
DESARROLLO DE PROTOCOLOS DE INOCULACIÓN ARTIFICIAL PARA LA CARACTERIZACIÓN SANITARIA DE *Eucalyptus globulus*

Autores: **Sofía Simeto¹**
 Gustavo Balmelli²
 Nora Altier³
 Beatriz Dini⁴
 Zohra Bennadji⁵

¹ Lic. Biol. Programa Nacional Producción Forestal. INIA Tacuarembó.

² Ing. Agr. (M.Sc.). Programa Nacional Producción Forestal. INIA Tacuarembó.

³ Ing. Agr. (M.Sc., Ph.D.). Protección Vegetal. INIA Las Brujas.

⁴ Auxiliar de Investigación. Protección Vegetal. INIA Las Brujas.

⁵ Ing. Agr. (Ph.D.). Directora del Programa Nacional Producción Forestal. INIA Tacuarembó.

Título: DESARROLLO DE PROTOCOLOS DE INOCULACIÓN ARTIFICIAL PARA LA
CARACTERIZACIÓN SANITARIA DE *Eucalyptus globulus*

Autores: Sofia Simeto
Gustavo Balmelli
Nora Altier
Beatriz Dini
Zohra Bennadji

Serie Técnica N° 169

© 2007, INIA

ISBN: 978-9974-38-242-8

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA
Andes 1365, Piso 12. Montevideo - Uruguay
<http://www.inia.org.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., Ph. D. Pablo Chilibroste - Presidente

Ing. Agr., Dr. Mario García - Vicepresidente



Ing. Agr. Eduardo Urioste

Ing. Aparicio Hirschy



Ing. Agr. Juan Daniel Vago

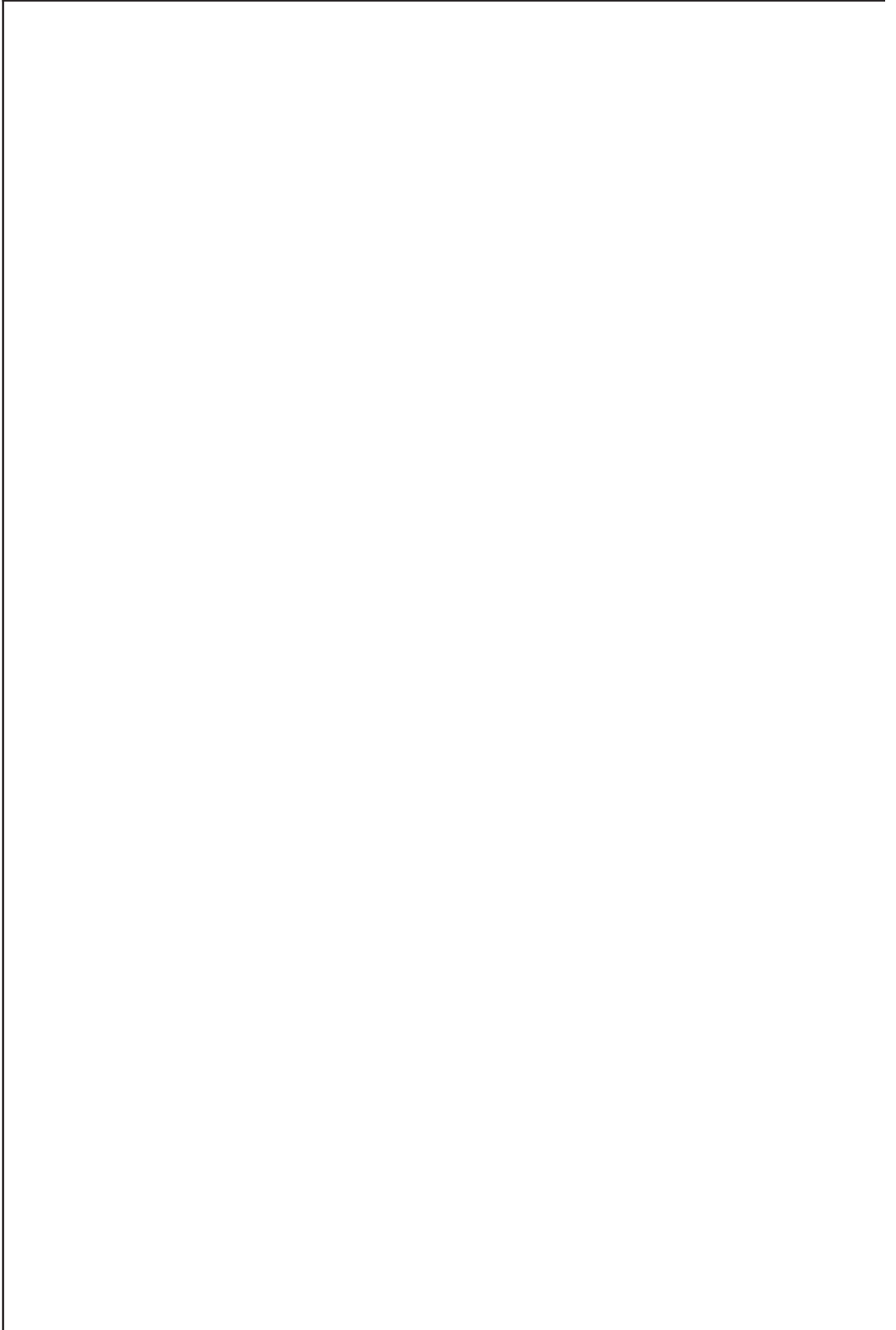
Ing. Agr. Mario Costa





CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	2
II.1. Roya del eucalipto causada por <i>Puccinia psidii</i>	2
II.2. Manchas foliares causadas por <i>Mycosphaerella</i> spp	4
II.3. Cancros en el fuste asociados a Botryosphaeriaceae	6
III. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA DE INOCULACIÓN	8
III.1. <i>Puccinia psidii</i>	8
III.2. <i>Mycosphaerella</i> spp	11
III.3. Botryosphaeriaceae	12
IV. IMPLICANCIAS PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO	19
V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	20
VI. AGRADECIMIENTOS	21
VII. BIBLIOGRAFÍA	21



DESARROLLO DE PROTOCOLOS DE INOCULACIÓN ARTIFICIAL PARA LA CARACTERIZACIÓN SANITARIA DE *Eucalyptus globulus*

I. INTRODUCCIÓN

La madera de *Eucalyptus globulus* presenta excelentes propiedades, tanto para la producción de celulosa como para la fabricación de papel. Estas características se ven reflejadas en el precio de la madera y en la seguridad del mercado, lo cual ha llevado a que esta especie sea la más plantada en Uruguay, existiendo actualmente más de 250 mil hectáreas (Boletín Estadístico MGAP, 2005).

Sin embargo, la productividad de *Eucalyptus globulus* en nuestro país se ve limitada por el efecto combinado de diversos factores, como falta de adaptación a condiciones climáticas (principalmente en zonas con escasa influencia marítima), suelos mal drenados y susceptibilidad a varias enfermedades y plagas. Los problemas de adaptación, especialmente cuando se combinan con la utilización de fuentes de semilla inadecuadas, se visualizan en la reducción del crecimiento y en la muerte de árboles, lo que finalmente se traduce en menor productividad.

Para contribuir a superar las limitaciones productivas que presenta *E. globulus* en algunas zonas, el INIA ha desarrollado diferentes acciones. Desde 1990 se viene evaluando el comportamiento productivo de numerosas fuentes de semilla en ensayos instalados en diferentes sitios (la información generada hasta el momento puede consultarse en la Serie Técnica N° 40, 68, 103, 123, 143 y 149 y en la Serie Actividades de Difusión N° 289, 462 y 491).

Para avanzar en esta línea de investigación, entre 2003 y 2004 se implementó un proyecto con financiamiento del Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT-MEC) titulado "Desarrollo de una raza local de

Eucalyptus globulus tolerante a las principales enfermedades y plagas". Este proyecto permitió identificar las principales enfermedades de *E. globulus*, conocer su incidencia relativa en las diferentes zonas forestales, evaluar la susceptibilidad a cada enfermedad de diferentes fuentes de semilla y conocer la factibilidad de mejorar por selección la resistencia a cada enfermedad (los resultados y la información generada en este proyecto puede consultarse en la Serie Técnica N° 143).

Posteriormente, mediante evaluaciones periódicas del comportamiento sanitario, se han comenzado a cuantificar los efectos provocados por diferentes enfermedades sobre el crecimiento, sobre la sobrevivencia y sobre la calidad de la madera para producción de celulosa (esta información se puede consultar en la Serie Técnica N° 152, en la Serie Actividades de Difusión N° 462 y 491, en la Revista de la Sociedad de Productores Forestales N° 27 y en las actas del IX Congreso de Ingenieros Agrónomos del Uruguay).

La evaluación periódica del nivel de síntomas en los tests genéticos (pruebas de progenie) ha permitido además la estimación de valores de cría parentales, el ranking de progenitores y el manejo genético de los huertos semilleros. En otras palabras, ha permitido incluir la sanidad como objetivo de selección en el Plan de Mejoramiento Genético de esta especie y comenzar a producir semilla mejorada por resistencia a enfermedades.

Sin embargo, en los ensayos de campo no siempre se encuentran presentes todas las enfermedades que se pretende evaluar o no siempre las mismas tienen la severidad necesaria para que se manifiesten daños cuantificables. Además, y aún en con-

diciones favorables para el desarrollo de enfermedad, la evaluación se realiza en general sobre grupos de síntomas (por ejemplo “manchas foliares” o “cancros”) y no sobre cada una de las enfermedades en forma aislada.

Por tal motivo y para avanzar en la incorporación de resistencia a enfermedades en el Plan de Mejora Genética se implementó un nuevo proyecto, titulado “Desarrollo de tests estándar de inoculación artificial para la caracterización sanitaria de germoplasma de *Eucalyptus globulus*”. Este proyecto, también financiado por PDT-MEC, se desarrolló entre 2005 y 2007. El objetivo general fue desarrollar y validar la metodología de inoculación artificial para tres enfermedades: roya del eucalipto (*Puccinia psidii*), manchas foliares (*Mycosphaerella* spp.) y canchales en el fuste (*Botryosphaeria* spp.). La meta planteada para este proyecto es la implementación de un Servicio de Evaluación Sanitaria que permita conocer la resistencia/susceptibilidad de materiales de propagación (semillas o clones) previo a ser utilizados a nivel comercial, contribuyendo de esta forma a disminuir el riesgo sanitario de las inversiones forestales con *E. globulus*.

En esta publicación se presentan los resultados obtenidos en dicho proyecto. En la primera parte se realiza la descripción y recopilación de antecedentes para las tres enfermedades. Luego se describen brevemente las metodologías utilizadas para cada enfermedad y se presentan los resultados obtenidos en las sucesivas etapas: colecta, producción y conservación de inóculo, inoculación de germoplasma y condiciones de incubación, y caracterización de la reacción a través de una escala de evaluación. Por último, se discuten las implicancias de las metodologías desarrolladas para el mejoramiento genético por resistencia a enfermedades y se consideran las acciones futuras para consolidar la implementación de un servicio de evaluación sanitaria.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

II.1. Roya del eucalipto causada por *Puccinia psidii*

El hongo *Puccinia psidii* Winter es el agente causal de la enfermedad conocida como “roya del eucalipto”. Fue originalmente descrita por Winter (1884) en hojas de guayabo (*Psidium guajava*) en Brasil, donde también fue reportada por primera vez en *Eucalyptus* en 1944 (Joffily, 1944). Se considera originaria de América Central y de América del Sur pero hoy en día su distribución abarca también el sur de los Estados Unidos, el Caribe y Hawaii.

P. psidii es capaz de infectar numerosas especies de la familia *Myrtaceae*, familia a la que pertenece el *Eucalyptus*. Recientemente se ha reportado la infección de *P. psidii* en una especie no perteneciente a la familia de las mirtáceas, *Heteropyxis nataliensis* (Alfenas *et al.*, 2005).

Debido a su gran capacidad de dispersión (a través del viento, de insectos, de animales y de la lluvia) y su amplio rango de hospedantes, esta enfermedad es considerada importante y es causa de gran preocupación, particularmente en Australia, donde podría causar gran daño en las poblaciones de *Eucalyptus* nativos.

Existe poca información sobre la infección de *P. psidii* en especies nativas en los lugares de origen de la enfermedad (Glen *et al.*, 2007). Esto se debe a que en general no se observan ataques severos en la misma, con excepción de eventuales epidemias en plantaciones comerciales de guayaba en Brasil (Ribeiro & Pommer 2004).

Cuando una especie es trasladada fuera de su rango de distribución natural existe el riesgo de exposición a nuevos patógenos, no presentes en el área de origen. Es probable que este haya sido el caso del

Eucalyptus con *P. psidii* y que nuestras mirtáceas nativas hayan servido como fuente de inóculo de cepas con capacidad de infectar *Eucalyptus*.

En Uruguay, el primer reporte de la presencia de *P. psidii* en *Eucalyptus globulus* fue realizado en el 2003 (Telechea *et al.*, 2003) aunque el patógeno había sido reportado con anterioridad en *Psidium brasiliensis* en 1981 (Koch de Brotos *et al.*, 1981).

Síntomas

Puccinia psidii infecta tejidos jóvenes en plantas de vivero y en plantas de hasta 2 años en el campo. Sobre huéspedes susceptibles el síntoma más característico de la enfermedad es la presencia de pústulas amarillo intenso, donde se da una esporulación pulverulenta sobre hojas juveniles, pecíolos y brotes (Figura 1). Las lesiones sobre los órganos afectados comienzan tomando una coloración castaño grisáceo que luego se verá recubierta por las uredosporas.

En materiales altamente susceptibles la enfermedad causa deformaciones, hipertrofia y necrosis de las porciones afectadas, pudiendo, en caso de ataques severos, matar los ápices con la consiguiente pérdida de dominancia apical y propiciando hábitos arbustivos. Sobre huéspedes resistentes, el patógeno induce una reacción de hipersensibilidad, expresada por pequeñas lesiones necróticas ("flecks") que generalmente no presentan esporulación (Junghans *et al.*, 2003).

Ciclo de vida

Puccinia psidii es considerada una roya autoica, es decir que todas sus fases se producen sobre el mismo huésped. A su vez se la considera hemicíclica ya que no todas sus fases han sido observadas en la naturaleza (Figueredo, 2001; Alfenas & Zauza, datos sin publicar). Contrariamente, Simpson *et al.* (2006) sugieren que podría tratarse de una especie heteroica con una fase aecial en un huésped desconocido, pero resulta dudoso dadas las múltiples observaciones realizadas en laboratorios independientes a partir de infecciones causadas por basidiosporas sobre el huésped telial (Figueredo, 2001; Alfenas & Zauza, datos sin publicar).

La germinación de las uredosporas y la infección se encuentran fuertemente afectadas por la temperatura, la presencia de agua libre sobre los tejidos (debido al rocío, etc) la intensidad de luz y el fotoperíodo (Ruiz *et al.*, 1989b). Numerosos estudios concuerdan en que un alto nivel de agua libre sobre el tejido y oscuridad por un período de 6 a 8 horas son necesarios para una germinación e infección exitosas (Piza & Ribeiro, 1988; Ruiz *et al.*, 1989a; 1989c; Coutinho *et al.*, 1998). El rango de temperatura óptimo es entre 15° C y 25° C (Ruiz *et al.*, 1989a; Carvalho *et al.*, 1994). Si bien existen diferencias en cuanto al rango de temperatura entre distintos estudios, éstas se deben probablemente a variaciones en la metodología de inoculación y a diferencias en los biotipos de roya utilizados.

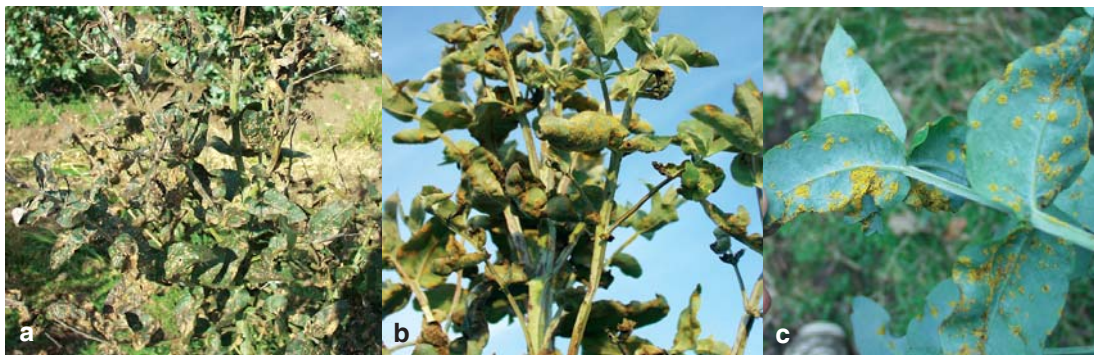


Figura 1. Infección natural de *Eucalyptus globulus* por *Puccinia psidii*. a) Árbol severamente afectado con ápices secos. b) Hojas y brotes apicales con pústulas amarillas características. c) Detalle de hoja infectada.

A través de inoculaciones cruzadas sobre diferentes huéspedes, diversos estudios sugieren la existencia de especialización fisiológica y por tanto reportan razas o biotipos de *P. psidii* (Coelho *et al.*, 2001; Xavier, 2002; Aparecido *et al.*, 2003). Según Coelho *et al.* (2001) se pueden separar tres grupos: un grupo capaz de infectar *Eucalyptus* spp. y *Syzygium jambos*, un segundo grupo capaz de infectar *Eucalyptus* spp. y *Psidium guajava* y un tercer grupo que sólo infecta *P. guajava*.

Impacto en Uruguay

La roya del *Eucalyptus* es una enfermedad con gran potencial destructivo, especialmente en especies o clones muy susceptibles. Es considerada además una enfermedad cuarentenaria en países donde no se encuentra presente (Coutinho *et al.*, 1998; Alfenas *et al.*, 2004).

Desde el punto de vista productivo la enfermedad puede tener efectos directos debidos a la pérdida de crecimiento o, en casos severos, a la muerte de la planta, y efectos indirectos debidos al estrés provocado en la planta, lo cual la hace más susceptible a factores abióticos y bióticos (Balmelli *et al.*, 2004).

En ensayos de *E. globulus* de un año, llevados a cabo en Rocha y Maldonado, se observó presencia de *P. psidii* en el 44 y 47 % de las hojas muestreadas, respectivamente (Balmelli *et al.*, 2004).

Control

Para la roya del *Eucalyptus* diversos autores reportan la existencia de variabilidad genética en cuanto a la resistencia a la enfermedad (Balmelli *et al.*, 2004; Coutinho *et al.*, 1998). En la Figura 2 se observa evidencia de variabilidad genética en condiciones de campo. Por lo tanto, la utilización de genotipos resistentes es una estrategia disponible para la reducción del impacto de la enfermedad.

En cuanto a la estrategia de aplicación de fungicidas es sólo viable en viveros, en jardines clonales y ocasionalmente en el campo, para materiales de gran valor genético. Los beneficios de la aplicación de



Figura 2. Infección natural de *Eucalyptus globulus* por *Puccinia psidii*. Diferencias en resistencia a la enfermedad: izquierda, árbol susceptible; derecha, árbol resistente.

fungicidas deben ser evaluados teniendo en cuenta los costos económicos y ambientales (Glen *et al.*, 2007).

II.2. Manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* spp.

El género *Mycosphaerella* cuenta con numerosas especies patógenas de *Eucalyptus* y es una de las enfermedades foliares más comunes. Más de 30 especies han sido descritas a partir de distintas manchas y lesiones en hojas juveniles y adultas. Muchas veces se ha observado que más de una especie de *Mycosphaerella* se encuentra colonizando una sola hoja de *Eucalyptus* y se han observado hasta cuatro especies asociadas a una única lesión (Crous, 1998).

Si bien las enfermedades foliares causadas por *Mycosphaerella* spp. y sus anamorfos rara vez provocan ataques severos en poblaciones de *Eucalyptus* nativos, en viveros y en plantaciones comerciales han llegado a causar grandes daños, por lo que son consideradas las enfermedades foliares más importantes en Australia (Park & Keane, 1982b; Carnegie & Keane, 1998), en Nueva Zelanda (Dick, 1982) y en Sudáfrica (Crous & Wingfield, 1996).

De las especies reportadas en *Eucalyptus* fuera de Australia, es probable que algunas se hayan dispersado a partir

de allí; esto incluye a *M. cryptica* y *M. nubilosa* en Nueva Zelanda (Dick, 1982; Dick & Gadgil, 1983), *M. cryptica* en Chile (Wingfield *et al.*, 1995), *M. marksii* en Indonesia, Vietnam, Sudáfrica y Portugal y *M. suttoniae* (*Phaeophleospora epicoccoides*) en Indonesia y Brasil (Crous, 1998). Sin embargo, muchas especies no han sido reportadas en Australia y sus poblaciones de origen podrían encontrarse en mirtáceas nativas (Crous & Wingfield, 1996; Crous, 1998). Existen reportes de la ocurrencia de *Mycosphaerella* spp. en mirtáceas nativas en Brasil (Ferreira, 1989; Corlett, 1991) y en Uruguay (Pérez *et al.*, 2007).

Las enfermedades foliares causadas por *Mycosphaerella* spp. son una de las mayores restricciones en la propagación de *Eucalyptus* en muchas partes del mundo. *M. cryptica* y *M. nubilosa* han causado daños considerables en plantaciones en Australia (Park & Keane, 1982a; 1982b; 1984; Carnegie *et al.*, 1994), mientras que *M. cryptica* y *M. juvenis* han tenido efectos severos en Nueva Zelanda (Ganapathi & Corbin, 1979) y Sudáfrica (Crous & Wingfield, 1996), respectivamente.

Síntomas

Los síntomas pueden variar según la o las especies presentes en la infección. En general, las especies de *Mycosphaerella* producen manchas de color castaño claro a marrón y son de forma irregular, angular o circular (Figura 3). Los bordes pueden ser más oscuros que las manchas y varían en su coloración (Balmelli *et al.*, 2004).

Una infección severa puede causar la abscisión prematura de las hojas y un marchitamiento y muerte del ápice (Crous, 1998; Carnegie *et al.*, 1994) provocando a la vez una pérdida de crecimiento y un aumento del estrés, dejando más vulnerable a la planta a la acción de otros patógenos y/o factores abióticos (Figura 4).

Ciclo de vida

Este género se caracteriza por la formación de fructificaciones de color negro sobre las lesiones en hojas (pseudotecios) en cuyo interior se producen esporas de origen sexual denominadas ascosporas. La dispersión ocurre a partir de la liberación activa de las ascosporas bajo determinadas condiciones ambientales. La propagación de las mismas ocurre principalmente a través del viento, mientras que la lluvia contribuye a la dispersión sobre un mismo árbol (Beresford, 1978).

Según estudios realizados en plantaciones de *Eucalyptus* en Nueva Zelanda por Cheah (1977) y Beresford (1978), las mayores concentraciones de ascosporas en el aire se dan durante el otoño y hasta principios del verano. A su vez, Park y Keane (1987) encontraron que en Australia la mayor cantidad de inóculo en el aire se registra en verano y hasta mediados de otoño. En el caso de *M. nubilosa*, *M. cryptica* y *M. parva*, la formación de fructificaciones ocurre durante todo el año, pero la liberación de las ascosporas requiere condiciones de humedad relativa cercanas a la saturación, no ocurriendo por debajo del 90% (Park y

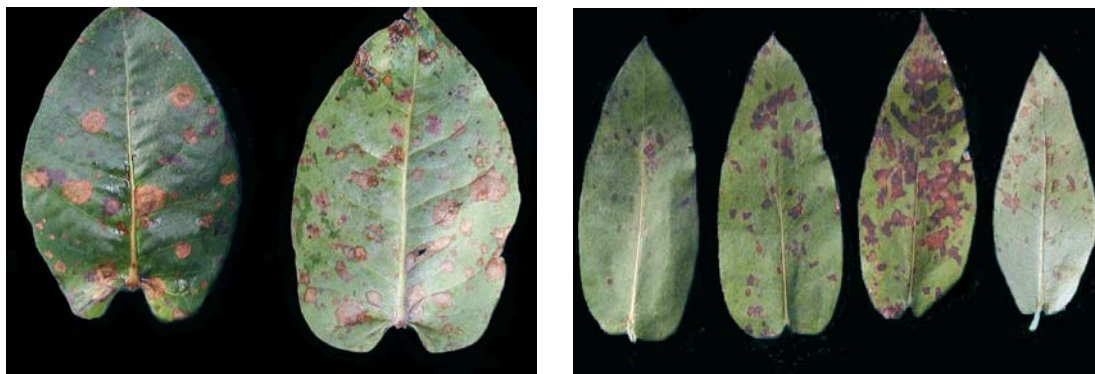


Figura 3. Manchas causadas por *Mycosphaerella* spp.

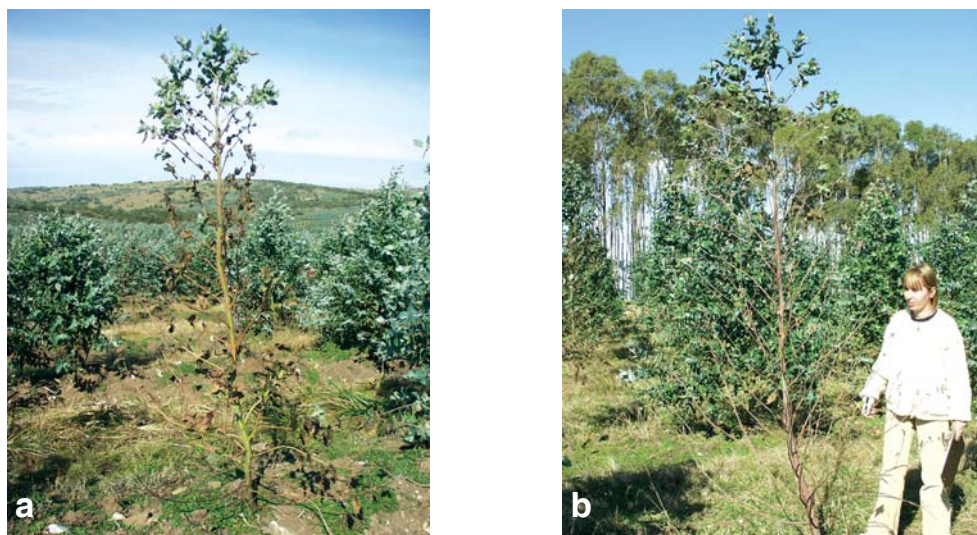


Figura 4. a) Defoliación causada por *Mycosphaerella* spp. en *Eucalyptus globulus*. b) Diferencias en resistencia a la enfermedad: adelante, árbol susceptible; atrás, árboles resistentes.

Keane, 1982a; 1987). Por otra parte, las temperaturas óptimas para dicha liberación son de 25° C para *M. nubilosa*, 20° C para *M. cryptica* y 7-25° C para *M. parva*. Estas temperaturas pueden diferir bajo condiciones de campo.

Impacto en Uruguay

Para Uruguay las especies reportadas para *Eucalyptus globulus* son: *M. marksii*, *M. walkeri*, *M. suberosa* (Wingfield, 2000) y *M. vespa* (Balmelli *et al.*, 2004). A su vez existen reportes de *M. heimii*, *M. marksii* y *M. aurantia* en mirtáceas nativas (Pérez *et al.*, 2007).

En ensayos de *E. globulus* de un año, llevados a cabo en Rocha y Maldonado, se constató la presencia de manchas de *Mycosphaerella* spp. en el 35 y 26 % de las hojas muestreadas, respectivamente (Balmelli *et al.*, 2004).

Control

Debido al daño causado por *Mycosphaerella* spp. en plantaciones comerciales, se ha buscado resistencia a estos patógenos en especies y orígenes de *Eucalyptus* tanto en Australia (Carnegie & Keane, 1998; Carnegie *et al.*, 1994; Dungey *et al.*, 1997), como en Sudáfrica (Purnell & Lundquist, 1986) y Nueva Zelanda (Wilcox, 1982a; 1982b).

Existen evidencias de variación en la resistencia a *Mycosphaerella* spp. entre distintas especies de *Eucalyptus* (Wilcox, 1982a; 1982b; Carnegie *et al.*, 1994), entre diferentes orígenes (Wilcox, 1982a; 1982b; Lunquist & Purnell 1987; Carnegie & Keane, 1998; Carnegie *et al.*, 1994; Dungey *et al.*, 1997) y entre familias (Reinoso, 1992; Dungey *et al.*, 1997). Estudios de heredabilidad de la resistencia en *E. globulus* en Tasmania demostraron la viabilidad de la selección por resistencia a la enfermedad como forma de reducir los efectos de la misma (Dungey *et al.*, 1997; Milgate *et al.*, 2005). Balmelli *et al.* (2004) también observaron valores moderados a altos de heredabilidad para defoliación en ensayos de *E. globulus* en Uruguay, por lo que se podría esperar una aceptable respuesta a la selección.

II.3. Cancros en el fuste asociados a Botryosphaeriaceae

Los cancros son infecciones que resultan en la muerte del cambium, de forma y tamaño variable, que pueden ocurrir en troncos y ramas de un árbol (Figura 5). Cuando se produce la invasión fúngica, se disparan mecanismos de respuesta por parte del árbol para restringir dicha infección. En *Eucalyptus*, el daño del cambium se ve ge-

neralmente acompañado de la exudación de quino (Figura 5). La respuesta del árbol frente a la invasión fúngica puede verse modificada debido a condiciones ambientales de manera que el estrés, ya sea biótico o abiótico, puede resultar en un aumento del tamaño del cancro (Old & Davison, 2000).

Diversos géneros de hongos se han reportado asociados a este tipo de lesiones, varios de los cuales se ubican dentro de la familia Botryosphaeriaceae. Este grupo es rico en especies y tiene una distribución cosmopolita. Dichas especies ocurren en un amplio rango de huéspedes y su modo de vida abarca el saprofitismo, el parasitismo y el endofitismo (Smith *et al.*, 1996).

Los anamorfos han sido ubicados en los géneros *Botryodiplodia* (Sacc.) Sacc, *Diplodia* Fr., *Dothiorella* Sacc., *Fusicoccum* Corda, *Lasiodiplodia* Ellis & Everh., *Macrophoma* (Sacc.) Berl. & Vogl., *Macrophomopsis* Petrak, *Sphaeropsis* Sacc., y *Neofusicoccum* (Denmann *et al.*, 2000; Crous *et al.*, 2006).

Debido a que las características morfológicas de estos géneros se encuentran pobremente definidas, los mismos no están claramente delimitados (Alonso, 2004) y existe confusión en la ubicación de las especies dentro del género. La taxonomía de la familia Botryosphaeriaceae se encuentra actualmente en revisión, atendiendo a la de sus anamorfos, las formas más comu-



Figura 5. Presencia de cancras en *Eucalyptus globulus*. (Gentileza del Ing.Agr. Carlos Pérez, Facultad de Agronomía, UDELAR).

nes encontradas en la naturaleza (Denmann *et al.*, 2000). Dada la controversia existente en cuanto a la taxonomía del género, a los efectos de esta publicación se utilizará en forma genérica "*Botryosphaeria*", de manera de simplificar la mención de los aislamientos, salvo aquellos que posean una identificación correcta.

Síntomas

Numerosas especies del género *Botryosphaeria* han sido reportadas como causantes de manchas de hojas, muerte apical en árboles jóvenes y de canchros en ramas y fuste (Barnard *et al.*, 1987; Davison & Tay, 1983; Shearer *et al.*, 1987; Old & Davison, 2000; Smith *et al.*, 2001). Estos síntomas han sido observados mayoritariamente asociados a estrés abiótico. A su vez diversas "*Botryosphaeria*" spp. han sido reportadas como endófitos, colonizando asintóticamente tejidos sanos de *Eucalyptus* spp. (Bettucci & Alonso, 1997; Bettucci *et al.*, 1997; Fisher *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1996). También fueron aisladas de tejidos sanos y sintomáticos en otras especies de mirtáceas nativas en Sudáfrica (Pavlic *et al.*, 2007), Australia (Burguess *et al.*, 2006) y Uruguay (Bettucci *et al.*, 2004; Carlos Pérez, com. pers.).

En función del genotipo, de las condiciones fisiológicas de la planta y de las condiciones ambientales, estos hongos pueden variar su modo de vida desarrollando la enfermedad. La ocurrencia de la misma se ha visto asociada a factores de estrés tales como viento, heladas, condiciones adversas de suelo y ocurrencia de sequía.

Impacto en Uruguay

Balmelli *et al.* (2006; 2007) no detectaron un efecto de la presencia de canchros sobre el crecimiento, pero sí un aumento en la mortalidad respecto a los árboles sanos. A su vez, Balmelli y Resquín (2005) encontraron una clara relación entre nivel de canchros y la mortalidad de las cepas. Se ha observado también que los árboles severamente afectados presentan una copa muy pequeña, con ocasional muerte total o parcial de la misma, así como la emisión de

brotos epicórmicos (Balmelli *et al.*, 2004). La aparición de estos rebrotos dificulta el descortezado de los árboles afectados al momento de la cosecha, debiéndose recurrir al descortezado manual cuando éstos son demasiado numerosos o de gran tamaño. A su vez, la madera de árboles afectados por canchros tiene un menor rendimiento en pulpa y un mayor consumo de reactivos con el consiguiente aumento de costos (Resquín *et al.*, 2005).

En Uruguay se ha reportado la presencia de *B. dothidea*, *Neofusicoccum ribis-N.parva* y *N. eucalyptorum* en distintas especies de *Eucalyptus* a partir de tejidos sanos y con síntomas (Alonso, 2004; Balmelli *et al.*, 2004; Bettucci *et al.*, 1999; Wingfield, 2000; Carlos Pérez, com. pers.).

Control

Al igual que con otras enfermedades, entre las distintas especies y orígenes de *Eucalyptus*, existen diferencias en las respuestas a la infección por "*Botryosphaeria*" spp. (Old & Davison, 2000), por lo que la selección de materiales resistentes es la estrategia más aceptada para el manejo de estas enfermedades en plantaciones comerciales (Gadgil *et al.*, 2000). A su vez, Balmelli *et al.* (2004) reportaron que la variabilidad observada en el nivel de síntomas se encuentra sujeta a un buen control genético y que por lo tanto es factible reducir la susceptibilidad mediante selección.

III. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA DE INOCULACIÓN

III.1. *Puccinia psidii*

A los efectos de realizar una capacitación en la metodología de trabajo con *P. psidii*, en setiembre de 2005 se realizó una pasantía de dos semanas en el Departamento de Patología Vegetal de la Universidad de Visoça, bajo la supervisión del Dr. Acelino Couto Alfenas, referente internacional en el tema. Se estudiaron las técnicas de colecta, multiplicación y conservación de inóculo, así como también los procedimien-

tos básicos de inoculación sobre plantas de *Eucalyptus grandis* y evaluación de la reacción a *P. psidii*, propuestos por Alfenas *et al.* (2004) y Junghans *et al.* (2003). En octubre de 2006, el Dr. Alfenas viajó a INIA Las Brujas durante una semana para supervisar el ajuste de la metodología en *E. globulus*.

La colecta inicial de inóculo se realizó en plantaciones jóvenes de *E. globulus* que presentaban infección natural de *P. psidii*. Se muestrearon hojas con pústulas, de las cuales se extrajo la esporada y se la envasó en ampollas de vidrio al vacío o en tubos eppendorf. Se obtuvieron un total de siete aislamientos.

Por tratarse de un parásito obligado (hongo biotrófico), el crecimiento y multiplicación de *P. psidii* requiere de tejidos vivos de un hospedante, no siendo posible su cultivo *in vitro*. Por tal razón, para la producción del inóculo se utilizan plantas de *Syzygium jambos*, mirtácea originaria del sudeste de Asia, altamente susceptible a la enfermedad. Una vez inoculadas con *P. psidii* se obtiene una gran esporulación sobre las hojas afectadas, facilitando de esta forma la obtención de inóculo para posteriores ensayos (Figuras 6a y 6b).

Para la inoculación de plantas de *S. jambos*, a partir de un stock de esporas y mediante un pincel de cerdas firmes, se espolvoreó la cara adaxial de las hojas más jóvenes. Las plantas se incubaron durante 24 horas en oscuridad, a 25°C y en un ambiente de humedad saturada. Posteriormente,

se trasladaron a una cámara de crecimiento a 20°C, con un régimen de luz/oscuridad de 12 horas. Transcurridos 12 días después de la inoculación (ddi), se colectó la esporada y se almacenó a -80°C.

A partir de las inoculaciones en plantas de *S. jambos* se pudo multiplicar exitosamente la mayoría de los aislamientos de *P. psidii* colectados. Atendiendo a la abundancia en el sitio de colecta y a la capacidad de multiplicación en *S. jambos*, se seleccionó uno de los aislamientos (aislamiento N° 10) para ser utilizado en las sucesivas inoculaciones. Del mismo, se obtuvo un aislamiento monopustular, a fin de asegurar la homogeneidad del inóculo. Este procedimiento permite el mantenimiento y la producción de inóculo en forma sistemática y periódica, tal como reporta Alfenas *et al.* (2004).

Los experimentos de inoculación sobre *E. globulus* se realizaron en plantas provenientes de semilla (de origen comercial y de progenies del programa de mejoramiento genético del INIA) y sobre material clonal. Para esta inoculación se preparó una suspensión en agua de 2×10^4 esporas/ml y se aplicó con un aspersor a ambas caras de los primeros pares de hojas (Figura 7a). Las condiciones de incubación fueron las mismas que las utilizadas para la inoculación de *S. jambos* (Figuras 7b y 7c).

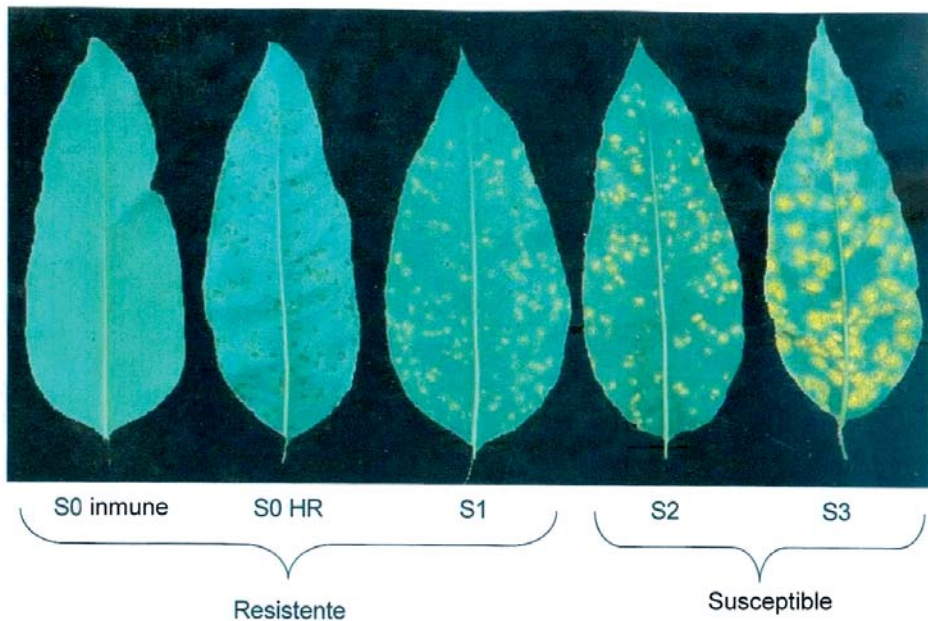
A los 12 ddi se realizó una evaluación preliminar de síntomas y a los 20 ddi la evaluación final. La caracterización de la reacción se realizó tomando como base la es-



Figura 6. a) Inoculación artificial de plantas de *Syzygium jambos* con *Puccinia psidii*. b) *S. jambos* con abundante esporulación.



Figura 7. a) Inoculación de *Eucalyptus* con *Puccinia psidii*. b) Cámara de incubación. c) Cámara de crecimiento.



Escala para la evaluación de resistencia a la roya del *Eucalyptus* con cuatro clases de severidad: S0= inmunidad o reacción de hipersensibilidad del tipo “fleck” o necrótico (S0 HR); S1= pústulas <0,8 mm de diámetro; S2= pústulas de 0,8 1,6 mm de diámetro y S3= pústulas = 1,6 mm (Junghans *et al.*, 2003; Fitopatología Brasileira, 28: 261-265).

Figura 8. Escala visual de reacción de *Eucalyptus grandis* a la inoculación artificial con *Puccinia psidii*. (Gentileza del Dr. Acelino Couto Alfenas, Universidad Federal de Visoça, Brasil).

cala visual desarrollada por Junghans *et al.* (2003) para *E. grandis* (Figura 8). Esta escala considera el tamaño y cantidad de pústulas, delimitándose cuatro clases de severidad: S0 = inmunidad o reacción de hipersensibilidad del tipo "fleck" o necrótico (S0H); S1 = pústulas puntiformes < 0,8 mm de diámetro; S2 = pústulas medianas de 0,8 a 1,6 mm de diámetro; S3 = pústulas grandes > 1,6 mm de diámetro. La lectura se debe realizar en los primeros pares de hojas del tallo principal, evitando las hojas de las ramificaciones laterales.

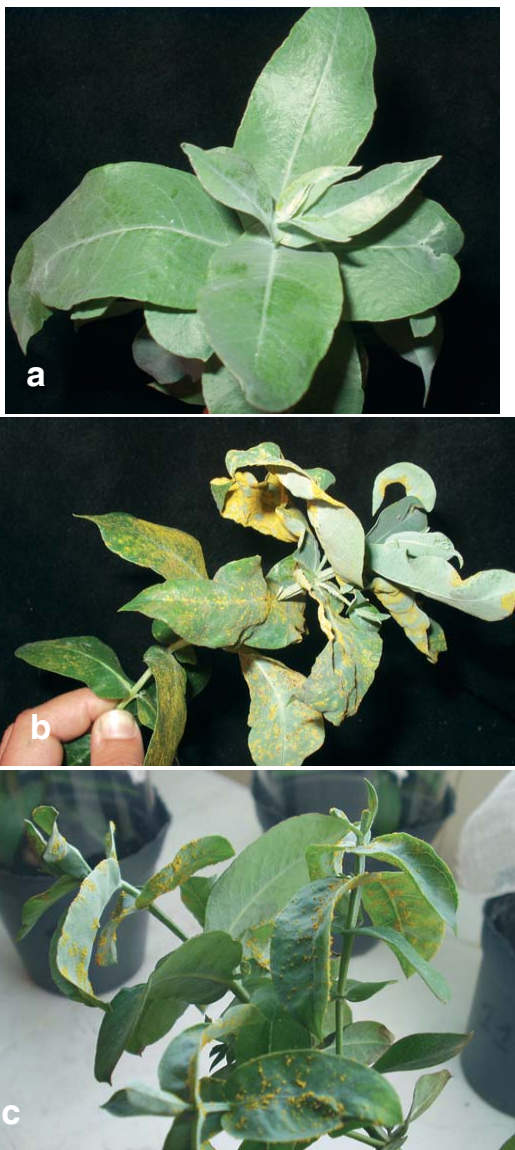


Figura 9. Inoculación artificial de *Eucalyptus globulus* con *Puccinia psidii*; a) planta resistente; b) y c) Plantas susceptibles.

Para *E. globulus*, tanto en las inoculaciones de plantas provenientes de semilla como de material clonal, la metodología permitió registrar reacciones diferentes en cuanto a la presencia de esporulación (tamaño y cantidad de pústulas). Las plantas fueron caracterizadas como resistentes o susceptibles (Figura 9).

En las plantas provenientes de semilla comercial se observaron diferentes respuestas que abarcaron desde S0 a S3. De las plantas provenientes de progenies del Programa de Mejoramiento Genético de INIA, dos de las familias inoculadas fueron totalmente susceptibles y la tercera familia presentó ocho plantas de reacción S3 (susceptibles) y una planta de reacción S0 (inmune). En la inoculación de cuatro clones de *E. globulus* se observaron respuestas S3 en las once plantas evaluadas para cada clon. Teniendo en cuenta los resultados de estas inoculaciones, y para poder realizar una evaluación más precisa, es necesario utilizar un número mayor de plantas, sobretodo para la evaluación de familias. Según Acelino Alfenas (com. pers.), es recomendable inocular 10 plantas en el caso de evaluación de clones y al menos 150 plantas en el caso de evaluación de familias.

A los efectos de implementar la metodología ajustada para seleccionar germoplasma por resistencia a la roya del *Eucalyptus*, hoy se dispone de materiales caracterizados como susceptibles para ser incluidos como testigos en futuras evaluaciones.

III.2. *Mycosphaerella* spp.

Para el aislamiento de *Mycosphaerella* spp. se muestrearon hojas en plantaciones jóvenes de *E. globulus*, que presentaban síntomas típicos de la enfermedad (manchas foliares y defoliación). Los aislamientos fueron obtenidos siguiendo el método descrito por Crous (1998). Se recortaron las lesiones de hojas recientemente colectadas y se dejaron en remojo por 2 horas. Se secaron los segmentos recortados y se los pegó en la tapa de una caja de Petri con MA 2%. Las fructificaciones (pseudotecios) presentes en las lesiones quedaron ubicadas hacia abajo, de manera que las ascosporas

fueran expulsadas sobre el medio de cultivo. Transcurridas 24 horas a temperatura ambiente, se reemplazaron las tapas y se incubó durante dos días más en oscuridad a 25° C. Las ascosporas germinadas se transfirieron a MA 2% fresco. Paralelamente, se ensayó un procedimiento abreviado, colocando hojas sintomáticas en cámara húmeda e incubándolas a temperatura ambiente; luego de siete días, las fructificaciones presentes en las manchas fueron directamente transferidas a MA 2%. En total, se obtuvieron 24 aislamientos de *Mycosphaerella* spp.

Para la producción de inóculo se evaluó el crecimiento de diversos aislamientos de *Mycosphaerella* spp. en cuatro medios de cultivo: CLA (Carnation Leaf Agar), agar agua 2%, PDA (Potato Dextrose Agar), y en agar agua 2% con fragmentos estériles de hoja de *Eucalyptus*. En todos los casos, se ensayaron regímenes de alternancia luz/oscuridad de 12 horas y oscuridad total a 25 ° C.

Los aislamientos de *Mycosphaerella* spp. obtenidos presentaron variabilidad y probablemente representen diferentes especies (Figura 10). Su identificación taxonómica está siendo actualmente completada (Carlos Pérez, com. pers.).

Cinco aislamientos fueron seleccionados para evaluar su capacidad de esporulación, característica esencial para lograr un volumen de inóculo mínimo a los efectos de realizar ensayos de inoculación sobre plantas de *Eucalyptus*. Ninguno de los medios de cultivo ni regímenes de luz/oscuridad ensayados permitieron promover la esporulación

de los aislamientos seleccionados, no habiendo sido posible preparar una suspensión de esporas para la inoculación.

Como alternativa, y en base a bibliografía consultada (Van den Ende, 1992; Silue *et al.*, 1999), se seleccionaron tres aislamientos para realizar un ensayo de inoculación con suspensiones de fragmentos miceliales. A partir de la fragmentación de colonias de *Mycosphaerella* spp. crecidas sobre agar V8 a 25 °C, se obtuvo una suspensión de aproximadamente 10⁴ fragmentos/ml de cada aislamiento. Las suspensiones se aplicaron mediante un aspersor sobre las hojas jóvenes de plantas de *E. globulus*. Durante los primeros cinco días las ramas inoculadas se mantuvieron cubiertas con una bolsa plástica a fin de mantener la humedad. En las condiciones en que fue ensayada esta técnica, no se logró inducir la ocurrencia de síntomas sobre las hojas inoculadas.

III.3. Botryosphaeriaceae

El muestreo para la colecta de especies de la familia Botryosphaeriaceae se realizó en plantaciones de *E. globulus* que presentaban árboles con síntomas (manchas necróticas y/o canchros en ramas y fuste) y árboles asintomáticos. Para el aislamiento desde lesiones se siguió el método descrito por Phillips *et al.* (2005). Las muestras sintomáticas se dispusieron en cámara húmeda y fueron incubadas a temperatura ambiente; luego de cuatro días, las fructificaciones presentes en las lesiones

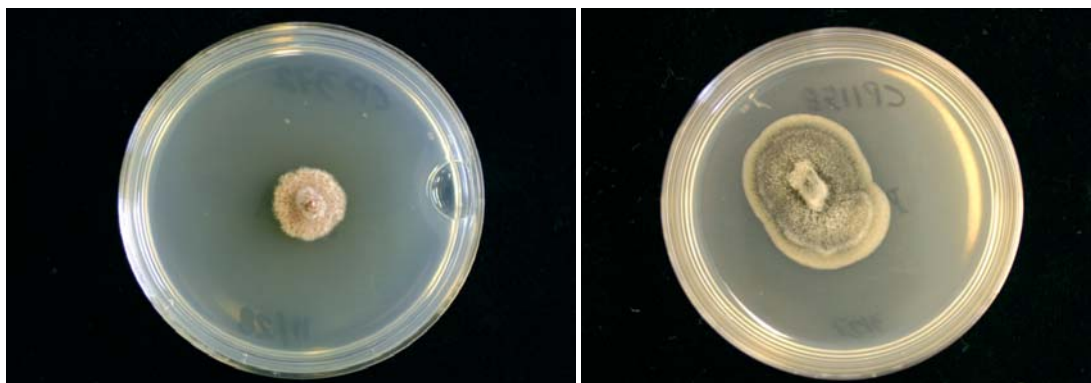


Figura 10. Colonias de *Mycosphaerella* spp. en MA 2 %. a) *M. aurantia*. b) *M. ambiphylla*. (Gentileza del Ing.Agr. Carlos Pérez, Facultad de Agronomía, UDELAR).



Figura 11. a) Técnica de aislamiento de colonias de “*Botryosphaeria*” spp. b) Colonias de *Botryosphaeria dothidea* en MA 2% (Gentileza del Ing. Agr. Carlos Pérez, Facultad de Agronomía, UDELAR). c) Mantenimiento de los aislamientos a 4° C.

fueron transferidas a MA 2%. Para el aislamiento de endófitos se utilizó el método propuesto por Simeto *et al.* (2005). Se procedió a la esterilización superficial e incubación de segmentos de ramas asintomáticas y posterior aislamiento selectivo de colonias de “*Botryosphaeria*” spp. (Figuras 11 a y 11b). Se obtuvieron un total de 54 aislamientos, los cuales fueron conservados en tubos con MA 2% a 4° C (Figura 11 c).

Los aislamientos de “*Botryosphaeria*” spp. obtenidos presentaron variabilidad en

sus características morfológicas, reconociéndose la ocurrencia de diferentes especies. La identificación taxonómica de los aislamientos está siendo actualmente completada (Carlos Pérez, com. pers.).

Se realizaron tres ensayos de inoculación sobre plantas de *E. globulus* provenientes de semilla (de origen comercial y de progenies del programa de mejoramiento genético del INIA) y dos ensayos sobre material clonal de *E. globulus* y *E. grandis*. Para la inoculación se ensayaron las técnicas propuestas por Alonso (2004), Pavlic *et al.* (2007) y Smith *et al.* (1994).

Para realizar los tres primeros ensayos, se seleccionaron ocho aislamientos de «*Botryosphaeria*» spp. según sitio de origen y especie (Cuadro 1). Para cada uno de los aislamientos se inocularon cinco plantas con tallos de 0,8 a 1,0 cm de diámetro, inclu-

Cuadro 1. Aislamientos de “*Botryosphaeria*” spp. seleccionados para los ensayos de inoculación sobre plantas de *Eucalyptus globulus* provenientes de semilla.

Aislamiento	Especie	Sitio de muestreo
ILB 61	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Tacuarembó
ILB 70	“ <i>Botryosphaeria</i> ” sp.	Lavalleja
ILB 60	<i>Neofusicoccum ribis</i>	Tacuarembó
ILB 20	“ <i>Botryosphaeria</i> ” sp.	Soriano
ILB 44	“ <i>Botryosphaeria</i> ” sp.	Rivera
UY 54	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>	Tacuarembó
ILB 34	“ <i>Botryosphaeria</i> ” sp.	Lavalleja
UY 185	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>	Tacuarembó



Figura 12. a) Aplicación de disco de agar con micelio de “*Botryosphaeria*” spp. b) Algodón húmedo por debajo del punto de inoculación y herida, cubiertos por film plástico.

yéndose además dos plantas como controles. Para proceder a la inoculación, se desinfectó con alcohol 75° la zona del tallo a inocular, luego se realizó una herida con un sacabocados y se retiró la corteza. Sobre el cambium expuesto se aplicó un disco de agar con micelio proveniente de una colonia de “*Botryosphaeria*” spp. creciendo sobre MA 2% y se recubrió con film plástico. Para evitar la desecación, por debajo del punto de inoculación se colocó un algodón embebido en agua destilada y también se recubrió con film plástico (Figuras 12 a y 12

b). En el caso de las plantas usadas como controles, se inoculó con un disco de agar estéril, y se procedió de la misma forma colocando algodón y film plástico. Los tres ensayos de inoculación se repitieron en los meses de abril, junio y agosto de 2006, observar posibles efectos de las condiciones ambientales.

La evaluación se realizó transcurridos 45 días, procediéndose a registrar el tipo de reacción. Los síntomas evaluados fueron: extensión longitudinal y en profundidad de la lesión, presencia de fructificaciones, de-

coloración de la corteza en la zona periférica al punto de inoculación, crecimiento irregular y/o deformación del tallo, rajaduras de distinta magnitud y formación de tejido de cicatrización. En base a estas determinaciones, se definieron las variables para la caracterización de la reacción.

Para comprobar la permanencia del inóculo, se obtuvieron fragmentos de tejido de la zona del punto de inoculación, de la zona decolorada y de la zona sana adyacente. Estos fragmentos fueron incubados, previa esterilización superficial, en MA 2% a 25 °C. Los aislamientos de "*Botryosphaeria*" spp. fueron comparados con los inoculados en cada caso en base a su macro y micromorfología.

Las reacciones observadas presentaron un rango amplio de variabilidad. Debido a que estos ensayos fueron realizados con diferentes aislamientos sobre plantas provenientes de semilla, es posible considerar que la variabilidad registrada fue función del genotipo de la planta y del genotipo del aislamiento (Figura 13).

Por esta razón, y con el fin de eliminar el efecto del genotipo de las plantas sobre la sintomatología, en diciembre de 2006 se

realizó un cuarto ensayo de inoculación sobre un clon de *E. globulus*. A su vez, para evaluar el posible efecto del ambiente sobre la expresión de síntomas se ensayaron tres condiciones de incubación: a) Estrés hídrico por exceso de agua, para lo cual se colocaron las macetas en un recipiente que se mantuvo con un cierto nivel de agua, de manera que éstas quedasen sumergidas parcialmente (Figura 14 a); b) Estrés térmico, para lo cual las plantas se mantuvieron en invernáculo con una temperatura de aproximadamente 35-40° C y fueron regadas de forma regular (Figura 14 b); c) Sin estrés, para lo cual las plantas simplemente se colocaron al aire libre, manteniendo un buen riego (Figura 14 c).

Para realizar este ensayo, se seleccionaron tres de los ocho aislamientos utilizados anteriormente, tomando en cuenta la reacción inducida en los ensayos previos (presencia de fructificaciones, lesión y deformación del tallo). Los aislamientos seleccionados fueron ILB 20, ILB 61 y UY 54. Para cada uno de los aislamientos y condiciones de incubación se inocularon tres



Figura 13. a) Variabilidad en la respuesta obtenida en los ensayos de inoculación de plantas de *Eucalyptus globulus* provenientes de semilla, para un mismo aislamiento de "*Botryosphaeria*" spp. b) Respuesta de las plantas control.



Figura 14. Ensayo de inoculación sobre material clonal de *Eucalyptus globulus*. a) Incubación bajo condiciones de estrés hídrico por exceso de agua. b) Incubación bajo condiciones de estrés térmico (por temperatura elevada). c) Incubación sin condiciones de estrés.

plantas, incluyéndose además una planta con un disco de agar estéril como control.

La variabilidad registrada en las reacciones fue considerablemente menor que la existente en las inoculaciones sobre plantas provenientes de semilla, donde cada una representaba un genotipo diferente (Figura 15). La realización de las inoculaciones sobre un clon permitió eliminar el efecto del genotipo de las plantas sobre el tipo de reacción. Sin embargo, en las respuestas observadas no se manifestaron diferencias en función de las condiciones de incubación ensayadas. Más aún, las plantas utilizadas como controles tampoco evidenciaron un efecto del estrés, lo que sugiere que no se logró inducir condiciones abióticas extremas.

Por último, en el marco de la tesis de doctorado del Ing.Agr. (M.Sc.) Carlos Pérez

y en forma coordinada entre INIA y Facultad de Agronomía, se realizó en enero de 2007 un quinto ensayo de inoculación sobre plantas de un clon de *E. grandis*. En este caso se utilizaron veinte aislamientos de "*Botryosphaeria*" spp. provenientes de *Eucalyptus* spp. y otras especies de mirtáceas nativas, obtenidos a partir de tejido sintomático y asintomático. La metodología utilizada para esta inoculación se modificó ligeramente respecto a la de los ensayos anteriores; la herida se efectuó solamente con bisturí retirando la corteza en forma longitudinal (aproximadamente 1 cm de largo) con cuidado de no dañar el cambium. Para cada uno de los aislamientos se inocularon tres plantas, incluyéndose además nueve plantas inoculadas con discos de agar estéril como controles. Las



a



b

c

Figura 15. Ensayo de inoculación sobre material clonal de *Eucalyptus globulus*. a) Respuesta de plantas de un clon de *E. globulus* a la inoculación con un mismo aislamiento de “*Botryosphaeria*” spp. b) Respuesta de las plantas control. c) Corte longitudinal de la zona afectada por la inoculación con detalle de exudación de quino.

plantas se mantuvieron en invernáculo a una temperatura de aproximadamente 25 °C.

La reacción registrada en las plantas clonales de *E. grandis* varió en función del aislamiento utilizado para la inoculación. Con algunos aislamientos no hubo reacción del tejido vegetal, observándose solamente el daño de la herida mecánica. Con otros aislamientos se observó una reacción de necrosis en el cambium que indica claramente la patogenicidad de los mismos, distinguiéndose a su vez dos grados de agresividad: (1) daño en el cambium y formación de tejido de cicatrización sobrecreciendo alrededor de la herida, y (2) ausencia de res-

puesta de defensa de la planta con una mayor extensión de la herida y eventual formación de fructificaciones. En base a los distintos tipos de reacción, fue posible elaborar una escala visual de tres clases: 0 = sin infección; 1 = con lesión en el cambium y presencia de tejido de cicatrización; y 2 = daño severo del cambium y ausencia de reacción de defensa de la planta (Figura 16). Los resultados de este último ensayo de inoculación demuestran la variabilidad presente en el complejo de aislamientos que componen la familia Botryosphaeriaceae, en cuanto a su capacidad patogénica sobre *Eucalyptus*.



Clase 0



Clase 1

Figura 16. Respuesta de plantas de un clon de *Eucalyptus grandis* a la inoculación con distintos aislamientos de "*Botryosphaeria*" spp.; escala visual de tres clases: 0 = sin infección; 1 = con lesión en el cambium y presencia de tejido de cicatrización; y 2 = daño severo del cambium y ausencia de reacción de defensa de la planta (Gentileza del Ing.Agr. Carlos Pérez, Facultad de Agronomía, UdelaR).



Clase 2

IV. IMPLICANCIAS PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO

Existen diferentes estrategias para el manejo de enfermedades forestales, unas tendientes a impedir la entrada de un agente patógeno (exclusión), otras tendientes a eliminar el inóculo de patógenos ya establecidos (erradicación) y otras orientadas a la protección (por ejemplo la aplicación de fungicidas). Sin embargo, el control de una enfermedad forestal es prácticamente imposible, siendo más factible la reducción de la incidencia y/o severidad de la misma. En este sentido, el mejoramiento genético es una herramienta ampliamente utilizada para el manejo de enfermedades forestales a través de la selección de genotipos más resistentes (Eldridge *et al.*, 1994; Simpson y Podger, 2000; Gadgil *et al.*, 2000).

Sin embargo, el mejoramiento genético por resistencia a enfermedades es complejo, costoso y requiere bastante tiempo. Las condiciones para obtener éxito en este tipo de mejora son similares a las necesarias para otras características: existencia de variación genética y al menos un moderado control genético. Además, en la mejora por resistencia a enfermedades se agregan otros factores: presencia del patógeno, condiciones ambientales adecuadas para que se produzca la enfermedad y, en algunos patógenos, variabilidad genética en su virulencia y/o agresividad. A su vez, en el caso de la resistencia a enfermedades la interacción genotipo-ambiente es más compleja, por un lado porque se da una doble interacción (árbol-ambiente y patógeno-ambiente) y por otro porque puede existir una interacción múltiple árbol-ambiente-patógeno.

Para las tres enfermedades de *E. globulus* estudiadas en este proyecto, Balmelli *et al.* (2004) constataron la existencia de variabilidad en cuanto al nivel de expresión de síntomas y obtuvieron valores de heredabilidad moderados a altos, por lo que sería esperable una buena respuesta a la selección. Dicha variabilidad puede ser

aprovechada de diferentes formas: elección de la fuente de semilla, selección y clonación de individuos resistentes, y selección recurrente (selección y cruzamiento de genotipos resistentes). Estas estrategias difieren en cuanto a simplicidad, recursos requeridos y tiempo necesario para obtener material mejorado, pero en todas ellas el nivel de mejora que puede obtenerse está directamente relacionado a la eficiencia con que se realice la selección y al grado con que se conozca y entienda la magnitud de la interacción genotipo-ambiente.

A su vez, la eficiencia en la selección está determinada por la precisión con que se evalúan y detectan los genotipos resistentes. Por otro lado, comprender las complejas interacciones genotipo-ambiente depende de cuán bien se tengan identificados los genotipos (tanto del árbol como del patógeno) y cuán controlado se tenga el ambiente. Es evidente que cuando la evaluación de susceptibilidad a diferentes enfermedades se realiza en condiciones de campo no es posible ejercer ningún tipo de control sobre los patógenos ni sobre las condiciones ambientales.

Por tal motivo, la inoculación artificial es una excelente herramienta para la evaluación de la expresión de resistencia/susceptibilidad a cada enfermedad ya que:

- Se puede evaluar la reacción a cada patógeno en forma aislada, puesto que se logra identificar los síntomas inducidos por cada uno (evitando los «complejos» de síntomas).
- Se asegura que todos los individuos tienen contacto con el patógeno y por lo tanto que la ausencia de síntomas se debe a la expresión de resistencia.
- Se tiene seguridad que todos los individuos tienen contacto con la misma cepa patógena y por lo tanto que las diferencias en el nivel de reacción se deben a diferencias de susceptibilidad.
- Se pueden elegir y controlar las condiciones ambientales, principalmente durante la incubación, lo que asegura la manifestación de la enfermedad.

- Todos los individuos se caracterizan en el mismo ambiente y por lo tanto se evita la eventual interacción entre la susceptibilidad y el estrés provocado por condiciones ambientales variables, lo que hace más precisa la evaluación.
- Se puede evaluar un gran número de genotipos en un espacio reducido y en corto tiempo, lo que reduce los costos de evaluación.
- Se puede conocer la susceptibilidad a determinada enfermedad de forma temprana, por lo que se obtienen resultados en menor tiempo.

En definitiva, la inoculación artificial permite mejorar la eficiencia con que se seleccionan los genotipos más resistentes y por lo tanto permite obtener mayores ganancias genéticas o reducir el tiempo y el costo requerido para alcanzar determinada ganancia.

Para *Puccinia psidii* se ajustó una metodología para su conservación y multiplicación *in vivo*, así como un protocolo de inoculación y evaluación de la reacción en plantas de *E. globulus*. En las inoculaciones se evidenció la existencia de variabilidad en cuanto a la resistencia a la enfermedad, siendo posible caracterizar el material como susceptible o resistente, lo cual permite pasar a una etapa de evaluación de materiales utilizados a nivel comercial, tanto de clones como lotes de semilla.

En el caso de Botryosphaeriaceae se cuenta con la metodología para la conservación y producción del inóculo y se ajustó un protocolo estándar de inoculación. Se definieron las variables a medir para caracterizar el tipo de reacción y se elaboró una escala de evaluación. Dado que se observó una gran variabilidad en la respuesta según la especie y el aislamiento utilizado, se considera necesario realizar una correcta identificación y caracterización de la estructura poblacional de Botryosphaeriaceae. Esto permitirá avanzar en la evaluación sanitaria en programas de mejoramiento genético mediante la selección de las cepas más

agresivas para ser utilizadas en las inoculaciones.

Si bien para *Mycosphaerella* spp. se cuenta con una metodología de aislamiento y conservación del inóculo, la ausencia de resultados exitosos en la inducción de esporulación *in vitro* plantea la necesidad de continuar evaluando alternativas, a los efectos de levantar esta restricción esencial para desarrollar un protocolo de inoculación. Por otro lado, la ocurrencia de variabilidad en el complejo de patógenos causantes de manchas foliares deberá ser tenida en cuenta para seleccionar las especies y aislamientos de *Mycosphaerella* a ser ensayados.

El desarrollo del proyecto FPTA N° 221/2006: "Caracterización de las poblaciones de *Botryosphaeria* y *Mycosphaerella* presentes en plantaciones de *Eucalyptus* en Uruguay, tendiente a minimizar el impacto económico de dicho" ejecutado por la Facultad de Agronomía, bajo la responsabilidad del Ing.Agr. (M.Sc.) Carlos Pérez, en un esfuerzo conjunto con INIA y el Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias-Ingeniería, contribuirá a despejar algunas de las interrogantes que quedan planteadas.

V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Al presente, se dispone de una colección de aislamientos de hongos patógenos de *Eucalyptus* para ser utilizados en la caracterización sanitaria de germoplasma, con el fin de asistir a los programas de mejoramiento genético. Parte de la variabilidad patogénica presente en las plantaciones forestales está representada en la colección y deberá ser correctamente estudiada.

En el caso de *Mycosphaerella* spp. se debe continuar investigando con el fin de lograr la inducción de esporulación *in vitro*, paso imprescindible para producir el inóculo necesario para desarrollar un protocolo de inoculación.

Para *Puccinia psidii* y Botryosphaeriaceae, dos de los grupos de microorganismos causantes de enfermedades de riesgo real o potencial para las plantaciones de *E.*

globulus en el país, se dispone de protocolos para la inoculación artificial.

Dichos protocolos permitirán establecer un Servicio de Evaluación Sanitaria que podrá ser utilizado directamente por el Programa Forestal del INIA y por empresas que tienen sus propios programas de mejoramiento genético. De esta forma, podrán evaluar sus poblaciones de cría y seleccionar los progenitores y/o clones en base a su resistencia a las principales enfermedades.

Otros beneficiarios de dicho servicio serán las empresas que importan semilla y/o los usuarios de las mismas, los cuales podrán conocer la calidad sanitaria de ésta y decidir su utilización en plantaciones comerciales, en base al conocimiento previo del comportamiento sanitario.

VI. AGRADECIMIENTOS

A las siguientes personas y empresas que colaboraron e hicieron posible la culminación de este proyecto de investigación: Acelino Couto Alfenas, Carlos Pérez, Alfredo Fernández, Eufores, Forestal Oriental S.A.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F.** 2004. Clonagem e Doenças do Eucalipto. Editora UFV: Visoça, Brazil.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; WINGFIELD, M.J.; ROUX, J.; GLEN, M.** 2005. *Heteropyxis natalensis*, a new host of *Puccinia psidii* rust. Australasian Plant Pathology, 34: 285-286.
- ALONSO, R.** 2004. Estudio de *Botryosphaeria* spp. en *Eucalyptus globulus* en Uruguay: ¿endofitismo o patogenicidad? Tesis de Maestría, Pedeciba, UDELAR.
- APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B.; FURTADO, E.L.** 2003. Groups of physiological variability in *Puccinia psidii* populations. Summa Phytopathologica 29:234-238.
- BALMELLI, G.** 1993. Daño de heladas en *Eucalyptus*. Serie Técnica N° 40. INIA. Montevideo. Uruguay. 32 p.
- BALMELLI, G.** 1995. Ensayos de orígenes de *Eucalyptus globulus*. Serie Técnica N° 68. INIA. Montevideo. Uruguay. 13 p.
- BALMELLI, G.** 2002. Avances en Mejoramiento Genético de *Eucalyptus globulus* en el Programa Nacional Forestal del INIA. 1) Comportamiento relativo de *E. globulus* en Zona 2. Serie Actividades de Difusión N° 289. pp. 1-5.
- BALMELLI, G.** 2002. Avances en Mejoramiento Genético de *Eucalyptus globulus* en el Programa Nacional Forestal del INIA. 2) Estrategia de Mejoramiento Genético en *E. globulus*. Serie Actividades de Difusión N° 289. pp. 6-13.
- BALMELLI, G.** 2002. Avances en Mejoramiento Genético de *Eucalyptus globulus* en el Programa Nacional Forestal del INIA. 3) Evaluación de fuentes de semilla de *E. globulus* en Zona 2. Serie Actividades de Difusión N° 289. pp. 14-25.
- BALMELLI, G.** 2005. Efecto de enfermedades foliares en *Eucalyptus globulus* al tercer año de crecimiento. **En:** IX Congreso de Ingenieros Agrónomos del Uruguay. Montevideo, Uruguay, 24 y 25 de octubre. 16 p. (<http://www.aiau.com.uy>).
- BALMELLI, G.; ALTIER, N.; MARRONI, V.** 2006. Efecto de los daños provocados por enfermedades foliares y por heladas en *Eucalyptus globulus* sobre el crecimiento posterior. Serie Actividades de Difusión N° 462. INIA. pp. 17-25.
- BALMELLI, G.; MARRONI, V.; ALTIER, N.; GARCÍA, R.** 2004. Potencial del Mejoramiento Genético para el manejo de enfermedades en *Eucalyptus globulus*. Serie Técnica N° 143. INIA. 44 p.
- BALMELLI, G.; RESQUÍN, F.** 1999. Evaluación de orígenes de *Eucalyptus globulus* al séptimo año. Serie Técnica N° 103. INIA. Montevideo. Uruguay. 15p.
- BALMELLI, G.; RESQUÍN, F.** 2001. Evaluación de especies y orígenes del género *Eucalyptus*. **En:** Seminario de Actualización en Tecnologías Forestales para Areniscas de Tacuarembó y Rivera. Serie Técnica N° 123. INIA. Montevideo. Uruguay. pp. 51-65.
- BALMELLI, G.; RESQUÍN, F.** 2005. Evaluación productiva de orígenes de *Eucalyptus globulus* en Zonas Litoral y Norte. Serie Técnica N° 149. INIA. 15p.

- BALMELLI, G.; RESQUÍN, F.** 2005. Efecto de enfermedades del fuste en *Eucalyptus globulus*. Forestal (Revista de la Sociedad de Productores Forestales). N° 27. pp. 9-14.
- BALMELLI, G.; RESQUIN, F.; ALTIER, N.; MARRONI, V.** 2006. Evaluación sanitaria, productiva y de propiedades de la madera de diferentes orígenes de *Eucalyptus globulus* a los 11 años. Serie Actividades de Difusión N° 462. INIA. pp. 1-9.
- BALMELLI, G.; RESQUIN, F.; BENNADJI, Z.; ALTIER, N.; MARRONI, V.** 2007. Sanidad, productividad y propiedades pulperas de orígenes de *Eucalyptus globulus* a los 11 años. Serie Actividades de Difusión N° 491. INIA. pp. 13-23.
- BALMELLI, G.; RESQUÍN, F.; TRUJILLO, I.** 2001. Evaluación de fuentes de semilla de las principales especies de *Eucalyptus*. En: Seminario de Actualización en Tecnologías Forestales para Areniscas de Tacuarembó y Rivera. Serie Técnica N° 123. INIA. Montevideo. Uruguay. pp. 67-87.
- BARNARD, E.; GEARY, T.; ENGLISH, J.; GILLY, S.** 1987. Basal cankers and coppice failure of *Eucalyptus grandis* in Florida. Plant Disease 71:358-361.
- BERESFORD, R.M.** 1978. *Mycosphaerella nubilosa* (Cke) Hansf. on *Eucalyptus delegantis* R.T. Baker: Further studies on epidemiology in North Island of New Zealand. MSc. Thesis, University of Auckland, New Zealand.
- BETTUCCI, L.; ALONSO, R.** 1997. A comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs of *Eucalyptus grandis* in Uruguay. Mycological Research 101:1060-1064.
- BETTUCCI, L.; ALONSO, R.; FERNÁNDEZ, L.** 1997. A comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs and seedlings of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. Sydowia 149: 109-117.
- BETTUCCI, L.; ALONSO, R.; TISCORNIA, S.** 1999. Endophytic mycobiota of healthy twigs and the assemblage of species associated with twig lesions of *Eucalyptus globulus* and *E. grandis* in Uruguay. Mycological research 103: 468-472.
- BETTUCCI, L.; SIMETO, S.; ALONSO, R.; LUPO, S.** 2004. Endophytic fungi of twigs and leaves of three native species of Myrtaceae in Uruguay. Sydowia 56:8-23.
- BOLETÍN ESTADÍSTICO MGAP.** 2005. <http://www.mgap.gub.uy/Forestal/DGF.htm>
- BURGESS, T.; SAKALIDIS, M.L.; HARDY, G.E.** 2006. Gene flow of the canker pathogen *Botryosphaeria australis* between *Eucalyptus globulus* plantations and native eucalypt forests in Western Australia. Austral Ecology, 31: 559-566.
- CARNEGIE, A.J.; KEANE, P.J.** 1998. *Mycosphaerella vespa* sp. nov. from diseased *Eucalyptus* leaves in Australia. Mycological Research, 102: 1274-1276.
- CARNEGIE, A.J.; KEANE, P.J.; ADES, P.K.; SMITH, I.W.** 1994. Variation in susceptibility of *Eucalyptus* provenances to *Mycosphaerella* leaf spot disease. Canadian Journal of Forest Research, 24: 1751-1757.
- CARVALHO, A.O.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; DO CARMO, M.G.F.** 1994. Evaluation of the progress of the *Eucalyptus* rust (*Puccinia psidii*) on *Eucalyptus cloeziana* coppice, in south-east of Bahia state, Brazil from 1987 to 1989. Revista Arvore, 18: 265-274.
- CHEAH, L.H.** 1977. Aeorobiology and epidemiology of *Mycosphaerella nubilosa* (Cke) Hansf. on *Eucalyptus* spp. MSc. Thesis, University of Auckland, New Zealand.
- COELHO, L.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.** 2001. Physiologic variability of *Puccinia psidii* – the rust of *Eucalyptus*. Summa Phytopathologica 27:295-300.
- CORLETT, M.** 1991. An annotated list of the published names in *Mycosphaerella* and *Sphaerella*. Mycological Memoirs, 18:1-328.
- COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, M.J.; ALFENAS, A.C.; CROUS, P.W.** 1998. Eucalyptus Rust: A Disease with the Potential for Serious International Implications. Plant Disease, 82: 819-825.
- CROUS, P.W.** 1998. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA. 169 pp.

- CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J.** 1996. Species of *Mycosphaerella* and their anamorphs associated with leaf blotch disease of *Eucalyptus* in South Africa. *Mycologia*, 88: 441–458.
- CROUS, P.; WINGFIELD, M.; MANSILLA, J.; ALFENAS, A.C.; GROENEWALD, J.** 2006. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. II. *Studies in Mycology*, 55:99-131.
- DAVISON, E.M.; TAY, C.S.** 1983. Twig, branch and upper trunk canker of *Eucalyptus marginata*. *Plant Disease*, 67: 1285-1287.
- DENMAN, S.; CROUS, P.W.; TAYLOR, J.E.; KANG, J.C.; PASCOE, I.; WINGFIELD, M.J.** 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria* and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*, 45:129–40.
- DICK, M.** 1982. Leaf-inhabiting fungi of eucalypts in New Zealand. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 20:65-74.
- DICK, M.; GADGIL, P.D.** 1983. *Eucalyptus* leaf spot. *Forest Pathology in New Zealand N° 1* (Forest Research Institute:Rotorua).
- DUNGEY, H.S.; POTTS, B.M.; CARNEGIE, A.J.; ADES, P.K.** 1997. *Mycosphaerella* leaf disease: genetic variation in damage to *Eucalyptus nitens*, *Eucalyptus globulus*, and their F1 hybrid. *Canadian Journal of Forest Research*. 27:750-759.
- ELDRIDGE, K.G.; DAVIDSON, J.; HARDWOOD, C.E.; VAN WYK, G.** 1994. *Eucalypt Domestication and Breeding*. Oxford Press. 288p.
- FERREIRA, F.A.** 1989. (Rust of eucalypts) In: *Patologia Florestal; Principais Doenças Florestais no Brasil*. pp. 129-152. (Sociedade de Investigações Florestais, Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, Brasil).
- FIGUEREDO, M.B.** 2001. Life cycle and ecology of *Puccinia psidii*. *O Biológico* 63: 69-71.
- FISHER, P.J.; PETRINI, O.; SUTTON, B.C.** 1993. A comparative study of fungal endophytes on xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. *Sydowia* 45: 338-345.
- GADGIL, P.D.; WARDLAW, T.J.; FERREIRA, F.A.; SHARMA, J.K.; DICK, M.A.; WINGFIELD, M.J.; CROUS, P.W.** 2000. Management of Diseases in Eucalypt Plantations. En: *Diseases and Pathogens of Eucalypts*. CSIRO, pp.519-529.
- GANAPATHI, A.; CORBIN, J.B.** 1979. *Colletoglyphum nubilosum* sp. nov., the imperfect state of *Mycosphaerella nubilosa* on *Eucalyptus* in New Zealand. *Transactions of the British Mycological Society*, 72: 237-244.
- GLEN, M.; ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; WINGFIELD, M.J.; MOHAMMED, C.** 2007. *Puccinia psidii*: a threat to Australian environment and economy – a review. *Australasian Plant Pathology* 36: 1-16.
- JOFFILY, J.** 1944. Rust of *Eucalyptus*. *Bragantia* 4:475-487.
- JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.** 2003. Escala de notas para quantificação de ferrugem em *Eucalyptus*. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 261-265.
- KOCH DE BRODOS L.; BOASSO, O.; RICCIO DE MACHADO, C.; GANDOLFO ANTÚNEZ, C.** 1981. Enfermedades de las plantas hongos superiores y saprofitas en Uruguay. Montevideo, Uruguay: Departamento de Comunicaciones, Dirección de Sanidad Vegetal, Ministerio de Agricultura y Pesca.
- LUNQUIST, 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.; VAILLACOURT, 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.
- OLD, K.; DAVISON, E.** 2000. Canker diseases of eucalypts. In: Keane, P., Kile, G., Podger, F. and Brown, B. (eds). *Diseases and Pathogens of Eucalypts*. Collingwood, Australia: CSIRO Publishing, 247-257.

- PARK, R.F.; KEANE, P.J.** 1982a. Three *Mycosphaerella* species from leaf diseases of *Eucalyptus*. Transactions of the British Mycological Society, 79: 95-100.
- PARK, R.F.; KEANE, P.J.** 1982b. Leaf diseases of *Eucalyptus* associated with *Mycosphaerella* species. Transactions of the British Mycological Society, 79: 101-115.
- PARK, R.F.; KEANE, P.J.** 1984. Further *Mycosphaerella* species causing leaf diseases in *Eucalyptus*. Transactions of the British Mycological Society 83: 93-105.
- PARK, R.F.; KEANE, P.J.** 1987. Spore production by *Mycosphaerella* species causing leaf diseases in *Eucalyptus*. Transactions of the British Mycological Society 89: 461-470.
- PAVLIC, D.; SLIPPERS, B.; COUTINHO, T.; WINGFIELD, M.J.** 2007. Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to *Eucalyptus*. Plant Pathology 56:624-636.
- PÉREZ, C. A., ALTIER, N., SIMETO, S., WINGFIELD, M. J.; BLANCHETTE, R. A.** 2007. *Eucalyptus* pathogens from native Myrtaceae trees in Uruguay. Phytopathology 97:S540.
- PHILLIPS, A., ALVES, A., CORREIA, A.; LUQUE, J.** 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. Mycologia 97:513-529.
- PIZA, S.M. DE T.; RIBEIRO, I.J.A.** 1988. Influence of light and temperature on uredospore germination of *Puccinia psidii* Winter. *Bragantia* 47, 75-78.
- PURNELL, R.C.; LUNQUIST, J.E.** 1986. Provenance variation of *Eucalyptus nitens* on the eastern Transvaal Highveld in South Africa. South African Forestry Journal, 138: 23-31.
- REINOSO, C.** 1992. Variation in *Eucalyptus globulus* in susceptibility to *Mycosphaerella* leaf diseases. Master of Forest Science. University of Melbourne, Melbourne.
- RESQUÍN, F.; DE MELLO, J.; FARIÑA, I.; MIERES, J.; ASSANDRI, L.** 2005. Caracterización de la celulosa de especies del género *Eucalyptus* plantadas en Uruguay. Serie Técnica N° 152. INIA. Montevideo. Uruguay. 84 p.
- RIBEIRO, I.J.A.; POMMER C.V.** 2004. Breeding guava (*Psidium guajava*) for resistance to rust caused by *Puccinia psidii*. Acta Horticulturae, 632: 75-78.
- RUIZ, R.A.R.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.** 1989a. Effect of temperature, light and inoculum source on teliospore and urediniospore production of *Puccinia psidii*. Fitopatologia Brasileira, 14: 70-73.
- RUIZ, R.A.R.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; DO VALE, F.X.R.** 1989b. Influência da temperatura, do tempo molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. Fitopatologia Brasileira, 14: 73-81.
- RUIZ, R.A.R.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA L.A.; BARBOSA M.B.** 1989c. Progress of the eucalypt rust, caused by *Puccinia psidii* in the field. Fitopatologia Brasileira, 14, 73-81 color verde.
- PHILLIPS, A., ALVES, A., CORREIA, A.; LUQUE, J.** 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. Mycologia, 97: 513-529.
- SHEARER, B.L.; TIPPETT, J.T.; BARTLE, J.R.** 1987. *Botryosphaeria ribis* infection associated with death of *Eucalyptus radiata* in species selection trials. Plant Disease, 71: 140-145.
- SILUE, D.; LAUNAY, V.; TIRILLI, Y.** 1999. Pathogenic variability in *Mycosphaerella brassicicola*, the causal agent of the ring-spot disease of crucifers. J. Phytopathology, 147 :141-147.
- SIMETO, S., ALONSO, R., TISCORNIA, S.; BETTUCCI, L.** 2005. Fungal community of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus maidenii* stems in Uruguay. Sydowia 57: 246-258.
- SIMPSON, J.A.; PODGER, F.D.** 2000. Management of Eucalypt Diseases: Options and Constraints. **En:** Diseases and Pathogens of Eucalypts. CSIRO, pp.427-444.
- SIMPSON, J.A.; THOMAS, K.; GRGURINOVIC, C.A.** 2006. Uredinales species pathogenic on species of Myrtaceae. Australasian Plant Pathology, 35: 549-562.
- SMITH, H.; CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J.; WINGFIELD, B.** 2001. *Botryosphaeria eucalyptorum* sp. nov., a new species in

- the *B. dothidea* complex on *Eucalyptus* in South Africa. *Mycologia* 93: 500 sesiones completas.
- SMITH, H.; KEMP, G.H.J.; WINGFIELD, M.J.** 1994. Canker and die-back of *Eucalyptus* in South Africa caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Pathology*, 43: 1031-1034.
- SMITH, H.; WINGFIELD, M.J.; PETRINI, O.** 1996. *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus nitens* in South Africa. *Forest Ecology and Management*: 89:189-195.
- TELECHEA, N., ROLFO, M., COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, M.J.** 2003. *Puccinia psidii* on *Eucalyptus globules* in Uruguay. *Plant Pathology*, 52:427.
- VAN DEN ENDE, J.E.** 1992. A screening test for *Mycosphaerella brassicicola* on *Brassica oleracea*. *Neth. J. Pl. Path.* 98:227-236.
- WILCOX, M.D.** 1982a. Preliminary selection of suitable provenances of *Eucalyptus regnans* for new Zealand. *New Zealand Journal of Forestry Science* 12: 468-479.
- WILCOX, M.D.** 1982b. Selection of genetically superior *Eucalyptus regnans* using family tests. *New Zealand Journal of Forestry Science* 12: 480-493.
- WINGFIELD, M.J.** 2000. Report on Diseases of Plantation *Eucalyptus* in Uruguay. 28p.
- WINGFIELD, M.J.; CROUS, P.W.; PEREDO, H.L.** 1995. A preliminary, annotated list of foliar pathogens of *Eucalyptus* spp. in Chile. *South African Forestry Journal* 173:53-57.
- XAVIER, A.A.** 2002. Histopatologia da interacao *Puccinia psidii* e virulencia de isolados do patógeno em espécies de Myrtaceae. PhD thesis, Federal University of Visoça, Brazil.