

## El género *Mycosphaerella* en plantaciones de *Eucalyptus* en Galicia

L. OTERO, O. AGUÍN, M. J. SAINZ, J. P. MANSILLA

El género *Mycosphaerella* incluye más de 30 especies patógenas en eucalipto, causando la enfermedad conocida como *Mycosphaerella* leaf blotch (MLB) o *Mycosphaerella* leaf disease (MLD). El síntoma más característico de MLB consiste en la aparición de manchas necróticas en las hojas que reducen la capacidad fotosintética, con la consiguiente disminución del crecimiento y de la producción de madera. Durante los años 2005-2007, se realizaron muestreos en plantaciones de eucalipto situadas en las provincias de Pontevedra, A Coruña y Lugo, con el objetivo de conocer la distribución de la enfermedad e identificar las especies de *Mycosphaerella* responsables. El 90% de los eucaliptales gallegos inspeccionados mostraron árboles con síntomas de MLB, siendo las plantaciones con árboles jóvenes las que presentaron un mayor nivel de severidad. Mediante técnicas moleculares de diagnóstico de material foliar sintomático, se han identificado nueve especies de *Mycosphaerella* y el anamorfo *Pseudocercospora pseudoeucalyptorum*. Dos de las especies, *M. madeirae* y *M. aurantia*, se citan por primera vez en España. *Mycosphaerella nubilosa* puede considerarse el principal causante de MLB en Galicia, ya que se detectó en el 60% de los eucaliptos afectados.

L. OTERO, O. AGUÍN, J. P. MANSILLA. Diputación Provincial de Pontevedra. Estación Fitopatológica do Areeiro. Subida a la Robleada, s/n. 36153 Pontevedra. E-mail: efa@efa-dip.org

M. J. SAINZ, J. P. MANSILLA. Dep. Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario, s/n. Lugo. 27002.

**Palabras clave:** eucalipto, mancha foliar necrótica, MLB, *Mycosphaerella nubilosa*.

### INTRODUCCIÓN

La superficie de masas puras del género *Eucalyptus* en Galicia se sitúa en torno a 178.000 hectáreas. Más del 95% corresponden a *E. globulus* Labill (SILVA-PANDO y RIGUEIRO, 1992), que producen 36.333.830 m<sup>3</sup> de madera con corteza (MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, 2001). Otras especies cultivadas en menor proporción son *E. nitens* (Deane & Maiden) Maiden, *E. viminalis* Labill y *E. obliqua* L'Herit.

En los últimos cinco años, en numerosas plantaciones de *E. globulus*, se ha detectado una enfermedad que afecta principalmente a las hojas juveniles, que muestran manchas y

necrosis (Figuras 1 y 2), y causa una defoliación prematura, cancros en pequeñas ramas, y detención del crecimiento del árbol (LUNDQUIST y PURNELL, 1987; CROUS, 1998; PARK *et al.*, 2000). La enfermedad se conoce como *Mycosphaerella* leaf blotch (MLB) o *Mycosphaerella* leaf disease (MLD), y puede estar ocasionada por diversas especies del género *Mycosphaerella* Johanson. Estas especies están consideradas como los patógenos foliares que causan mayores daños en especies de *Eucalyptus* en regiones templadas de todo el mundo (CROUS, 1998). También se ha observado que algunas especies de *Mycosphaerella* pueden infectar hojas adultas de eucalipto (GANAPATHI, 1979; PARK y KEANE, 1982b).



Figura 1. Síntomas foliares de *Mycosphaerella* sobre *Eucalyptus globulus*.



Figura 2. Detalle de las hojas con presencia de lesiones características de *Mycosphaerella*.

La taxonomía del género *Mycosphaerella* se ha basado tradicionalmente en la caracterización de las lesiones foliares y sobre todo en la observación del tamaño y morfología del ascocarpo, ascas y ascosporas (Figura 3), patrones de germinación de las ascosporas, tasas de crecimiento de los aislados en cultivo, y características y morfología de los anamorfos (CROUS, 1998). Estos métodos son insuficientes en muchos casos para la identificación de especies, debido a la gran variabilidad que presentan, a que frecuentemente coinciden entre distintas especies, y a la dificultad para conseguir aislar el hongo a partir de las lesiones.

El desarrollo de técnicas moleculares ha contribuido enormemente a la detección e identificación de las especies de *Mycosphaerella* (CARNEGIE *et al.*, 2001; CROUS *et al.*, 2001; KULARATNE *et al.*, 2004), que se basan

actualmente en la comparación de secuencias de las regiones ITS1 e ITS2 del ADN ribosomal (CROUS *et al.*, 2001; MAXWELL *et al.*, 2003; CROUS *et al.*, 2004).

Se han descrito más de 80 especies de *Mycosphaerella* y sus anamorfos sobre *Eucalyptus*, de las cuales 30 son consideradas patógenas (CROUS *et al.*, 2006), aunque apenas existe información sobre su incidencia y distribución, rango de hospedadores y patogenicidad. Hasta hace pocos años, dada la dificultad de identificación con técnicas tradicionales, la MLB se atribuía generalmente a *M. molleriana*. Sin embargo, CROUS *et al.* (2004), aplicando técnicas moleculares para el análisis del primer material sintomático de hojas de *E. globulus* recogidas en Galicia, demostraron que la enfermedad estaba causada principalmente por *M. nubilosa* y detectaron dos nuevas especies y sus anamorfos: *M. readeriellophora* Crous & J. P. Mansilla (anamorfo *Readeriella readeriellophora* Crous & J. P. Mansilla) y *M. communis* Crous & J. P. Mansilla (anamorfo *Dissoconium commune* Crous & J. P. Mansilla). Esta fue la primera cita de *M. nubilosa* sobre *E. globulus* no sólo en España sino en Europa.

El objetivo de este trabajo fue obtener un mapa de distribución de la MLB y estudiar la diversidad de especies del género *Mycosphaerella* en plantaciones de *Eucalyptus* en Galicia.



Figura 3. Ascas con ascosporas de *Mycosphaerella* emergiendo del cuerpo de fructificación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Muestreo

Se inspeccionaron plantaciones de eucalipto en las provincias de Pontevedra, A Coruña y Lugo, siguiendo los mapas provinciales a escala 1:250.000 y el mapa de distribución de masas de eucalipto en Galicia recogido en el MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE (2001). En las zonas con presencia de eucalipto, se trazó una retícula de puntos de muestreo de 10 x 10 km. En Pontevedra el muestreo se realizó entre los meses de marzo y agosto de 2005, en A Coruña entre noviembre de 2005 y marzo de 2006, y en Lugo desde septiembre de 2006 hasta febrero de 2007. En total se inspeccionaron 209 puntos, de los que 61 correspondieron a la provincia de Pontevedra (59 de *E. globulus* y 2 de *E. nitens*), 96 a la de A Coruña (91 de *E. globulus*, 3 de *E. viminalis*, 1 de *E. obliqua*, y 1 de *E. nitens*), y 52 a la de Lugo (51 de *E. globulus* y 1 de *E. nitens*) (Figura 4). En la mayoría de los puntos, se tomaron muestras de hojas juveniles sintomáticas de MLB en árboles de 2-3 años; en 12 plantaciones de *E. globulus* en Pontevedra, 4 en A Coruña y 17 en Lugo, se tomaron también muestras de hojas adultas con síntomas de la enfermedad en árboles de más de 5 años.

Dentro de cada plantación, se registró la presencia o ausencia de árboles con síntomas de MLB; en el caso de presencia de la enfermedad, se seleccionaron cinco árboles sintomáticos, para determinar el porcentaje de hojas con síntomas (en las plantaciones de A Coruña y Lugo) y la severidad (en las tres provincias).

Para estimar el porcentaje de hojas con síntomas, se seleccionaron cinco ramas por árbol, en las que se contaron el número total de hojas y las que tenían manchas características de *Mycosphaerella*. Hay que señalar que, en un árbol afectado por MLB, las hojas sintomáticas aparecen prácticamente en todas las ramas.

La severidad de la enfermedad se determinó en cada uno de los cinco árboles sintomáticos seleccionados mediante el examen

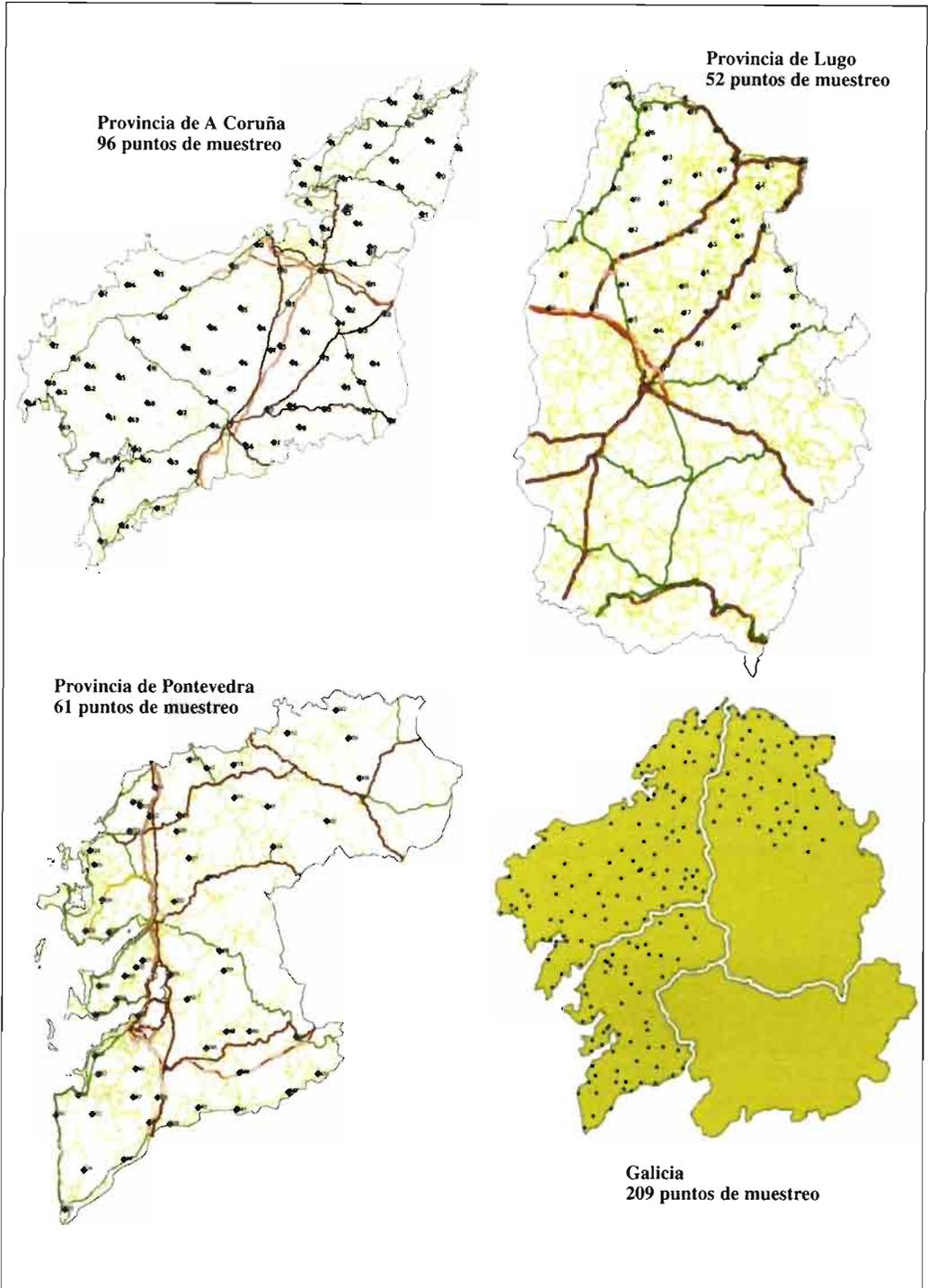


Figura 4. Localización de los puntos de muestreo de eucalipto en las provincias de A Coruña, Lugo y Pontevedra.



Figura 5. Lesión de MLB con los cuerpos de fructificación en la hoja.

*in situ* de ocho hojas situadas en la parte central de una rama externa (se eligió una rama externa para evitar el sombreado de estratos superiores), mediante una escala adaptada a partir de la propuesta por MAXWELL (2004), que establece una escala de severidad con seis niveles según el porcentaje de área foliar afectada por MLB: nivel 1, >0-6%; nivel 2, >6-12%; nivel 3, >12-25%; nivel 4, >25-50%; nivel 5, 50-75%; nivel 6, >75%.

#### Identificación de especies

En cada punto de muestreo, se recogieron de 15 a 20 hojas de eucalipto con síntomas de MLB, que se conservaron a 4 °C.

En el laboratorio, se observaron todas las hojas bajo microscopio estereoscópico para detectar la presencia de cuerpos de fructificación en las lesiones. En aquellas hojas que mostraron pseudotecios (Figura 5), se cortaron pequeños fragmentos de la lesión que se mantuvieron en agua estéril durante 24 h. Después se secaron y se pegaron a la tapa de una placa Petri de 5 cm, de forma que las ascosporas pudieran caer desde el cuerpo de fructificación a la base de la placa que con-

tenía como medio de cultivo agar-malta (AM) al 2%. Las placas se incubaron a 20 °C en oscuridad durante 24 horas. Con el objetivo de obtener cultivos monospóricos, se recogió en cada placa una sola ascospora germinada, que se transfirió a una nueva placa Petri donde se cultivó a 25 °C en oscuridad (CROUS, 1998).

La identificación molecular de especies de *Mycosphaerella* se realizó mediante amplificación, secuenciación y análisis de las regiones ITS del ADN ribosómico.

La extracción del ADN fúngico se llevó a cabo directamente a partir de las lesiones necróticas de las hojas, y de los cultivos monospóricos obtenidos. En ambos casos, para la extracción se utilizó el kit comercial 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. Después de pasar la muestra por los diferentes reactivos del kit, se obtuvo una solución de ADN genómico que se conservó a -20° C.

El ADN molde se amplificó mediante los primers ITS1F e ITS4 (GARDES y BRUNS 1993, WHITE *et al.*, 1990), que amplifican las regiones ITS1 e ITS2 del ADN ribosomal. La mezcla de amplificación consistió en 0,5 pmol de cada primer, 0,75 unidades de Bio-taq, 1x de tampón de PCR, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 μM de cada dNTP, 1 μl de la extracción de ADN y agua estéril hasta un volumen final de 25 μl. Las condiciones de la reacción fueron las propuestas por CROUS *et al.* (2004) para *Mycosphaerella*: desnaturalización inicial a 96 °C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos a 96 °C 30 segundos, 57 °C 30 segundos y 72 °C 90 segundos, finalmente una extensión a 72 °C durante 7 minutos. En todos los ensayos se incluyeron controles negativos de extracción y de amplificación (sin ADN), para detectar cualquier posible contaminación, y controles positivos que consistieron en ADN procedente de las cepas de referencia *M. communis* (CBS 114238), *M. nubilosa* (CBS 113064 y CBS 111445) y *M. readeriello-*

hora (CBS 114240) suministradas por el Dr. Pedro W. Crous (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Holanda).

Los productos de PCR se separaron y visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Cinco microlitros de cada producto de la amplificación se mezclaron con 2 mL de tampón de carga para llevar a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) en TBE 0,5 X a 120 V. En cada gel también se incluyó un marcador de 100 en 100 pb (marcador XIV, Roche Diagnostics). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 mg/mL), y se examinaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

Para secuenciación, los amplímeros se purificaron con el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con el BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 96 °C 1 min, 25 ciclos a 96 °C 10 sec, 50 °C 5 s, y 60 °C 4 min. Los productos de secuenciación se precipitaron en etanol (95% vol), se desnaturalizaron a 94 °C durante 3 minutos, y se cargaron en un secuenciador ABIPrism™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias se analizaron con el programa Sequencing Analysis 5.1, y se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando el programa de alineamiento BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

## RESULTADOS

### Incidencia y severidad de MLB

De las 209 plantaciones de eucalipto muestreadas, 193 presentaron árboles con síntomas de MLB, demostrando una amplia distribución de la enfermedad en Galicia. Todas las plantaciones de eucalipto inspeccionadas en Pontevedra mostraron hojas con lesiones y manchas causadas por *Mycosphaerella*. Tanto en A Coruña como en Lugo, hubo 8 plantaciones libres de MLB. La enfermedad afectaba principalmente a árboles con hojas juveniles, aunque también se observaron síntomas de MLB en hojas adultas.

El porcentaje de hojas con lesiones de MLB por árbol fue estimado en las plantaciones de A Coruña y Lugo, y mostró una mayor incidencia de la enfermedad en A Coruña (Cuadro 1). De las 88 plantaciones con MLB en A Coruña, 49 presentaron

Cuadro 1. Número de plantaciones según la incidencia (porcentaje de hojas afectadas)

% hojas síntomas	A Coruña	Lugo
0	8	8
>0-10%	7	12
>10-20%	2	9
>20-33%	10	5
>33-50%	20	6
>50-66%	25	3
>66-75%	21	5
>75-100%	3	4
TOTAL	96	52

Cuadro 2. Número de plantaciones según el nivel de severidad.

Nivel de severidad	Pontevedra	A Coruña	Lugo	TOTAL
Sin daños	0	8	8	16
1 (>0-6%)	11	13	20	44
2 (>6-12%)	29	44	14	87
3 (>12-25%)	14	29	6	49
4 (>25-50%)	7	2	3	12
5 (>50-75%)	0	0	1	1
6 (>75%)	0	0	0	0
TOTAL	61	96	52	209

árboles con más del 50% de sus hojas mostrando lesiones; sin embargo, en Lugo sólo 12 de las 44 plantaciones sintomáticas mostraron árboles con más del 50% de hojas infectadas.

La severidad de MLB se estimó en las tres provincias (Cuadro 2). En Pontevedra, el nivel de severidad más abundante fue el 2 (>6-12% del área foliar afectada) (Figura 6). En A Coruña, el nivel de severidad fue en su mayoría también el 2, si bien se encontraron 29 plantaciones con nivel 3, y 2 con nivel 4 (>25-50% del área foliar afectada), que fue el máximo registrado en esta provincia (Figura 7). En Lugo se constató una menor severidad de la enfermedad, ya que el nivel más frecuente fue el 1 (>0-6% del área foliar afectada) (Figura 8).

En ninguna de las plantaciones muestreadas se observó el nivel 6 (>75% del área foliar afectada), y sólo en un punto de la provincia de Lugo se estimó el nivel 5 (>50-75% del área foliar afectada).

### Identificación de especies

La identificación molecular se basó principalmente en el ADN obtenido directamente de las lesiones foliares, debido a la dificultad de obtener cultivos monospóricos de las especies de *Mycosphaerella*. Los principales problemas surgieron sobre todo del lento crecimiento de estos hongos en cultivo (en la mayor parte de los casos, 1 cm de diámetro mensual), que llevaron a que las extracciones de ADN no pudieran llevarse a cabo hasta unos dos meses después de la llegada del material vegetal al laboratorio. Además, esa lentitud de crecimiento aumentó el porcentaje de contaminación. A pesar de esto, se consiguieron cultivos monospóricos de la mayoría de las muestras (Figura 9). Cuando el ADN se extrajo a partir de lesiones foliares, los resultados de identificación se obtuvieron en menos de 72 horas.

Los primers ITS1F e ITS4 amplificaron un fragmento de ADN ribosómico de aproximadamente 550 pares de bases en todas las muestras (tanto de lesiones como de cultivos monospóricos), y también en los controles

positivos (Figura 10). En los controles negativos no se obtuvo amplificación.

Las secuencias obtenidas mostraron una homología superior al 95% con las disponibles en el GeneBank para nueve especies de *Mycosphaerella* y uno de sus anamorfos: *M. aurantia* A. Maxwell, *M. communis* Crous & J. P. Mansilla, *M. lateralis* Crous & M. J. Wingfield, *M. madeirae* Crous & Denman, *M. marskii* Carnegie & Keane, *M. molleriana* (Thüm.) Lindau, *M. nubilosa* (Cooke) Hansford, *M. parva* R. F. Park & Keane, *M. readeriellophora* Crous & J. P. Mansilla, y *Pseudocercospora pseudoeucalyptorum* Crous (anamorfo).

La identificación del anamorfo se realizó sólo a partir de material obtenido directamente de las lesiones foliares, mientras que la de *M. aurantia* lo fue exclusivamente a partir de cultivos monospóricos. Las restantes 8 especies de *Mycosphaerella* se identificaron a partir tanto de lesiones como de cultivos monospóricos.

En el Cuadro 3, se muestra el número de identificaciones de cada una de estas 10 especies en las plantaciones de eucalipto gallegas. Los resultados demostraron que, en Galicia, la MLB es debida principalmente a *M. nubilosa*, si bien en muchos eucaliptales la enfermedad está causada por *M. parva* y *M. molleriana*. Las restantes 7 especies mostraron una baja incidencia. *Mycosphaerella madeirae*, *M. marskii* y *M. readeriellophora* se detectaron en las tres provincias, mientras que *Ps. pseudoeucalyptorum* se detectó en Pontevedra y Lugo, *M. communis* y *M. lateralis* sólo en A Coruña, y *M. aurantia* sólo en Pontevedra.

En relación a la especie de eucalipto, las diez especies identificadas en este trabajo se han encontrado en plantaciones de *E. globulus*. Además *M. nubilosa* y *M. parva* se detectaron sobre *E. nitens* y *E. viminalis*, *M. madeirae* y *M. molleriana* se identificaron en hojas de *E. obliqua*, y *Ps. pseudoeucalyptorum* en *E. nitens*.

La diversidad de especies de *Mycosphaerella* varió según el tipo de hoja. En hojas juveniles (que constituyeron el 92% del

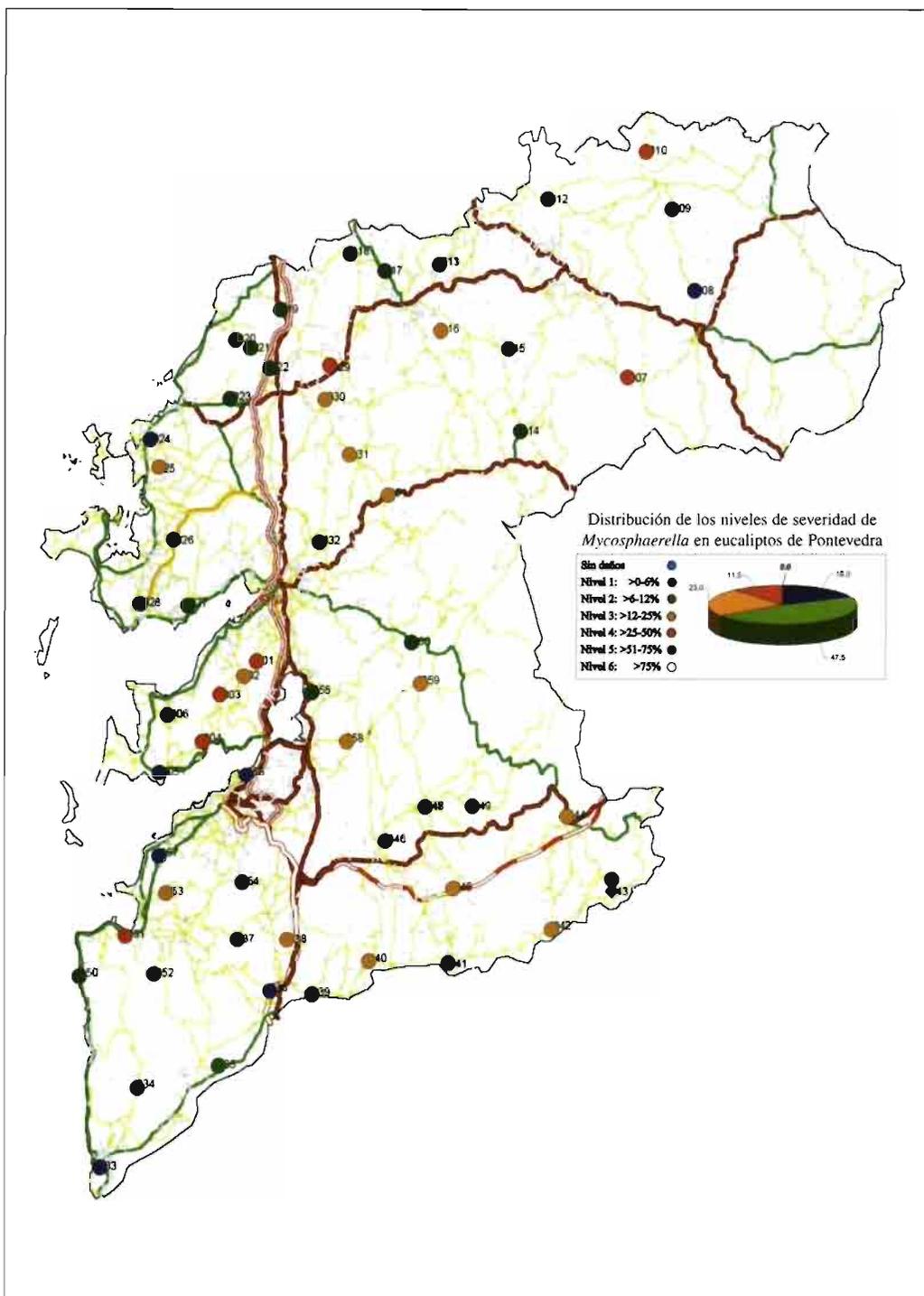


Figura 6. Distribución de los niveles de severidad de *Mycosphaerella* en eucaliptos de la provincia de Pontevedra

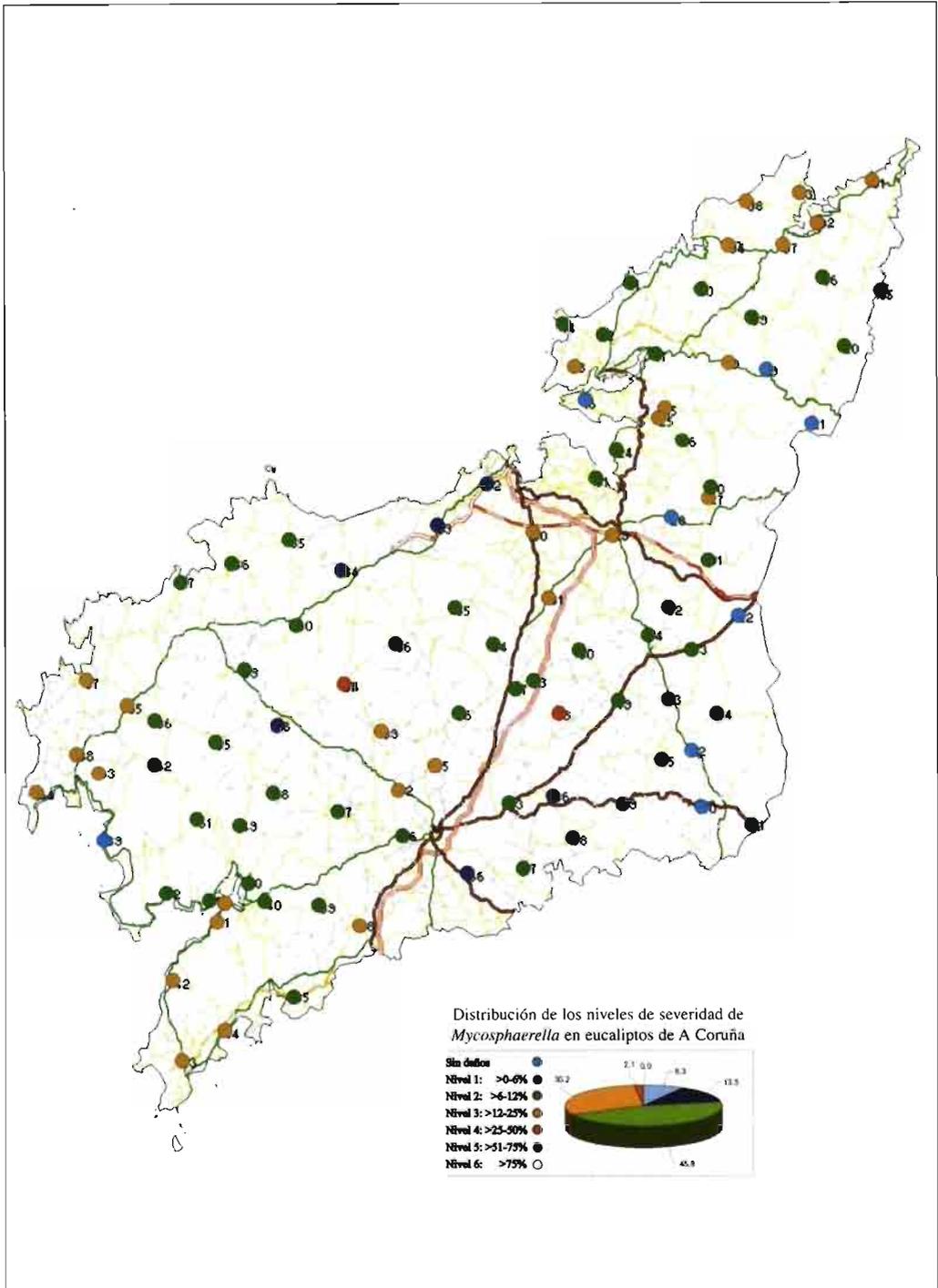


Figura 7. Distribución de los niveles de severidad de *Mycosphaerella* en eucaliptos de la provincia de A Coruña.

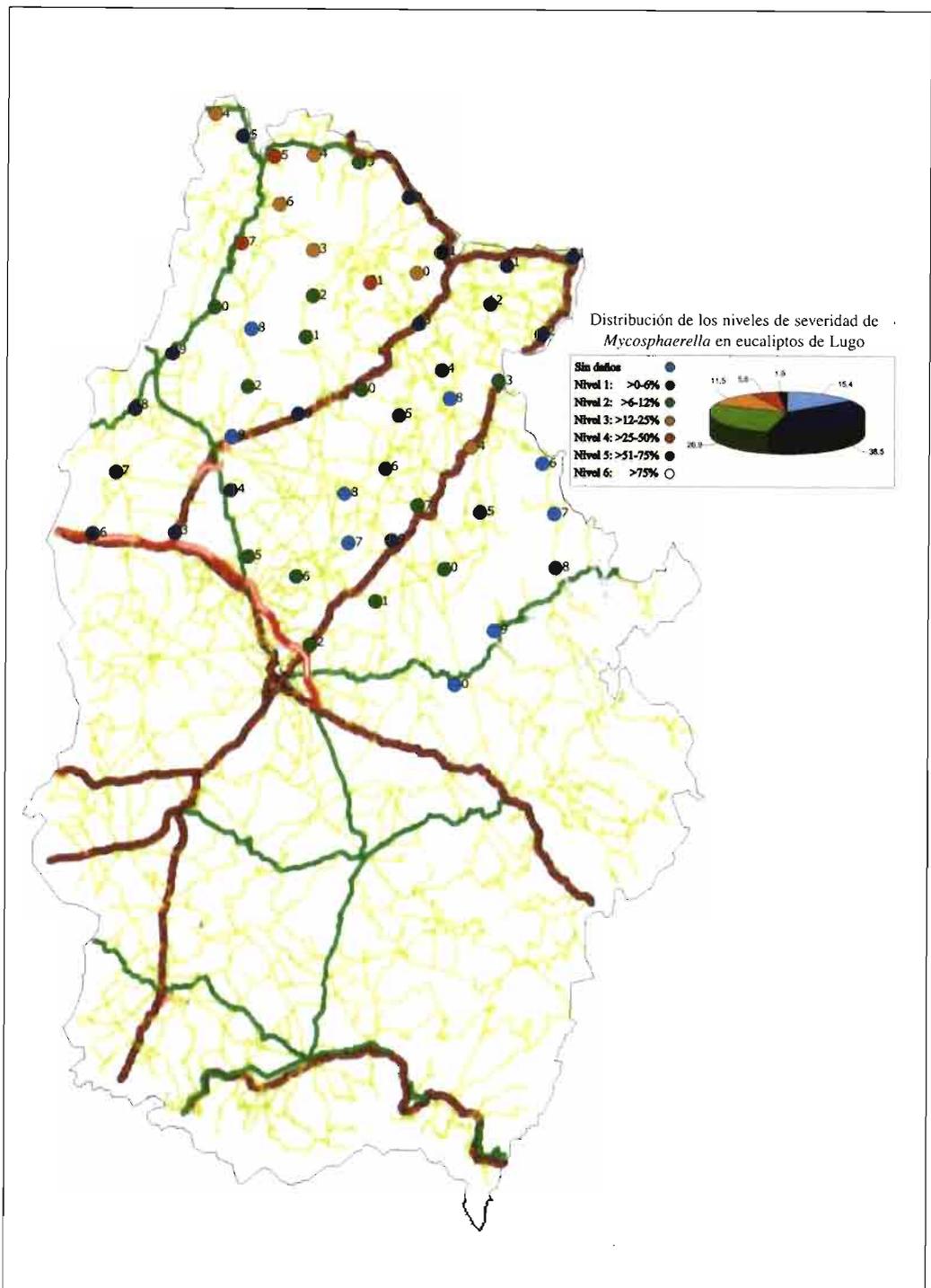


Figura 8. Distribución de los niveles de severidad de *Mycosphaerella* en eucaliptos de la provincia de Lugo.

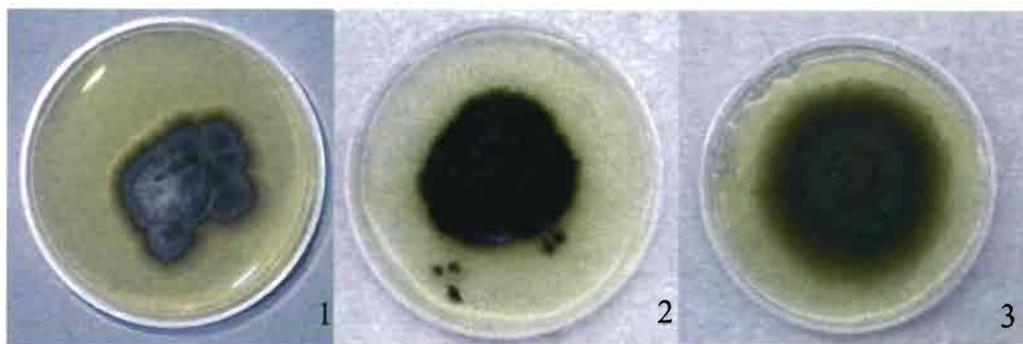


Figura 9. Cultivos monospóricos de *M. nubilosa* (1), *M. parva* (2) y *M. molleriana* (3).

total), se detectaron las diez especies, mientras que en hoja adulta sólo se identificaron cuatro: *M. nubilosa*, *M. communis*, *M. readeriellophora* y *Ps. pseudoeucalyptorum*. En hojas juveniles, la especie más abundante fue *M. nubilosa*, y *Ps. pseudoeucalyptorum* lo fue en hojas adultas.

## DISCUSIÓN

Los resultados demuestran que la enfermedad foliar causada por el género *Mycosphaerella* está ampliamente extendida en la gran mayoría de las plantaciones de eucalipto de Galicia, afectando principalmente a árboles de menos de 3 años, que tienen hojas juveniles. Es conocido que las especies de *Mycosphaerella* se desarrollan mejor en climas de temperaturas templadas y precipitaciones frecuentes (PARK, 1988a), características que suelen encontrarse en las zonas donde se cultiva el eucalipto en Galicia: franjas costeras de Pontevedra, A Coruña y Lugo. Las hojas de los árboles de la provincia de Lugo mostraron en general menor superficie foliar con lesiones de MLB que los de Pontevedra y A Coruña, provincias con costas más cálidas que la lucense.

La aplicación de técnicas moleculares permitió la identificación de nueve especies de *Mycosphaerella* y uno de sus anamorfos implicados en la MLB presente en Galicia. Con los primers utilizados (ambos universales para hongos), se obtuvo en todos los

casos (a partir de material de las lesiones foliares y/o de cultivos monospóricos) un fragmento de ADN ribosómico de aproximadamente 550 pares de bases, lo que coincide



Figura 10. Gel de agarosa al 2% mostrando el producto de amplificación obtenido con los primers ITS1F-ITS4 en tres muestras de *Mycosphaerella* (calles 1-3), control negativo de extracción (CE), control positivo (C+) y control negativo de amplificación (C-). M: marcador XIV de 100 a 2642 pb.

Cuadro 3. Número de identificaciones hechas para cada especie en cada una de las provincias

Especie	Pontevedra	A Coruña	Lugo	TOTAL
<i>M. nubilosa</i>	44	65	14	123
<i>M. parva</i>	3	14	13	30
<i>M. molleriana</i>	8	8	6	22
<i>M. madeirae</i>	3	4	2	9
<i>Ps. pseudoeucalyptorum</i>	5	0	4	9
<i>M. marksii</i>	4	3	1	8
<i>M. readeriellophora</i>	1	3	2	6
<i>M. communis</i>	0	3	0	3
<i>M. lateralis</i>	0	2	0	2
<i>M. aurantia</i>	1	0	0	1
TOTAL	69	102	42	213

con los resultados obtenidos por otros autores para el género *Mycosphaerella* (CROUS *et al.*, 2004, 2006). La identificación a nivel de especie se consiguió mediante la secuenciación del fragmento.

La especie más frecuente en hojas sintomáticas fue *M. nubilosa*, que puede considerarse la principal causante de la enfermedad en árboles jóvenes de los eucaliptales del noroeste de España, como también sucede en árboles jóvenes de *E. globulus* en Sudáfrica y Australia (PARK y KEANE 1982B; CARNEGIE *et al.* 1998; HUNTER, 2002). Los primeros trabajos sobre MLB hicieron pensar que *M. nubilosa* sólo era capaz de infectar hojas juveniles, penetrando por los estomas del envés (PARK, 1988b); sin embargo, en este trabajo se ha encontrado también en hojas adultas, lo que coincide con estudios recientes realizados por CROSS *et al.* (2004) y MAXWELL (2004).

Las otras nueve especies identificadas, salvo *M. molleriana* y *M. parva*, se detectaron en pocas plantaciones.

*Mycosphaerella molleriana* se encontró en el 10% de los eucaliptos sintomáticos gallegos. Curiosamente, en los primeros trabajos sobre *Mycosphaerella* en eucalipto, se consideraba a *M. molleriana* como la principal causante de MLB en muchos lugares del mundo (CROUS 1998, MAXWELL, 2004). Incluso en España, la primera referencia de *Mycosphaerella* en eucalipto cita a esta especie como responsable de la enfermedad

(RUPÉREZ y MUÑOZ, 1980). Sin embargo, la presencia de *M. molleriana* en estudios posteriores sólo pudo ser confirmada en Portugal (donde fue descrita originalmente) y en California (CROUS, 1998).

*Mycosphaerella parva* apareció en el 12% de las muestras foliares. En general, se considera como una especie saprófita asociada a lesiones viejas de *M. nubilosa* (PARK y KEANE, 1982a), aunque hay autores que sugieren que podría comportarse como patógena (CARNEGIE y KEANE, 1994).

De las 10 especies encontradas en el presente trabajo, ocho (*M. communis*, *M. lateralis*, *M. marksii*, *M. molleriana*, *M. nubilosa*, *M. parva*, *M. readeriellophora*, y *Ps. pseudoeucalyptorum*) ya habían sido identificadas por CROUS *et al.* (2004, 2006) sobre material vegetal de *E. globulus* recogido en Galicia. La detección adicional de dos nuevas especies, *M. madeirae* y *M. aurantia*, confirma la alta diversidad del género *Mycosphaerella* en eucaliptales de Galicia. La identificación de *M. madeirae* sobre *Eucalyptus globulus* y *E. obliqua* y de *M. aurantia* sobre *E. globulus* constituyen la primera referencia de estas especies como causantes de MLB en España.

Es necesario el estudio del ciclo biológico de las especies de *Mycosphaerella* encontradas en los eucaliptales gallegos, de las condiciones de clima que pueden favorecer su

persistencia, y de su patogenicidad. Todos ellos aspectos que permitirán un mejor conocimiento de la enfermedad y desarrollar métodos de control específicos, eficaces y económicamente viables.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PGIDITO5RF060301PR (Xunta de Galicia).

## ABSTRACT

OTERO, L., AGUÍN, O., SAINZ, M. J., MANSILLA, J. P. The genus *Mycosphaerella* on *Eucalyptus* stands of Galicia. *Bol. San. Veg. Plagas*, 33: 503-516.

*Mycosphaerella* genus comprises more than 30 species which are reported pathogens of *Eucalyptus*, causing a disease known as *Mycosphaerella* leaf blotch (MLB) or *Mycosphaerella* leaf disease (MLD). The main symptoms of MLB are necrotic leaf spots, which significantly reduce photosynthetic activity in the plant and consequently its growth and timber production. Eucalypt stands were surveyed in Pontevedra, A Coruña and Lugo provinces (Galicia, NW Spain) in 2005-2007, with the aim of studying the distribution of MLB and identifying the *Mycosphaerella* species involved. Ninety percent of Galician eucalypt stands showed trees with MLB symptoms, young tree stands being more severely affected. By using molecular diagnostic techniques on symptomatic leaf material, nine *Mycosphaerella* species and the anamorph *Pseudocercospora pseudo-eucalyptorum* were identified. Two species, *M. madeirae* and *M. aurantia*, are first reported in Spain. *Mycosphaerella nubilosa* can be considered as the main agent of MLB in Galicia, since it was detected in 60% of the affected eucalypts.

**Key words:** eucalypt, necrotic leaf spots, MLB, *Mycosphaerella nubilosa*.

## REFERENCIAS

- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.
- CARNEGIE, A. J., KEANE, P. J. 1994. Further *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of *Eucalyptus*. *Mycological Research*, 98: 413-418.
- 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. *Australian Forestry*, 61: 190-194.
- CARNEGIE, A. J., ADES, P. K., FORD, R. 2001. The use of RAPD-PCR analysis for the differentiation of *Mycosphaerella* species from *Eucalyptus* in Australia. *Mycological Research*, 105: 1313-1320.
- CROUS, P. W. 1998. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. *Mycologia Memoir*, 21. APS Press. 170 pp.
- CROUS, P. W., GROENEWALD, J. Z., MANSILLA, J. P., HUNTER, G., 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.
- CROUS, P. W., WINGFIELD, M. J., MANSILLA, J. P., ALFENAS, A. C., GROENEWALD, J. Z. 2006. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. II. *Studies in Mycology*, 55: 99-131.
- GANAPATHI, A. 1979. Studies on the etiology of the leaf spot disease of *Eucalyptus* spp. caused by *Mycosphaerella nubilosa* (Cke.). *Hansf. MSc. Thesis*, School of Forestry, University of Auckland, Nueva Zelanda.
- GARDES, M., BRUNS, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes- Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113-118.
- HUNTER, G. C. 2002. *Mycosphaerella* causing leaf blotch on *Eucalyptus* species in South Africa. *MSc. Thesis*, Natural and Agricultural Science, University of Pretoria, República de Sudáfrica.
- KULARATNE, H. A. G. C., LAWRIE, A. C., BARBER, P. A., KEANE, P. J. 2004. A specific primer PCR and RFLP assay for the rapid detection and differentiation in planta of some *Mycosphaerella* species associated with foliar diseases of *Eucalyptus globulus*. *Mycological Research*, 108: 1476-1493.
- LUNDQUIST, J. E., PURNELL, R. C. 1987. Effects of *Mycosphaerella* leaf spot on growth of *Eucalyptus nitens*. *Plant Disease*, 71: 1025-1029.

- 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.
- MAXWELL, A., DELL, B., NEUMEISTER-KEMP, G.G., HARDY, G.E.S.J. 2003. *Mycosphaerella* species associated with *Eucalyptus* in south-western Australia: new species, new records and a key. *Mycological Research*, **107**: 351-359.
- MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE. 2001. Tercer Inventario Forestal Nacional. Galicia. Madrid. España. 354 pp.
- PARK, R. F., 1988a. Effect of certain host, inoculum, 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. 1982a. Three *Mycosphaerella* species from leaf diseases of *Eucalyptus*. *Transactions of the British Mycological Society*, **79**: 95-100.
- PARK, R. F., KEANE, P. J. 1982b. Leaf diseases of *Eucalyptus* associated with *Mycosphaerella* species. *Transactions of the British Mycological Society*, **79**: 101-115.
- PARK, R. F., KEANE, P. J., WINGFIELD, M. J., CROUS, P. W. 2000. Fungal diseases of eucalypt foliage. En: Diseases and pathogens of eucalypts. Eds. P.J. Keane, G.A. Kile, F.D. Podger y B.N. Brown, pp. 153-239. CSIRO Publishers. Australia.
- RUPEREZ, A., MUÑOZ, C. 1980. Enfermedades de los eucaliptos en España. *Boletín del Servicio de Plagas*, **6**: 193-217.
- SILVA-PANDO, J., 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. En: PCR protocols: a guide to methods and applications. Eds. M. D. Innis, D. H. Gelfrand, J. J. Sninsky y T. J. White, pp. 315-322. New York Academic Press. Nueva York.

(Recepción: 11 julio 2007)

(Aceptación: 29 septiembre 2007)