

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *MYCOSPHAERELLA* EN *EUCALYPTUS*

OTERO, L.¹; AGUÍN, O.¹; SAINZ, M. J.² Y MANSILLA, J.P.^{1,2}

¹Estación Fitopatológica do Areiro (Diputación Pontevedra), Subida la Robleda s/n. 36153 Pontevedra. efa @efa-dip.org

²Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario, 27002 Lugo.

Palabras clave: cultivo monospórico, PCR, secuenciación, vivero forestal

Resumen: Varias especies del género *Mycosphaerella* pueden causar la enfermedad foliar conocida como MLB (*Mycosphaerella* leaf blotch disease) en eucalipto. En los últimos años se ha observado una alta incidencia de MLB en plantaciones de *Eucalyptus globulus* de Galicia. Aunque *E. globulus* es el eucalipto más utilizado en las plantaciones gallegas, cada vez es mayor la superficie plantada con otras especies, sobre todo *E. nitens*, de las que apenas existe información sobre sensibilidad a MLB y especies de *Mycosphaerella* que la causan. En este trabajo, se analizó el material vegetal sintomático de MLB de diversas especies de eucalipto en producción en un vivero forestal situado en Ares (A Coruña). La identificación de las especies de *Mycosphaerella* se llevó a cabo mediante el análisis de características morfológicas (morfología de las lesiones y cultivos monospóricos) y por técnicas moleculares en las que el ADN fúngico se extrajo bien directamente de las lesiones o de los cultivos monospóricos. El ADN extraído se amplificó y secuenció con los primers ITS1F e ITS4. También se utilizaron primers específicos para tres especies de *Mycosphaerella*. Los resultados indicaron que las especies más frecuentes eran *M. nubilosa* y *M. parva*.

INTRODUCCIÓN

El género *Eucalyptus* L'Herit. presenta un amplio número de enfermedades fúngicas foliares (PARK *et al.* 2000) aunque se considera al género *Mycosphaerella* Johanson como el más importante (CROUS 1998). En la actualidad se han descrito más de 30 especies de este género, en todo el mundo, causando daños en eucalipto (CROUS 1998) siendo el principal síntoma la presencia de manchas foliares necróticas, por eso a la enfermedad se la conoce como MLB (*Mycosphaerella* leaf blotch disease) (CROUS 1998).

En Galicia la superficie ocupada por eucaliptos es de aproximadamente 383.000 ha, entre masas puras y masas mixtas (TERCER INVENTARIO FORESTAL NACIONAL 2003), de las que *Eucalyptus globulus* Labill, constituye más del 95% (SILVA-PANDO Y RIGUEIRO 1992), sin embargo cada vez es mayor la superficie plantada con otras especies, sobre todo, *E. nitens*. En un estudio realizado en eucaliptales gallegos se ha observado una alta incidencia de MLB, identificándose nueve especies de *Mycosphaerella*, siendo *M. nubilosa* (Cooke) Hansford la principal causante de la enfermedad en *E. globulus* (OTERO *et al.* 2006). Sin embargo apenas existe información en otras especies de eucalipto sobre su sensibilidad a MLB y especies de *Mycosphaerella* que la causan.

La gran dificultad que presenta la utilización de las características morfológicas de las lesiones y de los aislados en cultivo para el diagnóstico de especies (CROUS *et al.* 2001), ha motivado que, en los últimos años, la detección e identificación de especies de *Mycosphaerella* se complemente con técnicas moleculares mediante la comparación de secuencias de la región del espacio de transcripción interno ITS1 e ITS2 del ADN ribosomal

(CROUS *et al.* 2001, CROUS *et al.* 2004) y en la utilización de primers específicos (GLEN *et al.* 2007).

Por eso el objetivo de este trabajo fue la identificación de especies de *Mycosphaerella* en diez especies diferentes de eucaliptos mediante características morfológicas y técnicas moleculares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

En abril de 2007 se llevó a cabo un muestreo en un vivero forestal situado en el municipio de Ares (A Coruña) donde se aprovechaba para uso ornamental el follaje de diversas especies del género *Eucalyptus*. Con la colaboración del propietario del vivero se seleccionaron eucaliptos de 10 especies que presentaban hojas con síntomas de MLB.

De cada árbol se recogieron entre 10-20 hojas sintomáticas que se mantuvieron a 4 °C, hasta su utilización en laboratorio.

Identificación mediante análisis de características morfológicas

Las hojas recogidas en cada árbol se agruparon por la similitud de los síntomas que presentaban. De cada muestra se hizo una descripción macromorfológica de las lesiones, indicando: forma, color, tamaño, distribución y presencia/ausencia de cuerpos de fructificación estableciendo, en el caso de que los hubiera, su forma, color, tamaño y distribución.

A nivel microscópico se estudió el tamaño y forma de ascocarpos, ascas y ascosporas, así como de conidios y conidióforos. Se estableció el patrón de germinación de las ascosporas (Figura 2) tomando como referencia los propuestos por CROUS (1998).

Para obtener cultivos monospóricos se cortaron pequeños fragmentos de las lesiones de las hojas que mostraban cuerpos de fructificación, según el método descrito por CROUS (1998). En estos cultivos se analizó la tasa de crecimiento (a las cuatro-ocho semanas), se midió el color del aislado tanto en su parte inferior como superior usando el colorímetro Color-Eye 7000^a (GretagMacbeth) y se hizo una estimación visual de la textura y forma de los márgenes de la colonia.

Identificación mediante técnicas moleculares

Para la identificación de especies mediante técnicas moleculares se utilizaron dos procedimientos, por un lado se llevó a cabo la secuenciación de las regiones ITS del ADN ribosomal y por el otro se realizó una múltiplex-PCR con primers específicos para tres especies de *Mycosphaerella*.

La extracción del ADN fúngico se llevó a cabo bien directamente de las lesiones necróticas de las hojas o a partir de cultivos monospóricos. Si la extracción del ADN se efectuaba directamente de las hojas, se cortaba un trozo de lesión de aproximadamente 25 a 200 mm²; y si se hacía a partir de los cultivos monospóricos, se recogían entre 20 y 40 mg de micelio. En ambos casos el ADN se extrajo utilizando el kit comercial EZNATM Fungal DNA Miniprep Kit (Omega Bio-tek) siguiendo el protocolo corto indicado por el fabricante.

Para la amplificación del ADN por PCR se utilizaron los primers ITS1F/ITS4, (GARDES & BRUNS 1993, WHITE *et al.* 1990), que amplifican las regiones ITS del ADN ribosomal, siguiendo las condiciones propuestas por CROUS *et al.* (2004), excepto que se aumentó la temperatura de anillamiento de 55 a 57°C.

Para la secuenciación los amplicones obtenidos se purificaron usando el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science) y se secuenciaron con el BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Los productos de la

secuenciación se cargaron en un ABIPrism™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias se analizaron con el programa Sequencing Analysis 5.1, y fueron comparadas con las depositadas en el GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Para la múltiplex-PCR el ADN obtenido en la primera reacción con los primers ITS1F/ITS4 se utilizó para una segunda amplificación según el protocolo propuesto por GLEN *et al.* (2006), que permitía la identificación de *M. nubilosa*, *M. parva* R. F. Park & Keane y *M. molleriana* (Thüm.) Lindau. En trabajos anteriores se había comprobado que estas especies eran las más abundantes en eucaliptales de Galicia (OTERO *et al.* 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todas las especies de eucalipto se detectó la presencia de *Mycosphaerella*, aunque se observaron diferencias en el nivel de incidencia de la enfermedad (Tabla 1).

Mediante el estudio de las características morfológicas se han identificado tres especies de *Mycosphaerella*: *M. nubilosa*, *M. parva* y *M. molleriana* y otros patógenos fúngicos como *Pestalotia* sp., fumaginas y *Pseudocercospora* spp. Este último género comprende especies que son anamorfos de *Mycosphaerella* siendo muy difícil su clasificación así como conocer la especie de *Mycosphaerella* con la que se corresponden (PARK *et al.* 2000).

Con las técnicas moleculares se han establecido seis especies de *Mycosphaerella*: *M. lateralis* Crous & M. J. Wingfield, *M. madeirae* Crous & Denman, *M. marksii* Carnegie & Keane, *M. molleriana*, *M. nubilosa* y *M. parva* (Tabla 1).

De las especies detectadas las más abundantes han sido *M. nubilosa* y *M. parva*. Resultados similares se encontraron en plantaciones de *E. globulus* de Galicia (OTERO *et al.* 2006). *M. nubilosa* puede provocar graves daños en hojas juveniles de *E. globulus* (CARNEGIE *et al.* 1998, MAXWELL 2004) y hasta el momento el número de hospedantes en el que había sido identificado se limitaba a seis especies (MAXWELL 2004). A nivel microscópico esta especie tiene ascosporas de forma ovoidal con los extremos redondeados, que no se estrechan en el septo y con unas dimensiones de 11-15 x 2-4,5 µm (Figura 1a). Estas ascosporas al germinar, sobre AM 2 % a 20 °C después de 24 horas, se extienden desde los extremos de forma paralela al eje mayor, engrosándose alrededor del septo y manteniéndose hialinas (Figura 2a). Los aislados tienen un color blanquecino en el centro pasando a verde pálido hacia los bordes, unos márgenes irregulares y poco micelio aéreo, la tasa de crecimiento mensual de 1,2 a 2,0 cm, en AM 2 % a 25 °C (Figura 3a).

M. parva es una especie que generalmente se considera saprófita porque coloniza viejas lesiones de *M. nubilosa* (PARK & KEANE 1982) aunque hay autores que sugieren que podría tratarse de una especie patógena (CARNEGIE & KEANE 1994, GLEN *et al.* 2007). En este estudio *M. parva* se ha detectado principalmente asociada a *M. nubilosa* pero en dos muestras se ha establecido como única especie presente, lo que podría indicar que tiene capacidad infectiva.

M. parva se diferencia de otras especies que afectan a *Eucalyptus*, por que sus ascocarpos, ascas y ascosporas son de menor tamaño. Las ascosporas se estrechan en el septo y son afiladas en los extremos con unas dimensiones de 7-11 x 1,5-3,0 µm (Figura 1b). Las ascosporas germinan desde uno o desde los dos extremos de la ascospora, creciendo de forma perpendicular al eje mayor, se oscurecen y se engrosan alrededor del septo AM 2 % a 20 °C después de 24 horas (Figura 2b). Los aislados son de color verde claro al principio, a veces con presencia de exudados, que con el paso del tiempo se va oscureciendo hasta adquirir un color negro. Los márgenes son irregulares y el micelio aéreo es moderado. El crecimiento del hongo es lento con una tasa de crecimiento mensual de 0,7 a 1,5 cm (Figura 3b).

La identificación de especies de *Mycosphaerella* mediante morfología fue compleja y lenta mientras que las técnicas moleculares han permitido un diagnóstico más rápido y fiable. En nuestro conocimiento se trataría de la primera identificación de *M. parva* en *E. glaucescens*, *E. pulverulenta*, *E. viminalis*, *E. regnans*, *E. gunni*, *E. cordata*, *E. crebra* y *E. dalrympleana*; de *M. nubilosa* en *E. glaucescens*, *E. pulverulenta*, *E. gunni*, *E. cordata* y *E. dalrympleana*; de *M. molleriana* en *E. nitens* y *E. dalrympleana*; de *M. marksii* en *E. pulverulenta* y *E. crebra*; de *M. lateralis* en *E. cordata* y *E. gunni*; de *M. madeirae* en *E. crebra*.

En las diez especies de *Eucalyptus* seleccionadas se han detectado seis de *Mycosphaerella* siendo *M. parva* y *M. nubilosa* las más frecuentes ya que prácticamente se han establecido en todas las muestras. Serán necesarias más investigaciones para conocer la patogenicidad y virulencia de estos hongos en las especies de eucalipto estudiadas.

Agradecimientos

Los autores queremos agradecer a D. Evaristo Moreira, propietario del vivero Moreira, por su colaboración en la recogida de muestras y en la identificación de las especies de eucalipto.

BIBLIOGRAFÍA

- CARNEGIE, A.J., ADES, P.K., KEANE, P.J. & SMITH, I.W.; 1998. *Mycosphaerella* diseases of juvenile foliage in a eucalypt species and provenances trial in Victoria, Australia. *Aust For.* 61: 190-194
- CARNEGIE, A.J. & KEANE P.J.; 1994. Further *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of *Eucalyptus*. *Mycol. Res.* 98: 413-418.
- CROUS, P.W.; 1998. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. *Mycological Memoir* 21, 170 pp.
- CROUS, P.W., HONG, L., WINGFIELD, B.D. & WINGFIELD, M.J.; 2001. ITS rDNA phylogeny of selected *Mycosphaerella* species and their anamorphs occurring on *Myrtaceae*. *Mycol. Res.* 105: 425-431.
- CROUS, P.W., GROENEWALD, J.Z., MANSILLA, J.P., HUNTER, G.C. & WINGFIELD, M.J.; 2004. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. *Stud. Mycol.* 50: 195-214.
- GARDES, M. & BRUNS, T.D.; 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes- Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- GLEN, M., SMITH, A.H., LANGRELL, S.R.H. & MOHAMMED, C.L.; 2007, Development of Nested Polymerase Chain Reaction Detection of *Mycosphaerella* spp. and Its Application to the Study of Leaf Disease in *Eucalyptus* Plantations. *Phytopathol.* 97: 132-144.
- MAXWELL, A.; 2004. The Taxonomy, Phylogeny and Impact of *Mycosphaerella* species on Eucalypts in South-Western Australia. Ph. Thesis. School of Biotechnology and Biological Science Murdoch University. Australia. 231 pp.
- OTERO, L., AGUÍN, O., MANSILLA, P., MONTENEGRO, D. Y PINTOS, C.; 2006. Identificación de especies de *Mycosphaerella* en *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus nitens* en Galicia. *Actas del XIII Congreso de la SEF*, 207. Murcia.
- PARK, R.F. & KEANE, P.J.; 1982. Three *Mycosphaerella* species from leaf diseases of *Eucalyptus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 79: 95-100.

PARK, R.F., KEANE, P.J., WINGFIELD, M.J. & CROUS, P.W.; 2000. Fungal diseases of eucalypt foliage. In: Keane, P.J., Kile, G.A., Podger, F.D. & Brown, B.N (eds.), *Diseases and pathogens of eucalypts*: 153–239. CSIRO Publishing. Collingwood. Australia.

TERCER INVENTARIO FORESTAL NACIONAL. GALICIA. 2003. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid. España. 354 pp.

SILVA-PANDO, J. Y RIGUEIRO RODRÍGUEZ, A.; 1992. *Guía das árbores e bosques de Galicia*. Editorial Galaxia. Vigo. España. 264 pp.

WHITE T.J., BRUNS T.D., LEE S.B. & TAYLOR J.W.; 1990. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In: MD Innis, DH Gelfrand, JJ Sninsky & TJ White (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*: 315-322. Academic Press. San Diego. Estados Unidos.



Figura 1. Ascospora de **a:** *M. nubilosa* y **b:** *M. parva*

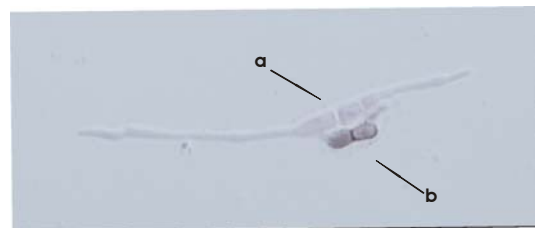


Figura 2. Ascosporas germinadas sobre AM 2% tras 24 h a 20 °C. **a:** *M. nubilosa* y **b:** *M. parva*.

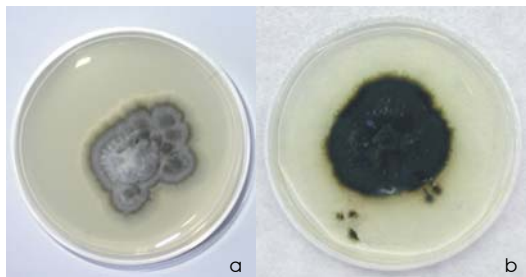


Figura 3. Cultivos monospóricos de **a:** *M. nubilosa* y **b:** *M. parva*

Tabla 1. Especies de *Mycosphaerella* identificadas por morfología y por biología molecular en cada una de las especies muestreadas y otros patógenos fúngicos detectados

Hospedante	Especies identificadas por características morfológicas		Especies identificadas por técnicas moleculares
	Mycosphaerella	Otros	
<i>E. globulus</i> *	<i>M. parva</i> , <i>M. nubilosa</i> , <i>M. molleriana</i> , <i>Mycosphaerella</i> spp.		<i>M. parva</i> , <i>M. nubilosa</i> , <i>M. lateralis</i>
<i>E. glaucescens</i> *	<i>M. parva</i> , <i>M. nubilosa</i> , <i>Mycosphaerella</i> spp.	<i>Pseudocercospora</i> spp., <i>Pestalotia</i> sp.	<i>M. parva</i> , <i>M. nubilosa</i>
<i>E. nitens</i> *	<i>M. parva</i> , <i>M. molleriana</i> , <i>Mycosphaerella</i> spp.	<i>Pseudocercospora</i> spp., <i>Pestalotia</i> sp.	<i>M. parva</i> , <i>M. nubilosa</i> , <i>M. molleriana</i>
<i>E. pulverulenta</i> *	<i>M. parva</i> , <i>M. nubilosa</i> , <i>Mycosphaerella</i> sp.	<i>Pseudocercospora</i> spp., <i>Pestalotia</i> sp.	<i>M. parva</i> , <i>M. nubilosa</i> , <i>M. marksii</i>
<i>E. viminalis</i> *	<i>M. parva</i>		<i>M. parva</i>
<i>E. regnans</i>	<i>Mycosphaerella</i> spp.	<i>Pseudocercospora</i> spp., <i>Pestalotia</i> sp.	<i>M. parva</i>
<i>E. gunni</i> *	<i>M. parva</i> , <i>M. nubilosa</i>		<i>M. parva</i> , <i>M. nubilosa</i> , <i>M. lateralis</i>
<i>E. cordata</i> *	<i>M. parva</i> , <i>M. nubilosa</i> , <i>Mycosphaerella</i> spp.		<i>M. parva</i> , <i>M. nubilosa</i> , <i>M. lateralis</i>
<i>E. crebra</i>	<i>M. parva</i>	<i>Pseudocercospora</i> spp., <i>Pestalotia</i> sp., <i>fumagina</i>	<i>M. parva</i> , <i>M. madeirae</i> , <i>M. marksii</i>
<i>E. dalrympleana</i>	<i>M. parva</i> , <i>M. nubilosa</i> , <i>M. molleriana</i> , <i>Mycosphaerella</i> spp.		<i>M. parva</i> , <i>M. nubilosa</i> , <i>M. lateralis</i>

*Especies con daños significativos de *Mycosphaerella* spp.