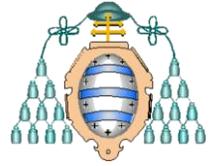




Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Forestales



Programa de Magister en Ciencias Forestales – Universidad de Concepción
Máster Universitario en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales – Universidad de Oviedo

“*Botryosphaeriaceae* asociadas a la muerte de ramas en plantaciones de *Eucalyptus globulus* Labill. en la región del Biobío y de La Araucanía (Chile)”.

Tesis para optar a los Grados de Magister en Ciencias Forestales y
Máster Universitario en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

GRACIELA SUAREZ PEREZ
CONCEPCIÓN-CHILE
2016

Profesor Guía: Eugenio Sanfuentes Von Stowasser
Dpto. de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

Profesora Guía: Abelardo Casares Sánchez
Dpto. de Biología de Organismos y Sistemas, Facultad de Biología
Universidad de Oviedo

***Botryosphaeriaceae* asociadas a la muerte de ramas en plantaciones de
Eucalyptus globulus Labill. en la región del Biobío y de La Araucanía
(Chile)**

Comisión Evaluadora:

Eugenio Sanfuentes Von Stowasser (Profesor guía)
Ingeniero Forestal, Dr. en Fitopatología

Rodrigo Hasbún Zaror (Profesor co-guía)
Ingeniero Forestal, Dr. en Biología

Abelardo Casares Sánchez (Co-guía externo)
Licenciado en Biología, Dr. en Biología

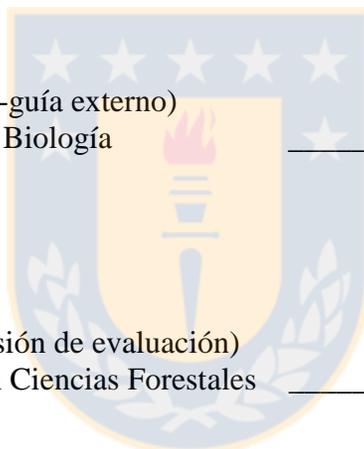
Miguel Castillo Salazar (Comisión de evaluación)
Ingeniero Forestal. Magister en Ciencias Forestales

Director de Postgrado:

Regis Teixeira Mendonça
Ingeniero Químico, Dr. en Tecnología Química

Decano Facultad de Ciencias Forestales:

Manuel Sánchez Olate.
Ingeniero Forestal, Dr. en Biología





Agradecimientos

Quiero agradecer cada párrafo, cada letra de este trabajo a personas y entidades que han permitido de algún modo que se haya realizado, pero no sin antes comenzar agradeciendo a los verdaderos artífices de esto, mis padres. Papa, mama, en vosotros sobran las palabras. Siempre me decís que por un hijo se hace cualquier cosa, se da la vida si es necesario, pero yo digo: ¿y por los padres? Con orgullo yo puedo decir lo mismo. Os quiero desde lo más intenso de mí ser, gracias. A ti Nene, ojala volvieres esos momentos de infancia para disfrutarte más aún si cabe. Me has cuidado y protegido toda la vida y sobre todo has aguantado mis caprichos y me has encubierto cuando “la liaba parda” eres mi orgullo de hermano y te adoro.

A la Universidad de Oviedo y Universidad de Concepción por desarrollar este convenio de doble titulación que me ha permitido ampliar conocimientos fuera de mi país. A la empresa forestal Mininco por financiar y facilitar este trabajo. A mi profesor guía Eugenio, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo enseñándome todo lo que sé sobre la Patología Forestal, gracias. A todos los integrantes del laboratorio de Patología Forestal de la facultad y del Centro de Biotecnología por vuestra ayuda en todos aquellos momentos que fueron necesarios. A mi profesor co-guía Rodrigo y su laboratorio de Epigenética por poner a mi disposición todo lo necesario para realizar este trabajo. A los aportes del profesor Rafael y su laboratorio de Suelos y Productividad Forestal.

A mis hermanos asturianos, Adrián y Pablo. Con vosotros dos inicié este proyecto, ¡qué lejos parece ya! Ojala nos juntemos algún día por Asturias y a golpe de culines recordemos estos momentos.

A todos mis grandes amigos españoles, mis fieles amigas Lucia, Miriam y Patricia, ¡que no decaigan esas conversaciones whatsapperas nunca! Os quiero. Al vasco de mis amores, gracias por venir a verme a Chile, fue el mejor regalo que hayas podido hacerme. A mi internacional Ilan, a mi Cris.

A todos los amigos y compañeros chilenos por apoyarme, entenderme y enseñarme tanto de Chile.

A la chilena de mi corazón, a la ladrona de calcetines, a la usurpadora de camas, a mi mimosa negrita, mi perrita Molly. No puedes entender la alegría que me dabas y lo mucho que te extraño pequeña.

A mis dos ángeles, que desde alguna parte del universo emitís vuestra luz para guiarme.

A toda mi familia.

Mil Gracias!

Índice

1.....	R
Resumen.....	9
2.....	A
Abstract.....	10
3.....	I
Introducción.....	11
3.1. Plantaciones de <i>Eucalyptus</i> en Chile.....	11
3.2 Familia Botryosphaeriaceae.....	12
3.2.1 Taxonomía e identificación.....	12
3.2.2 Botryosphaeriaceae como endófitos de plantas.....	13
3.2.3 Patogénesis en Botryosphaeriaceae.....	13
3.2.4 Reportes de enfermedades causadas por especies de Botryosphaeriaceae en Chile.....	15
4.....	H
Hipótesis.....	17
5.....	O
Objetivos.....	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos específicos.....	18
6.....	M
Metodología.....	19
6.1 Colecta de muestras.....	19
6.2 Métodos de aislamiento de hongos.....	20
6.2.1 Aislamientos directos.....	20
6.2.2 Aislamientos indirectos.....	21
6.3 Caracterización morfológica.....	21
6.4 Identificación molecular.....	22
6.4.1 Extracción de ADN.....	22
6.4.2 Amplificación con PCR.....	22
6.4.3 Secuenciación de ADN y análisis.....	23
6.5 Pruebas de patogenicidad en terreno.....	23

6.6 Pruebas de patogenicidad en invernadero.....	24
6.6.1 Condición de riego	24
6.6.2 Inoculación	25
7.....	R
Resultados	27
7.1 Aislados de hongos obtenidos de ramas de <i>E. globulus</i>	27
7.2. Caracterización e identificación de hongos aislados.....	30
7.2.1 <i>Neofusicocum parvum</i>	30
7.2.2 <i>Neofusicocum eucalyptorum</i>	31
7.2.3 <i>Cytospora cinereostroma</i>	32
7.2.4 <i>Cytospora eucalypticola</i>	33
7.2.5 <i>Phomopsis theicola</i>	34
7.2.6 <i>Quambalaria cyanescens</i>	35
7.2.7 <i>Alternaria arborescens</i>	36
7.2.8 <i>Eucasphaeria capensis</i>	37
7.2.9 <i>Pestalotiopsis microspora</i>	38
7.3 Pruebas de patogenicidad en terreno.	39
7.4 Pruebas de patogenicidad en invernadero.	41
7.4.1 Evaluación variables fisiológicas de las plantas.....	41
7.4.2 Patogenicidad en plantas	44
8.....	D
Discusión	46
9.....	C
Conclusiones	54
10.....	B
Bibliografía	55
11.....	A
Anexo	72

Índice de tablas

Tabla 1. Predios con plantaciones de *Eucalyptus globulus* muestreados en las Regiones del Biobío y de La Araucanía.....20.

Tabla 2. Presencia de aislados de hongos obtenidos desde ramillas de *Eucalyptus globulus* según condición del tejido de aislamiento.....27.

Anexos

Tabla 1 A. Identificación molecular de los aislados.....72.

Tabla 2 A. Comparación de resultados morfológicos con los de referencia.....72.

Tabla 3 A. Riego de plantas de *Eucalyptus globulus* en invernadero y mediciones de parámetros.....73.



Índice de figuras

- Figura 1.** Plantación de *Eucalyptus globulus* con muerte de ramillas. Plantación de *E. globulus* en sector de Nacimiento (a), árbol volteado con defoliación en el tercio medio de la copa (b), cancro en ramilla (c) y hoja con ataque de *Ophelimus* sp. y *Gonipterus platensis* (d).....20.
- Figura 2.** Método de aislamiento y esporulación. Cámaras húmedas con segmentos de ramillas de *Eucalyptus globulus* (a) y acículas de *Pinus radiata* sobre Agar-Agua a 20°C, con formación de picnidios de *Neofusicoccum parvum* (b).....22.
- Figura 3.** Plantas de *Eucalyptus globulus* en dos condiciones de riego. Riego diario (CR) y con reducciones del riego (SR) 26 .
- Figura 4.** Frecuencia relativa de especies, respecto a la condición de aislamiento de la ramilla de *Eucalyptus globulus*, desde tejido sintomático con presencia de *Ophelimus* sp. (C/O), tejido sintomático sin presencia de *Ophelimus* sp. (S/O) y tejido asintomático sin presencia del insecto (S/S)28.
- Figura 5.** Frecuencia relativa de especies de hongos, respecto al sector desde donde fueron obtenidos. Sector 1 y 2 (Región de BíoBío). Sector 3 y 4 (Región de la Araucanía).....29.
- Figura 6.** *Neofusicoccum parvum*. Morfología de la colonia creciendo en APD durante siete días a 20°C (a) y conidias hialinas (100x) (b).....30.
- Figura 7.** *Neofusicoccum eucalyptorum*. Morfología de la colonia, creciendo 7 (a) y 14 días (b) en agar-papa-dextrosa, a 20°C. Conidias de *N. eucalyptorum* (x100) (c).31.
- Figura 8.** *Cytospora cinereostroma*. Colonia de siete días a 24°C creciendo en APD (a). Conidias de *C. cinereostroma* (b).....32.
- Figura 9.** *Cytospora eucalypticola*. Colonia de *C. eucalypticola* de siete días a 24°C creciendo en APD (a). Reverso de una colonia con cuatro semanas (b).....33.
- Figura 10.** *Phomopsis theicola*. Colonia de *P. theicola* de siete días a 24°C creciendo en APD (a). Masa conidial emergiendo de un picnidio de *P. theicola* (b). α y β conidias (x100) (c)..... 34.
- Figura 11.** *Quambalaria cyanescens*. Colonia de *Q. cyanescens* de catorce días a 20°C creciendo en APD (a). Reverso de colonia de tres semanas con pigmentación azul (b). Conidas de *Q. cyanescens* (x100) (c).....35.

- Figura 12.** *Alternaria arborescens*. Colonia de *A. arborescens* de siete días a 20°C creciendo en APD (a). Ramificación de conidióforos (b) y conidias (100x) (c).....36.
- Figura 13.** Colonia de *Eucasphaeria capensis* de siete días, creciendo en medio PDA a 24°C 37.
- Figura 14.** *Pestalotiopsis microspora*. Colonia de *P. microspora* de siete días a 20°C bajo luz creciendo en APD (a). Picnidios (b) y conidias (100x) (c).....38.
- Figura 15.** Inoculaciones en árboles de *Eucalyptus globulus* de tres años de edad en el predio Escuadrón. Control inoculado con APD estéril (a). Cancro causado por *Neofusicoccum eucalyptorum* T3 (b) y *N. parvum* T2 (c).39.
- Figura 16.** Tamaño de lesión en árboles de *Eucalyptus globulus* inoculados con *Neofusicoccum eucalyptorum* (T1, T3 y T4) y *N. parvum* (T2), localizados en los predios Escuadrón (gris claro) y Meñir (gris oscuro). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas (95%) entre tratamientos en predio Escuadrón y letras minúsculas en predio Meñir.....40.
- Figura 17.** Inoculaciones en fustes de *Eucalyptus globulus* de cuatro años de edad en el predio Meñir (Nacimiento). Control inoculado con APD estéril (a). Cancro causado por *Neofusicoccum eucalyptorum* T1 visualizado como depresión del tronco (b) y cancro causado por *N. eucalyptorum* T4 (c)41.
- Figura 18.** Conductancia estomática en plantas de *Eucalyptus globulus*.....42.
- Figura 19.** Actividad fotosintética en plantas de *Eucalyptus globulus*.....42.
- Figura 20.** Transpiración de las hojas en plantas de *Eucalyptus globulus*.43.
- Figura 21.** Eficiencia del uso del agua (EUA) en plantas de *Eucalyptus globulus*.....43.
- Figura 22.** Tamaño de lesión en plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas con *Neofusicoccum eucalyptorum* (B, F y L), *N. parvum* (C), *Cytospora eucalypticola* (E), *C. cinereostroma* (D), *Phomopsis neotheicola* (O), *Eucasphaeria capensis* (R) y *Pestalotiopsis microspora* (T) en invernadero. Plantas con riego diario (CR) y con riego restringido (SR). Letras indican diferencias significativas (95%) entre tratamientos.....44.
- Figura 23.** Cancros en tallos de *E. globulus* bajo condiciones de riego diario (CR). Primera letra mayúscula indica identificación de la cepa. CC es control.....45.
- Figura 24.** Cancros en tallos de *E. globulus* bajo condiciones de restricción de riego (SR). Primera letra mayúscula indica identificación de la cepa. CC es control.....45.

Anexos

Figura 1A. Datos climáticos de la estación meteorológica Coronel (Región del Biobío), próxima al predio Escuadrón.....73.

Figura 2A. Datos climáticos de la estación meteorológica Human (Región del Biobío) próxima al predio Meñir.....74.

Figura 3A. Crecimiento en cm. de las cepas *Neofusicocum. eucalyptorum* y *N. parvum* a lo largo de una semana.....74.



1. Resumen

La presencia de canchros y muerte descendente en plantaciones de *Eucalyptus globulus* Labill. en las regiones del Biobío y de La Araucanía (Chile), son síntomas que pueden relacionarse con la actividad de ciertas especies de hongos patógenos de la familia Botryosphaeriaceae. Entre los géneros pertenecientes a dicha familia se encuentran miembros descritos como endófitos; *Guignardia*, *Botryosphaeria* (anamorfo *Neofusicoccum*), *Dothidotthia* (anamorfo *Dothiorella*), *Neofusicoccum*, *Pseudofusicoccum*, *Lasiodiplodia* y *Diplodia*. Algunos de estos endófitos dominan de manera común en ambientes donde crecen *Eucalyptus* spp y *Pinus* spp. Escaso es el conocimiento de estos individuos y de los daños causados en plantaciones forestales de *Eucalyptus globulus* Labill. en Chile, por lo que el objetivo del presente estudio fue identificar y establecer la patogenicidad de algunas especies de Botryosphaeriaceas asociadas a canchros y muerte de ramas en árboles de *E. globulus*. Fueron colectadas ramas sintomáticas y asintomáticas de árboles de *E. globulus* desde 12 predios localizados en las regiones del Biobío y de La Araucanía. Las ramas fueron sometidas a una desinfestación superficial y de los segmentos resultantes de estas, se realizaron cámaras húmedas para estimular la esporulación de estructuras fúngicas y aislamientos indirectos desde las zonas de avance de los tejidos lesionados. Las estructuras resultantes se transfirieron a medio de cultivo agar-papa-dextrosa (APD) con 100mg/L de sulfato de estreptomicina (SE), e incubadas a 24°C. Los aislados obtenidos fueron identificados mediante caracterización morfológica y secuenciación de la región ITS del ARN ribosomal. De un total de 134 aislados de hongos, el 42% correspondió al género *Neofusicoccum* presentes en ramas sintomáticas y asintomáticas. Las especies identificadas fueron *N. eucalyptorum* y *N. parvum*, ya habiendo sido, en estudios previos, reportados sus teleomorfos en plantaciones de *Eucalyptus* spp. en Chile. Los ensayos de patogenicidad en campo e invernadero, corroboran la agresividad de ambas especies, existiendo diferencias significativas en las lesiones originadas entre cepas de la misma especie y entre especies, siendo *N. parvum* más virulenta. El resultado de las inoculaciones de invernadero en dos bloques de plantas, uno con reducción de riego previo a la inoculación y otro con riego normalizado, para demostrar el estrés hídrico como factor detonante de una

mayor agresividad fúngica, solo evidenció diferencias significativas en una cepa de *N. eucalyptorum*.

Palabras clave: *Neofusicoccum* spp. *Eucalyptus globulus*, Muerte descendente, patogenicidad.

2. Abstract

Presence of cankers and dieback in plantations of *Eucalyptus globulus* Labill. in the Biobío and Araucanía regions (Chile) are symptoms that may be related to the activity of certain species of Botryosphaeriaceae. Among the genera belonging to Botryosphaeriaceae family are members who have been described as endophytes; Guignardia, Botryosphaeria (Neofusicoccum anamorph) Dothidotthia (Dothiorella anamorph) Neofusicoccum, Pseudofusicoccum, Lasiodiplodia and Diplodia. Some of these endophytes frequently dominate across many environments where *Eucalyptus* spp and *Pinus* spp grow. Knowledge of these endophytes and damage to forest plantations of *E. globulus* in Chile are sparse, so the aim of this study was to characterize, identify and test those species attributed to the presence of cankers and dieback in *E. globulus* trees in the country. To conduct this study, we collected symptomatic and asymptomatic branches of *E. globulus* plantations in Biobío and Araucanía regions. The branches were submitted to superficial disinfestation. Humid chambers were made from resulting segments of the branches to promote the sporulation of fungal structures. Additionally,, indirect isolates from development zones of injured tissues were made. The resultant structures were transferred to potato-dextrose-agar (PDA) medium with streptomycin sulfate 100mg/L and incubated at 24°C. The resultant isolates were identified based on molecular characterization and sequence data from the Internal Transcription Spacer (ITS) region of ribosomal RNA. From a total of 134 fungi isolates, 42% belonged to Neofusicoccum genera and were found in symptomatic and asymptomatic branches. The identified species were *N. eucalyptorum* and *N. Parvum*. Their teleomorphs were reported in previous studies in *Eucalyptus* spp. plantations in Chile. Pathogenicity trials in field and greenhouse bear out the aggressiveness of both species, showing significant differences in the injuries between strains of the same species and between species, where *N. parvum* appears more virulent. To show the potential role of the hydric stress as a triggering factor of fungal aggressiveness, we conducted greenhouse inoculations in two sets of plants. One set of plants had irrigation reductions pre

inoculation and the other set had normal irrigation. The results only suggested significant differences in one strain of *N. eucalyptorum*.

Key words: *Neofusicoccum* spp. *Eucalyptus globulus*, Die-back, pathogenicity.

3. Introducción

El género *Eucalyptus* es originario de Australia, Tasmania y diversas islas de la zona: Nueva Guinea, Timor, Solor, Flores, Nueva Bretaña, Molucas y Mindanao. Pertenece a la familia de las Mirtáceas, que comprenden una enorme diversidad biológica, con más de 700 especies distribuidas en regiones, esencialmente de climas mediterráneos, tropicales y subtropicales. Se estima que fue en el siglo XVIII cuando se inició la propagación de eucaliptos en diferentes latitudes del mundo, llegando a distribuirse con éxito en varios países de Europa, Asia, África, América y en algunas islas del pacífico (Obregón y Restrepo, 2000).

El área de plantaciones de eucaliptos a nivel mundial es más de 20 millones de hectáreas, de las cuales más de cinco millones corresponden a *Eucalyptus globulus* Labill. (Soto 2011), siendo *E. globulus* la especie más plantada en las regiones de clima mediterráneo, debido principalmente, a su adaptación a una amplia gama de climas y suelos, buenas aptitudes para la fabricación de papel de calidad y rápido crecimiento (Santelices 2005). Estas plantaciones de eucalipto presentan una serie de limitaciones a nivel mundial como son la amenaza tanto de enfermedades como de daños por insectos (Wingfield et al., 2012).

3.1. Plantaciones de *Eucalyptus* en Chile

En Chile particular importancia tienen las especies *E. globulus* y *E. nitens* Maiden, debido a su amplia distribución en términos de clima y suelo, lo que sumado a sus elevadas tasas de crecimiento les otorgan una alta rentabilidad económica (INFOR, 2011). Las plantaciones forestales representan el 14,6 % de la cobertura forestal del país (2,4 millones de hectáreas), siendo 774.000 ha plantaciones de especies de *Eucalyptus*, correspondiendo para *E. globulus* y *E. nitens* un 22,4% y 9,6%, respectivamente, del total de las plantaciones (INFOR, 2013). Estas plantaciones abastecen el 98% de las necesidades de madera de la industria forestal chilena orientada principalmente a la exportación y producción de bioenergía no contaminante mediante biomasa. Solamente en la región del Biobío la superficie plantada con *Eucalyptus*

spp. supera las 240.000 ha (INFOR, 2011) y en la región de La Araucanía supera las 198.900 ha (INFOR 2012).

En Chile, las primeras plantaciones comerciales de *Eucalyptus* spp. fueron establecidas en 1885, siendo *E. globulus* la especie más importante por su crecimiento y su utilización industrial, debido principalmente a la demanda de fibra corta para proyectos de celulosa. A partir de 1990 aumentaron considerablemente las plantaciones de otras especies, entre las cuales destacan *E. nitens* Maiden., *E. delegatensis* R. T. Baker., *E. viminalis* Labill. y *E. smithii* R.T. Baker, las que se establecieron en sitios no aptos para el crecimiento de *E. globulus* (Valencia y Cabrera 2008).

La mayor parte de las plantaciones con *Eucalyptus* spp. se han realizado en terrenos de aptitud forestal, incluyendo aquellos que se encuentran desgastados y erosionados producto del prolongado mal uso que se les dio en la agricultura. Por la alta rentabilidad de su cultivo, también se ha forestado en algunos suelos agrícolas de la depresión intermedia (Santelices 2005).

Enfermedades y plagas, así como las condiciones ambientales desfavorables presentan una problemática para la industria forestal y su viabilidad económica (Kliejunas et al., 2001). Algunas de las enfermedades más comunes en plantaciones de eucaliptos presentes en Chile son, a nivel foliar, manchas originadas por diferentes especies de *Micosphaerella* y *Terastosphaeria*, además de otros hongos causadores de manchas como *Harknesia* spp., *Sonderhenia* spp., *Phyllosticta* spp. A nivel de fuste, son comunes los canchros y die-back originados por *Botryosphaeria dothidea* y *Cytospora eucalypticola* (Adams et al., 2015).

3.2 Familia Botryosphaeriaceae

3.2.1 Taxonomía e identificación. Botryosphaeriaceae es la única familia en el Orden de los Botryosphaeriales (Schoch et al., 2006), en la que se incluyen patógenos que causan canchros en tallos (Barber et al., 2005). Se estima que esta familia contiene 26 géneros y unas 1500 especies (Kirk et al., 2008).

<i>Amarenomyces</i>	<i>Fusicoccum</i>	<i>Neodeightonia</i>
<i>Aplosporella</i>	<i>Granulodiplodia</i>	<i>Neofusicoccum</i>
<i>Auerswaldiella</i>	<i>Guignardia</i>	<i>Othia</i>
<i>Botryosphaeria</i>	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Phaeobotryosphaeria</i>
<i>Dichomera</i>	<i>Leptodothiorella</i>	<i>Phomatosphaeropsis</i>
<i>Diplodia</i>	<i>Leptoguignardia</i>	<i>Phyllosticta</i>
<i>Discochora</i>	<i>Macrophoma</i>	<i>Saccharata</i>
<i>Dothidotthia</i>	<i>Macrophomina</i>	<i>Sivanesia</i>
<i>Dothiorella</i>	<i>Natrassia</i>	<i>Thyrostroma</i>

3.2.2 Botryosphaeriaceae como endófitos de plantas. La mayoría de los géneros en Botryosphaeriaceae, como *Botryosphaeria* (anamorfo *Fusicoccum* basónimo de *Neofusicoccum*), *Dothidotthia* (anamorfo *Dothiorella*), *Pseudofusicoccum*, *Lasiodiplodia* y *Diplodia*, poseen especies reportadas como endófitos (Crous et al., 2006), tanto en gimnospermas y angiospermas, y algunas con importantes papeles como agentes patógenos. Algunos de estos endófitos forman comunidades que dominan frecuentemente en varios ambientes donde crecen especies de *Eucalyptus* y *Pinus* (Burgess et al., 2006, Smith et al., 1996a, b).

Se ha determinado como endófito *B. dothidea* (Moug.: Fr.) Ces. & De. No. (anamorfo = *F. aesculi* Corda) en *E. nitens* (Deane Et Maid.) Maid. en Inglaterra y *E. grandis* Hill ex Maid., *E. camaldulensis* Dhen, *E. nitens* en Sudafrica (Fisher et al., 1993). *E. smithii* RT Baker Smith et al., (1996a) también en Sudáfrica, siendo poco frecuente en *Eucalyptus* nativos en Australia. El hongo *Neofusicccum australe* fue aislado desde ramas de árboles en plantaciones de *E. globulus* en el oeste de Australia, fuera de su área de distribución natural, y *N. eucalyptorum* y *N. eucalypticola*, predominan en las áreas de distribución natural en el este de Australia y Tasmania (Burgess et al., 2006). La abundancia de relatos de Botryosphaeriaceae indicaría que son particularmente exitosas como colono endofítico oportunista. (Slippers and Wingfield 2007).

3.2.3 Patogénesis en Botryosphaeriaceae. Los hongos del género *Botryosphaeria* se asocian como patógenos en una amplia gama de hospedantes. En *Eucalyptus* spp., estos hongos se conocen como saprófitos y patógenos oportunistas (Davison y Tay 1983, Barnard et al., 1987,

Shearer et al. 1987, Smith et al., 1994), ocasionando daños mayores cuando las plantas están bajo estrés por sequía, heladas, anegamiento y daño por insectos (Wene y Schoeneweiss 1980, Pusey 1989, Old et al., 1990). Las especies de Botryosphaeriaceae en *Eucalyptus* spp. han sido detectadas tanto en entornos nativos como en plantaciones (Sankaran et al., 1995, Slippers et al., 2009), manifestándose con una amplia gama de síntomas, como también infectando en hojas de árboles asintomáticos en prácticamente todos los *Eucalyptus* que se plantan comercialmente (FAO,2006).

En el pasado, el dogma general era que la penetración e infección por especies de Botryosphaeriaceae se producía a través de heridas (Von Arx & Müller 1954, Smith et al., 1994). Sin embargo, diversos estudios han mostrado, que estos hongos pueden penetrar directamente a través de lenticelas, estomas u otras aberturas en las plantas sanas (Brown & Hendrix 1981, Kim et al., 1999, Michailides 1991, Smith 2001). Estas formas de penetración permitirían infecciones por endófitos, a menos que el hospedante esté bajo estrés, en cuyo caso, la infección sería producida de igual manera que la causada por un hongo oportunista en un hospedero debilitado. Prácticamente en todas las partes de la planta; corteza, xilema, ramas, hojas, flores, frutas, cápsulas de semillas, conos y semillas, han sido detectados Botryosphaeriaceae en forma latente (Cilliers et al., 1995, Johnson et al., 1992, Kim et al., 2001, 2004, Lupo et al., 2001, Smith et al., 1996a, b).

Se postula que las infecciones por Botryosphaeriaceae endófitos en hospederos leñosos ocurren principalmente a través de la transmisión horizontal, es decir, las infecciones individuales a través de esporas. Carroll (1988) observó que muchos endófitos en arboles producen masas de esporas viscosas que están asociados con la dispersión por lluvia, fenómeno que también sería válido para Botryosphaeriaceae, donde tanto los teleomorfos y especialmente los anamorfos esporulan desde un ostiolo central en el peritecio o picnidio, respectivamente. Si bien esto no es una adaptación específica para las Botryosphaeriaceae u hongos endófitos de árboles, podría tener algunas ventajas para estos hongos. Puede ayudar a la adhesión a superficies durante períodos húmedos y más probables a la dispersión local en un hospedante específico y su descendencia circundante sobre plantas que compartan afinidades genéticas. La dispersión y la infección endofítica por Botryosphaeriaceae puede

ocurrir a través de ascosporas o conídias siendo las estructuras de fructificación en la fase de anamorfo más comunes en la naturaleza, y en cultivos, que las estructuras del teleomorfo para muchas Botryosphaeriaceae (Slippers and Wingfield 2007).

La expresión de la enfermedad para especies de Botryosphaeriaceae está casi exclusivamente asociada con alguna forma de estrés o condiciones del crecimiento de los árboles no óptimas. Las condiciones de estrés que se han relacionado con estos hongos, incluyen el estrés por sequía, daños físicos (por ejemplo, el granizo), biológicos (como el daño por otros patógenos o insectos), las heladas o nevadas intensas, competencia entre plantas, o la plantación de especies o variedades en sitios inadecuados (altitud, tipo de suelo, temperatura, etc) (Blodgett y Stanosz 1995, Ma et al., 2001, Paoletti et al., 2001, Schoeneweiss 1981, Smith et al., 1994, Stanosz et al., 2001).

Varios tipos de síntomas se han relacionado con miembros de Botryosphaeriaceae, incluyendo cancro en ramillas y ramas principales, die-back, aborto de semillas, pudrición del cuello, ahogamiento o tizón de las plántulas, canchros en raíz, mancha azul y en casos graves, la muerte de los árboles enteros (Ahumada 2003, Bega et al., 1978, Brown & Britton 1986, Gure et al., 2005, Johnson et al. 1992, Lupo et al., 2001, Michailides 1991, Sánchez et al., 2003, Smith et al., 1994, Swart y Wingfield 1991).

3.2.4 Reportes de enfermedades causadas por especies de Botryosphaeriaceae en Chile.

El rápido crecimiento de las plantaciones de eucalipto comercial se ha traducido en un aumento de nuevas plagas y enfermedades. En Chile, las especies de *Botryosphaeria*, no han sido consideradas como patógenos severos en plantaciones de *Eucalyptus* (Ahumada 2003). En Chile solo se ha realizado un estudio referente al efecto de *Botryosphaeriaceae* en plantaciones comerciales de *E. globulus* y *E. nitens*, identificándose las especies *B. parva* Pennycook & Samuels, *B. eucalyptorum* Crous, H. Sm. ter & M.J. Wingf. y *Botryosphaeria* sp. (Ahumada, 2003), siendo aún insuficiente el conocimiento sobre su presencia y su potencial para causar enfermedad en plantaciones del país.

Contrariamente, existe mayor cantidad de información sobre el efecto de especies de Botryosphaeriaceae en especies frutales. Así por ejemplo, se han identificado *Diplodia seriata*, *D. mutila*, *B. dothidea* y *Spencermartinsia viticola* causando canchros y muerte regresiva, en viñedos de uva de mesa y *N. arbuti*, *N. australe* y *N. parvum* en plantaciones de arándanos. Probablemente, la especie más conocida en especies forestales presente en Chile es *Diplodia pinea* (= *Sphaeropsis sapinea*), que afecta las plantaciones de *P. radiata*, produciendo una muerte apical, marchitamiento de copa y manchado de madera (Chou 1987).

En los últimos años, en plantaciones de *E. globulus*, localizadas entre las regiones del Bío-Bío y de La Araucanía en Chile, se viene observando necrosis foliar, muerte de ramas y ramillas en la zona superior del tercio medio de la copa, junto con el ataque de insectos que se alimentan del follaje de los árboles. Estos síntomas se han ido agravando en las épocas estivales, siendo más severa en el verano 2012-2013. Algunos de los síntomas observados se han relacionado con ataque de especies de la familia Botryosphaeriaceae en *Eucalyptus* spp; como son canchro en ramillas y ramas, die-back.



4. Hipótesis

Especies de la familia Botryosphaeriaceae están asociados a muerte de ramas y ramillas en plantaciones de *E. globulus* en las regiones del Bío-bío y de La Araucanía y la agresividad de estos hongos es dependiente de una menor disponibilidad de agua en plantas de la especie.



5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar las especies de Botryosphaeriaceae asociados a la muerte de ramas y ramillas en árboles de *E. globulus*.

5.2 Objetivos específicos

Determinar las especies de hongos asociadas a ramas y ramillas con canchros y asintomáticas en árboles de *E. globulus*.

Determinar la patogenicidad de los hongos aislados en *E. globulus*.

Determinar el efecto de la disponibilidad de agua en *E. globulus* en la severidad de la enfermedad causada por especies de Botryosphaeriaceae.



6. Metodología

6.1 Colecta de muestras

Fueron muestreadas plantaciones de *E. globulus* entre 4-6 años de edad, localizadas en el valle central en las regiones del Bío-bío y la Araucanía, pertenecientes a la empresa Forestal Mininco S.A. Las colectas fueron realizadas en predios de cuatro sectores; Nacimiento (Sector 1) y Mulchén (Sector 2) en la Región del Bío-bío, y en Collipulli (Sector 3) y Angol (Sector 4) en la Región de La Araucanía; (Figura 1, Tabla 1). En cada sector se realizó una evaluación visual de tres árboles (distribuidos aleatoriamente dentro de cada predio) con síntomas consistente en defoliación, canchros y muerte de ramas en el tercio medio de la copa, realizando el volteo de los mismos (Figura 1b). De cada árbol se colectaron tres ramillas con síntomas (Figura 1c), tres asintomáticas y tres con síntoma y ataque de *Ophelimus* sp.

Se midió la altura de cada árbol volteado (con cinta métrica) y se colectaron las ramas/ramillas con tijeras de podar. Para cada árbol se registraron las coordenadas geográficas, la presencia de otros agentes causantes de daños (*Ophelimus* sp. y *Gonipterus platensis*) (Figura 1d) y la presencia de canchros tanto en ramas como tronco. Las ramas colectadas fueron depositadas en bolsas de plástico de 60 x 90 cm etiquetadas con los siguientes datos: número de sector, predio, número de parcela y tipo de ramilla. Posteriormente, las muestras se trasladaron al laboratorio de Patología Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción donde se mantuvieron a una temperatura de 4-5°C hasta su procesamiento.

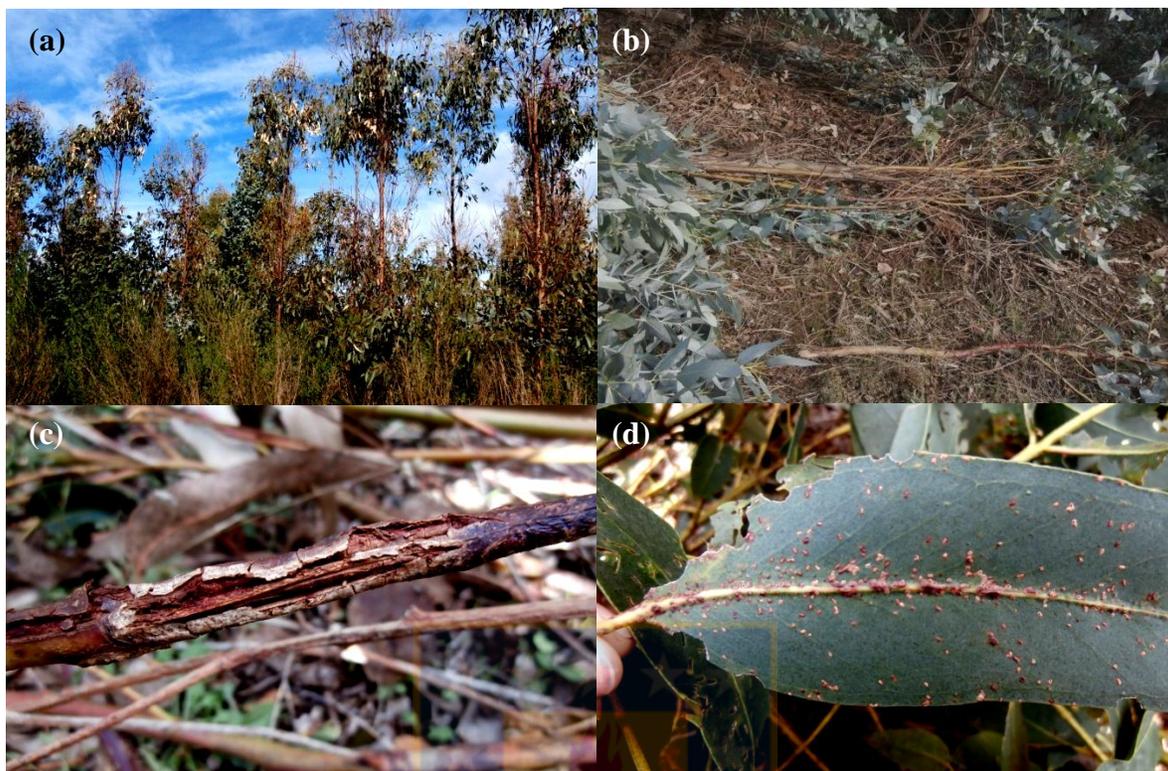


Figura 1. Plantación de *Eucalyptus globulus* con muerte de ramillas. Plantación de *E. globulus* en sector de Nacimiento (a), árbol volteado con defoliación en el tercio medio de la copa (b), cancro en ramilla (c) y hoja con ataque de *Ophelimus* sp. y *Gonipterus platensis* (d).

Tabla 1. Predios con plantaciones de *Eucalyptus globulus* muestreados en las Regiones del Bio-Bio y de La Araucanía.

Sector 1.	Sector 2.	Sector 3.	Sector 4.
Nacimiento	Mulchén	Collipulli	Angol
Pichún 5137	Santa Rosa de Chumulco	San Carlos Chico	Santa Rita Lote B
Santa Rosa 1556	Malven	Mininco	El Chequen
Junquillar	Despertar campesino	La Escuadra	Los Hinojos

6.2 Métodos de aislamiento de hongos

6.2.1 Aislamientos directos. Las ramas colectadas en terreno fueron sometidas a una desinfección superficial en etanol al 70% durante 30s, hipoclorito de sodio al 5% por 3 min y

enjuagues con agua destilada por 3 min. Se eliminó el excedente de agua con papel absorbente y los segmentos de ramillas se colocaron en cámara húmeda, consistente en placas de Petri con papel absorbente en su base humedecido en agua destilada estéril (ADE) para estimular la esporulación del hongo asociado a la ramilla. Durante el proceso, las muestras se dejaron en reposo a temperatura ambiente, que fluctuó aproximadamente entre 17-22°C.

Diariamente se realizaron evaluaciones con lupa estereoscópica del material dispuesto en las cámaras húmedas (Figura 2a), para comprobar la presencia de micelio y/o cuerpos fructíferos de hongos. Las estructuras fúngicas resultantes se transfirieron con aguja estéril a placas de Petri conteniendo medio de cultivo agar-papa-dextrosa (APD) con 100mg/L de sulfato de estreptomicina (SE), e incubadas a temperatura de 24°C.

6.2.2 Aislamientos indirectos. Se realizaron a partir de trozos de 10 x 10 mm obtenidos desde las zonas de avance de los canchales, como también desde ramillas y ramas asintomáticas. La desinfección superficial de los segmentos se realizó por inmersión en 70% de etanol durante 30s, hipoclorito de sodio al 5% durante 3 min y abundantes lavados con ADE. Los trozos se secaron con papel absorbente y fueron dispuestos en placas de Petri conteniendo medio agar-papa-dextrosa (APD) con 100mg/L de SE. Las placas se mantuvieron a una temperatura de 24°C hasta un periodo de tres semanas.

6.3 Caracterización morfológica

Para obtener estructuras reproductivas de los hongos aislados, discos de micelio colectados desde colonias creciendo activamente en medio APD fueron dispuestos en el centro de placas de Petri conteniendo agar-agua (AA) al 2%. Luego, sobre los discos de micelio se colocaron acículas de *P. radiata* y ramillas de eucalipto, las que previamente fueron desinfectadas superficialmente con etanol al 70% durante 30s., hipoclorito de sodio al 5% durante 3 min y lavados en ADE, para estimular la producción y fructificación de estructuras (picnidios) y conídias (Figura 2b). Las placas se mantuvieron cuatro semanas a una temperatura de 20°C, bajo un rango de luz ultravioleta cercano a la luz visible, hasta que se observaron las estructuras reproductivas en los órganos indicados (aproximadamente tres semanas después del cultivo) (Pérez et al., 2009).

Los aislamientos se caracterizaron inicialmente con base a la morfología del cultivo en APD. Los picnidios y conidias producidos fueron examinados en microscopio óptico (x400), añadiéndose azul de lactofenol para inhibir la germinación y mejorar la visualización para la medición de largo y anchos de las conidias. Para la identificación a nivel de género se utilizaron las claves de Barnett y Hunter (1998) y Sutton (1980). A nivel de especie, la identificación se comparó con aquellos trabajos publicados donde se realizó la identificación de las especies.

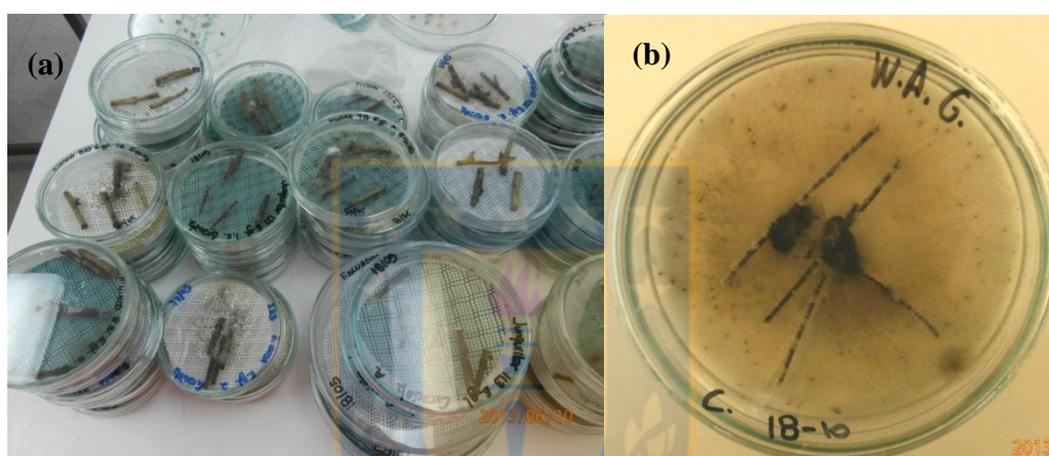


Figura 2. Método de aislamiento y esporulación. Cámaras húmedas con segmentos de ramillas de *Eucalyptus globulus* (a) y acículas de *Pinus radiata* sobre Agar-Agua a 20°C, con formación de picnidios de *Neofusicoccum parvum* (b).

6.4 Identificación molecular

6.4.1 Extracción de ADN. El ADN genómico se extrajo a partir del micelio de los aislados obtenidos, colectándose mediante raspaje con bisturí estéril desde colonias creciendo por una semana en APD y luego colocado en un tubo Eppendorf. El ADN se extrajo utilizando el Kit de extracción AXYGEN (Biosciences), de acuerdo al protocolo descrito para la purificación de ADN de tejidos de plantas y hongos.

6.4.2 Amplificación con PCR. La región genómica que codifica para el ARN ribosomal (rRNA) fue amplificada utilizando una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) a partir del ADN extraído de cada aislado. Se utilizaron los partidores ITS 5 (5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3') e ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') según Schoch et

al., (2012). La región amplificada incluye el extremo 3' del gen 18S del rRNA (subunidad menor), el primer espaciador transcriptor interno ITS1, el gen completo 5.8S del rRNA, el segundo espaciador transcriptor interno ITS2 y el extremo 5' del gen 28S del rRNA (subunidad mayor). Las mezclas de reacción de PCR contenían concentraciones finales de: 0,5 U de Taq ADN polimerasa (Taq polymerase Applied biosystem), 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 0,2 mM de cada partidor, 0,01mg/ml de BSA y 1 ng de ADN en un volumen final de 15 ul. El programa de PCR utilizado consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización (95°C durante 15 s), alineamiento (53°C durante 30 s) y elongación (72°C durante 90 s) y terminó con un paso de elongación final a 72°C durante 10 min. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con SYBR® Safe (Life Technologies) y se visualizaron bajo iluminación UV.

5.4.3 Secuenciación de ADN y análisis. Los fragmentos amplificados fueron aislados y enviados a secuenciar por el método de Sanger en Macrogen (Corea). Los resultados de la secuenciación de fragmentos se procesaron usando el programa Geneious (versión 4.8.5). Posteriormente, se realizó un BLAST en la página NCBI con el fin de encontrar homologías con otras secuencias reportadas (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi).

6.5 Pruebas de patogenicidad en terreno

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en árboles de *E. globulus* de tres años de edad, localizados en los predios Escuadrón (36°56'07.4"S 73°08'40.7"W) y Meñir (37°33'37.04"S 72°44'7.42"W). El primer predio se encuentra a 1.7 km de la costa y es infrecuente el problema de muerte de ramas y ramillas. Los suelos predominantes son de los órdenes Alfisoles (suelos con buen grado de evolución) e Inceptisoles (suelos de desarrollo incipiente). Son suelos derivados de terrazas marinas altas y de relieve plano a ligeramente inclinado y de colores pardos rojizos asociados con otros de menor evolución. En la vertiente poniente de la Cordillera de la Costa los suelos se han desarrollado directamente a partir de roca granítica (FAO). Por el contrario, el segundo predio se ubica en el valle central y ha presentado alta incidencia del problema (Comunicación personal Miguel Castillo 2014). El suelo aquí presente corresponde a Entisoles aluviales de desarrollo moderado junto a suelos de texturas

gruesas formados a partir de arenas gruesas basálticas, estos presentan una rápida permeabilidad, aun cuando hay sectores que presentan un nivel freático alto (FAO). Las condiciones climatológicas de precipitación y temperaturas para ambos predios, seis meses antes y durante las pruebas de patogenicidad fueron registrados como referencia para establecer diferencias en estas variables y un posible efecto de estrés en los árboles (Tabla 1A y 2A).

Fueron inoculadas una cepas de *N. parvum* (C) y tres cepas de *N. eucalyptorum* (B, F y L); dos con idénticas características referente a capacidad de esporulación y tamaño de conídias (B y L) y otra que no presentaba esporulación en condiciones *in vitro*. Las inoculaciones fueron realizadas en el tronco utilizando discos de micelio de los hongos en prueba. La superficie del tronco fue desinfectado superficialmente con alcohol etílico al 70%. Luego, a una altura de 1,30 m del árbol, se efectuó una herida con bisturí estéril hasta alcanzar la zona cambial. En cada herida fue colocado un disco de micelio obtenidos a partir de cultivos puros creciendo durante una semana en APD, a 24°C. Luego, la zona inoculada se cubrió con cinta transparente (Parafilm) para evitar la desecación y contaminación. En los árboles control se colocaron discos de APD estéril. Para cada cepa y control se realizaron tres repeticiones (árboles). Ambos ensayos se realizaron utilizando el mismo método de inoculación de forma aleatoria dentro de un sector de cada predio.

La evaluación se realizó 120 días después de la inoculación y consistió en medir el tamaño de la lesión (necrosis) en la zona cambial, raspando la corteza que presentaban síntomas externos. Desde cada árbol inoculado se recolectó tejido en la zona de avance de la lesión y fue cultivado de acuerdo a lo descrito anteriormente junto con la correspondiente identificación. Se utilizó el análisis de la varianza y test de comparaciones múltiples de Tukey (nivel de confianza 95%) para determinar diferencias significativas en el tamaño de las lesiones entre los tratamientos.

6.6 Pruebas de patogenicidad en invernadero.

Las pruebas de patogenicidad fueron realizadas, en el invernadero de la Facultad de Ciencias Forestales (Universidad de Concepción), entre los meses de Febrero y Marzo. Fueron utilizadas plantas de *E. globulus* de diez meses, que se trasplantaron a bolsas individuales de 25x40cm conteniendo sustrato de corteza de pino compostado. Se realizaron riegos diarios durante los meses previos a la inoculación.

6.6.1 Condición de riego Las plantas fueron sometidas a dos esquemas de riego, uno grupo con riego diario y el otro grupo con reducciones del riego (Figura 3) (Tabla 3A). Se evaluaron semanalmente durante un mes, variables fisiológicas de las plantas. Para tal efecto se seleccionaron cinco plantas de cada grupo midiéndose la conductancia estomática ($\text{mol/m}^2\text{s}$), capacidad fotosintética ($\text{umol/m}^2\text{/s}$) y transpiración ($\text{mmol/m}^2\text{/s}$) con un medidor portátil de fotosíntesis LI COR además de la eficiencia del uso del agua (EUA $\text{umol CO}_2\text{/mmol H}_2\text{O}$) utilizando la expresión de (Morales et al., 2004):
EUA= Fotosíntesis/Transpiración.

6.6.2 Inoculación. Se inocularon las mismas cepas utilizadas en las pruebas de terreno; *N. parvum* (C) y *N. eucalyptorum* (B, F, L) además de otras especies aisladas en la colecta de terreno; *Cytospora eucalypticola* (D), *C. cinereostroma* (E), *Diaporthe neotheicola* (O), *Eucasphaeria capensis* (R) y *Pestalotiopsis microspora* (T). Las inoculaciones fueron realizadas en el tallo utilizando discos de micelio de los hongos en prueba. La superficie del tallo fue desinfectado superficialmente con alcohol etílico al 70%. Luego, se efectuó una herida con sacabocados del número 3 estéril. En cada herida fue colocado un disco de micelio obtenidos a partir de cultivos puros creciendo durante una semana en APD, a 24°C excepto *E. capensis* cuyo cultivo puro creció durante dos semanas. Luego, la zona inoculada se cubrió con cinta transparente (Parafilm) para evitar la desecación y contaminación. En las plantas control se colocaron discos de APD estéril. Para cada aislado y control fueron inoculadas cinco plantas distribuidas aleatoriamente en cada uno de los dos. La evaluación se realizó 21 días después de la inoculación y consistió en medir el tamaño de la lesión (necrosis) y recolectar tejido desde la zona de avance de la lesión para corroborar el reisolamiento mediante la identificación realizada a cada aislado. Para el análisis estadístico se utilizó el análisis de la varianza y test de comparaciones múltiples de Tukey (nivel de confianza 95%)

para determinar diferencias significativas en el tamaño de las lesiones entre todos los tratamientos.

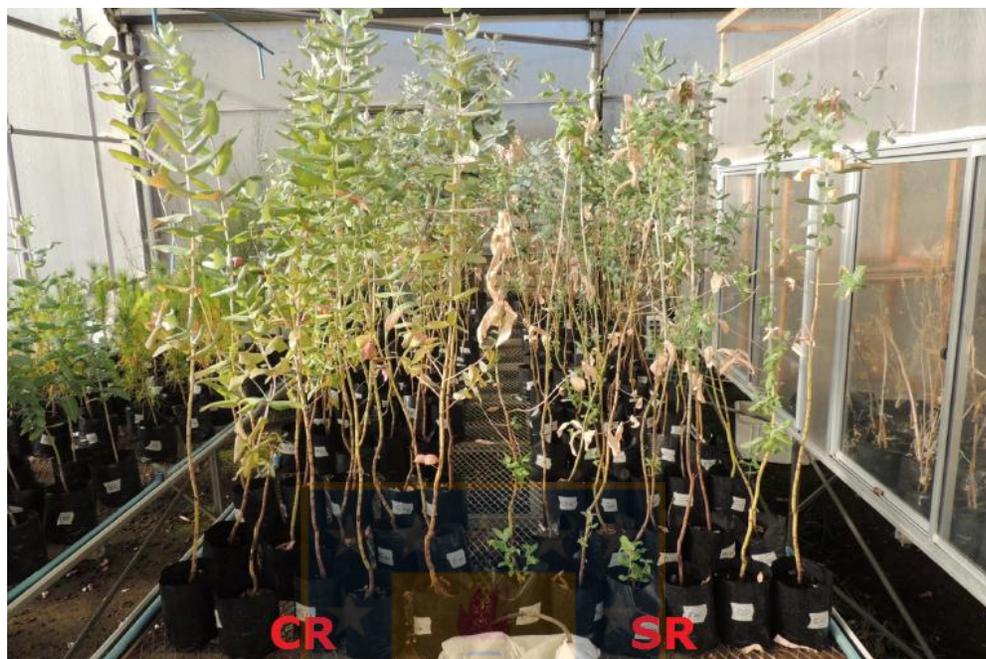


Figura 3. Plantas de *Eucalyptus globulus* en dos condiciones de riego. Riego diario (CR) y con reducciones del riego (SR).

7. Resultados

7.1 Aislados de hongos obtenidos de ramas de *E. globulus*.

De un total de 216 aislamientos realizados de forma directa e indirecta desde un mismo número de ramas colectadas, se obtuvieron un total de 134 aislados de hongos. En base a una caracterización morfológica que consideró crecimiento y morfología de la colonia, y tipo de esporas, se diferenciaron un total de nueve tipos, o morfotipos, los cuales correspondieron a mayoritariamente a especies de Botryosphaeriaceae y a otros tipos de hongos (Tabla 2).

La mayoría de los aislados correspondieron al género *Neofusicoccum* (42%), siendo obtenido con mayor frecuencia desde tejido sintomático (cancros) con presencia de ataque del insecto *Ophelimus* sp. (Figura 4). La frecuencia relativa de aislamientos de *N. eucalyptorum* para el sector 1 y 2 fue de 54% en ambos, 39% para el sector 3 y 11% para el sector 4, siendo el predio Santa Rosa (sector 1) el que registró un mayor número de aislados de esta especie. Entretanto la especie *N. parvum* sólo fue aislada en el predio Malven del sector 2 (Mulchén) con una frecuencia relativa del 9%, coincidiendo con el sector que presentó una mayor variedad de especies aisladas (Figura 5).

Tabla 2. Presencia de aislados de hongos obtenidos desde ramillas de *Eucalyptus globulus* según condición del tejido de aislamiento.

Especie	Condición de ramillas		
	Sintomática con <i>Ophelimus</i> sp.	Sintomática sin <i>Ophelimus</i> sp.	Asintomática
<i>Neofusicoccum parvum</i>		+	-
<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>	+	+	+
<i>Cytospora eucalypticola</i>	+	+	+
<i>Cytospora cinereostroma</i>	+	+	+
<i>Quambalaria cyanescens</i>	-	-	+
<i>Phomopsis theicola</i>	-	+	-
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	-	+	-
<i>Alternaria arborescens</i>	+	+	-
<i>Eucasphaeria capensis</i>	-	+	-

(+) Presencia, (-) ausencia.

Q. cyanescens fue la única especie detectada únicamente en tejido completamente asintomático con una frecuencia relativa del 8%. Por otro lado, *P. theicola* y *E. capensis* fueron aisladas solo desde tejido con síntomas y presencia del insecto en el sector 2, al igual que *P. microspora* (sector 4) todas ellas con frecuencias relativas menor al 5%.

Aunque en menor frecuencia, las dos especies de *Cytospora* aparecieron en las tres condiciones de ramillas y obtenidas en tres de los cuatro sectores. El resto de los hongos aislados presentaron menor frecuencia comparado con los géneros anteriormente mencionados.

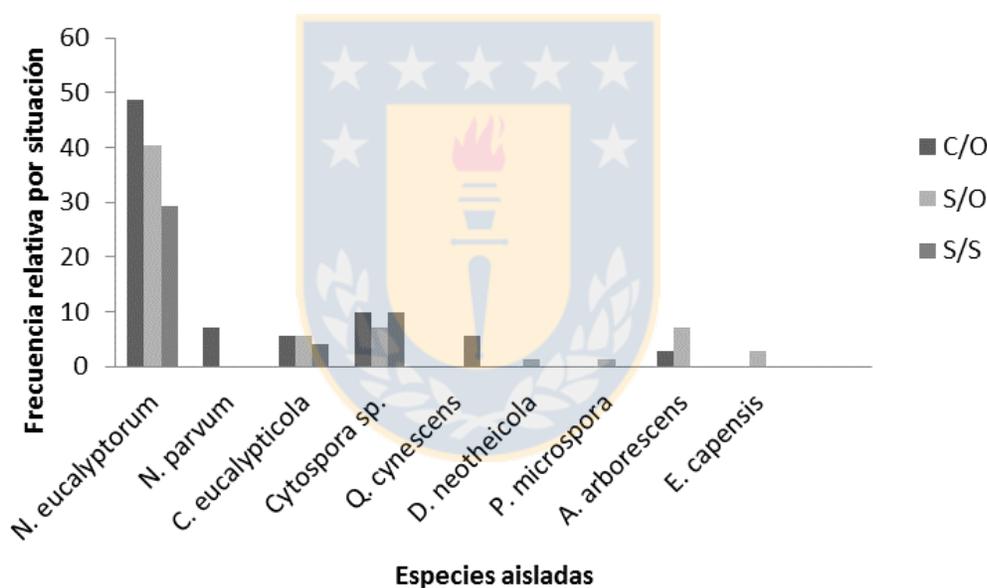
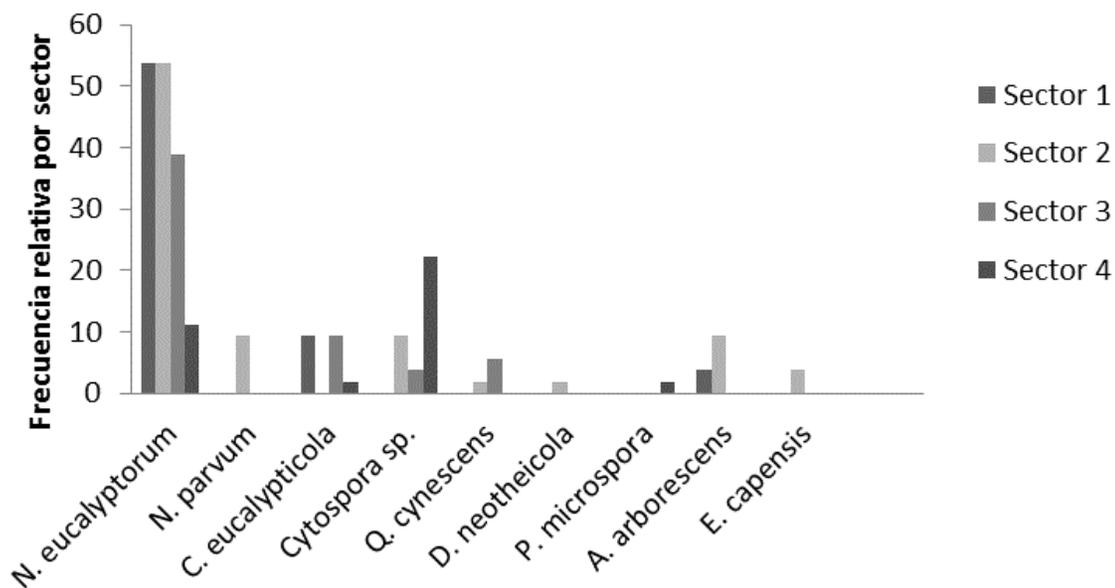
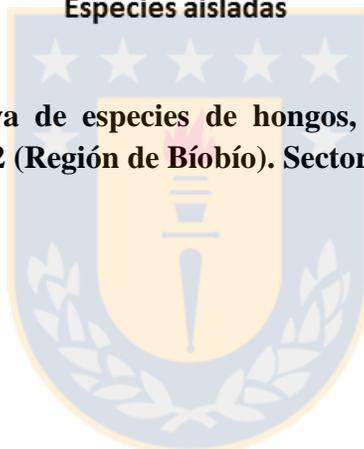


Figura 4. Frecuencia relativa de especies, respecto a la condición de aislamiento de la ramilla de *Eucalyptus globulus*, desde tejido sintomático con presencia de *Ophelimus* sp. (C/O), tejido sintomático sin presencia de *Ophelimus* sp. (S/O) y tejido asintomático sin presencia del insecto (S/S).



Especies aisladas

Figura 5. Frecuencia relativa de especies de hongos, respecto al sector desde donde fueron obtenidos. Sector 1 y 2 (Región de BíoBío). Sector 3 y 4 (Región de la Araucanía).



7.2. Caracterización e identificación de hongos aislados.

7.2.1 *Neofusicoccum parvum*. Se obtuvieron cuatro aislamientos de *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) aislados desde tejido sintomático con y sin ataque de *Ophelimus* sp. La colonia del hongo presentó micelio algodonoso blanco-grisáceo, que comenzó a oscurecerse desde el centro de la placa tornándose totalmente gris oscuro a partir del segundo día (Figura 6a). Después de dos a tres semanas de incubación, se desarrolló el estado anamorfo en la colonia, formándose conidiomatas (picnidios), globulosos uni o multiloculares, presentando en su interior conidias hialinas con paredes lisas, fusiformes a elipsoidales con la base redondeada y el ápice a menudo ligeramente aguzado. Las conidias presentaron entre uno a dos septos, con un largo de 15,77-24,88 μ m y ancho de 5,06-9,52 μ m, y con un promedio de 19,08 μ m x 7,37 μ m, respectivamente (Figura 6b). El resultado del BLAST presentó un 99% de identidad con la secuencia para *Neofusicoccum parvum* presente en el GenBank (Tabla 1A)

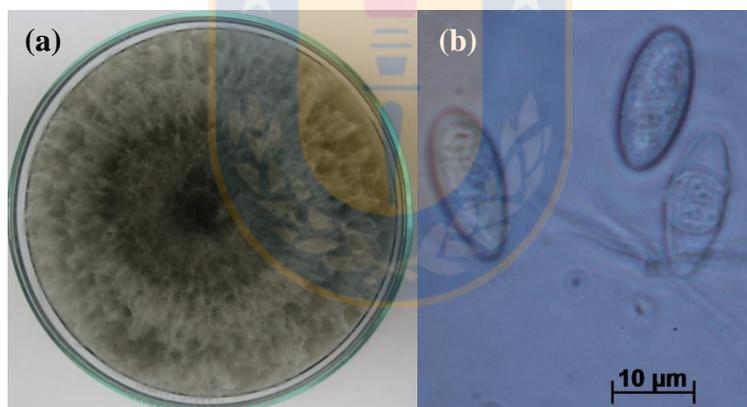


Figura 6. *Neofusicoccum parvum*. Morfología de la colonia creciendo en APD durante siete días a 20°C (a) y conidias hialinas (100x) (b).

7.2.2 *Neofusicoccum eucalyptorum*. Se obtuvieron un total de 85 aislamientos de esta especie. La colonia presentó un micelio algodonoso de color blanco que se fue tornado gris-oliváceo desde el centro a partir de los 6-7 días (Figura 7a, b).

Se obtuvo la fase de teleomorfo a partir de la cual se visualizaron los Conidiomatas (Picnidios) globulosos uni o multiloculares, presentando una masa estromática con conidias fusiformes a claviformes, hialinas con paredes lisas y aseptadas. La base de las conídias es redondeada y con un ápice a menudo obtuso (Figura 7c). El rango de mediciones para esta cepa fue de 25,9-31,77 μm de largo x 6,69-9,73 μm de ancho, con un Pomedio de 29,28 x 8,78 μm , respectivamente. No se obtuvo esporulación de la cepa con menor crecimiento de la colonia, bajo las mismas condiciones de incubación. El resultado de la secunciación de la región ITS obtuvo un 99% de identidad con *N. eucalyptorum* presente en GenBank (Tabla 1A).

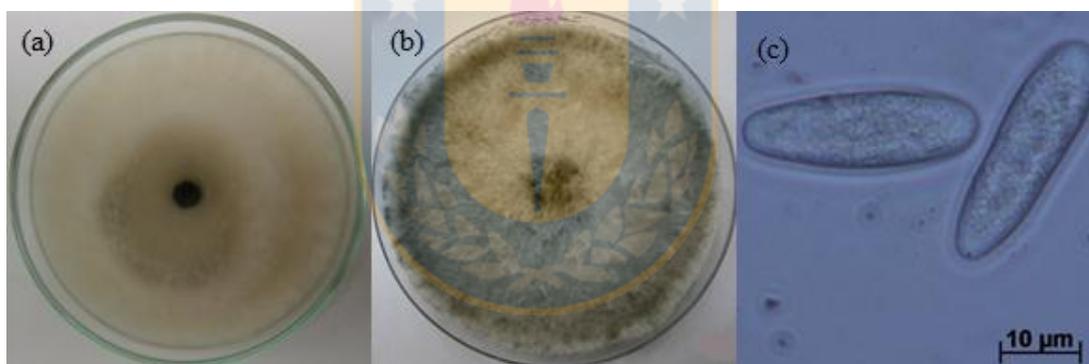


Figura 7. *Neofusicoccum eucalyptorum*. Morfología de la colonia, creciendo 7 (a) y 14 días (b) en agar-papa-dextrosa, a 20°C. Conidias de *N. eucalyptorum* (x100) (c).

7.2.3 *Cytospora cinereostroma*. Se obtuvieron un total de 19 aislamientos de *Cytospora cinereostroma* desde tejido sintomático con y sin presencia de *Ophelimus* sp. y desde tejido asintomático. La colonia del hongo creciendo en medio PDA presentó micelio amarillo claro con bordes amarillo-grisáceos volviéndose a una tonalidad oliva-marrón. El reverso de la placa presentó una coloración verde olivácea intensa a negro de textura aterciopelada y ligeramente elevado con zonas sin crecimiento (Figura 8a). Las conidias se formaron después de dos a tres semanas bajo luz negra, y fueron hialinas, gutuladas, aseptadas y reniformes, y tuvieron un largo de entre 3,65-5,86 μm y 1,16-2,33 μm de ancho, con un promedio de 4.33 x 1.74 μm , respectivamente (Figura 8b). El resultado de la secunciación presentó un 98% de identidad con la secuencia para el estado sexual *Valsa cinereostroma* presente en GenBank (Tabla 1A).

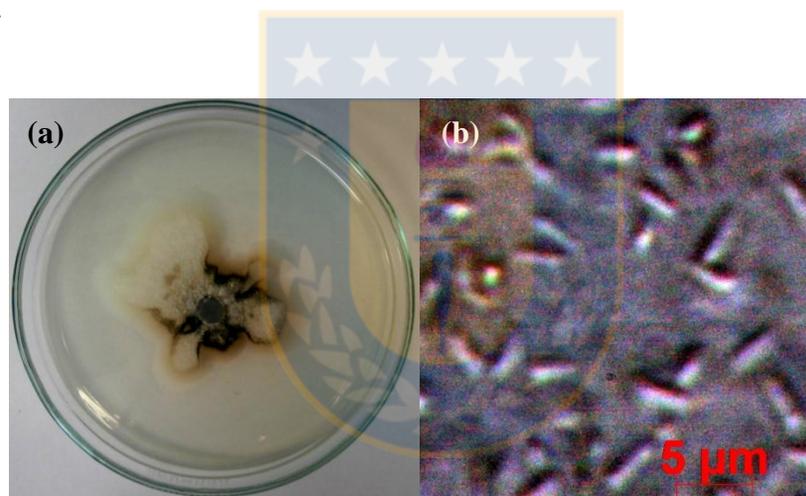


Figura 8. *Cytospora cinereostroma*. Colonia de siete días a 24°C creciendo en APD (a). Conidias de *C. cinereostroma* (b).

7.2.4 *Cytospora eucalypticola*. Se obtuvieron once aislamientos desde tejido sintomático con y sin presencia de *Ophelimus* sp. y tejido asintomático. En medio de cultivo se obtuvo el anamorfo *Cytospora eucalypticola* (Van der Westh. 1965) según identificación molecular. La colonia comenzó a formar un micelio blanco-beige, aterciopelado y ligeramente elevado que cubrió la placa Petri entre los 7-10 días a 24°C. Con el paso de los días la colonia se volvió gris-oliváceo y completamente marrón-oliva oscuro con el envejecimiento de la colonia. El reverso de las colonias de varias semanas presentó una coloración negra (Figura 9a, b). El resultado de la secenciación de la región ITS obtuvo un 100% de identidad con la secuencia para el estado asexual *Cytospora eucalypticola* presente en GenBank (Tabla 1A).

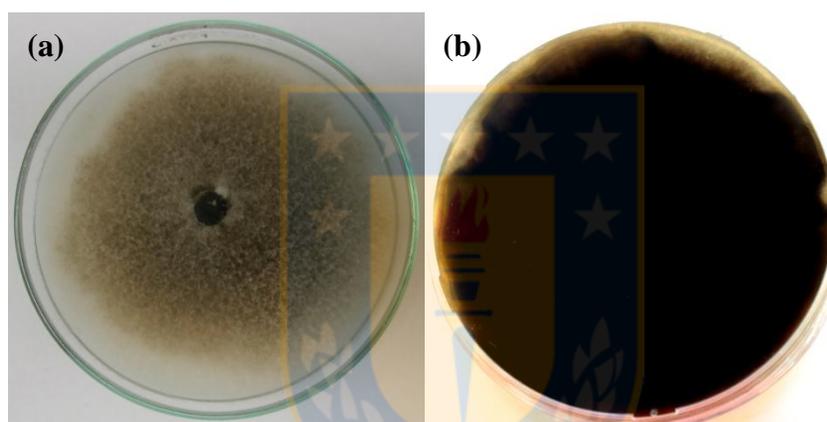


Figura 9. *Cytospora eucalypticola*. Colonia de *C. eucalypticola* de siete días a 24°C creciendo en APD (a). Reverso de una colonia con cuatro semanas (b).

7.2.5 *Phomopsis theicola*. Se obtuvo un aislado de *Phomopsis theicola* (Curzi 1927) desde tejido sintomático y sin presencia de ataques de *Ophelimus* sp. La colonia obtenida en medio PDA presento un micelio compuesto por hifas hialinas y tabicadas, ligeramente elevado que se volvió más espeso, denso y lanoso con el envejecimiento. Predominantemente de color blanco, con una tonalidad sepia. El reverso la colonia presentó una coloración amarillenta con parches pardo-negruzcos coincidentes con las masas picnidiales de superficie. El crecimiento de la colonia alcanzó la totalidad de la placa entorno a los siete días en oscuridad (Figura 10a). Colonias de 15 días bajo luz negra comenzaron a formar conidiomatas picnidiales multiloculares negros tanto agrupados como dispersos e inmersos en el medio. La masa conidial emergió tanto en forma de gotas blanco-amarillentas como en forma de cirros amarillo-marrón (Figura 10b).

Alfa conidias hialinas, elipsoidales con ápices redondeados con un rango de longitud de 7,16-9,55 μm x un ancho de 2,35-3,72 μm y un promedio de 8,26 x 2,85 μm Las beta conidias hialinas y ligeramente curvadas presentaron un rango de 26,04-32,55 μm de largo x 0,94-1,58 μm de ancho, con un promedio de 29,10 x 1,36 μm , respectivamente (Figura 10c). El resultado de la secunciación obtuvo un 100% de identidad con la secuencia para *Diaporthe neotheicola* presente en GenBank (Tabla 1A).

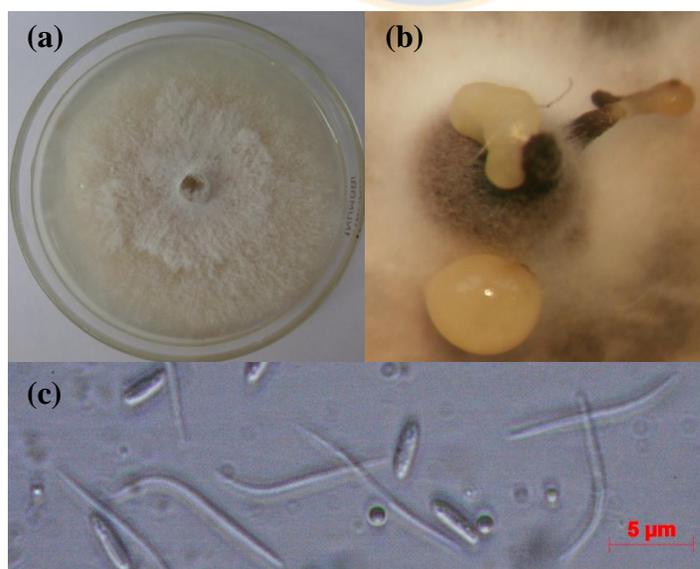


Figura 10. *Phomopsis theicola*. Colonia de *P. theicola* de siete días a 24°C creciendo en APD (a). Masa conidial emergiendo de un picnidio de *P. theicola* (b). α y β conidias (x100) (c).

7.2.6 *Quambalaria cyanescens*. Se obtuvieron cuatro aislamientos con morfología concordante a *Quambalaria* spp. La colonia presentó micelio irregular con textura harinosa, aterciopelada, de coloración blanquecina con partes púrpuras (visible en el reverso en colonias de más de dos semanas) que se tornan azul con el envejecimiento de la colonia, debido a la sensibilidad al pH del pigmento que se difunde por el agar (Figura 11a,b). Las hifas son hialinas y tabicadas, con células conidiogénicas terminales y laterales, formándose las conidias por crecimiento simpodial. Las conidias obtenidas son hialinas, elipsoidales, ovaladas con un rango de 2.86-5.51 μm de largo x un rango de 2.28-3.58 μm de ancho (Figura 11c). El resultado de la secunciación de la región ITS obtuvo un 99% de identidad con la secuencia para *Quambalaria cyanescens* presente en GenBank (Tabla 1A).



Figura 11. *Quambalaria cyanescens*. Colonia de *Q. cyanescens* de catorce días a 20°C creciendo en APD (a). Reverso de colonia de tres semanas con pigmentación azul (b). Conidas de *Q. cyanescens* (x100) (c).

7.2.7 *Alternaria arborescens*. Se obtuvieron cuatro aislamientos con morfología concordante a *Alternaria* spp. La colonia algodonosa y elevada presentó un micelio verde aceituna oscuro con el borde de crecimiento entre blanco y gris con abundante esporulación en medio PDA a 24°C (Figura 12a), para luego tornarse pardo-grisácea. En medio Agar Zanahoria (AZ) la colonia presentó un micelio marrón oscuro desde el principio. Desde colonias de AZ se observaron conidióforos largos sobre los que se ramificaron en forma simpodial cadenas de conidias (Figura 12b). Las dictiosporas, presentaron septos tanto longitudinales como transversales (Figura 12c, d). El resultado del BLAST obtuvo un 100% de identidad con la secuencia para *Alternaria arborescens* presente en GenBank (Tabla 1A).

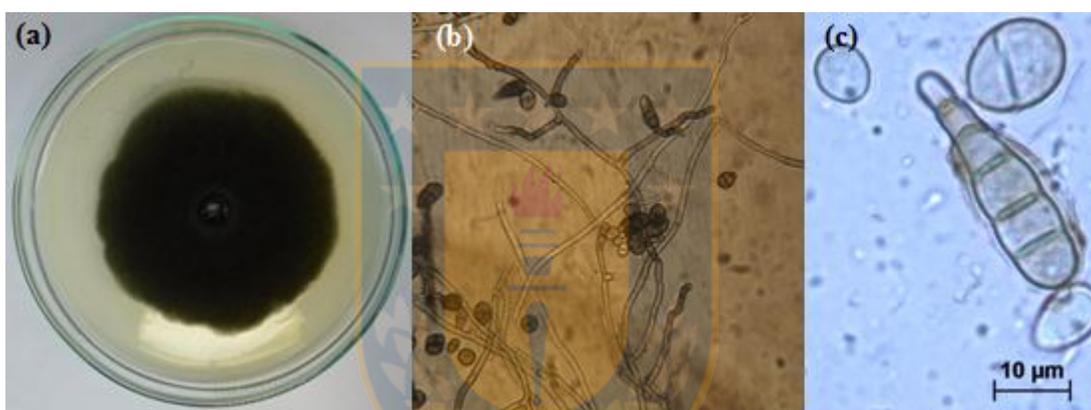


Figura 12. *Alternaria arborescens*. Colonia de *A. arborescens* de siete días a 20°C creciendo en APD (a). Ramificación de conidióforos (b) y conidias (100x) (c).

7.2.8 *Eucasphaeria capensis*. Se obtuvieron dos aislados de *E. capensis* desde tejido sintomático sin presencia de *Ophelimus* sp. en *E. globulus*. La colonia en medio PDA a 24°C presentó un lento crecimiento con escaso micelio aéreo, con coloración anaranjada (Figura 13) y márgenes lisos de color crema. El resultado de la secunciación obtuvo un 98% de identidad con la secuencia para *Eucasphaeria capensis* presente en GenBank (Tabla 1A).

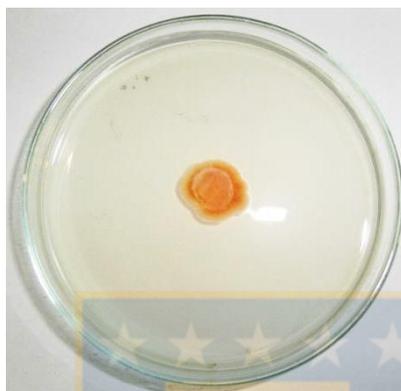


Figura 13. Colonia de *Eucasphaeria capensis* de siete días, creciendo en medio PDA a 24°C.

7.2.9 *Pestalotiopsis microspora*. Se obtuvo un aislado de esta especie, desde tejido sintomático sin presencia de *Ophelimus* sp.. La colonia en medio PDA presentó un micelio beige pálido y azafranado en el reverso. El crecimiento del cultivo fue de 75 mm a los siete días (Figura 14a,b). Después de una semana se formaron masas de esporas de color negro bajo condiciones de luz a 20°C. Las conidias poseían cinco células, siendo la apical y basal hialinas. Las tres células centrales variaron en diferentes tonalidades de marrón y el rango de los apéndices observado fue de 3-4. El rango de longitud de las conidias varió de (17,14) 20,24-27,88 (30,73) μm x 4,29-5,36 μm de ancho. El apéndice basal hialino presentó un rango de longitud de (3,85) 4,09-6,35 (7,46) μm siendo mayores los apéndices superiores, con longitud de (8,52)10,03-16,88(17,42) μm (Figura 14c). El resultado de la secuenciación de la región ITS obtuvo un 99% de identidad con la secuencia para *P. microspora* presente en GenBank (Tabla 1A).

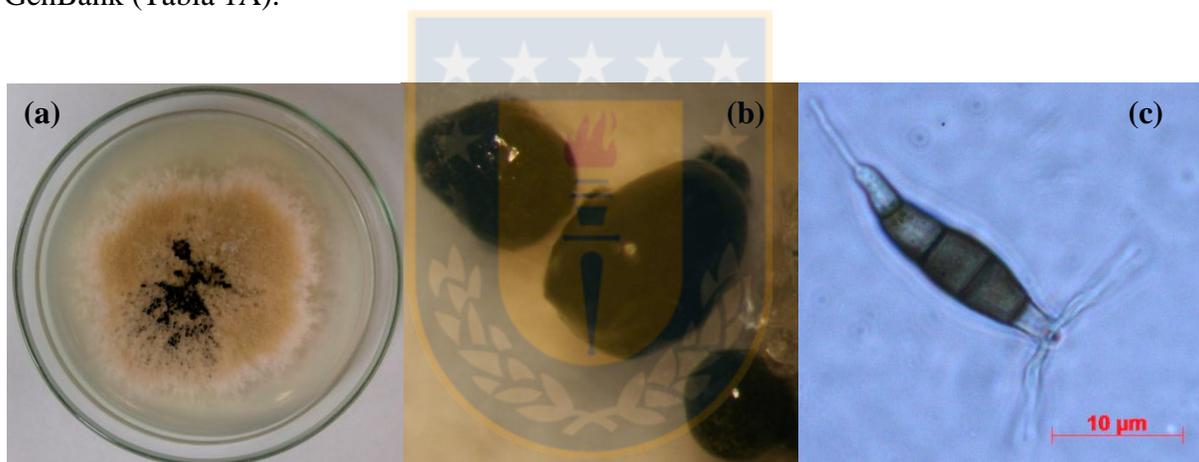


Figura 14. *Pestalotiopsis microspora*. Colonia de *P. microspora* de siete días a 20°C bajo luz creciendo en APD (a). Picnidios (b) y conidias (100x) (c).

7.3 Pruebas de patogenicidad en terreno.

En el Predio Escuadrón los cuatro aislados inoculados causaron canchros en los tallos de *E. globulus* (Figura 15). El aislado *N. parvum* (C) T2 fue el más agresivo, presentando los canchros de mayor longitud, contrariamente, el aislado *N. eucalyptorum* (F) T3 provocó los canchros de menor longitud. Las cepas *N. eucalyptorum* (B y L) T1 y T4 fueron presentaron comparativamente con las otras cepas un nivel de agresividad intermedio (Figura 16).



Figura 15. Inoculaciones en árboles de *Eucalyptus globulus* de tres años de edad en el predio Escuadrón. Control inoculado con APD estéril (a). Cancro causado por *Neofusicoccum eucalyptorum* T3 (b) y *N. parvum* T2 (c).

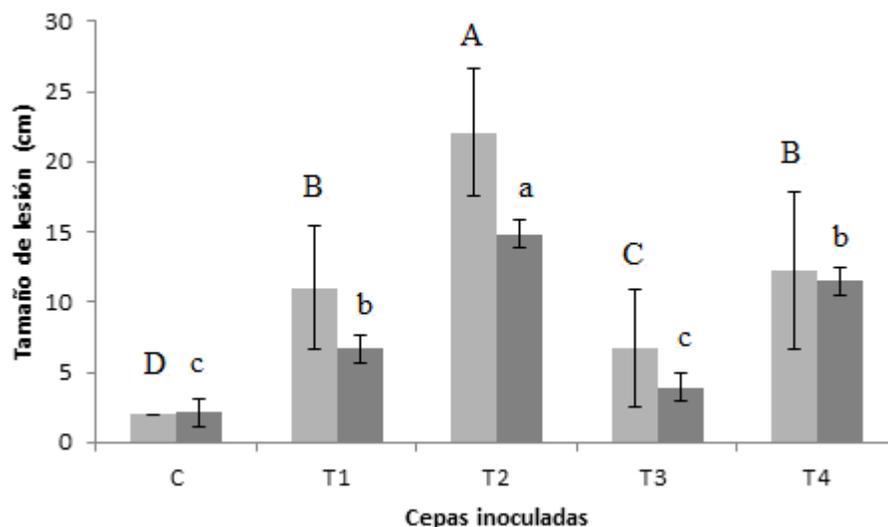


Figura 16. Tamaño de lesión en árboles de *Eucalyptus globulus* inoculados con *Neofusicoccum eucalyptorum* (T1, T3 y T4) y *N. parvum* (T2), localizados en los predios Escuadrón (gris claro) y Meñir (gris oscuro). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas (95%) entre tratamientos en predio Escuadrón y letras minúsculas en predio Meñir.

Para el Predio Meñir todos los aislados inoculados, a excepción de *N. eucalyptorum* T3, provocaron canchros en los tallos. El aislado de *N. parvum* T2, presentó los canchros de mayor longitud, entretanto los aislados T1 y T4 tuvieron tamaños de lesión semejantes aunque menores que *N. parvum* T2 (Figura 17).



Figura 17. Inoculaciones en fustes de *Eucalyptus globulus* de cuatro años de edad en el predio Meñir (Nacimiento). Control inoculado con APD estéril (a). Cankro cuasado por *Neofusicoccum eucalyptorum* T1 visualizado como depresión del tronco (b) y cancro causado por *N. eucalyptorum* T4 (c).

Todos los controles mostraron un área circular entorno a la herida de inoculación necrótica debido a la oxidación del tejido desde los cuales no se han re-aislado cepas patogénicas. Del resto de árboles inoculados se re-aislaron respectivamente, cada una de los cuatro aislados previamente inoculados. La comparación de los re-aislamientos se corroboró morfológicamente a nivel de colonia para todas las cepas.

7.4 Pruebas de patogenicidad en invernadero.

7.4.1 Evaluación variables fisiológicas de las plantas. Los valores de conductancia estomática se mantuvieron un rango de 0.1 a 0.4 mol/(m²s) para ambas condiciones de riego (Figura 17), siendo valores normales para especies de *Eucalyptus*. En las plantas con menor riego, tienden a ir disminuyendo con las semanas.

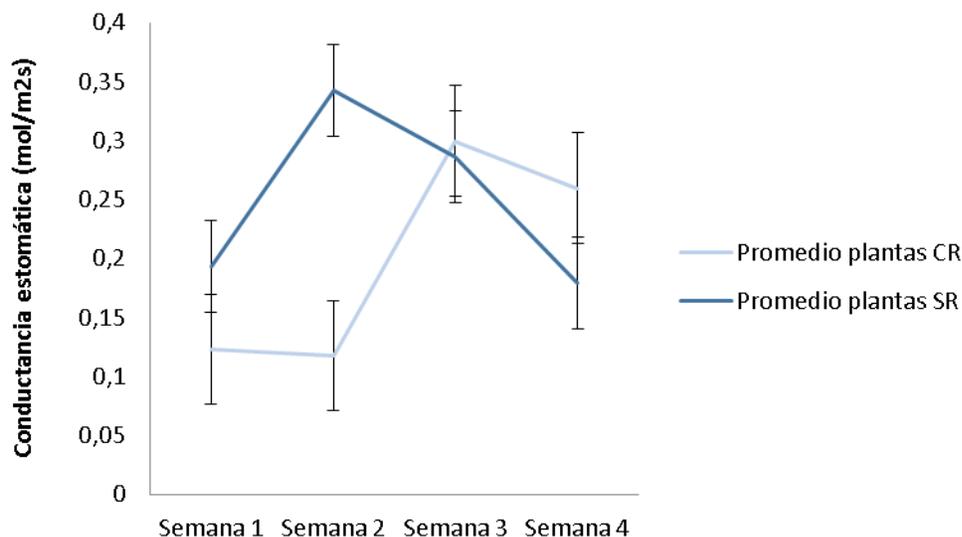


Figura 18. Conductancia estomática en plantas de *Eucalyptus globulus*.

La fotosíntesis en las plantas varió entre 6 y 10 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), similares entre ambos grupos de plantas (Figura 18), por lo que el grupo de plantas con reducción de riego no estaría manifestando una condición de estrés (hídrico) por ser valores aceptables bajo condiciones normales para especies de *Eucalyptus*.

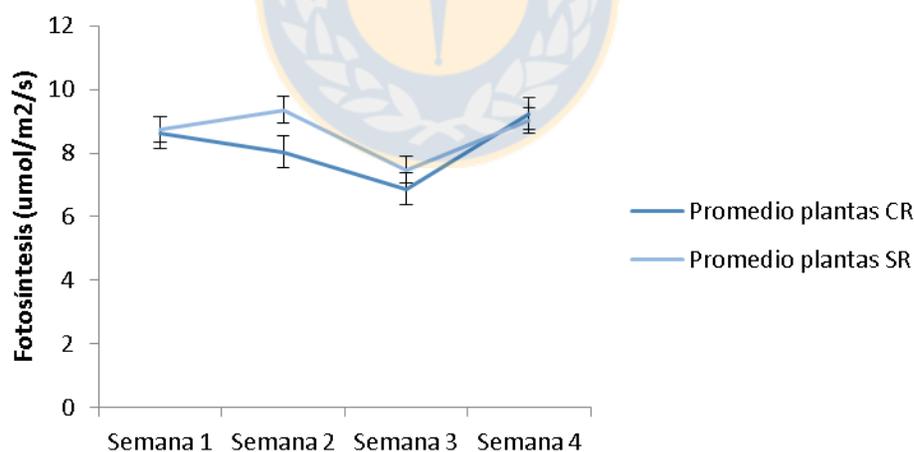


Figura 19. Actividad fotosintética en plantas de *Eucalyptus globulus*.

La tasa de transpiración en las plantas con riego diario (Figura 19) aumentó a lo largo del ensayo. El bloque con reducción de riego (Figura 19), muestra valores que no corresponden a condiciones de estrés moderado o severo.

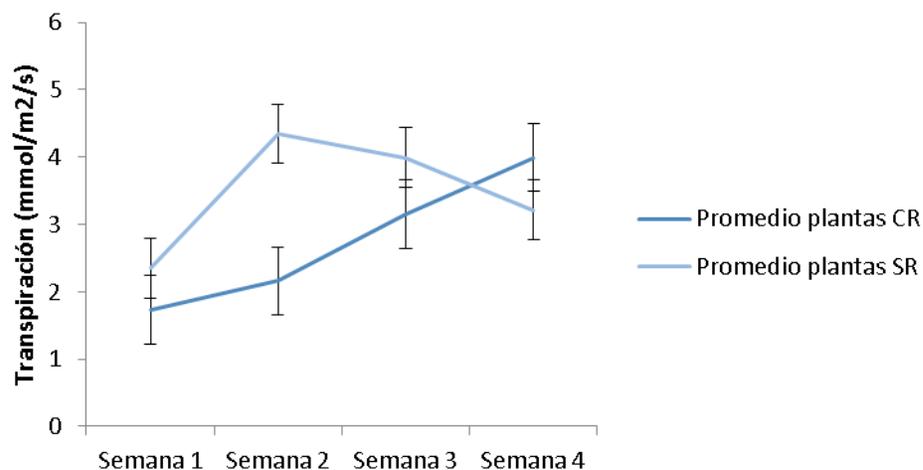


Figura 20. Transpiración de las hojas en plantas de *Eucalyptus globulus*.

Los valores de la eficiencia del uso del agua (EUA) tendieron a disminuir, sin embargo, en la última semana, se observó una tendencia en aumento (Figura 20), atribuyéndose a la necesidad de la planta de una mayor disponibilidad de agua y por tanto volviéndola más eficiente en el uso de esta (Begg y Turner, 1976; Zhang, Marshall y Fins, 1996; Brady y Weil, 1999). Por tanto, a mayor déficit hídrico, mayor será también los valores de EUA obtenidos.

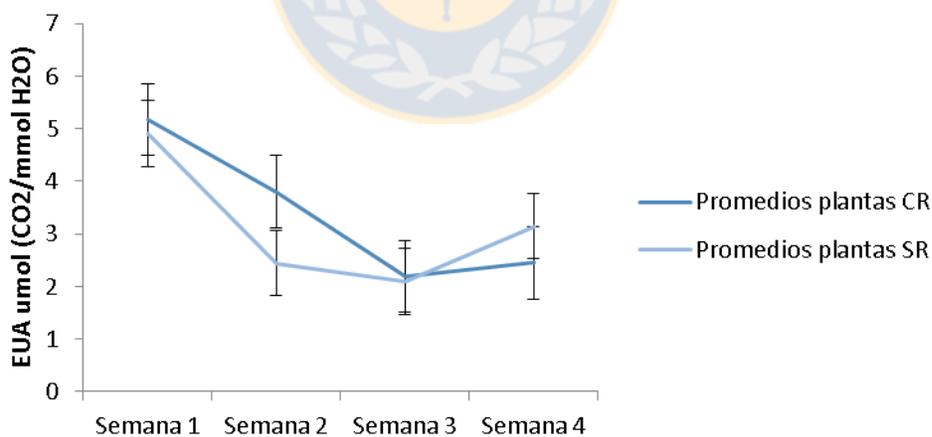
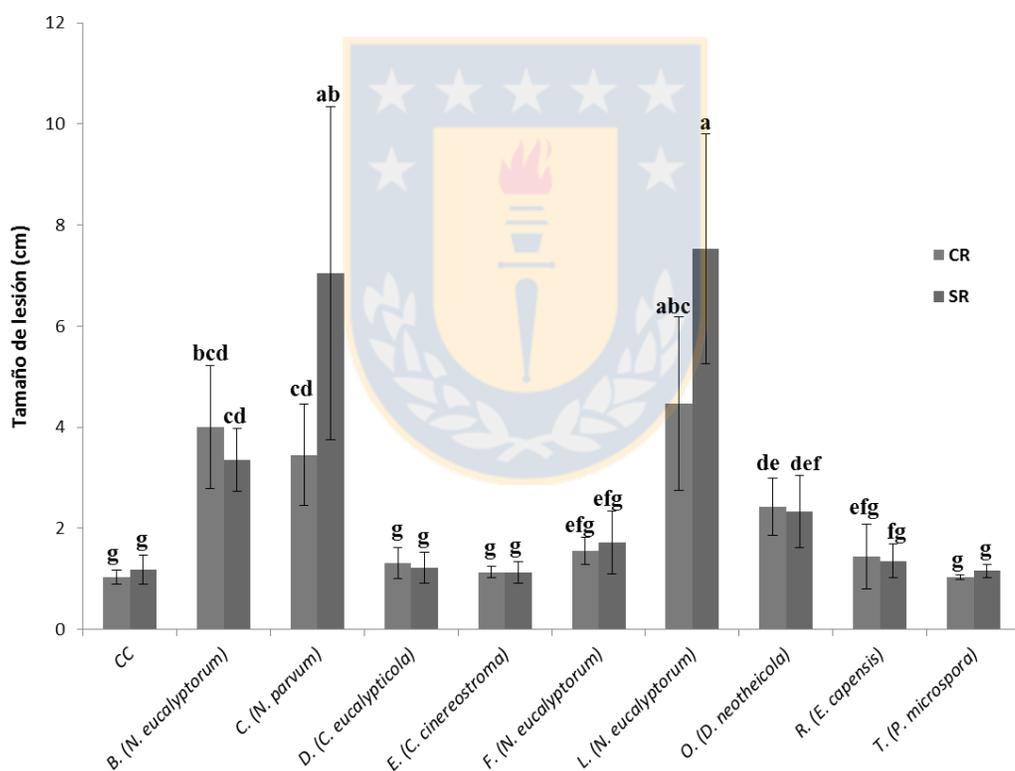


Figura 21. Eficiencia del uso del agua (EUA) en plantas de *Eucalyptus globulus*.

Se observaron otros cambios fisiológicos como la pérdida de turgencia y expansión de las hojas, marchitez y abscisión de las hojas basales.

7.4.2 Patogenicidad en plantas. Los nueve aislados inoculados originaron lesiones en ambos grupos de plantas sin ser el tamaño de estas significativo. En ambas condiciones de riego, las especies de *Neofusicoccum* fueron las que causaron mayor tamaño de lesión, aunque solo *N. parvum* fue el único aislado que presentó diferencias significativas entre ambos bloques, siendo la lesión mayor en las plantas con reducción de riego. De las cuatro cepas de *Neofusicoccum* inoculadas, solo el aislado *N. eucalyptorum* (F) no fue patógeno en las plantas de *Eucalyptus* en ambas condiciones de régimen hídrico, al igual que las especies de *Cytospora* (E y D), *Eucasphaeria capensis* (R) y *Pestalotiopsis microspora* (T). Del mismo modo que las especies de *Neofusicoccum* (B, C y L) el hongo *P. neotheicola* (O) demostró patogenicidad en *E. globulus* pero sin evidencias significativas entre ambos bloques. (Figura 22,



24).

Figura 22. Tamaño de lesión en plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas con *Neofusicoccum eucalyptorum* (B, F y L), *N. parvum* (C), *Cytospora eucalypticola* (E), *C. cinereostroma* (D), *Phomopsis neotheicola* (O), *Eucasphaeria capensis* (R) y *Pestalotiopsis microspora* (T) en invernadero. Plantas con riego diario (CR) y con riego restringido (SR). Letras indican diferencias significativas (95%) entre tratamientos.

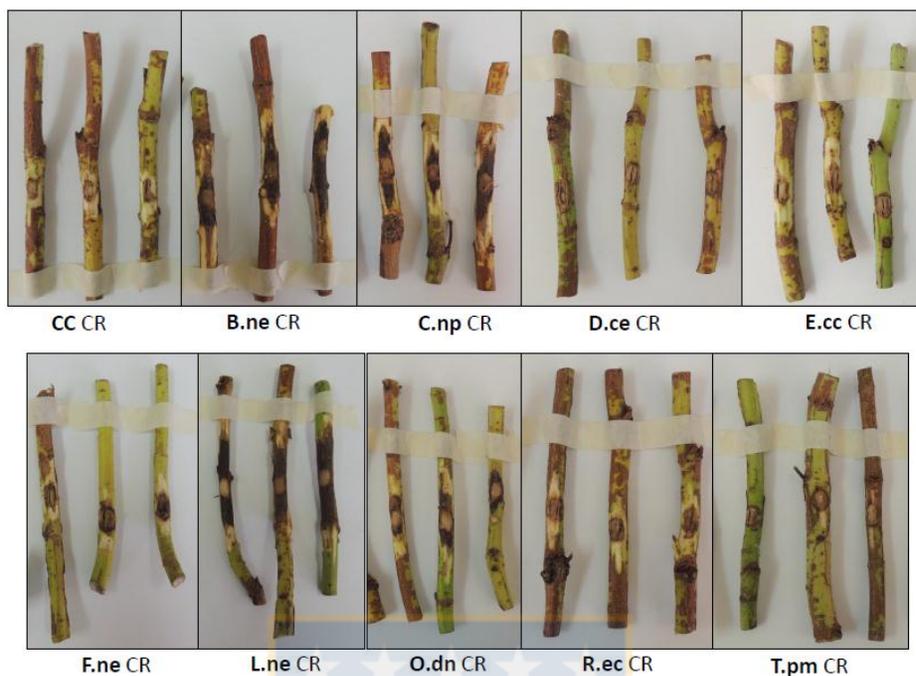


Figura 23. Cancros en tallos de *Eucalyptus globulus* bajo condiciones de riego diario (CR). Primera letra mayúscula indica identificación de la cepa. CC es control.

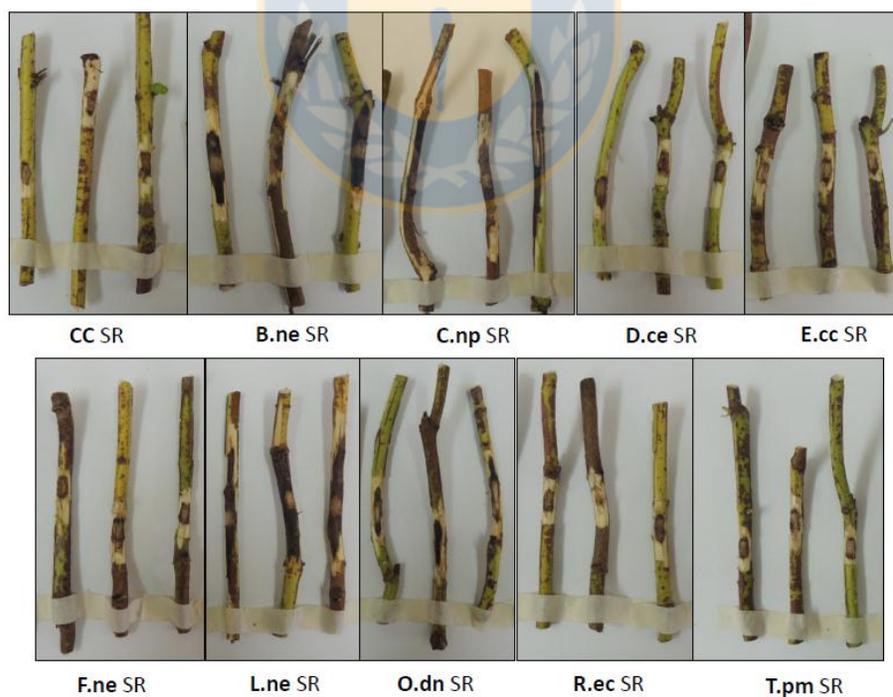


Figura 24. Cancros en tallos de *Eucalyptus globulus* bajo condiciones de restricción de riego (SR). Primera letra mayúscula indica identificación de la cepa. CC es control.

8. Discusión

Del total de los nueve morfotipos identificados, el 42% correspondió al género *Neofusicoccum* siendo *N. eucalyptorum* la especie identificada con mayor frecuencia en los aislamientos realizados y en todos los sectores muestreados. Aunque con un número mayor de aislamientos desde tejido infectado por el insecto *Ophelimus* sp. para esta especie, no hay diferencias que indiquen una relación entre ambos. *N. parvum* fue la única especie aislada desde tejido infectado por el insecto y desde un mismo sector aunque se desconoce una relación hongo-patógeno en ambas especies como puede ser el caso de los escarabajos de ambrosia, donde la relación entre hongo e insecto es mutualista, ya que los primeros se benefician del transporte de esporas e introducción dentro de la madera (Parra et al., 2001) o el caso de la asociación entre escarabajos de corteza y hongos manchadores como los Ophiostomatales (Harrington 1993). En ambos casos, el hongo estaría comportándose como alimento o manchando pero no causando un daño estructural de la madera aunque Berryman (1972) sugiere que algunas especies de *Ophiostoma* asociadas a estos escarabajos son fitopatógenos, es decir, causan lesiones alrededor de las zonas de ataque del escarabajo y colonizan la abura con el fin de propiciar un ambiente adecuado para la cría de escarabajo y por consiguiente la muerte del tejido del árbol. En el género *Cytospora* se aislaron ambas especies desde tejido infectado por *Ophelimus* sp. en una frecuencia similar a los aislamientos desde tejidos tanto asintomáticos como sin presencia del insecto.

Las inoculaciones efectuadas en plantas y árboles de *E. globulus* confirmaron la patogenicidad de *N. parvum* y *N. eucalyptorum*. Ambas especies, incluida la cepa de *N. eucalyptorum* cuyo crecimiento es más lento y sin esporulación, tienen la capacidad de infectar y producir canchales en troncos de árboles de esta especie, por lo que estas pueden estar contribuyendo a los síntomas detectados en campo donde se realizó el muestreo. La expresión de enfermedades de Botryosphaeriaceae está casi exclusivamente asociada con muchas formas de estrés en los árboles (Blodgett and Stanosz 1995; Ma et al., 2001; Stanosz et al., 2001; Slippers and Winfield 2007).

El primer reporte de *B. eucalyptorum* y *B. parva* causando patogenicidad (teleomorfos de *Neofusicoccum eucalyptorum* y *N. parvum*) en plantaciones de *Eucalyptus* en Chile fue en

2003 mediante el trabajo de Ahumada. En él, confirma que *B. parva* fue la especie que originó en promedio las lesiones de mayor tamaño en las inoculaciones llevadas a cabo en su estudio, concordando con los resultados obtenidos para este trabajo en que las lesiones de *N. parvum*, en ambos predios, fueron mayores que las obtenidas para los aislados de *N. eucalyptorum*. Este resultado concuerda con lo obtenido por Smith et al., (2001) y Ahumada (2003) sobre la capacidad de *B. eucalyptorum* de originar tamaños de lesión menores que los formados por otras especies del mismo género.

La cepa *N. eucalyptorum* aislada en los cuatro sectores muestreados, ha presentado diferencias en algunos de los aislamientos realizados en dos predios del sector 1 (Nacimiento) y un predio del sector 3 (Collipulli) respecto al resto de aislamientos de esta misma especie. Estas diferencias pasan por ser cepas cuyo crecimiento es más lento y no esporulan bajo las mismas condiciones que los aislamientos de esa misma especie en otros predios.

Smith et al., (2001) reportaron la patogenicidad de *N. eucalyptorum* mediante la inoculación de cinco aislados obtenidos desde *E. grandis* y *E. nitens* sobre clones de *E. grandis* (ZG14), no encontrando diferencias en agresividad entre los aislados. Por el contrario, este estudio muestra diferencias significativas en la patogenicidad de cepas de la misma especie. Perez et al., (2009) reportan la capacidad de originar canchros de diferentes aislados de *N. eucalyptorum* obtenidos desde Mirtaceae nativas y árboles de *Eucalyptus* sobre clones de *E. grandis*, encontrando diferencias significativas en los tamaños de lesión entre aislados siendo aquellos provenientes de hospederos nativos los que producen una mayor lesión.

En Chile, existen reportes de estas especies causando canchros en cultivos, *N. parvum*, *N. arbuti* y *N. austale* en arándanos Latorre et al., (2012). El hongo *N. eucalyptorum* ha sido reportado en Uruguay como endófito en *E. globulus* y aislado también desde lesiones de corteza, Alonso (2004). *N. eucalyptorum* y *N. parvum* han seguido reportándose en los últimos años en diferentes partes del mundo donde existen plantaciones de *Eucalyptus* Pillay et al., (2013) con aislamientos de varias especies de Botryosphaeriaceae, entre las que se encuentran las descritas en este trabajo, desde *E. grandis* y *Syzygium cordatum*

Basándonos en estudios reportados en otros países sobre la capacidad endófito de especies de *Botryosphaeria* y sus estados asexuales, además de la falta de trabajos sobre *Myrtaceae* nativas chilenas, sería posible plantear un salto de hospedero de estas especies fúngicas entre *Myrtaceae* nativas y las especies de eucalipto introducidas. Este traspase de agentes puede realizarse en ambos sentidos, provocando que aquellas cepas que no son originalmente endófitas del huésped portador, se comporten de forma más virulenta en estos. La importancia sobre el conocimiento sanitario de la flora autóctona del país permitiría conocer mejor el comportamiento de estas especies endófitas, su rol como patógenos sobre otras especies arbóreas, así como proponer futuras medidas de control.

De los aislados identificados como *C. eucalypticola* no se obtuvo esporulación pero coincidieron las características de la colonia; color y textura (Adams et al., 2005), junto con los resultados de la secuenciación de la región ITS. Estudios realizados en plantaciones de *E. globulus* y *E. maidenii* sobre tejidos asintomáticos Simeto et al., (2005) y en tejidos asintomáticos y con cancos en plantaciones de *E. grandis* y *E. globulus* en Uruguay, revelaron que *C. eucalypticola* y *Botryosphaeria* spp. estaban presentes en ambos tipos de tejido, (Betucci et al., 1999). Previamente Ruperez y Muñoz (1980) mencionan la presencia de *C. ambiens* sobre partes muertas próximas al ataque de *Botryosphaeria*. Adams et al., (2005) detectaron la presencia a menudo de cancos de *Cytospora* sobre partes de árboles de eucalipto cuyo cambium ha muerto por la presencia de *B. dothidea*. Numerosos autores atribuyen a *C. eucalypticola* como endófito que habita tanto en el xilema como en las hojas de eucalipto (Betucci y Saravay 1993, Fisher et al. 1993, Adams et al. 2005).

Ambas especies de *Cytospora* han sido aisladas tanto en tejidos sintomáticos como asintomáticos en los cuatro sectores muestreados y desde árboles con presencia de *Neofusicoccum* sp. lo que corrobora que este género como su telomorfo *Valsa* spp, son comúnmente encontrados en árboles de *Eucalyptus* (Adams et al., 2005). La baja patogenicidad de ambas especies en las plantas de invernadero no concuerdan con la afirmación de que muchas de estas especies son consideradas patógenos importantes formadores de cancos tanto en tallos como en ramas (Adams et al., 2005). Debido a la similitud de los aislados obtenidos en estudios de diferentes partes del mundo, desde especies

de *Eucalyptus*, *Malus*, *Pinus*, *Populus*, *Prunus* y *Salix*, (Adams et al., 2006) sugieren que estos hongos patogénicos son importados en sus hospederos como endófitos.

Los aislados caracterizados morfológica y molecularmente como *Quambalaria cyanesces* concuerdan con la descripción realizada por Hoog y de Vries (1973). *Q. cyanesces* fue reportando por primera vez en tejido vegetal en *E. pauciflora* en New South Wales, Australia. También ha sido aislado desde tejido humano (Hoog y de Vries 1973) y en asociación con escarabajos de la corteza en Hungría, Bulgaria y el Mediterráneo (Kolarík et al., 1990). En Australia sobre especies de *Corymbia callophyla* y *C. ficifolia* desde tejidos asintomáticos y tejidos con síntomas en asociación con *Quambalaria pitereka* en hojas y con *Q. coyrecup* en canchros (Paap et al., 2006).

Tres especies del género *Quambalaria* son las consideradas causantes de dieback en hojas y brotes de *Corymbia* spp. y *Eucalyptus* spp., siendo estas *Q. eucalypti*, *Q. pitereka* y *Q. pusilla* Simpson (2000). También en árboles jóvenes de *Eucalyptus* en Australia, Tailandia, Sur América y Sudáfrica (Roux et al., 2006). Como las enfermedades descritas ocurren en especies de árboles nativos de Australia, de Beer et al., (2006) proponen Australia como centro de origen de las especies de *Quambalaria*.

Del aislado obtenido como *Diaporthe neotheicola* bajo identificación molecular, se ha obtenido su estado anamorfo in vitro, *Phomopsis theicola*. Concordando su morfología con la descrita por Santos y Phillips (2009). Su aislamiento desde ramas asintomáticas y su capacidad patogénica en plantas de *E. globulus* demostrada en el ensayo de invernadero corrobora el manifiesto de múltiples autores considerándola como patógeno de plantas (Webber y Gibbs 1984, Carroll 1986, Boddy y Griffith 1989, Rehner y Uecker 1994, García-Reyne et al., 2011, Udayanga et al., 2011 y Gomes et al., 2013). Ambos géneros son considerados por los autores antes mencionados como endófitos y saprófitos además de ser agentes patógenos en humanos y otros mamíferos.

El género *Diaporthe* es un grupo económicamente importante de hongos fitopatógenos que causan enfermedades en una amplia gama de cultivos, plantas ornamentales y árboles

forestales (Farr et al., 2002a, b, Crous 2005, Udayanga et al., 2011 y Udayanga et al., 2014). Así por ejemplo *D. neotheicola* ha sido reportado en; *Acacia*, *Acer*, *Actinidia deliciosa*, *Aspalathus linearis*, *Bougainvillea spectabilis*, *Camellia sinensis*, *Castanea*, *Citrus limon*, *C. limonia*, *Crataegus*, *Diospyros*, *Foeniculum vulgare*, *Fuchsia*, *Hydrangea*, *Juglans*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus*, *Quercus*, *Rhus*, *Ribes*, *Vitis vinifera* y *Wisteria sinensis* en diferentes partes del mundo Argentina, Australia, Europa (Grecia, Portugal, España, Italia), Nueva Zelanda, Sudáfrica y Estados Unidos (California) (Udayanga et al., 2014). Hay reportes de *D. rudis* en el género *Eucalyptus* en España, no siendo así en Chile, donde sí se han reportado especies como *D. australafricana* en *Corylus* y *Vaccinium* (Udayanga et al., 2014).

El aislado identificado molecularmente como *P. microspora*, concuerda con la caracterización morfológica realizada en base a Keith et al., (2006). *Pestalotiopsis* es un género no específico a un hospedero o taxón, infectado una amplia gama de hospederos (Hopkins y McQuilken 2000, Keith et al., 2006, Maharachchikumbura et al., 2011) y provocar diversos tipos de enfermedades en plantas; canchales, muerte regresiva de brotes, manchas foliares, tizón en acículas y ápices, tizón gris, clorosis severa y pudrición de frutos (Pirone 1978, Kwee y Chong, 1990, Xu et al., 1999, Tagne y Mathur 2001, Sousa et al., 2004, Espinoza et al., 2008, Maharachchikumbura et al., 2011). Este género es conocido como patógeno débil, que afecta a hospederos debilitados y ha sido observado en viveros de Brasil provocando daño sobre *Eucalyptus* (Ferreira 1989) y algunas coníferas (Smith et al., 1992).

Pestalotiopsis microspora ha demostrado tener una baja patogenicidad en las plantas de *E. globulus* en invernadero por lo que se corrobora que su relación con las plantas parece ser la de un patógeno débil invadiendo hojas de edad o como simbionte endofítico con la planta superior (Metz et al., 2000, Keith et al., 2006).

Concretamente en Chile, González (1997) identificó *Pestalotiopsis* sp. causando daños en plantaciones de *E. delegatensis* (Ahumada 2003). Existen reportes en otras partes del mundo de especies de *Pestalotiopsis* atacando a *Eucalyptus* spp. *Pestalotiopsis funerea* en *E. globulus* en India (Upadyhay y Dwivedi 1980). Daños por *Pestalotiopsis* en hojas de *Eucalyptus* en plantaciones de España (Ruperez y Muñoz 1980). Enfermedades foliares en *E. grandis* y *E.*

tereticornis por *P. disseminata*, *P. guepinii* y *P. mangiferae*. *P. versicolor* en *E. tereticornis* y *P. neglecta* en *E. globulus* y *E. grandis* todas ellas en diferentes regiones de India (Sharma et al., 1985). Manchas foliares en plantaciones clonales de *Eucalyptus* originados por *Pestalotiopsis* en la India (Mohan y Manokaran 2013).

El aislado identificado molecularmente como *Eucasphaeria capensis* no fue corroborado morfológicamente, ya que no obtuvo esporulación (Gams et al., 1998 y Crous et al., 2007). El género *Eucasphaeria* fue descrito como microhongo asociado con *Eucalyptus* sp. (Myrtaceae) y la especie *E. capensis* ha sido aislada desde hojas y hojarasca de *Eucalyptus* sp. en Sudáfrica (Crous et al., 2007) y como endófito de raíz en *Irtus communis* (Myrtaceae) en la región mediterránea de España, junto con otros hongos endófitos, en un estudio referido a colonización de raíces, aumento de biomasa y efectos en la simbiosis como micorriza arbuscular, (Vaz et al., 2012).

El aislado que mediante caracterización molecular corresponde a *Alternaria arborescens*, concuerda con lo obtenido in vitro y la descripción morfológica de (Carrillo 2003). El género *Alternaria* contiene especies cosmopolitas que se encuentran presentes en un amplio rango de huéspedes. Actuando como patógenos, reducen el rendimiento de las cosechas o alteran los vegetales almacenados (Andersen et al., 2001). Especies de *Alternaria* compiten con otros hongos sobre la superficie vegetal y ha sido antagonista de otros hongos como *Cladosporium*, *Epicoccum* y *Fusarium* (Lacey 1989). Las especies de *Alternaria*, son capaces de producir una gran variedad de compuestos, algunos tóxicos para plantas (fitotoxinas) y para mamíferos y aves (micotoxinas) (Minoletti et al., 2000). Concretamente, *A. arborescens* (sinónimo *A. alternata* f. *Sp. lycopersici*), es un hongo que produce toxinas AAL, siendo esto el agente causal del cancro del tallo de tomate. (Peever et al., 2004). Respecto a la presencia de *Alternaria* como hospedero en especies de *Eucalyptus*, hay estudios que indican el aislamiento de *Alternaria* desde tallos, lesiones foliares y semillas de *E. grandis* en México (Perez-Vera et al., 2005).

Mediante la medición de los parámetros fisiológicos analizados en el proceso de estrés de las plantas de *E. globulus*, no se han obtenido valores como los obtenidos por Milla (2010), quien

obtiene para *E. globulus* bajo condiciones de estrés moderado y severo valores de conductancia estomática en torno a 1.5 y 4 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Según Torres (2005), en *Phaseolus vulgaris*, las conductancias de especies sin estrés hídrico son mayores que aquellas que si lo reciben. Milla (2010) también señala que la transpiración de las especies de Eucaliptus aumenta al igual que la fotosíntesis rápidamente tras la aplicación de un riego. Los valores de fotosíntesis obtenidos son valores normales que no tienden a valores como los obtenidos en Milla (2010) cercanos a 2 y 1 ($\text{mmol}/\text{m}^2/\text{s}$) para condiciones de estrés moderado a severo respectivamente.

La presencia de marchitez y abscisión de las hojas son señales de una alteración en la planta, tal y como señalan Tilman et al., (1996), si la energía de la planta es menor que la que necesita para mantener su biomasa, como puede ocurrir en plantas afectadas por estrés severo y prolongado, o no adaptadas al estrés que están recibiendo, pueden incluso eliminar tejidos. Por tanto, el déficit hídrico, influye directamente en el crecimiento, desarrollo y funcionamiento de las plantas. También se ha demostrado que una reducción del 20-50% de la reserva hídrica del suelo, induce una reducción de la expansión foliar, dependiendo de la demanda evaporativa, por el contrario, los procesos de fotosíntesis y transpiración son menos sensibles y requieren que la reserva hídrica se agote hasta un 60-70% para que disminuyan sus tasas por déficit hídrico (Sadras et al., 1993).

El inminente cambio climático es un gran factor a tener en cuenta respecto al comportamiento como patógenos de estas especies de endófitos, estos cambios, pueden añadir un estrés adicional a las plantaciones por el agravamiento de condiciones extremas, volviéndolas más susceptibles a aquellos endófitos que causan enfermedad en hospederos bajo situaciones de estrés (Slippers y Wingfield 2007). Cuando la condición ambiental que determina el estrés se distribuye por grandes áreas, el resultado podría ser que enfermedades leves causadas por endófitos se conviertan en enfermedades más severas (Desprez-Loustau et al., 2006). A su vez, estos cambios en el medio ambiente, pueden limitar los rangos de acción de endófitos, incluyendo ciertas Botryosphaeriaceae, cambiando la infección de estas comunidades de endófitos a áreas más específicas (Slippers y Wingfield 2007). En el caso en que esos endófitos presenten un papel protector (Carrol 1988 y Arnol et al., 2003), los huéspedes

quedarían vulnerables en su ausencia, siendo infectados probablemente por un nuevo conjunto de endófitos, siendo especies de Botryosphaeriaceae eficaces en este sentido (Slippers y Wingfield 2007).

Un manejo futuro para las plantaciones de *Eucalyptus* spp. en Chile, pasaría por la selección de especies o clones adaptados a las condiciones climáticas y a la ubicación de las plantaciones para minimizar el factor estrés. Realizar una selección de genotipos resistentes a la enfermedad de manera que se puedan establecer plantaciones con una base genética que reduzca su vulnerabilidad frente a estas enfermedades (Neiker, 2009).



9. Conclusiones

Cancros y die-back en ramas y ramillas en plantaciones de *Eucalyptus globulus* en localidades de la región del Biobío y de La Araucanía pueden asociarse *Neofusicoccum*; *N. eucalyptorum* y *N. parvum* y *Phomopsis theicola*.

No se ha demostrado que la presencia de *Ophelimus* sp. induzca una mayor presencia de especies fúngicas o a una mayor virulencia de estas.

Se ha demostrado que los aislamientos inoculados expresan síntomas en el tejido vegetal causando patogenicidad en el hospedero pero no demuestra que la presencia o un mayor tamaño de estos estén ligados a una situación de estrés de ambos predios los seis meses previos y durante el periodo de inoculación.

Las reducciones del riego en plantas de *Eucalyptus*, previas a las inoculaciones de invernadero, no mostraron diferencias significativas en agresividad, respecto a las plantas con riego normalizado, en ocho de los nueve aislados inoculados.

No todas las especies de hongos inoculadas y consideradas endófitas de *Eucalyptus* spp. fueron patógenas, salvo *Phomopsis theicola* y las especies del género *Neofusicoccum*.

10. Bibliografía

Adams GC, Wingfield MJ, Common R and Roux J. 2005. Phylogenetic relationships and morphology of *Cytospora* species and related teleomorphs (Ascomycota, Diaporthales, Valsaceae) from Eucalyptus. *Studies in Mycology* 52:1-144.

Adams GC, Roux J and Wingfield MJ. 2006. *Cytospora* species (Ascomycota, Diaporthales, Valsaceae): introduced and native pathogens of trees in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 35:521-548.

Ahumada R. 2003. Pathogens in comercial *Eucalyptus* plantations in Chile, with special reference to *Mycosphaerella* and *Botryosphaeria* species. M.Sc. Thesis. University of Pretoria, Pretoria, South Africa. 148pp.

Alonso R, 2004. Estudio de *Botryosphaeria* spp. en *Eucalyptus globulus* en Uruguay: Endofitismo o Ppatogenicidad? Montevideo, Uruguay: PEDECIBA, Tesis de Maestría.

Alonso R, Tiscornia S, Alfenas A, Bettucci L. 2009. Fungi associated to bark lesions of *Eucalyptus globulus* stems in plantations from Uruguay. *R. Árvore* 33:(4) 591-597.

Andersen B, Krùger E and Roberts RG. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research* 105: 291-299.

Arnold AE, Mejia LC, Kyllø D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N and Herre EA. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100: 15649–15654.

Barber PA, Burgess TI, Hardy GE, St J, Slippers B, Keane PJ and Wingfield MJ. 2005. *Botryosphaeria* species from *Eucalyptus* in Australia are pleoanamorphic, producing *Dichomera* synanamorphs in culture. *Mycological Research* 109:1347–1363.

Barnard EL, Geary T, English JT and Gilly SP. 1987. Basal cankers and coppice failure of *Eucalyptus grandis* in Florida. *Plant Disease* 71: 358–361.

Barnett HL and Hunter BB. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4th ed. St. Paul, Minn 22: 218.

Begg J and Turner N. 1976. Crop Water Deficits. *Adv. Agron.* 28: 161-217.

Bega RJ, Smith RS, Matinez AP and Davis CJ. 1978. Severe damage to *Pinus radiata* and *Pinus pinaster* by *Diplodia pinea* and *Lophodermium* spp. on Molakai and Lunai in Hawaii. *Plant Disease Reporter* 62: 329–331.

Berryman AA. 1972. Resistance of conifers to invasion by bark beetle-fungus associations. *BioScience* 22:598-602.

Bettucci L and Alonso RA. 1997. Comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs of *Eucalyptus grandis* in Uruguay. *Mycological Research* 101 (9):1060-1064.

Bettucci L and Saravay M. 1993. Endophytic fungi of *Eucalyptus globulus*: a preliminary study. *Mycological Research* 97: 679-682.

Bettucci L, Alonso R and Fernandez L. 1997. A comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs and seedlings of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *Sydowia* 49(2):109-117.

Bettucci L, Alonso R and Tiscornia S. 1999. Endophytic mycobiota of healthy twigs and the assemblage of species associated with twig lesions of *E. globulus* and *E. grandis* in the central west region of Uruguay. *Mycological Research* 103(4):468-472.

Blodgett JT and Stanosz GR. 1995. *Sphaeropsis sapinea* and host water stress in a red pine plantation in central Wisconsin. *Phytopathology* 85: 1044.

Boddy L and Griffith GS. 1989. Role of endophytes and latent invasion in the development of decay communities in sapwood of angiospermous trees. *Sydowia* 41:41-73.

Brady N C and Weil R. 1999. *The Nature and Properties of Soils*. 12 th Edition. Prentice-Hall, Inc. New Jersey, U.S.A. 881.

Brown EA and Britton KO. 1986. *Botryosphaeria* diseases of apple and peach in the South-eastern United States. *Plant Disease* 70: 480–484.

Brown EA and Hendrix FF. 1981. Pathogenicity and histopathology of *Botryosphaeria dothidea* on apple stems. *Phytopathology* 71:375–379.

Burgess TI, Barber PA and Hardy G. 2005. *Botryosphaeria* spp. associated with eucalypts in Western Australia including description of *Fusicoccum macroclavatum* sp. nov. *Australasian Plant Pathology* 34: 557–567.

Burgess TI, Sakalidis M and Hardy G. 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.

Carrillo L. 2003. *Los Hongos de los Alimentos y Forrajes*.

Carroll G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69: 2–9.

Castaño-Zapata J. 1994. *Principios básicos de fitopatología*. 2ª ed. Tegucigalpa: Zamorano Academic Press.

Chen SF, Barnes I, Chungu D, Roux J, Wingfield MJ, Xie YJ and Zhou, XD. 2011. High population diversity and increasing importance of the *Eucalyptus* stem canker pathogen, *Teratosphaeria zuluensis*, in South China. *Austral. Plant Pathol.* 40:407–415.

Chou CKS. 1987. Crown wilt of *Pinus radiata* associated with *Diplodia pinea* infection of woody stems. *European Journal of Forest Pathology* 17 (7): 398-411.

Cilliers AJ, Swart WJ and Wingfield MJ. 1995. The occurrence of *Lasiodiplodia theobromae* on *Pinus elliotii* seeds in South Africa. *Seed Science and Technology* 23: 851–860.

Cortinas MN, Barnes BD, Wingfield BD and Wingfield MJ. 2011. Unexpected genetic diversity revealed in the Eucalyptus canker pathogen *Teratosphaeria gauchensis*. *Austral. Plant Pathol.* 40, 497–503.

Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Philips AJL, Alves A, Burgess T, Barber P and Groenewald JZ. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* 55: 235–253.

Crous PW. 2005. Impact of molecular phylogenetics on the taxonomy and diagnostics of fungi. *Bull OEPP/EPPO* 35:47–51.

Crous PW, Mohammed C, Glen M, Verkley GJM and Groenewald JZ. 2007. *Eucalyptus* microfungi known from culture. *Eucasphaeria* and *Sympoventuria* genera nova, and new species of *Furcaspora*, *Harknessia*, *Heteroconium* and *Phacidiella*. *Fungal Diversity* 25: 19-36.

Controladora de Plagas Forestales S.A. CPF. 2012. Veinte años al servicio del manejo integrado de plagas forestales en el país 1992-2012. Edición extraordinaria Noviembre 2012. Chile. 53.

Davison EM and Tay CS. 1983. Twig, branch and upper trunk cankers of *Eucalyptus marginata*. Plant Disease 67, 1285–1287.

De Beer ZW, Begerow D, Bauer R, Pegg GS, Crous PW and Wingfield MJ. 2006. Phylogeny of *Quambalariaceae* fam. nov., including important *Eucalyptus* pathogens from South Africa and Australia. Studies in Mycology 55: 289–298.

De Hoog G S and De Vries G A. 1973. Two new species of *Sporothrix* and their relation to *Blatobotrys nivea*. Antonie van Leeuwenhoek 39: 515-520.

Denman S, Crous PW, Taylor JE, Kang JC, Pascoe I and Wingfield MJ. 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: 129–140.

Desprez-Loustau ML, Marcais B, Nageleisen LM, Piou D, Vannini A. 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. Annals of Forest Science 63: 597–612.

Espinoza J G, Briceño EX, Keith LM and Latorre BA. 2008. Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. Plant Dis 92:1407-1414.

Farr DF, Castlebury LA, Rossman AY. 2002a. Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States. Mycologia 94:494–504

Farr DF, Castlebury LA, Rossman AY, Putnam ML. 2002b. A new species of *Phomopsis* causing twig dieback of *Vaccinium vitis idaea* (lingonberry). Mycol Res 106:745–752

Ferreira F. 1989. Patología Florestal. Principias Doenças Florestais no Brasil. Viçosa, Brasil. Sociedade de Investigações Florestais. 570 p.

Fisher PJ, Petrini O and Sutton BC. 1993. A comparative study of fungal endophytes in leaves xylem and bark of *Eucalyptus nitens* in Australia and England, *Sydowia* 45: 338-345.

Gams W, Hoekstra ES and Aptroot A. 1998. CBS course of mycology. 4th ed. Central bureau voor Schimmelcultures, Baarn, the Netherlands. 165.

Garcia-Reyne A, Lopez-Medrano F, Morales JM, Garcia Esteban C, Martin I, Erana I, Meije Y, Lalueza A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez-Tudela JL and Aguado JM. 2011. Cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: first report of human infection by this fungus. *Transplant Infectious Disease* 13:204–207.

Gomes RR, Glienke C, Videira SIR, Lombard L, Groenewald JZ and Crous PW. 2013. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia* 31: 1–41.

González, G. 1997. Estudio Epidemiológico de Enfermedades Foliares en Eucalipto en Chile. Informe de Avance 2. Universidad de Concepción.

Gryzenhout M, Myburg H, Wingfield BD and Wingfield MJ. 2006. Cryphonectriaceae (Diaporthales), a new family including *Cryphonectria*, *Chrysoporthe*, *Endothia* and allied genera. *Mycologia* 98: 239-249.

Gure A, Slippers B and Stenlid J. 2005. Seed-borne *Botryosphaeria* spp. from native *Prunus* and *Podocarpus* trees in Ethiopia, with a description of the anamorph *Diplodia rosulata* sp. nov. *Mycological Research* 109: 1005–1014.

Harrington TC. 1993. Biology and Tasonomy of Fungi Associated with Bark Beetles. In: TC. Harrington and FW. Cobb Jr., (eds) *Leptographium Root Diseases on Conifers*. Chapter3, 1-39. St Paul, Minnesota, USA. American Phytopayhological Society Press.

Hopkins K E and McQuilken M P. 2000. Characteristics of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK. *Eur. J. Plant Pathol.* 106:77-85.

Hoog GS, De Vries GA. 1973. Two new species of *Sporothrix* and their relation to *Blastobotrys nivea*. *Antonie van Leeuwenhoek* 39: 515–520.

Hunter GC, Wingfield MJ, Crous PW and Wingfield MJ. 2006. A multi-gene phylogeny for species of *Mycosphaerella* occurring on *Eucalyptus* leaves. *Stud. Mycol.* 55: 147–161.

Johnson GI, Mead AJ, Cooke AW and Dean JR. 1992. Mango stem end rot pathogens – Fruit infection by endophytic colonisation of the inflorescence and pedicel. *Annals of Applied Biology* 120: 225–234.

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW and Stalpers JA. (2008). *Dictionary of the Fungi* (10th edition). Wallingford: CABI. 100.

Keith LM, Velasquez ME, and Zee FT. 2006. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. *Plant Dis.* 90:16-23.

Kim KW, Park EW and Ahn K-K. 1999. Pre-penetration behavior of *Botryosphaeria dothidea* on apple fruits. *Plant Pathology Journal* 15: 223–227.

Kim KW, Park EW, Kim YH, Ahn K-K, Kim PG, and Kim KS. 2001. Latency- and defense-related ultrastructural characteristics of apple fruit tissues infected with *Botryosphaeria dothidea*. *Phytopathology* 91: 165–172.

Kim KW, Park EW and Kim KS. 2004. Glyoxysomal Nature of Microbodies Complexed with Lipid Globulus in *Botryosphaeria dothidea*. *Phytopathology* 94: 970–977.

Kliejunas JT et al. 2001. Pest risk assessment of the importation into the United States of unprocessed *Eucalyptus* logs and chips from South America. Washington: United States

Department of Agriculture; Forest Service, Forest Products Laboratory. (General Technical Report FLP-GTR-124).134.

Kolarik M, Slavikova E and Pazoutova S. 2006. The taxonomic and ecological characterization of the clinically important heterobasidiomycete *Fugomyces cyanescens* and its association with bark beetles. *Czech Mycology* 58: 81–98.

Kwee L T, and Chong K K. 1990. *Guava in Malaysia: Production, Pests and Diseases*. Tropical Press SDN. BHD, Kuala Lumpur, Malaysia.

La enfermedad del chancro en eucaliptos. 2009. Confederacion de forestalistas del País Vasco. Neiker-tecnalia.

Latorre B, Díaz G, and Reed M. 2012. Effect water activity on in vitro mycelia growth of *Neofusicoccum* spp. infecting blueberry. *Cien. Inv. Agr.* 39(1):221-228.

Lombard L, Zhou XD, Crous PW, Wingfield BD and Wingfield MJ. 2010. *Calonectria* species associated with cut-ting rot of *Eucalyptus*. *Persoonia* 24: 1–11.

Lupo S, Tiscornia S and Bettucci L. 2001. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globulus*. *Revista Iberoamericana de Micologia* 18: 38–41.

Maharachchikumbura SS N, Guo LD, Chukeatirote E, Bahkali AH and Hyde KD. 2011. *Pestalotiopsis*: morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity* 50:167–187.

Martínez R, Azpíroz H, Rodríguez J, Cetina V y Gutiérrez M. 2006. Importancia de las Plantaciones Forestales de *Eucalyptus*. Universidad Autónoma Indígena de México. *Ra Ximhai* 2: 815-846.

Martinez S. 2005. *Inocutis jamaicensis*, the causal agent of eucalypt stem rot in Uruguay. *Mycotaxon* 91(1):165-171.

Ma Z, Morgan DP and Michailides TJ. 2001. Effects of water stress on *Botryosphaeria* blight of pistachio caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease* 85: 745–749.

Metz A M, Haddad A, Worapong J, Long DM, Ford E J, Hess WM and Strobel GA. 2000. Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus. *Microbiology* 146:2079-2089.

Michailides TJ. 1991. Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. *Phytopathology* 81: 566–573.

Milla E A. 2010. Efecto del déficit hídrico en algunas respuestas fisiológicas de *Eucalyptus globulus* Labill, *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh y *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell. Tesis Ing. Forestal. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 51.

Minoletti C et al. 2000. 3D Model of the F1 part of chloroplast ATP-synthase interacting with the phytotoxin tentoxin. resumen 198

Mohan V and Manokaran P. 2013. Assessment of disease problems in different clonal plantations of *Eucalyptus* spp. in South India. *J. Acad. Indus. Res.*1(9).

Morales D. González A, Peters J, Luis V and Jiménez M. 2004. Ecofisiología de los bosques de laurisilva y pinar de Tenerife. *Cuad. Soc. Esp. Cien. For.* 20: 25-35.

Morales A, Latorre BA, Piontelli E and Besoain X. 2012. *Botryosphaeriaceae* species affecting table grape vineyards in Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 39:445-458.

Neiker. 2009. Chancros causados por *Botryosphaeria*. La enfermedad del chancro en eucaliptos. URL: <http://www.avisosneiker.com/wp-content/uploads/2011/02/20091021Ficha-chancro-EUCALIPTUS021.pdf>.

Obregón C y Restrepo N. 2000. El eucalipto. Una opción de alta rentabilidad. Programa forestal Colombiano. www.Revista-MM.com. (17 de abril de 2013).

Old KM, Gibbs R, Craig I, Myers BJ and Yaun ZQ. 1990. Effect of drought and defoliation on the susceptibility of *Eucalyptus* to cankers caused by *Endothia gyrosa* and *Botryosphaeria ribis*. *Australian Journal of Botany* 38: 571–581.

Parra P, González M, Valencia JC y Faúndez J. 2001. Manual para la certificación sanitaria Forestal.

Pampolina NM, Dell B and Malajczuk N. 2002. Dynamics of ectomycorrhizal fungi in an *Eucalyptus globulus* plantation: effect of phosphorus fertilization. *Forest Ecology and Management* 158: 291–304.

Paoletti E, Danti R and Strati S. 2001. Pre- and post-inoculation water stress affects *Sphaeropsis sapinea* canker length in *Pinus halepensis* seedlings. *Forest Pathology* 31: 209–218.

Paap T. 2006. The incidence, severity and possible causes of canker disease of *Corymbia calophylla* (marri) in the southwest of Western Australia. Doctoral dissertation, Murdoch University, Perth, USA. 198pp.

Peever TL, Su G, Carpenter-Boggs L and Timmer LW. 2004. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia* 96(1):119-134.

Pérez C, Wingfield M, Slippers B, Altier N and Blanchette R. 2009. *Neofusicoccum eucalyptorum*, a *Eucalyptus* pathogen, on native Myrtaceae in Uruguay. *Plant Pathology* 58: 964-970.

Perez-Vera OA, Yanez-Morales M D J, Alvarado-Rosales D, Cibrian-Tovar D, and Garcia-Diaz S E. 2005. Fungi associated to eucalyptus, *Eucalyptus grandis* Hill: Maid. *Agrociencia*. 39: 311-318.

Pillay K, Slippers B, Wingfield M and Gryzenhout M. 2013. Diversity and distribution of co-infecting Botryosphaeriaceae from *Eucalyptus grandis* and *Syzygium cordatum* in South Africa. *South African Journal of Botany* 84: 38-43.

Pirone PP. 1978. *Diseases and Pests of Ornamental Plants*. Wiley Interscience, New York.

Phillips AJL, Alves A, Correia A and Luque J. 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia* 97: 513–529.

Pusey PL. 1989. Influence of water stress on susceptibility of non-wounded peach bark to *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Dis.* 3: 1000-1003.

Rehner SA and Uecker FA. 1994. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. *Canadian Journal of Botany* 72: 1666-1674.

Roux J, Mthlane ZL, de Beer ZW, Eisenberg B and Wingfield MJ. 2006. *Quambalaria* leaf and shoot blight on *Eucalyptus nitens* in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 35:427-433.

Ruperez A & Muñoz C. 1980. Enfermedades de los Eucaliptus en España. *Bol. Serv. Plagas*, 6: 193-217.

Sadras VO, Hall AJ and Connor DJ. 1993. Light-associated nitrogen distribution profile in flowering canopies of sunflower *Helianthus annuus* L. altered during grain filling. *Oecologia* 95: 488-494.

Sánchez ME, Venegas J, Romero MA, Phillips AJL and Trapero A. 2003. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. *Plant Disease* 87: 1515–1521.

Sankaran KV, Sutton BC and Minter DW. 1995. A checklist of fungi recorded on *Eucalyptus*. *Mycological Papers* 170: 1–376.

Santelices R. 2005. Development of a *Eucalyptus globulus* plantation established in spring using different irrigation treatments. *Bosque* 26(3): 105-112.

Santos JM and Phillips AJL. 2009. Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. *Fungal Diversity* 34: 111-125.

Schoeneweiss DF. 1981. The role of environmental stress in diseases of woody plants. *Plant Disease* 65: 308–314.

Schoch C, Shoemaker RA, Seifert KA, Hambleton S, Spatafora JW and Crous PW. 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia* 98: 1041-1052.

Schoch C, Seifert K, Huhndorf S, Robert V, Spouge J, Levesque C, Chen W, and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA. *Proceedings of the National Academy Science of USA*. 109: 6241–6246.

Sharma J K, Mohanan C and Maria Florence EJ. 1985. Disease survey in nurseries and plantations of forest tree species grown in Kerala. Kerala forest research institute peechi, thrissur. kfri Research Report 36: 268.

Shearer BL, Tippet JT and Bartle JR. 1987. *Botryosphaeria ribis* infection associated with death of *Eucalyptus radiata* in species selection trials. *Plant Disease*, 71: 140–145.

Sigler L, Harris J and Dixon D. 1990. Microbiology and Potential Virulence of *Sporothrix cyanescens*, a Fungus Rarely Isolated from Blood and Skin. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 1009-1115.

Simeto S, Alonso R, Tiscornia S, and Bettucci L. 2005. Fungal community of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus maidenii* stems in Uruguay. *Sydowia*,57(2), 246-258.

Simeto S, Balmelli G, Altier N, Dini B and Bennadji Z. 2007. Desarrollo de Protocolos de Inoculación Artificial para la Caracterización Sanitaria de *Eucalyptus globulus*. Montevideo, Uruguay: INIA: Serie Técnica 169.

Simpson JA. 2000. Quambalaria, a new genus of eucalypt pathogens. *Australasian Mycologist* 19: 57–62.

Slippers B, Crous PW, Denman S, Coutinho TA, Wingfield BD and Wingfield MJ. 2004a. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96: 83–101.

Slippers B, Fourie G, Crous PW, Coutinho TA, Wingfield BD and Wingfield MJ. 2004b. Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lutea*. *Mycologia* 96: 1030–1041.

Slippers B, Fourie G, Crous PW, Coutinho TA, Wingfield BD, Carnegie A and Wingfield MJ. 2004c. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South Africa. *Studies in Mycology* 50: 343–358.

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

Slippers B, Burgess T, Pavlic D, Ahumada R, Maleme H, Mohali S, Rodas C and Winfield MJ (2009) A diverse assemblage of Botryosphaeriaceae infect Eucalyptus in native and non-native environments. *Southern Forests* 27(2): 101–110

Smith I, J Dunez, D Phillips, R Lelliott, S Archer. 1992. *Manual de Enfermedades de las Plantas*. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa. 671.

Smith H, Kemp GHJ and Wingfield MJ. 1994. Canker and die-back of *Eucalyptus* in South Africa caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Pathology* 43(6):1031-1034.

Smith H, Wingfield MJ, Crous PW and Coutinho TA. 1996a. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. in South Africa. *South African Journal of Botany* 62: 86–88.

Smith H, Wingfield MJ and Petrini O. 1996b. *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus nitens* in South Africa. *Forest Ecology and Management* 89: 189–195.

Smith H, Crous PW, Wingfield MJ, Coutinho TA and Wingfield BD. 2001. *Botryosphaeria eucalyptorum* sp. nov., a new species in the *B. dothidea*-complex on *Eucalyptus* in South Africa. *Mycologia* 93: 277–284.

Sorauer P. 1905. “The nature of disease”. In: Colemanm, E. & Damrosch, B. (eds.), *The Other Side of the Tapestry*. Yale University.

Sousa M F, Tavares R M, Geros H and Lino-Neto T. 2004. First report of *Hakea sericea* leaf infection caused by *Pestalotiopsis funerea* in Portugal. *Plant Pathol.* 53:535.

Soto MA. 2011. El problema de las plantaciones de eucalipto. Asociación Medio Ambiental IZATE. Disponible en <http://izate.blogspot.com/2011/03/problema-de-las-plantaciones-de.html>. (20 de abril de 2013)

Stanosz GR, Blodgett JT, Smith DR and Kruge EL. 2001. Water stress and *Sphaeropsis sapinea* as a latent pathogen of red pine seedlings. *New Phytologist* 149: 531–538.

Sutton BC. 1980. *The Coelomycetes, Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata.* Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute. 696.

Swart WJ and Wingfield MJ. 1991. Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. *Plant Disease* 75:761–766.

Tagne A and Mathur S B. 2001. First report of chlorotic spot of maize caused by *Pestalotiopsis neglecta*. *Plant Pathol.* 50:791.

Taylor K, Andjic V, Barber PA, Hardy St. JGE and Burgess TI. 2012. New species of *Teratosphaeria* associated with leaf diseases on *Corymbia calophylla* (Marri.). *Mycol Prog.* 11: 159–169.

Tilman D. 1996. Biodiversity: population versus ecosystem stability. *Ecology* 77: 350-363.

Torres N. 2005. Efecto del estrés hídrico sobre la fotosíntesis, rendimiento y abscisión en un cultivo de poroto *Phaseolus vulgaris* L. Tesis Ing. Agr. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 60.

Udayanga D, Xingzhong L, McKenzie EHC, Chukeatirote E, Bahkali AHA and Hyde KD. 2011. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common pathogens. *Fungal Diversity* 50: 189-225.

Udayanga D, Castlebury LA, Rossman A Y and Hyde KD. 2014. Species limits in *Diaporthe*: molecular re-assessment of *D. citri*, *D. cytospora*, *D. foeniculina* and *D. rudis*. *Persoonia* 32: 83–101.

Upadhyay R K and Dwivedi RS. 1979. Cultural and Taxonomical studies on *Pestalotiopsis funera* causing leaf spot of *Eucalyptus globulus*. Proc. Indian natn. Sci. Acad. 3: 397-404.

Valencia J y Cabrera J. 2008. Análisis económico de opciones productivas para plantaciones de *Eucalyptus nitens* en el sur de Chile. INFOR, Instituto Forestal. Santiago, Chile. 18.

Vaz ABM Sampedro I, Siles JA, Vasquez JA, García-Romera I, Vierheilig H, Rosa CA and Ocampo JA. 2012. Arbuscular mycorrhizal colonization of *Sorghum vulgare* in presence of root endophytic fungi of *Myrtus communis*. Applied Soil Ecology 61: 288– 294.

Von Arx JA and Müller E. 1954. Die Gattungen der amersporen Pyrenomyceten. Beitrage zur Kryptogamen flora der Schweiz 11:1–434.

Webber J and Gibbs JN. 1984. Colonization of elm bark by *Phomopsis oblonga*. Transactions of the British Mycological Society 82: 348-352.

Wene EG and Schoeneweiss DF. 1980. Localized freezing predisposition to *Botryosphaeria dothidea* in differentially frozen woody stems. Can. J. Bot. 58: 1455-1458.

Wet J De, Burgess T, Slippers B, Preisig O, Wingfield BD and Wingfield MJ. 2003. Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. Mycological Research 107: 557–566.

Wingfield MJ, Roux J, Slippers B, Hurley BP, Garnas J, Myburg AA and Wingfield BD. 2012. Established and new technologies reduce increasing pest and pathogen threats to Eucalypt plantations. Forest Ecology and Management 301: 35-42.

Xu L, Kusakari S, Hosomi A, Toyoda H, Ouchi A. 1999. Postharvest disease of grape caused by *Pestalotiopsis* species. Annals of the Phytopathological Society of Japan 65:305-311.

Zhang J, Marshall J and Fins L. 1996. Correlated population differences in dry matter accumulation, allocation, and water-use efficiency in three sympatric conifer species. *For. Sci.* 42 (2): 242-249



11. Anexo

Tabla 1A. Identificación molecular de los aislados.

DESCRIPTION	Max Score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>	955	1056	100%	0.0	99%	EU860373.1
<i>Neofusicoccum parvum</i>	996	1145	100%	0.0	99%	EU860385.1
<i>Cytospora eucalypticola</i>	1050	1050	100%	0.0	100%	EU552120.1
<i>Sporothrix cyanescens</i>	1114	1114	100%	0.0	99%	AJ535500.1
<i>Diaporthe neotheicola</i>	977	977	99%	0.0	100%	KC145914.1
<i>Eucasphaeria capensis</i>	937	937	99%	0.0	98%	EF110619.1
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	1000	1000	99%	0.0	99%	AX045823.1
<i>Valsa cinereostroma</i>	990	990	94%	0.0	98%	AY347368.1
<i>Alternaria arborescens</i>	987	987	100%	0.0	100%	EU098120.1

Tabla 2A. Comparación de resultados morfológicos con los de referencia.

Especie	Tamaño Conidias (Estudio)	Tamaño Conidias (Bibliografía)	Características (Estudio)	Características (Bibliografía)
<i>Neofusicoccum parvum</i> (Pennycook & Samuels)	15,77-24,88µm x 5,06-9,52µm	(12-)15-20(- 24) x (4-)4.5- 6(-7.5) µm	No se ha observado pigmentación	Célula central oscura (antes de la germinación)
<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i> (Crous, H. Smith & M.J. Wingf.)	25,9-31,77 µm x 6,69-9.73 µm	(18-)20-23(- 25) x 7-8(-12) µm	No se obtuvo esporulación para las dos cepas de menor crecimiento en colonia.	No hay reportes

Tabla 3A. Riego de plantas de *E. globulus* en invernadero y mediciones de parámetros.

SEMANA	BLOQUE 1	BLOQUE 2	MEDICIONES
1	Riego diario	Riego cada dos días	12/11/2014
2	Riego diario	Riego cada tres días	20/11/2014
3	Riego diario	Riego cada tres días	28/11/2014
4	Riego diario	Riego cada tres días	12/12/2014

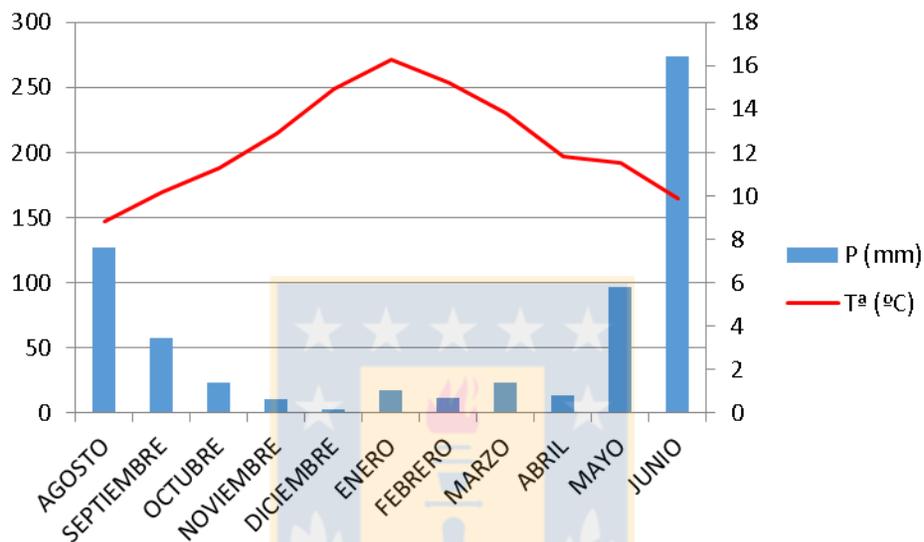


Figura 1A: Datos climáticos de la estación meteorológica Coronel (Región del Biobío), próxima al predio Escuadrón.

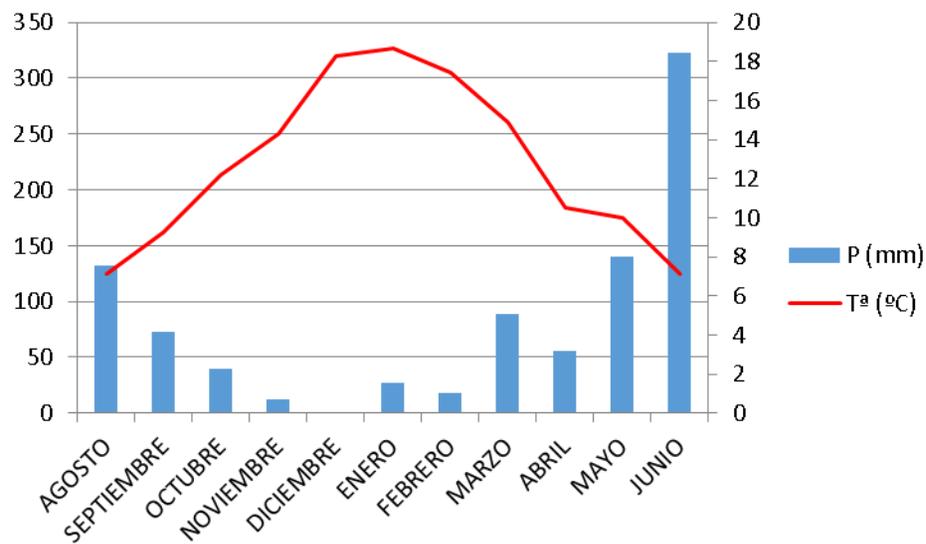


Figura 2A: Datos climáticos de la estación meteorológica Human (Región del Biobío) próxima al predio Meñir.

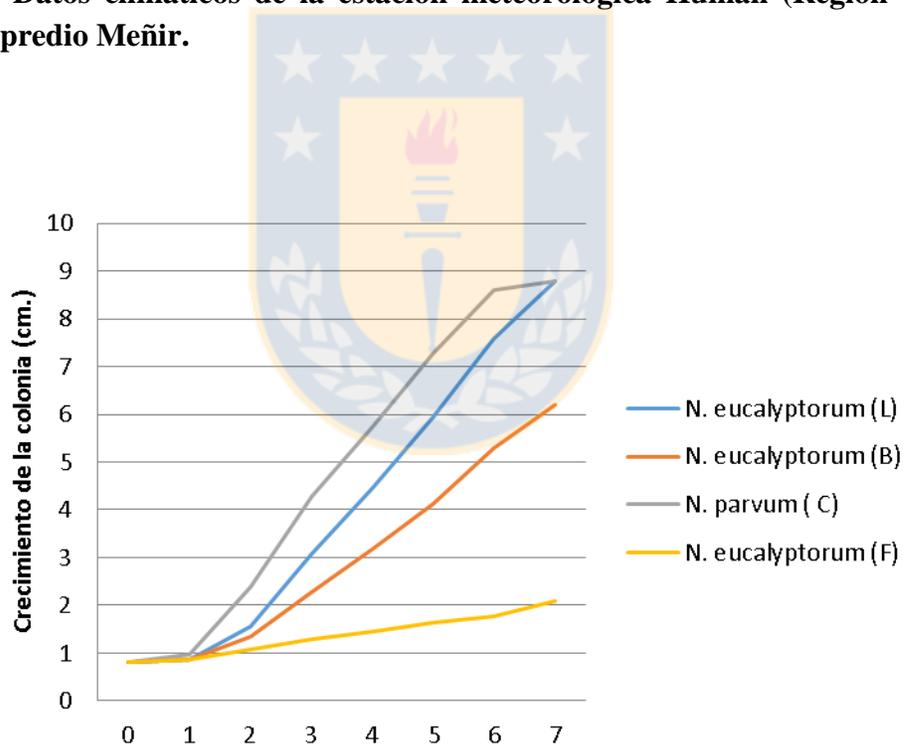


Figura 3A. Crecimiento en cm. de las cepas *N. eucalyptorum* y *N. parvum* a lo largo de una semana.