISIG, O.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J.** 2005. Relative pathogenicity of *Cryphonectria cubensis* on *Eucalyptus* clones differing in their resistance to *C. cubensis*. Plant Disease 89: 659-662.
- VAN ZYL, L.M.; COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, M.J.** 2002. Morphological, cultural and pathogenic characteristics of *Coniothyrium zuluense* isolates from different plantation regions in South Africa. Mycopathologia 155: 149-153.
- WINGFIELD, M.J.; SWART, W.J.; KEMP, G.H.J.** 1991. Pathology consideration in clonal propagation of *Eucalyptus* with special reference to the South African situation Proceedings of the IUFRO International Symposium for Intensive Forestry: The Role of Eucalypts, Durban, South Africa. p. 811-820.
- WINGFIELD, M.J.; COUTINHO, T.A.; ROUX, J.; WINGFIELD, B.** 2002. The future of exotic plantation forestry in the tropics and southern Hemisphere: Lessons from pitch canker. South African Forestry Journal 195: 79-82.



# CAPÍTULO VIII

## EFECTO DE *Teratosphaeria nubilosa* SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Eucalyptus globulus* Y *Eucalyptus maidenii* AL AÑO DE INICIADA LA INFECCIÓN

Gustavo Balmelli<sup>1</sup>, Sofía Simeto<sup>1</sup>, Diego Torres-Dini<sup>1</sup>, Alicia Castillo<sup>2</sup>, Nora Altier<sup>3</sup>, Pablo Núñez<sup>1</sup>, Federico Rodríguez<sup>1</sup>, Wilfredo González<sup>1</sup>, Guillermo Pérez<sup>4</sup>, Julio J. Diez<sup>5</sup>

### 1. INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de *Teratosphaeria nubilosa* en Uruguay en el año 2007 (Pérez *et al.*, 2009), las plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* y *E. maidenii* están siendo severamente afectadas por la enfermedad conocida como Manchas de *Mycosphaerella*. Dicha enfermedad afecta principalmente el follaje juvenil, produciendo manchas foliares y defoliación (Carnegie *et al.*, 1998; Hunter *et al.*, 2009) (Figura 1). La frecuente ocurrencia y gran severidad de los daños provocados por esta enfermedad (Balmelli *et al.*, 2009a, 2009b, 2011a; Simeto *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2013) son consecuencia de la alta susceptibilidad del follaje juvenil de *E. globulus* y *E. maidenii*, del gran volumen de inóculo producido por el patógeno y de que las condiciones ambientales predisponentes (varios días de lluvia y alta humedad relativa) son frecuentes en nuestro país. La magnitud del problema en *E. globulus*, que en ocasiones llega a provocar pérdidas de área foliar superiores al 80% (Balmelli *et al.*, 2011a; Pérez *et al.*, 2013; Alonso *et al.*, 2013), ha provocado en los últimos años el reemplazo de esta especie por otras más resistentes, como *E. dunnii* y *E. grandis*. De hecho, el área plantada anualmente con *E. globulus* ha sufrido una

drástica reducción, pasando de 11600 hectáreas en 2006 a 706 hectáreas en 2011 (MGAP, 2013).

La pérdida de área foliar provocada por plagas y enfermedades afecta el crecimiento de los árboles y en determinadas circunstancias provoca mortalidad, lo cual disminuye la productividad de la plantación. Sin embargo, y a pesar de la gravedad del problema, la magnitud de las pérdidas provocadas por *T. nubilosa* en *E. globulus* y en *E. maidenii* aún no ha sido cuantificada en nuestro país. Por otro lado, si bien *E. maidenii* es utilizada por algunas empresas forestales para sustituir a *E. globulus*, hasta el momento tampoco se conoce la susceptibilidad relativa de ambas especies. Por tal motivo, y en el marco de un proyecto de mejora genética de *E. globulus* y *E. maidenii* (Balmelli *et al.*, 2013a), el presente trabajo tiene como objetivos: a) evaluar el comportamiento relativo de *E. globulus* y *E. maidenii* frente a *T. nubilosa*; b) cuantificar el efecto del daño provocado por la enfermedad sobre el crecimiento y sobre la mortalidad al año de comenzada la infección; y c) cuantificar el efecto del cambio de follaje sobre el nivel de daño, sobre el crecimiento y sobre la mortalidad posterior.

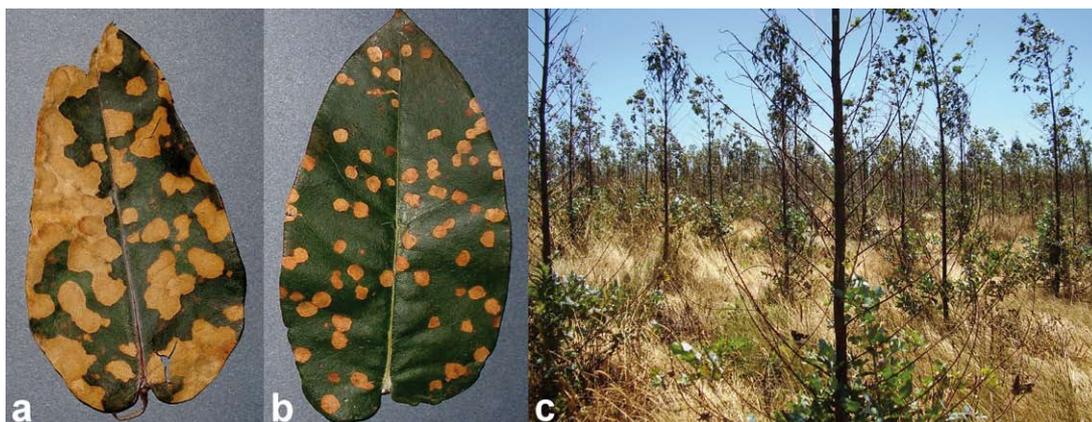
<sup>1</sup> Programa Nacional de Investigación en Producción Forestal, INIA Tacuarembó. gbalmeili@tb.inia.org.uy

<sup>2</sup> Sección Biotecnología, INIA Las Brujas.

<sup>3</sup> Programa de Sustentabilidad Ambiental, Sección Bioinsumos, INIA Las Brujas.

<sup>4</sup> Polo de Desarrollo Universitario Forestal, Centro Universitario de Tacuarembó (CUT), UdelaR.

<sup>5</sup> Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. Instituto de Gestión Forestal Sostenible. Universidad de Valladolid. Palencia, España.



**Figura 1.** Manchas típicas de *T. nubilosa* en a) *E. globulus* y b) *E. maidenii*. c) Plantación de *E. globulus* con defoliación severa, muerte de ápices y ramas y rebrotes basales.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

La población evaluada corresponde a una prueba de progenies de *E. globulus* y *E. maidenii* instalada en marzo de 2011 en Lavalleja (Ruta 8, km 161). El ensayo se instaló en un suelo 2.11a y su preparación consistió en la aplicación de herbicida pre-laboreo (Glifosato, 3 L/ha), laboreo en fajas (subsulado y excéntrica) y aplicación de herbicida pre y post emergente (Goal + Arnes: 1.5 + 1.5 L/ha). La densidad de plantación fue de 1428 plantas por hectárea (3.5 metros entre líneas y 2 metros entre plantas). Se fertilizó al momento de la plantación con 80 g/planta de 12/48/8. El material genético evaluado corresponde a 194 familias de polinización abierta de *E. globulus* y 86 de *E. maidenii*, provenientes de las poblaciones de cría del INIA. El diseño experimental es de bloques completos al azar, con 3 repeticiones y parcelas de 8 plantas en línea.

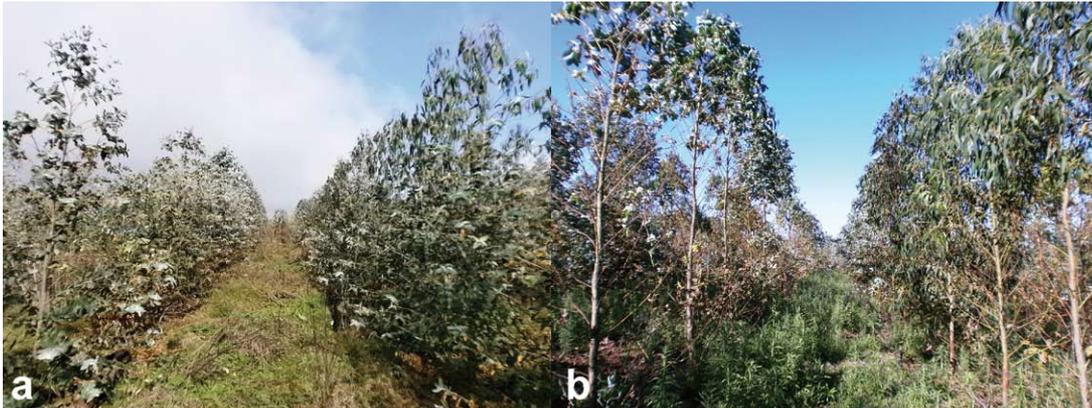
En febrero de 2012 se registraron varios días consecutivos de lluvia y/o alta humedad relativa, lo cual desencadenó una severa infección de *T. nubilosa*. Entre marzo y mayo se registraron nuevas infecciones, lo que provocó un aumento continuo de la defoliación en los meses siguientes. El crecimiento (altura), la severidad del daño foliar y la precocidad del cambio de follaje fueron evaluados en mayo de 2012 a los 14 meses de edad (Fi-

gura 2). La susceptibilidad a la enfermedad fue cuantificada en la totalidad de la copa de cada árbol en base a la severidad de manchas foliares y a la defoliación (porcentaje de hojas caídas), mediante escalas visuales adaptadas de Lundquist y Purnell (1987). Para la severidad de manchas se utilizó una escala con intervalos de 5% (0, 5, 10, etc.) y para la defoliación con intervalos de 10% (0, 10, 20, etc.). Con ambos parámetros se estimó el daño foliar total mediante el Índice de Daño de Copa (IDC), adaptado de Stone *et al.* (2003), calculado como:

$$\text{IDC} = \text{Defoliación} + ((1 - \text{Defoliación}/100) \times \text{Severidad de manchas}/100).$$

Para evaluar la precocidad del cambio de follaje se midió la proporción de follaje adulto, también con una escala visual a intervalos de 10% (Figura 3).

En diciembre de 2012 (a los 21 meses de edad, Figura 2) se evaluó defoliación y proporción de follaje adulto, utilizando las mismas escalas que en la evaluación anterior. Finalmente, en mayo de 2013 (a los 26 meses de edad y 12 meses de la primera evaluación) se evaluó el crecimiento (altura y diámetro) y la proporción de follaje adulto. El número de árboles vivos en cada medición se utilizó para calcular la mortalidad ocurrida entre dos evaluaciones.



**Figura 2.** Vista del ensayo en el momento de la evaluación a los 14 meses (izquierda) y a los 21 meses (derecha).



**Figura 3.** a) Árbol con 60% de defoliación y sin follaje adulto; b) árbol con 40% de defoliación y 20% de follaje adulto y c) árbol con 10% de defoliación y 70% de follaje adulto.

El efecto del daño provocado por *T. nubilosa* se analizó en cada especie por separado. El análisis se realizó a nivel fenotípico, considerándose a ambas poblaciones como unidades genéticamente heterogéneas. La relación entre diferentes variables a nivel individual se estimó mediante el coeficiente de correlación de Pearson. El efecto del daño se evaluó, mediante análisis de varianza, para el porcentaje de defoliación a los 14 meses, comparándose el crecimiento medio (incremento en altura entre los 14 y los 26 meses y DAP a los 26 meses) y la mortalidad media entre los 14 y

los 26 meses registrados en cada nivel de defoliación. Para los contrastes de medias se utilizó el test de Tukey-Kramer. El mismo tipo de análisis se utilizó para cuantificar el efecto de la precocidad del cambio de follaje (porcentaje de follaje adulto a los 14 meses) sobre el crecimiento y sobre la mortalidad posterior. Para la evaluación de los efectos sobre la mortalidad se excluyeron del análisis 92 árboles de *E. globulus* y 39 de *E. maidenii* que se volcaron con posterioridad a la primera evaluación. También se excluyeron 87 árboles de *E. globulus* y 31 de *E. maidenii* que

fueron seleccionados por su alta proporción de follaje adulto y cortados en agosto de 2012 para su clonación. La normalidad de los datos así como la homocedasticidad de la varianza residual se comprobó mediante análisis gráficos (gráficas de distribución normal y gráficas de valores predichos vs residuales), los cuales mostraron que no existen desviaciones en la normalidad ni falta de homogeneidad de varianza. Para los análisis estadísticos se utilizaron los procedimientos GLM y CORR del SAS (SAS Institute 1997).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **Comportamiento relativo de *E. globulus* y *E. maidenii* frente a *T. nubilosa***

En la primera evaluación sanitaria, a los tres meses de iniciada la infección de *T. nubilosa*, prácticamente el 100% de los árboles de ambas especies presentaban manchas foliares y defoliación. Esta última característica representó un 81.6% del daño total (IDC) en *E. globulus* y un 83.6% en *E. maidenii*. El nivel de daño en *E. globulus* fue superior al de *E. maidenii*, encontrándose diferencias significativas para severidad de manchas ( $P < 0.05$ ), para defoliación ( $P < 0.01$ ) y para el daño total (IDC) ( $P < 0.01$ ) (Cuadro 1). Entre la primera y la segunda evaluación, el nivel de

daño provocado por la enfermedad continuó aumentando, principalmente por un incremento en la defoliación. Este hecho resaltó las diferencias en susceptibilidad entre ambas especies, registrándose a los 21 meses (a los 10 meses de iniciada la infección) una defoliación media del 52.5% en *E. globulus* y 28.8% en *E. maidenii* (Cuadro 1).

El cambio de follaje, de juvenil a adulto, comenzó significativamente más temprano en *E. globulus* que en *E. maidenii*. A los 14 meses el 34.1% de los árboles de *E. globulus* ya tenía hojas adultas, mientras que en *E. maidenii* solo tenían hojas adultas el 2.8% de los árboles (Cuadro 1). Las diferencias en el cambio de follaje entre ambas especies se mantuvo hasta la última evaluación (26 meses), momento en que el 82.8% y 54.3% de los árboles de *E. globulus* y *E. maidenii* tenían hojas adultas (Cuadro 1). *E. maidenii* presentó a los 26 meses un promedio de 12% de follaje adulto, valor similar al que presentó *E. globulus* a los 14 meses (9.9%), indicando que esta última especie comienza el cambio de follaje aproximadamente un año antes (Cuadro 1). El follaje juvenil es mucho más susceptible a *T. nubilosa* que el follaje adulto (Park *et al.*, 2000), por lo que si bien *E. globulus* es más susceptible a *T. nubilosa* que *E. maidenii*, la mayor precocidad en el cambio de follaje le permitiría escapar a nuevas infecciones.

**Cuadro 1.** Comportamiento relativo de *E. globulus* y *E. maidenii* a los 14, 21 y 26 meses de edad.

Característica	14 meses		21 meses		26 meses	
	<i>E. globulus</i>	<i>E. maidenii</i>	<i>E. globulus</i>	<i>E. maidenii</i>	<i>E. globulus</i>	<i>E. maidenii</i>
Severidad de manchas (%)	10.5	5.6	-	-	-	-
Defoliación (%)	31.5	22.8	52.5	28.8	-	-
IDC (%)	38.7	27.1	-	-	-	-
% árboles con follaje adulto	34.1	2.8	53.9	9.3	82.8	54.3
% Follaje Adulto	9.9	0.6	17.3	2.3	29.4	12.0
Sobrevivencia (%)	82.9	87.1	77.1	81.0	74.2	79.7
Altura (cm)	287	275	-	-	596	655
DAP (cm)	-	-	-	-	5.5	7.0

Nota: las diferencias entre especies fueron significativas al 1% para todas las características, excepto para severidad de manchas a los 14 meses y para sobrevivencia a los 26 meses que fueron significativas al 5% y para sobrevivencia en las dos primeras evaluaciones (diferencias no significativas).

En la evaluación realizada a los 14 meses ambas especies presentaban similar sobrevivencia (Cuadro 1). Sin embargo, entre los 14 y los 26 meses la mortalidad promedio de *E. globulus* fue mayor que la de *E. maidenii*, lo que determinó que a los 26 meses la sobrevivencia de *E. maidenii* pasara a ser significativamente mayor que la de *E. globulus*. Por otro lado, a los 14 meses el crecimiento de *E. globulus* era significativamente mayor que el de *E. maidenii*, pero entre los 14 y los 26 meses el crecimiento relativo se revirtió, pasando *E. maidenii* a tener mayor altura y mayor DAP promedio que *E. globulus* (Cuadro 1). El menor crecimiento de *E. globulus* entre los 14 y los 26 meses podría deberse al efecto perjudicial del mayor nivel de daño registrados en esta especie. En un ensayo de especies y orígenes de *Eucalyptus* instalado en Lavalleja en 1992, y por lo tanto en ausencia de la enfermedad, el crecimiento de *E. globulus* fue superior al de *E. maidenii*, tanto al primer año como al tercer año (datos sin publicar). Estos resultados confirmarían la hipótesis de que el menor crecimiento de *E. globulus* observado en el presente ensayo, es consecuencia de un mayor nivel de daño provocado por *T. nubilosa* en esta especie.

### **Efecto del daño provocado por *T. nubilosa* sobre el crecimiento y sobre la mortalidad al año de comenzada la infección**

Al momento de la primera evaluación sanitaria no existían árboles sin daño, por lo tanto no se dispone de un verdadero control para cuantificar el efecto de la enfermedad sobre el crecimiento y sobre la sobrevivencia, tomándose como base de comparación al grupo de árboles que presentaban entre 0 y 10% de defoliación (clase 10%). La cantidad de árboles que presentaba cada nivel de defoliación se presenta en el Cuadro 2.

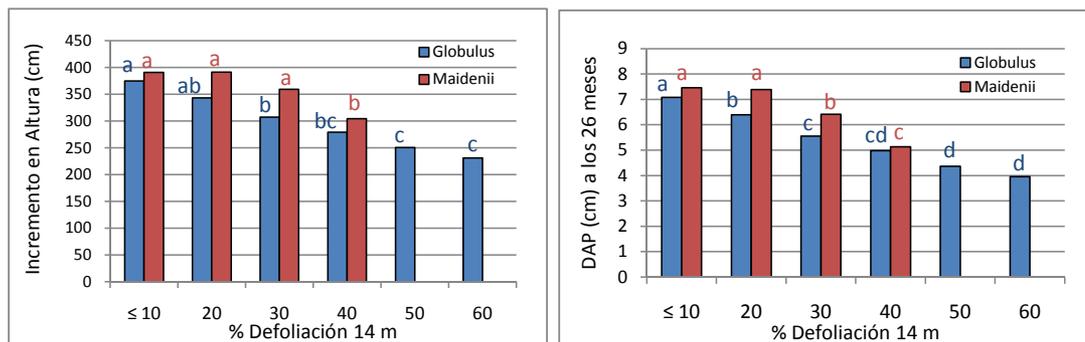
En ambas especies se encontró una relación inversa entre el nivel de daño a los 14 meses y el crecimiento posterior (incremento en altura entre los 14 y los 26 meses y DAP a los 26 meses) (Figura 4). En *E. maidenii* so-

**Cuadro 2.** Número de árboles de *E. globulus* y de *E. maidenii* con cada nivel de defoliación en la evaluación realizada a los 14 meses de edad.

Defoliación (%)	<i>E. globulus</i> (N° de árboles)	<i>E. maidenii</i> (N° de árboles)
≤ 10	185	234
20	572	838
30	1709	571
40	1073	81
50	198	0
60	20	0

lamente los árboles con 40% de defoliación mostraron un incremento en altura significativamente menor que los árboles menos dañados (defoliación ≤ 10%). En *E. globulus* los árboles con una defoliación igual o superior al 30% tuvieron crecimientos significativamente menores que los de la clase de defoliación ≤ 10% (Figura 4). La diferencia de crecimiento en altura entre los árboles más dañados y los menos dañados, es decir la pérdida de crecimiento en los niveles de mayor defoliación, fue de 22% en *E. maidenii* y de 38% en *E. globulus*. También se observó una relación inversa entre el nivel de daño a los 14 meses y el DAP a los 26 meses (Figura 4). Sin embargo, el efecto del daño sobre el DAP es significativo a niveles de defoliación más bajos (30% en *E. maidenii* y 20% en *E. globulus*) y las pérdidas de crecimiento en los niveles de mayor defoliación son mayores que las registradas para el crecimiento en altura (32% en *E. maidenii* y 44% en *E. globulus*).

El efecto de la reducción del área foliar en *Eucalyptus* ha sido reportado por varios autores: Carnegie & Ades (2003) para manchas de *Mycosphaerella* y Pinkard *et al.* (2006) para defoliación artificial, encontraron que el crecimiento de *E. globulus* se vio afectado a partir de un 10% de daño; Smith (2006) en *E. globulus* y Lundquist y Purnell (1987) en *E. nitens*, reportan que el crecimiento se vio afectado cuando la defoliación producida por *Mycosphaerella* fue superior al 20% y 25%, respectivamente. Sin embargo,

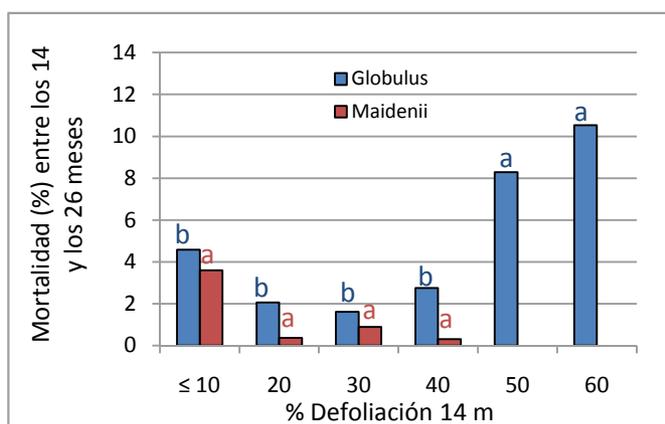


**Figura 4.** Efecto del nivel de defoliación a los 14 meses sobre el crecimiento (incremento en altura) entre los 14 y los 26 meses (izquierda) y sobre el DAP a los 26 meses (derecha). Dentro de cada especie, clases de defoliación con diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (al 5%) en el crecimiento.

Pinkard (2003) en *E. globulus* no encontró pérdidas de crecimiento en sitios de buena productividad con defoliaciones de hasta un 40%, mientras que Rapley *et al.* (2009) en *E. nitens*, no encontraron efectos sobre el crecimiento con defoliaciones menores al 60%. El efecto del daño de enfermedades foliares sobre *E. globulus* fue reportado previamente para Uruguay por Balmelli *et al.* (2011b, 2013b), quienes encontraron que el crecimiento fue afectado significativamente cuando la defoliación fue mayor al 40%, con pérdidas de 20% en DAP al séptimo año en los árboles con mayor defoliación. El ensayo analizado en dichos trabajos sufrió un único evento de defoliación durante el primer año, lo que contrasta con la situación actual,

donde la defoliación provocada por *T. nubilosa* continuó aumentando en el segundo año (Cuadro 1). Según Collett & Neumann (2002) y Wills *et al.* (2004), las defoliaciones repetidas tienen un mayor efecto perjudicial sobre el crecimiento que las defoliaciones aisladas, lo que explicaría las mayores pérdidas de crecimiento registradas en el presente estudio.

El daño provocado por *T. nubilosa* no afectó la sobrevivencia posterior en *E. maidenii* pero sí en *E. globulus*, donde los árboles más dañados (clases de defoliación 50 y 60%) presentaron mortalidades significativamente mayores que los árboles de las demás clases de daño (Figura 5). Si bien existen estudios en base a



**Figura 5.** Efecto del nivel de defoliación a los 14 meses sobre la mortalidad entre los 14 y los 26 meses. Dentro de cada especie, clases de defoliación con diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (al 5%) en mortalidad.

defoliación artificial en *E. globulus*, en los cuales la defoliación, aún a niveles de 100%, no afectó la sobrevivencia a los 11 meses post daño (Collett & Neumann, 2002), los resultados del presente trabajo sugieren que defoliaciones del 50% o superiores comprometen la sobrevivencia posterior. Similares resultados fueron reportados por Balmelli *et al.* (2011b, 2013b), donde la mortalidad en ensayos de *E. globulus* afectados por enfermedades foliares aumentó significativamente cuando los valores de defoliación fueron superiores al 60%. Sin embargo la muerte de árboles no puede atribuirse directamente al daño provocado por la enfermedad, sino que probablemente sea el resultado de una interacción entre el debilitamiento de los árboles más dañados y el efecto de otros factores bióticos o abióticos, incluida la competencia generada por árboles vecinos (Carnegie *et al.*, 1994).

**Efecto de la precocidad del cambio de follaje en *E. globulus* sobre el nivel de daño provocado por *T. nubilosa* y sobre el crecimiento y la mortalidad posterior**

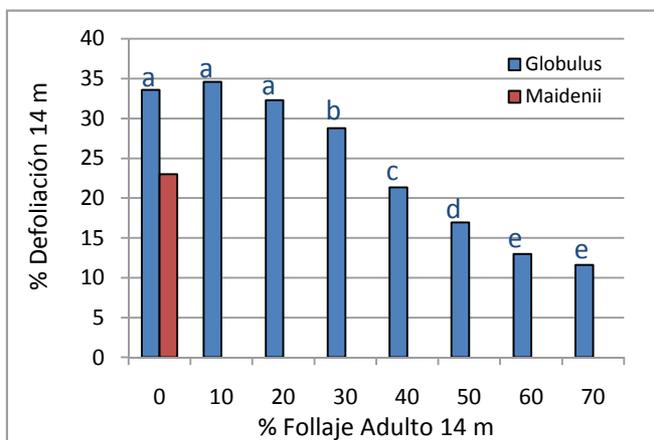
La cantidad de árboles de *E. globulus* y *E. maidenii* que a los 14 meses presentaba cada nivel de follaje adulto se presenta en el Cuadro 3. Dado que el 97% de los árboles de *E. maidenii* presentaba únicamente follaje

**Cuadro 3.** Número de árboles de *E. globulus* y de *E. maidenii* con cada nivel de follaje adulto en la evaluación realizada a los 14 meses de edad.

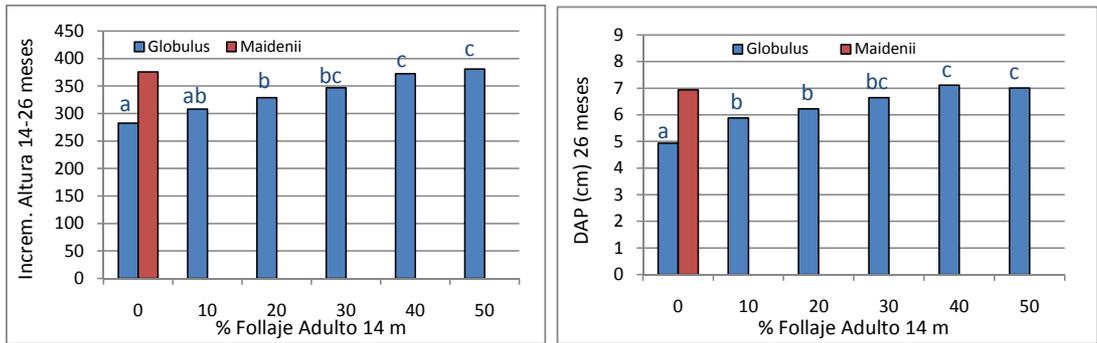
Follaje Adulto(%)	<i>E. globulus</i> (N° de árboles)	<i>E. maidenii</i> (N° de árboles)
0	2543	1747
10	254	25
20	255	9
30	499	13
40	216	0
50	78	0
60	30	0
70	25	0

juvenil, el efecto de la precocidad del cambio de follaje no fue analizado en esta especie.

El follaje juvenil es mucho más susceptible a *T. nubilosa* que el follaje adulto (Park *et al.*, 2000), lo que explica la relación inversa observada en *E. globulus* entre el cambio de follaje y el nivel de daño a los 14 meses (Figura 6). En esta especie se registró una disminución significativa en el nivel de defoliación en aquellos árboles que tenían 30% o más de follaje adulto. Desde otro punto de vista, la defoliación de los árboles de *E. globulus* que presentaban 40% de follaje adulto fue similar a la defoliación de los árboles de



**Figura 6.** Relación entre el porcentaje de follaje adulto y la defoliación observada a los 14 meses. Dentro de *E. globulus*, clases de follaje adulto con diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (al 5%) en el porcentaje de defoliación. La defoliación en *E. maidenii* se presenta únicamente como referencia.

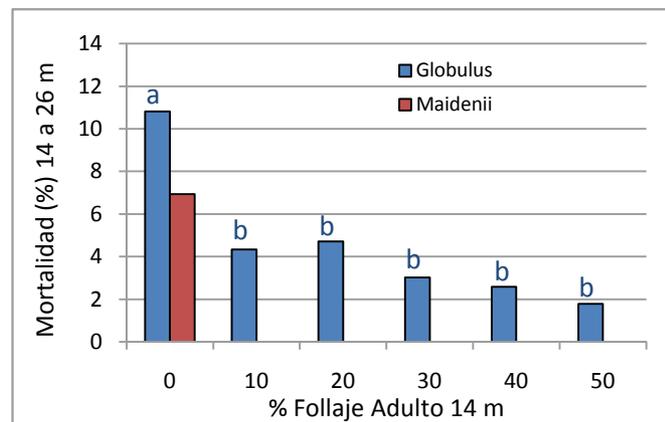


**Figura 7.** Efecto del porcentaje de follaje adulto a los 14 meses sobre el crecimiento (incremento en altura) entre los 14 y los 26 meses (izquierda) y sobre el DAP a los 26 meses (derecha) en *E. globulus*. Clases de follaje adulto con diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (al 5%) en el crecimiento. El crecimiento para *E. maidenii* se presenta únicamente como referencia.

*E. maidenii* con el 100% de follaje juvenil. El hecho de que *E. maidenii* presente menor nivel de daño que *E. globulus* sugiere que la mayor resistencia relativa no está dada por una mayor proporción de follaje adulto, sino por diferencias en características anatómicas y/o fisiológicas del follaje juvenil.

En *E. globulus* se encontró una relación directa entre el porcentaje de follaje adulto a los 14 meses y el crecimiento posterior:  $r = 0.43$  ( $P < 0.01$ ) con el incremento en altura entre los 14 y los 26 meses y  $r = 0.49$  ( $P < 0.01$ ) con el DAP a los 26 meses (Figura 7). Los árboles que tenían un 20% o más de

follaje adulto, o los que tenían al menos un 10% de follaje adulto, tuvieron respectivamente un crecimiento en altura y DAP significativamente mayor que los que aún no habían comenzado a cambiar el follaje (0% follaje adulto). La diferencia de crecimiento entre los árboles con mayor proporción de follaje adulto respecto a los que tenían 100% de follaje juvenil fue de un 25% en altura y de un 30% en DAP. En otras palabras, el cambio precoz de follaje, asociado a un menor nivel de daño (Figura 6), tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento posterior, siendo dicho efecto más marcado en el caso del DAP.



**Figura 8.** Efecto del porcentaje de follaje adulto a los 14 meses sobre la mortalidad entre los 14 y los 26 meses en *E. globulus*. Clases de follaje adulto con diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (al 5%) en la mortalidad. La mortalidad para *E. maidenii* se presenta únicamente como referencia.

El efecto de la precocidad en el cambio de follaje en *E. globulus* sobre la mortalidad entre los 14 y los 26 meses se presenta en la Figura 8. Los árboles que a los 14 meses ya habían comenzado a cambiar el follaje presentaron una mortalidad significativamente menor que aquellos que solamente presentaban follaje juvenil. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad de los árboles que a los 14 meses presentaban diferente proporción de follaje adulto.

Los resultados obtenidos indican que el cambio precoz de follaje en *E. globulus* reduce el nivel de daño de *T. nubilosa*. A su vez, y probablemente debido a lo anterior, favorece el crecimiento y reduce la mortalidad de los árboles afectados. Parece lógico por lo tanto promover el cambio temprano de follaje como medida de manejo de la enfermedad. Hay al menos dos alternativas para ello: acelerar el crecimiento inicial mediante una silvicultura intensiva y utilizar genotipos seleccionados por precocidad en el cambio de follaje. Sin embargo la relación entre el crecimiento inicial y el momento en que comienza el cambio de follaje en *E. globulus* es relativamente pobre: Milgate *et al.* (2005) reportan una correlación fenotípica de 0.25 entre la altura a los 5 meses y la presencia de follaje adulto a los 2 años; y Balmelli *et al.* (2013b) reportan una correlación fenotípica de 0.35 entre la altura a los 8 meses y el porcentaje de follaje adulto a los 20 meses. Por el contrario, en varios trabajos se reporta un fuerte control genético del momento en que se produce el cambio de follaje en *E. globulus*, con heredabilidades que varían entre 0.41 y 0.74 (Balmelli *et al.*, 2013c, 2014; Hamilton *et al.*, 2011; Jordan *et al.*, 1999; Lopez *et al.*, 2002), lo que demuestra la posibilidad de seleccionar genotipos con cambio precoz de follaje.

#### 4. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados obtenidos demuestran que el nivel de daño provocado por *T. nubilosa* fue mayor en *E. globulus* que en *E. maidenii*. Sin

embargo, la susceptibilidad relativa de ambas especies depende del momento de la evaluación, o lo que es lo mismo, de la severidad de la infección (como se vio, la diferencia en el porcentaje de defoliación entre ambas especies era de 9% a los 14 meses y de 24% a los 21 meses). De todas formas, el daño registrado en *E. maidenii* sugiere que esta especie, desde el punto de vista de sustituir a *E. globulus*, es una alternativa riesgosa y poco efectiva cuando se dan condiciones ambientales para la ocurrencia de infecciones severas de *T. nubilosa*.

Las manchas foliares y la defoliación provocadas por *T. nubilosa* afectaron el crecimiento en ambas especies, aunque el efecto perjudicial fue mayor en *E. globulus* que en *E. maidenii*, registrándose en los árboles más defoliados una pérdida de crecimiento en DAP de 45% y 30%, respectivamente. En el caso de *E. globulus*, en los niveles de defoliación más altos también se registró una relativamente alta mortalidad. Si bien la muerte de árboles no puede atribuirse al efecto directo de la enfermedad, el debilitamiento que ésta genera en los árboles los predispone al efecto de otros factores bióticos o abióticos, lo que compromete su supervivencia.

La información generada en este trabajo también demuestra que si bien el follaje juvenil de *E. globulus* es muy susceptible a *T. nubilosa*, el cambio a follaje adulto comienza bastante antes que en *E. maidenii*. Dado que el follaje adulto es resistente a *T. nubilosa*, los árboles de *E. globulus* con mayor proporción de follaje adulto crecieron un 30% más y tuvieron menor mortalidad que los árboles que solamente tenían follaje juvenil. Desde el punto de vista productivo es deseable que el cambio de follaje comience lo antes posible ya que el follaje adulto le permite al árbol recuperarse y escapar a nuevas infecciones. Por tal motivo, en INIA se está ejecutando un proyecto de selección y clonación de individuos que presentan esta característica.

Finalmente, cabe destacar que la información aquí presentada cuantifica el efecto del daño provocado por *T. nubilosa* al año de iniciada

la infección, siendo necesario continuar la evaluación hasta la edad de cosecha.

## 5. AGRADECIMIENTOS

A la empresa Sierras Calmas por proveer el sitio, por la preparación del terreno y por el mantenimiento del ensayo. El estudio fue parcialmente financiado por una beca otorgada al primer autor por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) de España en el marco del Programa de Formación del Sistema de los INIA de Iberoamérica.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

**ALONSO, R.; SORIA, S.; LUPO, S.; BETTUCCI, L.; PÉREZ, C.** 2013. Alternativas de manejo de enfermedades foliares en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus*. En: V Jornada Técnica de Protección Forestal. Serie Técnica INIA 209. Montevideo. pp 39-44.

**BALMELLI, G.; SIMETO, S.; MARTINEZ, G.; TORRES, D.; PÉREZ, C.; FROS, D.; BENTANCUR, O.** 2009a. Incidencia y severidad de enfermedades y plagas en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* en las regiones Sureste y Litoral Oeste de Uruguay. En: Jornada Técnica de Protección Forestal. Tacuarembó: INIA. (Serie Actividades de Difusión; 567). p. 51-65.

**BALMELLI, G.; SIMETO, S.; MARTÍNEZ, G.; TORRES, D.; GONZÁLEZ, P.; FROS, D.; BENTANCUR, O.; PÉREZ, C.** 2009b. Relevamiento sanitario de otoño en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus dunnii* en el Sureste y Litoral Oeste. En: Seminario Técnico de Sanidad Forestal. Tacuarembó: INIA. (Serie Actividades de Difusión; 594). p. 51-72.

**BALMELLI, G.; SIMETO, S.; MARTÍNEZ, G.; TORRES, D.; PÉREZ, C.A.; BENTANCUR, O.** 2011a. Incidence and severity of pests and diseases on young plantations of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. En: IUFRO

Forest Protection Joint Meeting: pathogens, insects and their associations affecting forestry worldwide. 8-11 Noviembre. Colonia del Sacramento, Uruguay.

**BALMELLI, G.; SIMETO, S.; ALTIER, N.; MARRONI, V.; DIEZ, J.J.** 2011b. Efecto de la defoliación provocada por *Mycosphaerella* spp. en el crecimiento y en la supervivencia de *Eucalyptus globulus*. En: Día de campo forestal en zona Sureste. Serie Actividades de Difusión 644. INIA Tacuarembó. pp 5-11.

**BALMELLI, G.; SIMETO, S.; TORRES-DINI, D.; CASTILLO, A.; ALTIER, N.; PÉREZ, G.; Mac GREGOR, J.; PEVERELLI, A.; DIEZ, J.J.** 2013a. Mejoramiento genético en *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus maidenii* por resistencia a *Teratosphaeria nubulosa*. En: V Jornada Técnica de Protección Forestal. Serie Técnica INIA 209. Montevideo. pp 55-65.

**BALMELLI, G.; SIMETO, S.; ALTIER, N.; MARRONI, V.; DIEZ, J.J.** 2013b. Long term losses caused by foliar diseases on growth and survival of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *New Forests* 44(2): 249-263.

**BALMELLI, G.; SIMETO, S.; MARRONI, V.; ALTIER, N.; DIEZ, J.J.** 2013c. Genetic variation for resistance to *Mycosphaerella* leaf disease and *Eucalyptus rust* on *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* (First online, DOI. 10.1007/s13313-013-0254-7).

**BALMELLI, G.; SIMETO, S.; TORRES, D.; CASTILLO, A.; PÉREZ, G.; MAC GREGOR, J.; PEVERELLI, A.; ALTIER, A.; DIEZ, J.** 2014. Susceptibility to *Teratosphaeria nubulosa* and precocity of vegetative phase change in *Eucalyptus globulus* and *E. maidenii* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* (aceptado el 05/12/2013).

**CARNEGIE, A.J.; ADES, P.K.** 2003. *Mycosphaerella* leaf disease reduces growth of plantation-grown *Eucalyptus globulus*. *Australian Forestry* 66: 113-119.

- CARNEGIE, A.J.; KEANE, P.J.; ADES, P.K.; SMITH, I.W.** 1994. Variation in susceptibility of *Eucalyptus globulus* provenances to *Mycosphaerella* leaf disease. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 1751-1757.
- CARNEGIE, A.J.; ADES, P.K.; KEANE, P.J.; SMITH, I.W.** 1998. *Mycosphaerella* disease of juvenile foliage in a eucalypts species and provenance trial in Victoria, Australia. *Australian Forestry* 61: 190-194.
- COLLETT, N.G.; NEUMANN, F.G.** 2002. Effects of simulated chronic defoliation in summer on growth and survival of blue gum (*Eucalyptus globulus* Labill.) within young plantations in northern Victoria. *Australian Forestry* 65, 99-106.
- HAMILTON, M.G.; TILYARD, P.A.; WILLIAMS, D.R.; VAILLANCOURT, R.E.; WARDLAW, T.J.; POTTS, B.M.** 2011. The genetic variation in the timing of heteroblastic transition in *Eucalyptus globulus* is stable across environments. *Australian Journal of Botany* 59: 170-175.
- HUNTER, G.C.; CROUS, P.W.; CARNEGIE, A.J.; WINGFIELD, M.J.** 2009. *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of *Eucalyptus* spp. in native and introduced areas. *Molecular Plant Pathology* 10: 1-14.
- JORDAN, G.J.; POTTS, B.M.; WILTSHIRE, R.** 1999. Strong, independent quantitative genetic control of vegetative phase change and first flowering in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* (Tasmanian Blue Gum). *Heredity* 83: 179-187.
- LOPEZ, G.A.; POTTS, B.M.; DUTKOWSKI, G.W.; APIOLAZA, L.A.; GELID, P.E.** 2002. Genetic variation and inter-trait correlations in *Eucalyptus globulus* base population trials in Argentina. *Forest Genetics* 9:217-231
- LUNDQUIST, J.E.; PURNELL, R.C.** 1987. Effects of *Mycosphaerella* leaf spot on growth of *Eucalyptus nitens*. *Plant Disease* 71: 1025-1029.
- MILGATE, A.W.; POTTS, B.M.; JOYCE, K.; MOHAMMED, C.; VAILLANCOURT, R.E.** 2005. Genetic variation in *Eucalyptus globulus* for susceptibility to *Mycosphaerella nubilosa* and its association with tree growth. *Australasian Plant Pathology* 34: 11-18.
- MGAP.** 2013. Recurso Forestal: bosques plantados registrados. <http://www.mgap.gub.uy>.
- PARK, R.F.; KEANE, P.J.; WINGFIELD, M.J.; CROUS, P.W.** 2000. Fungal diseases of Eucalypt foliage. In 'Diseases and pathogens of Eucalypts'. (Eds PJ Keane, GA Kile, FD Podger, BN Brown) pp. 153-239. (CSIRO publishing, Australia).
- PÉREZ, G.; HUNTER, G.; SLIPPERS, B.; PÉREZ, C.A.; 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* 125: 109-118.
- PÉREZ, C.A.; MARTÍNEZ, G.; SIMETO, S.; TORRES-DINI, D.; PALLADINO, C.; LANGONE, F.; BENTANCUR, O.; BALMELLI, G.** 2013. Prospección sanitaria en plantaciones jóvenes de eucalipto: primavera 2008 - otoño 2012. En: V Jornada Técnica de Protección Forestal. Serie Técnica INIA 209. Montevideo. pp 23-28.
- PINKARD, E.A.** 2003. Physiological and growth responses related to pattern and severity of pruning in young *Eucalyptus globulus*. *Forest Ecology and Management* 182:231-245.
- PINKARD, E.A.; BAILLIE, C.C.; PATEL, V.; PATERSON, S.; BATTAGLIA, M.; SMETHURST, P.J.; MOHAMMED, C.L.; WARDLAW, T.; STONE, C.** 2006. Growth responses of *Eucalyptus globulus* Labill. to nitrogen application and severity, pattern and frequency of artificial defoliation. *Forest Ecology and Management* 229: 378-387.

**RAPLEY, L.P.; POTTS, B.M.; BATTAGLIA, M.; PATEL, V.S. & ALLEN, G.R.** 2009. Long-term realised and projected growth impacts caused by autumn gum moth defoliation of 2-year-old *Eucalyptus nitens* plantation trees in Tasmania, Australia. *Forest Ecology and Management* 258:1896-1903.

**SIMETO, S.; BALMELLI, G.; MARTÍNEZ, G.; TORRES, D.; GONZÁLEZ, P.; FROS, D.; BENTANCUR, O.; PÉREZ, C.A.** 2010. Relevamiento sanitario de *Eucalyptus* spp. en el Sureste y Litoral Oeste del país. En: Jornada Técnica de Protección Forestal. Las Brujas: INIA. (Serie Actividades de Difusión; 629). p. 41-51.

**SAS INSTITUTE.** 1997. SAS/STAT software: changes and enhancements through Release 6.12. SAS Institute: Cary, NC.

**SMITH, A.** 2006. The Development of Strategies for the Management and Research of Foliar Pathogens on Eucalypt Plantations: Using *Mycosphaerella* as a Case of Study. PhD Thesis, University of Tasmania.

**STONE, C.; MATSUKI, M.; CARNEGIE, A.** 2003. Pest and disease assessment in Young eucalypt plantations: field manual for using the Crown Damage Index. Canberra: Parsons, M. National Forest Inventory, Bureau of Rural Sciences.

**WILLS, J.A.; BURBIDGE, T.E.; ABBOTT, I.** 2004. Impact of repeated defoliation on jarrah (*Eucalyptus marginata*) saplings. *Australian Forestry* 67:194–198.

# CAPÍTULO IX

## VARIABILIDAD GENÉTICA EN SUSCEPTIBILIDAD A *Teratosphaeria pseudoecalypti* EN EUCALIPTOS COLORADOS

Gustavo Balmelli<sup>1</sup>, Fernando Resquin<sup>1</sup>, Sofía Simeto<sup>1</sup>, Diego Torres<sup>1</sup>, Pablo Núñez<sup>1</sup>, Federico Rodríguez<sup>1</sup>, Wilfredo González<sup>1</sup>

### 1. INTRODUCCIÓN

Los eucaliptos denominados “colorados” (principalmente *Eucalyptus camaldulensis* y *E. tereticornis*) fueron plantados en cortinas y en montes de abrigo y sombra en todo el país. El uso generalizado de estos eucaliptos con dichos fines se debió a su gran rusticidad, ya que se adaptan a todo tipo de suelos y tienen buena tolerancia a la sequía y a las heladas. Si bien la forestación con fines industriales prefirió especies de más rápido crecimiento y/o de maderas más aptas para producción de celulosa (como *E. globulus*, *E. grandis* o *E. dunni*), en los últimos años se ha renovado el interés en los eucaliptos colorados como alternativas de diversificación orientadas a la producción de madera de alto valor. En este marco, y con el fin de generar semilla mejorada localmente, en el año 2007 el INIA inició un Plan de Mejoramiento Genético en *E. tereticornis*. Los objetivos de selección definidos en dicho plan de mejora son el aumento de la velocidad de crecimiento y la mejora de la forma del fuste<sup>2</sup>.

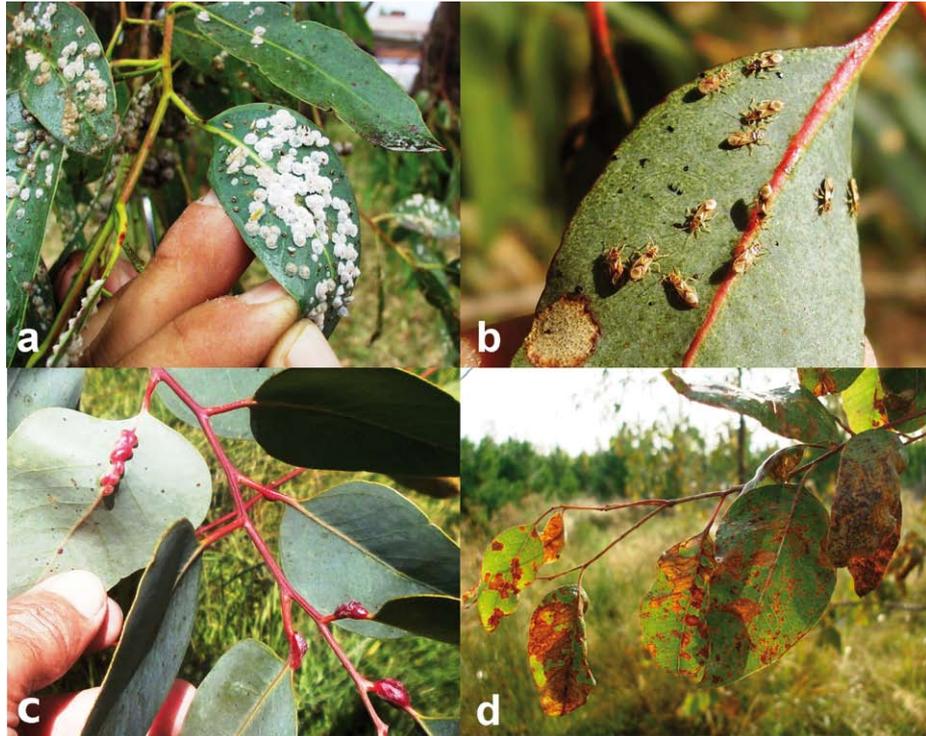
Si bien históricamente los eucaliptos colorados han presentado una excelente sanidad, en los últimos años han ingresado a nuestro país varias plagas y enfermedades frente a las cuales estos eucaliptos han mostrado ser muy susceptibles. En 2007 es reportado el psílido de escudo (*Glycaspis brimblecom-*

*bei*), en 2008 se observa por primera vez la chinche del eucalipto (*Thaumastocoris peregrinus*), en 2011 aparecen manchas foliares (recientemente identificadas como *Teratosphaeria pseudoecalypti*) y en 2013 aparece la avispa agalladora (*Leptocybe invasa*) (Figura 1). El efecto combinado y sostenido en el tiempo de estas plagas y enfermedades ha provocado un debilitamiento en gran parte de los montes de eucaliptos colorados, los cuales presentan frecuentemente árboles de gran porte severamente defoliados, con muerte de ramas o totalmente muertos (Figura 2).

Por su rápida dispersión en el país y por la severidad de sus daños en los eucaliptos colorados, las manchas foliares y la defoliación provocadas por *T. pseudoecalypti* generan una especial preocupación ya que ponen en riesgo su utilización a escala comercial. Por tal motivo se consideró necesario incluir la resistencia a esta enfermedad como uno de los principales objetivos de selección del Plan de Mejoramiento Genético de *E. tereticornis*. Para conocer las posibilidades de selección por resistencia se evaluó el nivel de daño en el pool genético de INIA, definiéndose como los objetivos del presente trabajo: a) conocer la susceptibilidad relativa de *E. camaldulensis* y *E. tereticornis* a *T. pseudoecalypti* y b) cuantificar la variabilidad genética para resistencia a *T. pseudoecalypti* en *E. tereticornis*.

<sup>1</sup> Programa Nacional de Investigación en Producción Forestal. INIA. Ruta 5, km 386. Tacuarembó.

<sup>2</sup> La descripción del Plan de Mejoramiento de *E. tereticornis* puede ser consultada en la Serie Actividades de Difusión N°557.



**Figura 1.** Plagas y enfermedades que afectan a los eucaliptos colorados: a) psílido de escudo (*Glycaspis brimblecombei*); b) chinche del eucalipto (*Thaumastocoris peregrinus*); c) avispa agalladora (*Leptocybe invasa*); d) manchas foliares provocadas por *Teratosphaeria pseudoeucalypti*.



**Figura 2.** Aspecto de algunas cortinas y montes de eucaliptos colorados severamente afectados por plagas y enfermedades.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

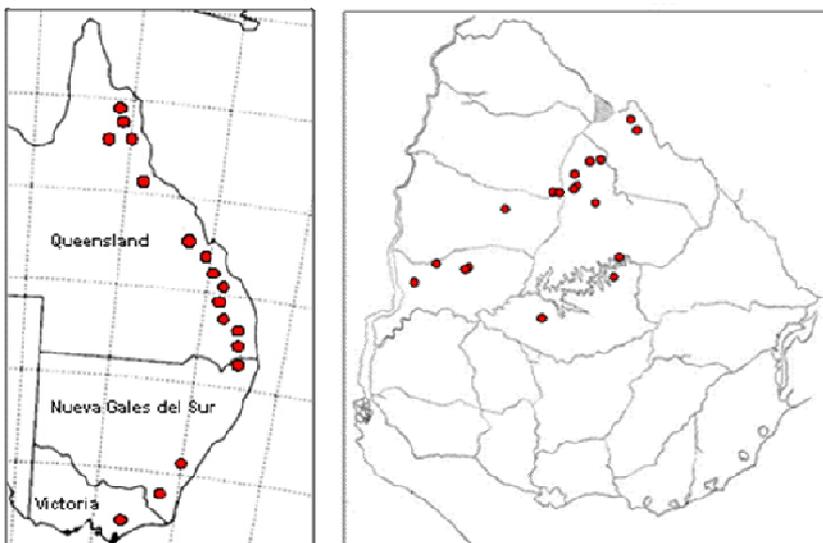
La susceptibilidad relativa de *E. camaldulensis* y *E. tereticornis* a *T. pseudoeucalypti* se estudió en un ensayo de manejo de eucalipitos colorados instalado en octubre de 2009 en Paso del Cerro (Tacuarembó). Dicho ensayo evalúa el comportamiento de *E. tereticornis* (procedente de Bañado de Medina, FAGRO) y *E. camaldulensis* (procedente de Claromecó, provincia de Buenos Aires), con dos intensidades de laboreo (con y sin subsolador) y 2 esquemas de raleo (aún no aplicados). El marco de plantación es de 4 metros entre fajas y 2.5 metros entre plantas (1000 árboles/ha). El diseño experimental es de BCA (bloques completos al azar), con 3 repeticiones y parcelas de 110 árboles.

En 2012 (al 3er año de crecimiento) se evaluó el crecimiento (altura y diámetro) y el nivel de daño (defoliación) provocado por *T. pseudoeucalypti*. La escala de daño utilizada para evaluar la defoliación fue de 0, 20, 40, 60 y 80%. El comportamiento relativo de ambas especies fue analizado mediante análisis de varianza (ANOVA).

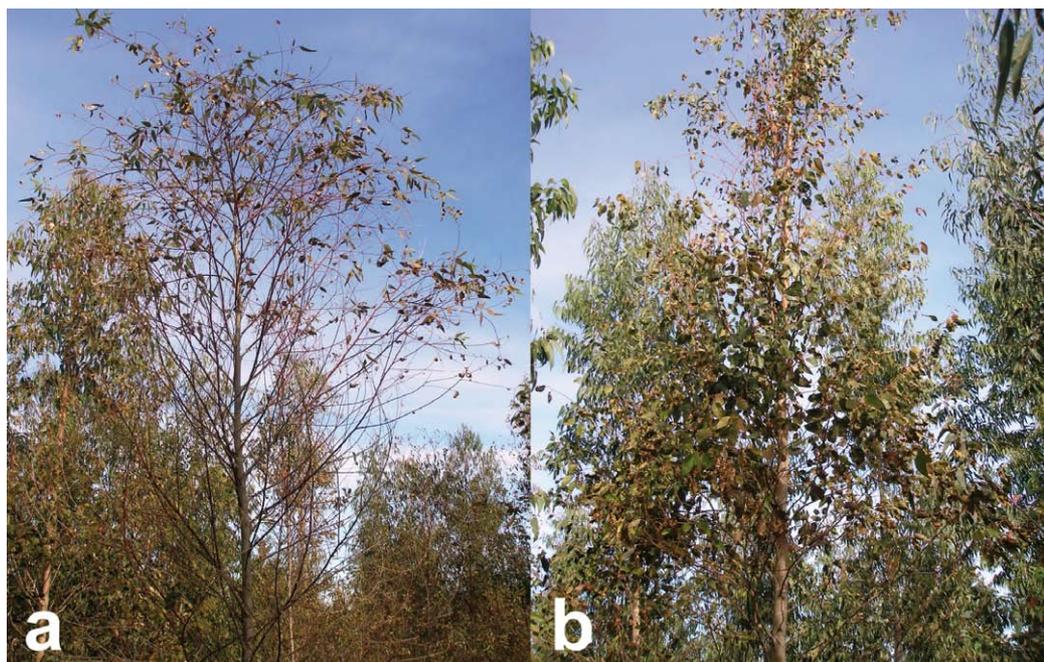
La variabilidad genética para resistencia a *T. pseudoeucalypti* en *E. tereticornis* se analizó

en el Huerto Semillero de esta especie instalado en marzo de 2009 en la Unidad Experimental La Magnolia. El marco de plantación es de 4 metros entre fajas y 2.5 metros entre plantas (1000 árboles/ha). Se aplicó glifosato pre-laboreo (Roundup, 4 l/ha) y se laboreó en fajas con excéntrica. Se fertilizó al momento de la plantación con 100 g/planta de 8/40/0 y se aplicó herbicida post-plantación (Goal 1l/ha + Arnes 1l/ha). El diseño experimental es de Bloques Completos (sistemáticos), con 10 repeticiones y parcelas de 1 planta. El pool genético está conformado por 165 familias de medios hermanos, provenientes de 16 orígenes australianos (cubriendo buena parte del área de distribución natural de la especie), 18 procedencias locales (plantaciones comerciales donde se seleccionaron árboles por crecimiento y forma) y un programa de mejora en Argentina (Centro de Investigaciones y Experiencias Forestales, CIEF) (Figura 3).

En 2012 (al 3er año de crecimiento) se evaluó el crecimiento (altura y diámetro) y el nivel de daño (defoliación) provocado por *T. pseudoeucalypti*. La escala de daño utilizada para evaluar la defoliación fue de 0 a 10% (baja susceptibilidad), 10 a 30% (susceptibilidad moderada) y más de 30% (alta susceptibilidad). La susceptibilidad relativa de las



**Figura 3.** Ubicación geográfica de los orígenes de *E. tereticornis* introducidos desde Australia (izquierda) y de las plantaciones locales donde fueron seleccionados los árboles superiores (derecha).



**Figura 4.** Daños provocados por *T. pseudoeucalypti* al tercer año de crecimiento: defoliación severa en *E. camaldulensis* (izquierda) y leve en *E. tereticornis* (derecha).

diferentes fuentes de semilla y de los diferentes orígenes o procedencias fue analizado mediante análisis de varianza (ANOVA) y contraste de medias (test de Tukey-Kramer) para el porcentaje de árboles altamente susceptibles (más de 30% de defoliación).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

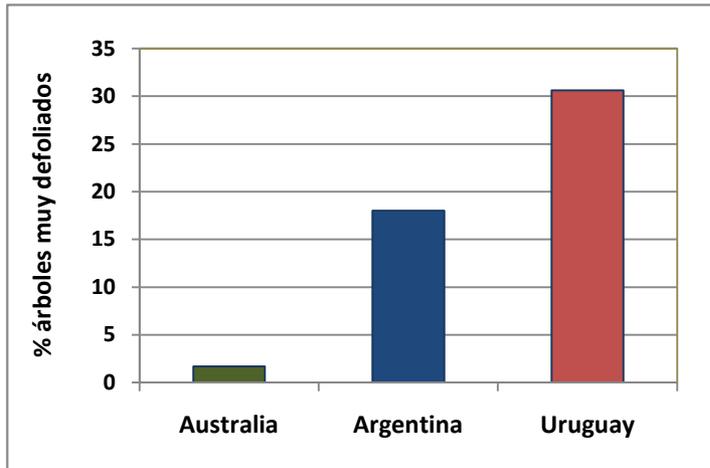
#### **Susceptibilidad relativa de *E. camaldulensis* y *E. tereticornis* a *T. pseudoeucalypti***

El nivel de daño provocado por *T. pseudoeucalypti* en *E. camaldulensis* fue significativamente mayor que en *E. tereticornis*, registrándose valores medios de defoliación de 37.0% y 5.8%, respectivamente (Figura 4). Las marcadas diferencias en susceptibilidad a la enfermedad observada entre ambas especies podría explicar la gran heterogeneidad existente en el estado sanitario de los montes de eucaliptos colorados. Es frecuente ver algunas cortinas y montes en muy mal estado (con árboles parcial o totalmente muertos) y otras, a relativamente corta distancia, prácticamente sin daños o con aceptable sanidad.

En el momento de la evaluación de daño el crecimiento de *E. tereticornis* era mayor que el de *E. camaldulensis*, con un DAP medio de 6.9 y 5.8 cm, respectivamente. Si bien estas fuentes de semilla no han sido comparadas sin la presencia de esta enfermedad, es lógico pensar que la diferencia de crecimiento podría estar explicada por un efecto detrimento del alto nivel de daño observado en *E. camaldulensis*. Sin embargo los niveles de daño registrados en el ensayo parecen no afectar la sobrevivencia, la cual fue de 87.4% en *E. camaldulensis* y de 82.1% en *E. tereticornis*. Es probable que la mortalidad que se observa en los montes de eucaliptos colorados se deba al efecto combinado de esta enfermedad y diferentes plagas (como *Glycaspis* y *Thaumastocoris*) y/o al debilitamiento progresivo de los árboles por el daño recurrente provocado por la enfermedad.

#### **Variabilidad genética para resistencia a *T. pseudoeucalypti* en *E. tereticornis***

Se encontraron diferencias altamente significativas en el porcentaje de árboles severamente afectados (defoliación mayor al 30%)



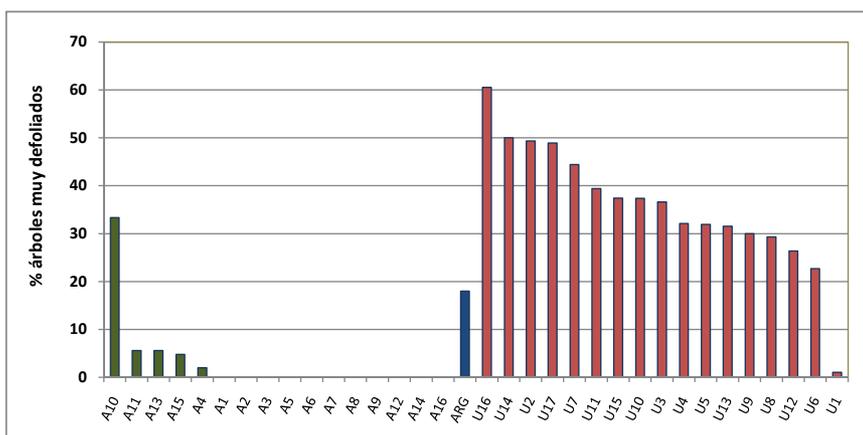
**Figura 5.** Comportamiento relativo frente a *T. pseudoeucalypti* (como porcentaje de árboles con defoliación mayor al 30%) de las tres fuentes de semilla de *E. tereticornis*.

por *T. pseudoeucalypti* a diferentes niveles: fuentes de semilla, origen o procedencia y familias dentro de origen o procedencia. El área de distribución natural (Australia) fue la fuente de semilla menos afectada, presentado solamente un 1.7% de los árboles con defoliación severa, mientras que la más afectada fue la fuente de semilla local (plantaciones comerciales), con un promedio de 30.6% de los árboles severamente defoliados (Figura 5).

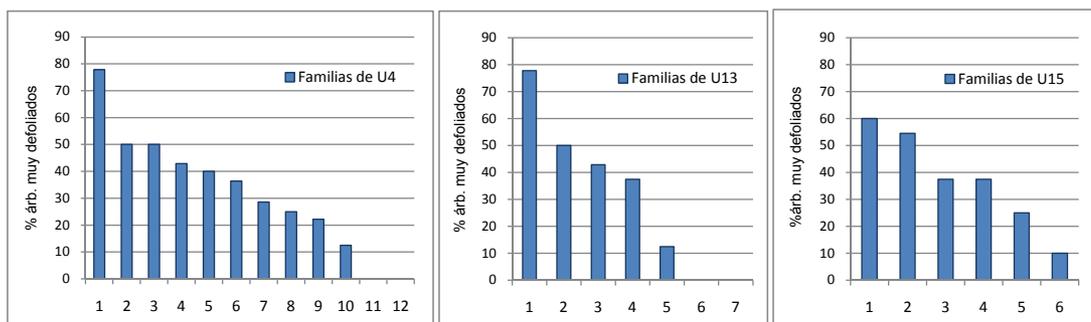
Los orígenes australianos presentaron muy poca variabilidad en susceptibilidad a la enfermedad. Salvo un origen que presentó un

33% de árboles muy afectados, los orígenes australianos tuvieron entre 0 y 6% de árboles muy defoliados (Figura 6). Por el contrario, las procedencias locales presentaron gran variabilidad, en general dentro de un rango de entre 23 y 50% de árboles muy afectados, aunque una de ellas presentó más del 60% de árboles severamente defoliados y otra solamente un 1% (Figura 6).

El alto nivel de daño de las procedencias locales, así como su gran variabilidad, sugiere que gran parte de los montes de eucaliptos colorados de nuestro país está constituido por híbridos entre *E. tereticornis* y



**Figura 6.** Comportamiento relativo frente a *T. pseudoeucalypti* (como porcentaje de árboles con defoliación mayor al 30%) de los diferentes orígenes y procedencias de *E. tereticornis*.  
 Nota: A = origen australiano; ARG=procedencia Argentina; U = procedencia local.



**Figura 7.** Susceptibilidad relativa (como porcentaje de árboles con defoliación mayor al 30%) a nivel de familias para algunas de las procedencias locales de *E. tereticornis* frente a *T. pseudoecalypti*.

*E. camaldulensis* y/o que son una mezcla de ambas especies. Esta hipótesis parece confirmarse por el hecho de que la procedencia local que prácticamente no presenta árboles con daño severo (U1 en Figura 6) es la única que tenemos seguridad de que es *E. tereticornis* puro, ya que corresponde a un ensayo de orígenes de esta especie que la Facultad de Agronomía instaló en 1980 en Villasboas (Durazno).

La mayor parte de las procedencias locales también presentó importante variabilidad entre familias (es decir, entre el promedio de las progenies obtenidas de diferentes árboles selectos) en la susceptibilidad a la enfermedad. A modo de ejemplo, en la Figura 7 se presenta el comportamiento frente a la enfermedad de diferentes familias para algunas procedencias locales. Esta variabilidad entre familias está determinada por un buen control genético de la susceptibilidad a la enfermedad, obteniéndose para el porcentaje de defoliación una heredabilidad de  $0.33 \pm 0.09$ . Ambos factores (gran variabilidad en el nivel de daño y aceptable heredabilidad) sugieren que es posible obtener buenas respuestas a la selección por resistencia a *T. pseudoecalypti* en *E. tereticornis*.

Si bien los objetivos del plan de mejora genética de *E. tereticornis* eran mejorar la productividad y la forma del fuste, la severidad

de las manchas provocadas por *T. pseudoecalypti* determinaron que en las etapas iniciales se diese prioridad a mejorar la resistencia a la enfermedad, sacrificándose la mejora de la forma del fuste. Por lo tanto, en el primer raleo genético del Huerto Semillero, realizado en junio de 2013, se eliminaron las peores 36 familias (las más susceptibles y de menor crecimiento) y los peores árboles de las familias remanentes (Figura 8). De esta forma, y hasta que se realice un nuevo raleo genético, se mantienen como productores de semilla 129 familias, con un promedio de 3.7 árboles por familia. En 2013 (entre agosto y noviembre) floreció el 35% de los árboles del huerto, por lo cual se prevé realizar la primera cosecha de semilla durante el 2014.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que *E. camaldulensis* es significativamente más susceptible a *T. pseudoecalypti* que *E. tereticornis*. Dentro de esta última especie existe importante variabilidad genética para resistencia a la enfermedad, lo cual sumado a la relativamente buena heredabilidad que presenta dicha característica, sugiere que el manejo genético realizado en el Huerto Semillero de INIA permitirá obtener semilla de *E. tereticornis* de aceptable comportamiento frente a la enfermedad.



**Figura 8.** Primer raleo genético del Huerto Semillero de *E. tereticornis* (La Magnolia, junio 2013). Eliminación de las familias e individuos más susceptibles a *T. pseudoeucalypti*.

## BIBLIOGRAFÍA

RESQUIN, F.; BALMELLI, G.; NÚÑEZ, P.; RODRÍGUEZ, F.; GONZÁLEZ, W. 2008. Desarrollo de una raza local de *Eucalyptus tereticornis* de buen potencial productivo

para las condiciones del Uruguay: inicio de un Plan de Mejora Genética. En: Jornada Técnica Eucaliptos colorados: mejoramiento genético, propiedades y uso de la madera. Tacuarembó: INIA. (Serie Actividades de Difusión 557). p. 39-47.

Impreso en Setiembre de 2014  
en PRONTOGRÁFICA  
Cerro Largo 850 - Tel.: 2902 3172  
Montevideo Uruguay  
E-mail: [pgrafica@adinet.com.uy](mailto:pgrafica@adinet.com.uy)  
Dep. Legal 000.000