

INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD FOLIAR CAUSADA POR *MYCOSPHAERELLA SPP.* EN EUCALIPTALES DE GALICIA (NO ESPAÑA)

Otero, L.^{1*}; Aguín, O.¹; Sainz, M.J.²; Mansilla, P.^{1,2}

¹Estación Fitopatológica do Areeiro. Subida a la Robleda, s/n. 36153. Pontevedra. España.

²Dep. Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario 27001, Lugo. España

*Autores para la correspondencia: efa@efa-dip.org

Boletín del CIDEU 4: 3-8 (2007)
ISSN 1885-5237

Resumen

El género *Mycosphaerella* incluye más de 30 especies que son patógenas en eucalipto. La enfermedad que ocasionan se conoce como MLB (*Mycosphaerella* leaf blotch). El síntoma más característico consiste en la aparición de unas manchas necróticas en las hojas que reducen su capacidad fotosintética, con la consiguiente disminución del crecimiento y de la producción de madera.

En 2005-2006 se hizo un muestreo en las masas de eucalipto, la mayoría de *Eucalyptus globulus*, situadas en las provincias de Pontevedra y A Coruña (noroeste de España). En el muestreo se estimó la incidencia y severidad de la enfermedad. Se recogieron hojas con síntomas para la identificación de especies mediante técnicas moleculares.

En prácticamente todos los puntos muestreados se detectaron síntomas de la enfermedad, aunque los valores de incidencia y severidad fueron muy variables. Las plantaciones con árboles jóvenes fueron las más afectadas, con unos valores de incidencia y severidad mayores que los observados en las plantaciones con árboles adultos y en las repoblaciones recientes. Por técnicas moleculares se han identificado 11 especies de *Mycosphaerella* de las que cinco se han detectado por primera vez en España: *M. parva*, *M. vespa*, *M. madeirae*, *M. lateralis* y *M. aurantia*. En el 65% de las muestras se ha encontrado *M. nubilosa*, que puede considerarse el principal causante de la enfermedad en Galicia.

Palabras clave: identificación, mancha necrótica, MLB, *Mycosphaerella nubilosa*, secuenciación.

Summary

Incidence and severity of leaf blotch caused by *Mycosphaerella spp.* in eucalyptus stands in Galicia (NW) Spain

Mycosphaerella genus comprises more than 30 species which are reported pathogens of eucalyptus. Disease caused by these species is known as MLB (*Mycosphaerella* leaf blotch). The main symptoms caused by this genus are necrotic leaf spots, which significantly reduce photosynthetic activity in the plant and consequently its growth and subsequent timber production.

Eucalyptus stands, mainly with *Eucalyptus globulus*, were surveyed in Pontevedra and A Coruña provinces (NW Spain) in 2005-2006. In the sampling, both the incidence and severity of the disease was estimated. Symptomatic leaves were collected in order to identify the species involved using molecular techniques.

Disease symptoms were found in nearly almost all surveyed sites, although the incidence and severity rates presented differences among sites. Young tree stands were more severely affected, being the incidence and severity higher than in adult tree stands and recently reforested areas. Of the 11 species identified, five were detected for the first time in Spain: *M. parva*, *M. vespa*, *M. madeirae*, *M. lateralis* y *M. aurantia*. *M. nubilosa* was found in 65% of the samples, being this species the main agent of the disease in Galicia.

Keywords: identification, necrotic spots, MLB, *Mycosphaerella nubilosa*, sequencing.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha extendido por las masas de eucalipto una enfermedad que afecta a las hojas y que se conoce como MLB (*Mycosphaerella* leaf blotch). *Mycosphaerella* spp. es un género muy extenso, donde más de 30 especies están asociadas, en todo el mundo, con enfermedades sobre eucalipto (Crous, 1998). El principal síntoma son manchas necróticas en las hojas (Figura 1), por eso se conoce como mancha de la hoja causada por *Mycosphaerella*. Estas lesiones reducen la capacidad fotosintética, el crecimiento del árbol y la producción de madera, pudiendo en algunos casos llegar a provocar la muerte de la planta (Park y Keane, 1982). Las especies que causan mayores daños varían según las regiones, siendo su origen, distribución, impacto y virulencia poco conocido (Maxwell, 2004).

La identificación de las especies de *Mycosphaerella* es difícil por que es frecuente encontrar más de una especie en una misma lesión (Crous, 1998), aislar el hongo en medio artificial es complejo, su crecimiento es, en algunos casos, muy lento y los parámetros que se utilizan para la diferenciación de especies por características morfológicas están muy influenciados por las condiciones de cultivo (Crous *et al.*, 2001). En los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares, que han facilitado el trabajo de diferenciación de especies, basadas en la secuenciación de regiones ITS del ADN ribosómico (Crous *et al.*, 2004; Maxwell, 2004).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la distribución, evaluar el daño e identificar las especies de *Mycosphaerella* existentes en los eucaliptales del NO España.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

Durante los años 2005-2006 se llevaron a cabo muestreos en las provincias de Pontevedra y A Coruña. El diseño de estos muestreos se realizó siguiendo los mapas provinciales a escala 1:250.000 y un mapa



Figura 1. Hojas con síntomas de *Mycosphaerella*

de distribución de masas de eucalipto en Galicia (Ministerio de Medio Ambiente, 2001). Sobre estos mapas se trazó una red de puntos de muestreo de 10x10 km en aquellas zonas donde había masas de eucalipto. Se inspeccionaron un total de 157 masas de eucalipto, de las que 61 corresponden a la provincia de Pontevedra y 96 a la de A Coruña. Todos los puntos de muestreo coincidieron con plantaciones de *Eucalyptus globulus* Labill. excepto tres que eran de *E. nitens* (Deane y Maiden) Maiden, tres de *E. viminalis* Labill., una de *E. obliqua* L'Herit. (con algunos *E. globulus*), una masa mixta de *E. nitens* (como especie predominante) y de *E. globulus* y dos masas mixtas donde predominaba *E. globulus*.

En cada punto de muestreo se anotaban las características de la plantación, indicando la especie o especies de *Eucalyptus* que la componían, la edad y el estado general de los árboles.

La severidad de la enfermedad se estimó tanto en Pontevedra como en A Coruña siguiendo el método propuesto por Maxwell

(2004). Se seleccionaron cinco árboles, representativos del total de daños, en cada punto de muestreo. Se escogió una rama por árbol y de cada rama se estimó la severidad de MLB en ocho hojas situadas en la parte central. Se estableció un código de severidad con seis niveles según el porcentaje de área foliar afectada, cuya distribución es:

Nivel	% del area foliar afectada
1	0-5
2	6-10
3	11-25
4	26-50
5	51-75
6	>76

En la provincia de A Coruña también se cuantificó la incidencia de MLB, para ello de cada árbol se cogieron cinco ramas en las que se contaban el número total de hojas y las que tenían síntomas de la enfermedad con lo que se calculaba el porcentaje de hojas afectadas.

Identificación de especies

En cada punto de muestreo se recogieron de 15 a 20 hojas afectadas que se mantuvieron en bolsas de plástico, a 4°C hasta su utilización en laboratorio.

Con estas muestras se hicieron cultivos monospóricos siguiendo las indicaciones de Crous (1998) y Maxwell (2004).

La identificación de especies de *Mycosphaerella* se ha realizado mediante la secuenciación de las regiones ITS del ADN ribosómico y el análisis de las secuencias obtenidas. La extracción del ADN fúngico se hizo de los cultivos monospóricos o directamente de las lesiones necróticas de

las hojas. En ambos casos el ADN se extrajo mediante un kit comercial de extracción, EZNA™ Fungal DNA Miniprep Kit (Omega Bio-tek), siguiendo el protocolo corto pero sin añadir mercaptoetanol ni RNAsa y haciendo una homogenización previa con un pistón estéril.

Con estas extracciones se procedió a la identificación de las especies mediante la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando los primers ITS1F e ITS4 (0,5 pmol de cada primer) y con las condiciones de amplificación que aparecen en Crous *et al.* (2004).

El producto de amplificación se secuenció utilizando el kit comercial BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La secuencia de ADN se analizó en un secuenciador ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y mediante el uso del programa BLAST se compararon las secuencias obtenidas con las que existen en el Gen-Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

RESULTADOS

Incidencia y severidad de MLB

En el 95% de los puntos de muestreo se encontraron síntomas de la enfermedad. Sólo en ocho puntos no se observaron árboles afectados por MLB.

Los valores de incidencia y severidad que se obtuvieron han sido muy variables, en el caso de la severidad los niveles que se estimaron fueron de uno a cuatro. No se detectó ningún punto con valores superiores, es decir, con niveles cinco y seis (Tabla 1).

Tabla 1. Número y porcentaje de masas según el nivel de severidad

Nivel severidad	Provincia de Pontevedra		Provincia de A Coruña		TOTAL	
	Nº de masas	% de masas	Nº de masas	% de masas	Nº de masas	% de masas
Sin daños	0	0,0	8	8,3	8	5,1
1	11	18,0	13	13,5	24	15,3
2	29	47,5	44	45,8	73	46,5
3	14	23,0	29	30,2	43	27,4
4	7	11,5	2	2,1	9	5,7
5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
6	0	0,0	0	0,0	0	0,0
TOTAL	61	100,0	96	100,0	157	100,0

Los daños más importantes se encontraron en plantaciones constituidas por árboles jóvenes, es decir, aquellos que presentan sólo hojas juveniles, de tal manera que en el 73% de esas masas la incidencia, porcentaje de hojas con síntomas, era mayor del 50%. En cuanto a la severidad, área foliar afectada, en el 85% de las plantaciones jóvenes el nivel de severidad era igual o mayor a dos y en un 36,5% igual o mayor que tres.

Las plantaciones con árboles adultos estaban menos afectadas, la incidencia no llegaba al 33% en dos tercios de los puntos y el nivel de severidad era uno en el 38% de las plantaciones. Las hojas adultas muy raramente estaban afectadas, así sólo un 8% de las muestras que se recogieron correspondían a este tipo de hojas. En estos puntos también se tuvieron en cuenta los rebrotes, por lo que en algunos casos de gran cantidad de rebrotes, árboles tras incendios, los niveles de incidencia y severidad fueron elevados.

En repoblaciones recientes, aquellas cuyas plantas tienen hojas juveniles glaucas, la incidencia y la severidad fueron mucho más bajas. La incidencia fue menor del 50% en

la mayor parte de las repoblaciones (85%) y el nivel de severidad era uno en la mitad de los puntos de este tipo. Tres de las ocho plantaciones donde no se encontraron síntomas eran repoblaciones.

Identificación de especies

Con los primers ITS1F e ITS4 se obtuvo un producto de aproximadamente 550 pb. en todas las muestras. El análisis de las secuencias obtenidas han permitido la identificación de once especies: *M. nubilosa* (Cooke) Hansford, *M. marskii* Carnegie y Keane, *Pseudocercospora pseudoecalyptorum* Crous (anamorfo), *M. molleriana* (Thüm.), *M. readeriellophora* Crous y J. P. Mansilla, *M. communis* Crous y J. P. Mansilla, *M. parva* R. F. Park y Keane, *M. vespa* Carnegie y Keane, *M. madeirae* Crous y Denman, *M. lateralis* Crous y M. J. Wingfield y *M. aurantia* A. Maxwell. Las cinco últimas se han detectado por primera vez en España.

M. nubilosa es la más frecuente, con un 65% de las muestras secuenciadas, las demás aparecen en un porcentaje mucho menor (Tabla 2). En algunos puntos se identificaron dos especies.

Tabla 2. Porcentaje de identificación de las especies detectadas en las provincias de Pontevedra y A Coruña

Especie	Pontevedra	A Coruña	TOTAL
	% de identificaciones	% de identificaciones	% de identificaciones
<i>M. nubilosa</i>	62,86	65,26	64,24
<i>M. parva</i>	4,29	14,74	10,30
<i>M. vespa</i>	10,00	3,16	6,06
<i>M. marksii</i>	7,14	2,11	4,24
<i>M. madeirae</i>	4,29	4,21	4,24
<i>Ps. pseudoecalyptorum</i>	7,14	0,00	3,03
<i>M. readeriellophora</i>	1,43	4,21	3,03
<i>M. communis</i>	0,00	3,16	1,82
<i>M. lateralis</i>	0,00	2,11	1,21
<i>M. molleriana</i>	1,43	1,05	1,21
<i>M. aurantia</i>	1,43	0,00	0,61
TOTAL	100,00	100,00	100,00

DISCUSIÓN

Mycosphaerella como patógeno del eucalipto, está distribuido en prácticamente todos los eucaliptales del área estudiada, afectando a gran parte de los árboles jóvenes y rebrotes.

Las diferencias que se observan en el impacto de MLB en las plantaciones pueden ser debidas a muchos factores, las condiciones de cultivo, las condiciones climáticas locales, las especies de *Mycosphaerella* presentes, la cantidad de inóculo inicial, etc. Un factor fundamental en el nivel de daño es la edad de la plantación, siendo los árboles jóvenes los que están más afectados.

Las plantaciones con árboles adultos estaban menos dañadas y las hojas adultas prácticamente no tenían síntomas de MLB, de manera que las lesiones necróticas se limitaban a las hojas jóvenes de los rebrotes. Las repoblaciones recientes tenían también menos daños, probablemente por el período que necesita el patógeno para

establecerse, ya que se ha observado que las plantaciones de dos años están mucho más afectadas que las de un año (Maxwell, 2004).

De las especies identificadas la más frecuente ha sido *M. nubilosa*, que puede considerarse la principal causante de la enfermedad en el NO de España. El hecho de que *M. nubilosa* preferentemente infecte hojas jóvenes (Park, 1988b) explicaría el que la inmensa mayoría de árboles con síntomas de la enfermedad sean jóvenes o eran rebrotes con hojas jóvenes y que los árboles adultos prácticamente no sufran daños. Lo que corresponde con otros estudios donde se constata la importancia de la infección que provoca en hojas jóvenes de *E. globulus* (Maxwell, 2004; Park y Keane, 1982).

Las demás especies han sido identificadas en menor número, solamente destacar *M. parva*, *M. vespa*, *M. madeirae*, *M. lateralis* y *M. aurantia* por ser la primera vez que se registran en España.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Carnegie, A.J., Keane P.J., 1994. Further *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of *Eucalyptus*. *Mycological Research* 98, 413-418.
- Crous, P.W. 1998. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. *Mycologia Memoir* 21, 1-170
- 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*. *Studies in Mycology* 50, 195-214.
- 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. *Mycology Research* 105, 425-431
- 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. 231pp.
- Ministerio de Medio Ambiente. 2001. Tercer Inventario Forestal Nacional. Galicia. Madrid. España. 354 pp.
- Park, R.F., 1988a. Effect of certain host inoculums and environmental and environmental factors on infection of *Eucalyptus* species by two *Mycosphaerella* species. *Transactions of the British Mycological Society* 90, 221-228.
- Park, R.F., 1988b. Epidemiology of *Mycosphaerella nubilosa* and *M. cryptica* on *Eucalyptus* spp. In South-Eastern Australia. *Transactions of the British Mycological Society* 91, 261-266.
- Park, R.F., Keane, P.J., 1982. Leaf diseases of *Eucalyptus* associated with *Mycosphaerella* species. *Transactions of British Mycological Society* 79, 101-115.