

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**PROSPECCIÓN DE ESPECIES DE *Calonectria* EN VIVEROS
FORESTALES DE URUGUAY**

por

**Florencia SCARABINO APRILE
Valentina VILLANO BAISÓN**

**Trabajo final de grado
presentado como uno de los
requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2024**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Trabajo final de grado aprobado por:

Director/a en pie de igualdad:

Ing. Agr. MSc. Rossana Reyna

Dra. Ing. Agr. María Julia Carbone

Tribunal:

Ing. Agr. Msc. Rossana Reyna

Dra. Ing. Agr. Victoria Moreira

Lic. Biol. MSc. Sofía Simeto

Fecha: 20 de diciembre de 2024

Estudiantes:

Florencia Scarabino Aprile

Valentina Villano Baisón

AGRADECIMIENTOS

Nuestro más sincero agradecimiento a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), por su apoyo económico a través de los fondos y a los viveros visitados que hicieron posible el desarrollo de esta investigación. Sin su colaboración, este trabajo no habría sido posible.

Agradecemos a Facultad de Agronomía y al Grupo Disciplinario de Fitopatología, cuyo respaldo técnico y científico nos permitió contar con las herramientas y el conocimiento necesario para llevar a cabo este estudio. Sus aportes fueron fundamentales en el desarrollo y análisis de los resultados obtenidos.

Nuestro más profundo agradecimiento a Rossana y Julia, por su orientación, paciencia y dedicación. Su experiencia y consejos fueron cruciales en cada etapa de la tesis, brindándonos siempre apoyo y motivación para superar los obstáculos que se presentaron.

A nuestras familias y parejas, a los que están y a los que dejaron su huella en el camino, por su amor incondicional, comprensión y apoyo durante toda la carrera, y, sobre todo, por creer en nosotras y motivarnos a seguir adelante en cada momento.

Por último y no menos importante, a nuestros amigos, por estar siempre ahí brindando palabras de aliento y distracción cuando más lo necesitábamos, e incluso comprender las reiteradas ausencias en planes y juntas.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 IMPORTANCIA DEL SECTOR FORESTAL EN URUGUAY.....	10
2.2 GÉNERO <i>Eucalyptus</i>	10
2.2.1 Caracterización de <i>Eucalyptus grandis</i> , <i>Eucalyptus dunnii</i> y <i>Eucalyptus smithii</i>	11
2.3 PRODUCCIÓN DE PLANTAS EN EL VIVERO	12
2.3.1 Características de la fase de minijardín	12
2.3.2 Características de la fase de enraizamiento.....	13
2.3.3 Características de la fase de siembra de semillas (establecimiento)	13
2.3.4 Características de la fase de crecimiento	13
2.3.5 Características de la fase de rustificación	14
2.3.6 Calidad de los plantines	14
2.4 ENFERMEDADES DE VIVERO EN <i>Eucalyptus</i>	14
2.5 GÉNERO <i>Calonectria</i>	15
2.5.1 Características del proceso de las enfermedades causadas por <i>Calonectria</i>	16
2.5.2 Descripción de síntomas causados por <i>Calonectria</i> en <i>Eucalyptus</i> spp.....	17
2.5.3 Descripción de signos producidos por <i>Calonectria</i>	18
2.5.4 Identificación de especies de <i>Calonectria</i>	18
2.5.5 Antecedentes de <i>Calonectria</i> presentes en Uruguay	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 MUESTREO	20
3.2 AISLAMIENTO.....	21
3.3 EXTRACCIÓN DE ADN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN.....	21
3.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	22
3.5 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1 AISLAMIENTO.....	28
4.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	31

4.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	36
5. DISCUSIÓN	39
6. CONCLUSIONES.....	42
7. BIBLIOGRAFÍA.....	43

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras Nro.

Figura 1 Proceso de viverización en un vivero forestal.....	12
Figura 2 Ciclo de vida de las especies patogénicas de Calonectria.....	17
Figura 3 Sintomatología de Calonectria spp. y proceso de aislamiento	28
Figura 4 Presencia del patógeno según el vivero	29
Figura 5 Presencia de Calonectria spp. según el vivero y el origen de la muestra	31
Figura 6 Árbol filogenético	32
Figura 7 Coloración y morfología de las colonias utilizadas en la caracterización morfológica.....	36
Figura 8 Morfología de los aislados	38

Tablas Nro.

Tabla 1 Número de muestras colectadas en cada vivero según sitio	20
Tabla 2 Número de muestras de plantines sintomáticos según especie.....	20
Tabla 3 Programas de PCR utilizado para cada región génica.....	22
Tabla 4 Secuencias utilizadas en el análisis filogenético extraídas del GenBank	24
Tabla 5 Presencia (%) del patógeno según el origen de muestra	30
Tabla 6 Aislados de Calonectria spp. obtenidos a partir de materiales de vivero.....	34
Tabla 7 Medidas de conidios, fiálide y vesícula para cada aislado expresado en μm	37

RESUMEN

En las últimas tres décadas, el sector forestal en Uruguay ha experimentado un crecimiento significativo, consolidándose como el segundo rubro exportador agropecuario, siendo *Eucalyptus* el género más plantado en el país. La viverización es la primera etapa del complejo forestal en donde la producción de plantas está expuesta al ataque de diversos patógenos. Especies del género *Calonectria* causan enfermedades en vivero tales como damping off, podredumbre radicular, mancha foliar y anillamiento de tallo ocasionando importantes pérdidas económicas. El propósito de este trabajo fue realizar una prospección e identificación de las especies de *Calonectria* presentes en viveros de *Eucalyptus* de las regiones norte y centro este del país, basándose en técnicas de caracterización molecular y morfológica. Se realizaron visitas a tres viveros y se colectaron un total de 123 muestras correspondientes a plantines sintomáticos de *Eucalyptus* spp., suelo debajo de mesadas, agua de riego, sustrato de primer uso y arena de canaletones, abarcando todas las etapas de viverización. Se constató la presencia del patógeno en un 11% de las muestras y se obtuvieron 17 aislados los cuales fueron identificados molecularmente, junto con 15 cepas adicionales de *Calonectria* obtenidas previamente en el marco de otro proyecto, mediante las regiones génicas factor de elongación y beta tubulina. En base al análisis filogenético, 24 aislados pertenecen al complejo *Ca. candelabrum* y ocho al complejo *Ca. cylindrospora*. Dentro del primero, todos los aislados se identificaron como *Ca. pauciramosa* mientras que, del segundo, los aislados se agruparon en dos clados (cinco y tres), diferentes entre sí y al resto de las especies conocidas de *Calonectria*. Esto sugiere que podría tratarse de especies nuevas no descritas. Complementariamente, la caracterización morfológica reveló una considerable diversidad entre los aislados de *Ca. pauciramosa*, cuyas estructuras coincidieron con las descripciones reportadas en la literatura. Estos hallazgos son un importante precedente para el estatus fitosanitario en el complejo forestal del país.

Palabras clave: sanidad forestal, vivero forestal, *Cylindrocladium*, taxonomía, identificación molecular

SUMMARY

Over the past three decades, the forestry sector in Uruguay has experienced a significant growth, consolidating itself as the second largest agricultural export sector, with *Eucalyptus* being the most planted genus in the country. Nursery production is the first stage of the forestry sector, where plant production is exposed to various pathogens attacks. Species from the genus *Calonectria* cause diseases in nurseries such as damping-off, root rot, leaf spot, and stem canker, leading to significant economic losses. The aim of this study was to survey and identify *Calonectria* species present in *Eucalyptus* nurseries in the northern and central eastern regions of the country, based on molecular and morphological characterization techniques. Visits were made to three nurseries and a total of 123 samples were collected, including symptomatic *Eucalyptus* spp. seedlings, soil beneath benches, irrigation water, first-use substrate, and sand tray, covering all nursery stages. The pathogen was found in 11% of the samples, yielding resulting in a collection of 17 isolates being that were molecularly identified, together with 15 additional *Calonectria* strains previously isolated from other study, using the elongation factor and beta-tubulin gene regions. Based on the phylogenetic analysis, 24 isolates belong to the *Calonectria candelabrum* complex, and eight belong to *Ca. cylindrospora* complex. Within the former, all isolates were identified as *Ca. pauciramosa*, while the isolates from the latter are grouped into two clades (five and three), different from each other and from other known *Calonectria* species. This suggests that these could be new, undescribed species. Complementary, the morphological characterization revealed considerable diversity among *Ca. pauciramosa* isolates, whose structures matched descriptions reported in the literature. These findings are an important precedent for the phytosanitary status of the country's forestry complex.

Keywords: forest health, forest nursery, *Cylindrocladium*, taxonomy, molecular identification

1. INTRODUCCIÓN

El sector forestal en Uruguay desempeña un rol crucial en la economía del país. Según los datos de Uruguay XXI y Centro de Estudios de la Realidad Económica y Social, el área forestal continúa en pleno crecimiento consolidándose como una de las principales actividades productivas del país (Centro de Estudios de la Realidad Económica y Social [CERES], 2023; Uruguay XXI, 2023).

El complejo forestal abarca diversas etapas que incluyen la preparación del terreno, la producción de plantas, la plantación, el manejo y mantenimiento del monte, la cosecha, la industria de transformación y la comercialización de productos derivados. Dentro de estas etapas, la etapa de producción de plantas en el vivero juega un rol fundamental, ya que es uno de los primeros eslabones del complejo. Las condiciones de humedad, temperatura y densidad de plantación a las que están expuestos los plantines, pueden influir directamente en la sanidad y en el riesgo de proliferación de enfermedades. Es principalmente en esta etapa donde especies del género *Calonectria*, patógeno fúngico, causan diversas enfermedades que ocasionan pérdidas económicas severas. Conocer con precisión cuales son las especies dentro de este género que afectan la producción en la etapa de vivero es imprescindible para proponer y desarrollar medidas de manejo acordes al patógeno involucrado, asegurando de esta forma, la calidad de los plantines para su futuro desarrollo en campo.

1.1. OBJETIVO GENERAL

Ampliar los conocimientos sobre la etiología y epidemiología de enfermedades causadas por especies de *Calonectria* en viveros de *Eucalyptus* spp. del norte y centro este de Uruguay.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las posibles fuentes de inóculo de especies de *Calonectria* en el proceso de producción de plantas de *Eucalyptus* spp.
- Identificar las especies de *Calonectria* presentes en materiales de las diferentes etapas del proceso de producción de plantas de *Eucalyptus* spp.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTANCIA DEL SECTOR FORESTAL EN URUGUAY

La actividad forestal en Uruguay ha experimentado un crecimiento continuo durante los últimos 25 años, impulsado por un plan de desarrollo forestal que involucró políticas de estado como la Segunda Ley Forestal (N.º 15.939), la Ley de Zonas Francas (N.º 15.921), la firma de tratados de protección de inversiones y la implementación de incentivos y apoyos al sector. Previo a estas políticas de estado, Uruguay contaba con menos de 50 mil hectáreas forestadas. Sin embargo, para el año 2023, la superficie destinada a uso forestal ascendió a 1.1 millones de hectáreas (6,24% del área del país) correspondiendo 72% a plantaciones de eucaliptos y el 19% a plantaciones de pinos (Uruguay XXI, 2023).

El sector forestal uruguayo abarca una amplia gama de actividades que van desde la producción de semillas y plantas hasta el transporte de productos finales. El principal objetivo es la producción de madera, destinada tanto a las plantas procesadoras de pasta de celulosa como a las industrias de transformación mecánica (Uruguay XXI, 2023).

El compromiso político ha sido esencial para que Uruguay pase de ser un importador neto de productos derivados de la madera a transformar la forestación en uno de los principales rubros de exportación del país (CERES, 2023). En el año 2023, la pulpa de celulosa representó el principal producto forestal exportado, con un valor que alcanzó los 2.019 millones de dólares, posicionando al sector forestal como el segundo rubro exportador dentro del sector agropecuario nacional (Uruguay XXI, 2023). En este escenario el panorama para el sector forestal es cada vez más prometedor.

En nuestro país los bosques artificiales se implantan con plantines producidos en viveros. La producción nacional de los viveros ascendió a 98.122.784 plantines en el año 2022, entre los cuales predominó el género *Eucalyptus*, representando el 98% de la producción, mientras que el 2% restante correspondió a plantines del género *Pinus*. Asimismo, dentro del género *Eucalyptus*, prevaleció la producción de *E. grandis* representando un 46,6% del total, seguido de *E. dunnii* con un 29,4% y *E. smithii* con un 14,1% del total producido para este género (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca [MGAP], 2022).

2.2 GÉNERO *Eucalyptus*

El área de distribución natural del género *Eucalyptus* se localiza entre los 7° N y 43° S de latitud y la gran mayoría de especies se encuentran en territorio australiano, centro de origen del género. Algunas de las razones por las que es un género elegido para forestación es su gran adaptabilidad, las características de su madera y la gran diversidad de especies que posee (600 taxones específicos y sub específicos), lo que permite seleccionar las más adecuadas para cada una de las condiciones ambientales particulares de una región (Brussa, 1994).

En Uruguay, el género *Eucalyptus* se ha establecido sobre la mayoría de los grupos de suelos del territorio (Jacobs, 1981). El norte del país concentra la mayor área forestada con 270.785 hectáreas cubiertas, seguida por el litoral del país, que abarca 256.529 hectáreas. La zona centro este cuenta con una superficie de 174.427 hectáreas, mientras que la zona este tiene la menor extensión forestada, con 167.240 hectáreas (CERES, 2023).

2.2.1 Caracterización de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus dunnii* y *Eucalyptus smithii*.

2.2.1.1 Descripción de *Eucalyptus grandis*

La distribución natural de esta especie se localiza al este del continente australiano, desde el norte de Nueva Gales del Sur hasta el sur de la costa de Queensland. Se desarrolla en clima templado (sur) hasta tropical (norte) con una temperatura media máxima del mes más cálido de 29 a 32°C y media mínima del mes más frío de 5 a 6°C. Tolera heladas escasas y precipitaciones estivales con una media anual de 1.000 a 3.000 mm (Boland et al., 1987). Su mayor tasa de crecimiento se observa sobre suelos con buena capacidad de retención de agua, profundos, de texturas limosas y bien drenados (Kelly et al., 1983, como se cita en Boland et al., 1987).

La densidad de la madera es variable, con una densidad en seco al aire de 545–955 kg/m³. Se utiliza para construcción general y para producción de pulpa y papel (Boland et al., 1987).

El cultivo de *E. grandis* en Uruguay se expandió en la década de 1960, luego de que se introdujera en 1963 desde huertos semilleros de Sudáfrica. Esta especie ha logrado un excelente crecimiento en suelos arenosos profundos cerca del Río Uruguay (Jacobs, 1979). Actualmente es una de las especies más empleadas en plantaciones comerciales debido a su buena conformación y velocidad de crecimiento (Brussa, 1994).

2.2.1.2 Descripción de *Eucalyptus dunnii*

Esta especie tiene una distribución natural restringida en el continente australiano, entre el noreste de Nueva Gales del Sur y el extremo sureste de Queensland (Boland et al., 1987). Se desarrolla principalmente en zonas continentales, desde 300 a 750 m sobre el nivel del mar. Prevalece en clima templado, con un promedio de temperaturas máximas de 27 a 30°C, mínimas de 0 a 3 °C y precipitaciones estivales del orden de 1.000 a 1.700 mm anuales. Se desarrolla sobre suelos de alta fertilidad, buena capacidad de retención de agua y buena aireación. Presenta buena tolerancia a heladas y sensibilidad al mal drenaje (Brussa, 1994).

Las características de su madera son similares a *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus*, con una densidad de aproximadamente 800 kg/m³ y es utilizada para construcciones ligeras y producción de pulpa (Boland et al., 1987).

2.2.1.3 Descripción de *Eucalyptus smithii*

Esta especie se desarrolla originalmente en el sureste australiano, en las regiones centro este y sur (34°- 37° 30' S), en áreas costeras y continentales desde prácticamente el nivel del mar hasta los 1.100 m de altitud. Prevalece en clima templado a templado-frío con un promedio de temperaturas máximas de 22 a 28°C y mínimas de 6°C con hasta 60 heladas al año y precipitaciones mayoritariamente uniformes del orden de los 750 a 1.700 mm anuales. En lo que respecta a los suelos, esta especie crece en suelos franco arcillosos a franco limosos originados sobre basalto (Boland et al., 1987).

Fue introducida al Uruguay por Antonio Lussich a comienzos del siglo XX y su uso se difundió a pequeña escala (Brussa, 1994). En el año 2007, la introducción al país del patógeno *Teratosphaeria nubilosa*, causante de la enfermedad foliar *Mycosphaerella* leaf disease (MLD) o *Teratosphaeria* leaf disease (TLD), afectó severamente a las plantaciones comerciales de *Eucalyptus globulus* (Pérez et al., 2009). Esta problemática implicó una fuerte caída de los rendimientos de dicha especie, lo que motivó al sector forestal uruguayo a considerar el uso de

otras especies de eucalipto para sustituir a *E. globulus*, siendo *Eucalyptus smithii* la opción más prometedora por las características pulpables muy similares a *E. globulus* (Alonso et al., 2013).

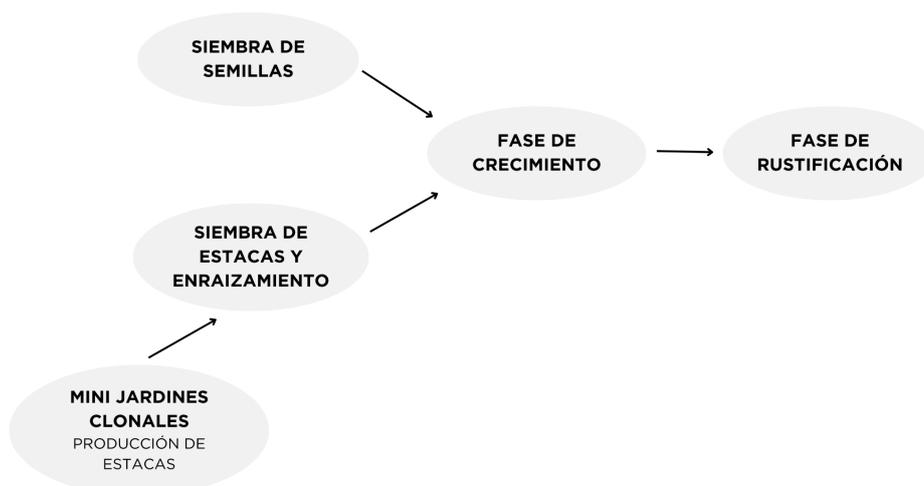
2.3 PRODUCCIÓN DE PLANTAS EN EL VIVERO

La plantación de *Eucalyptus* en campo se efectúa utilizando plántulas producidas en viveros forestales. Comúnmente, estas plántulas se obtienen a partir de semillas botánicas o por medio de propagación vegetativa (producción clonal). En ambos casos, se utilizan bandejas de diversa capacidad, que contienen un número variable de tubetes (contenedores) por bandeja según el vivero. Los tubetes permiten un manejo eficiente del desarrollo radicular y facilitan la posterior plantación en campo (Escobar Rodríguez, 2007).

La producción de plantas en vivero consta de diferentes fases o etapas dependiendo del tipo de plantas a producir. En el caso de plantas originadas de semilla botánica, la primera etapa es la siembra de semillas, seguida de una fase de crecimiento y, por último, una fase de rustificación. Para la producción de plantas por propagación vegetativa, la primera etapa es la producción de plantas madre en minijardines clonales en donde se producen las estacas. Luego se realiza la siembra de estacas y enraizamiento, seguido de la etapa de crecimiento y, por último, la rustificación (Figura 1).

Figura 1

Proceso de viverización en un vivero forestal



Nota. Adaptado de R. Reyna (comunicación personal, octubre de 2023).

Cada una de las etapas de producción se caracteriza por tener objetivos específicos, condiciones ambientales diferentes y características de manejo definidas (Escobar Rodríguez, 2007).

2.3.1 Características de la fase de minijardín

En esta fase se encuentran las plantas madre de los materiales genéticos que constituyen el material base para la propagación. De estas plantas se obtienen estacas de aproximadamente 10-15 cm con dos nudos, para su posterior enraizamiento. Las plantas madre se producen sobre canaletones con arena, bajo un sistema de fertirriego y calefacción a unos 26°C, con humedad relativa del 60-70%. Además, se mantienen en un ambiente iluminado, pero protegido por nylon

y/o malla sombra. Generalmente las plantas madre se mantienen por siete a nueve años y luego son sustituidas por plantas más jóvenes (M. Nión, comunicación personal, junio 2024).

2.3.2 Características de la fase de enraizamiento

El objetivo de esta fase es que las estacas obtenidas en minijardín clonal generen raíces adventicias a partir de células vegetales totipotentes presentes en la estaca (Alfenas et al., 2009). Para ello, las estacas son colocadas en un ambiente propicio para estimular la rizogénesis. Se exponen a una iluminación adecuada en calidad y cantidad según la época del año, protegidas con nylon y/o malla sombra. La temperatura óptima se mantiene entre 28 y 30°C en la zona de emisión de raíces con la utilización de un sistema denominado cama caliente y entre 20 y 25°C en la zona de las hojas (Alfenas et al., 2009). Esta fase se caracteriza por necesitar alta humedad relativa en el entorno de 90% lo que se logra a través de un sistema de riego por nebulización. Generalmente esta fase tiene una duración de 25 a 35 días. Se espera que el porcentaje de enraizamiento al finalizar esta etapa alcance entre el 50 y 70%, sin embargo, dependerá de cada material genético propagado (M. Nión, comunicación personal, junio 2024).

2.3.3 Características de la fase de siembra de semillas (establecimiento)

La producción de plántulas a partir de semillas, comienza con la siembra de la semilla en los tubetes y concluye una vez que los plantines obtienen el primer par de hojas verdaderas. Esta fase suele durar entre una a cuatro semanas.

Cabe destacar que la fase de establecimiento es determinante para el futuro del cultivo y está en juego la inversión del 70% de los costos totales. Por este motivo, es fundamental tomar todos los recaudos necesarios con el fin de aumentar las probabilidades de éxito. Entre las prácticas de manejo más relevantes se destacan asegurar una buena limpieza y desinfección de los contenedores con el fin de disminuir fuentes de contaminación biótica, utilizar un medio de crecimiento adecuado, hacer un correcto llenado del contenedor, utilizar semillas de buena calidad y asegurar un buen desarrollo radicular, entre otras medidas de manejo (Escobar Rodríguez, 2007).

2.3.4 Características de la fase de crecimiento

El objetivo de esta fase es darle a la plántula las mejores condiciones ambientales para que alcance su máximo crecimiento. Para ello, se adoptan medidas de manejo que permitan a las plántulas alcanzar altas tasas de transpiración y fotosíntesis. Entre ellas se destacan evitar el estrés hídrico manteniendo una buena frecuencia de riego y asegurar la cantidad necesaria de nutrientes para la planta en el momento que lo necesita. Concomitantemente, es necesario realizar monitoreos periódicos para evaluar el coeficiente de uniformidad de las plantas y en caso de que sea bajo, se realiza una clasificación de las plántulas por tamaño (altura y diámetro), con el objetivo de realizar un manejo diferenciado (Escobar Rodríguez, 2007).

La fase de crecimiento puede durar entre 6 a 24 semanas, dependiendo de las condiciones de producción (riego, fertilización, temperatura), de la época del año, entre otros factores. La fase se da por finalizada cuando las plántulas alcanzan la altura final deseada (Escobar Rodríguez, 2007).

2.3.5 Características de la fase de rustificación

Esta fase corresponde a la última etapa de vivero previo a la plantación. Tiene por objetivo someter los plantines a las condiciones a las cuales estarán expuestos en campo. Para ello, se reduce el riego y la fertilización con nitrógeno con el fin de que la planta se adapte a condiciones más limitantes de humedad y temperatura, y a su vez, detenga el crecimiento en altura. Estas medidas de manejo se realizan de forma paulatina, teniendo en consideración que al final de dicha fase, estos individuos vivirán a costa de sus reservas acumuladas y estarán en receso vegetativo (Escobar Rodríguez, 2007). La fase de rustificación culmina cuando las plantas logran la calidad necesaria para ser despachadas, pero su permanencia en esta fase de producción dependerá de la logística del vivero y de la demanda de plantines, pudiendo permanecer en esta etapa por más de 60 días.

2.3.6 Calidad de los plantines

La calidad del plantín repercute directamente en el potencial de la plantación y la calidad del rodal (Rossi Cabrera, 2010). Según Ortega Lasuen et al. (2006) un plantín de buena calidad es aquel que, tras su trasplante, logra un crecimiento vigoroso y sobrevive ante condiciones de estrés ambiental. Está vinculado directamente a variables morfológicas y fisiológicas, siendo los parámetros altura y diámetro de cuello, los más utilizados. Generalmente se busca obtener plantines de 20 a 40 cm de altura, diámetro mayor a 2 mm, pan radicular completo y consistente, presencia de 4 o más pares de hojas, ausencia de bifurcaciones y lesiones, buena turgencia, tallo sin curvaturas y raíces blancas no espiraladas ni torcidas (G. Dogliotti, comunicación personal, mayo 2024). Además, el estado sanitario de los plantines es un parámetro crucial en la calidad de estos.

Ignorar la calidad del plantín puede resultar en una disminución del porcentaje de supervivencia y crecimiento inicial de plantas una vez trasplantadas en campo, ocasionando rodales desuniformes y un menor volumen de madera por hectárea a turno final. A modo de mitigar esta situación, las empresas forestales realizan reposiciones durante los dos primeros meses desde la plantación inicial, con el fin de restablecer la densidad de plantas original. Esto implica un aumento en el costo de plantación, producto de la ineficiencia en mano de obra, traslado, reposición de plantas, entre otros factores (García, 2007, como se cita en Rossi Cabrera, 2010).

2.4 ENFERMEDADES DE VIVERO EN *Eucalyptus*

Según Alfenas et al. (2004), el desarrollo de cualquier enfermedad resulta de la interacción entre el patógeno y el hospedero, siempre que coexistan en el mismo momento y lugar, y se den condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad. Es importante destacar que este proceso se ve favorecido cuando la planta enfrenta condiciones de estrés, volviéndose más susceptible al ataque de patógenos. Algunas de estas condiciones incluyen la disminución del pH del suelo, baja luminosidad, temperaturas subóptimas y una exposición prolongada a déficit nutricional.

La causa de las enfermedades en vivero puede ser de origen genético (anormalidades), biótico (infeccioso) o abiótico (no infeccioso). En tal sentido, las condiciones ambientales de alta temperatura, alta humedad, riego regular, junto con un espaciamiento reducido, son favorables para el desarrollo de agentes bióticos (Alfenas et al., 2009).

Los hongos, junto con las bacterias, son los principales agentes patogénicos que causan enfermedades infecciosas en especies forestales, especialmente en el eucalipto. Según Old et al. (2003, como se cita en Alfenas et al., 2009), hasta los viveros mejor gestionados pueden verse afectados por estos agentes. Si bien hay varias enfermedades potencialmente destructivas de plantas de vivero, incluso las más graves pueden ser controladas adecuadamente por diversas estrategias de manejo. Algunas de ellas son mantener el equilibrio entre las condiciones ambientales y la implementación de medidas de higiene que aseguren una baja presión de inóculo, entre otras (Brown & Ferreira, 2000).

Dentro de las enfermedades que afecta especies del género *Eucalyptus* en viveros se encuentran el damping-off, también llamada enfermedad de los almácigos, causada por un complejo de hongos y oomicetes que incluye *Botrytis cinerea*, *Calonectria* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* y/o *Fusarium* spp., diversas manchas foliares causadas por diferentes hongos (especies de *Coniella*, *Phaeophleospora* y *Mycosphaerella*), la roya del eucalipto, causada por *Austropuccinia psidii* y la podredumbre de plántulas o de plantas, causada por *Botrytis cinerea* y *Calonectria* spp., entre otras (Alfenas et al., 2009; Brown & Ferreira, 2000).

Los patógenos del género *Calonectria* son considerados muy problemáticos en los viveros de *Eucalyptus* spp., dado que tienen el potencial de afectar plántulas en distintas etapas del proceso productivo causando distintas enfermedades. Es importante destacar que estos patógenos pueden impactar seriamente en los programas de producción y, consecuentemente, en los programas de plantación a campo (Brown & Ferreira, 2000).

2.5 GÉNERO *Calonectria*

Según Crous (2002) y Lombard et al. (2010c), el género *Calonectria* se asocia a una amplia gama de síntomas de enfermedades en un gran número de hospederos en todo el mundo. Se ha encontrado que este género afecta aproximadamente a 100 familias y 335 especies de plantas utilizadas como cultivos forestales, agrícolas y hortícolas. Concretamente, dentro de los cultivos forestales se asocia a cinco familias de plantas destacándose *Fabaceae* (*Acacia* spp.), *Myrtaceae* (*Eucalyptus* spp.) y *Pinaceae* (*Pinus* spp.).

Actualmente hay registradas 133 especies dentro del género *Calonectria* (Liu et al., 2022; Mohali & Stewart, 2021; Pham et al., 2022; Sánchez-Gonzalez et al., 2022; Wang et al., 2019), distribuidas en 11 complejos de especies. Las especies de *Calonectria* (también conocidas por su anamorfo *Cylindrocladium* según la nomenclatura anterior) pertenecen al reino Fungi, filo Ascomycota, e integran el orden Hypocreales y familia Nectriaceae (*Cylindrocladium* sp. Morgan, (1892), s.f.).

Según Crous (2002), en términos de características morfológicas, las especies de *Calonectria* a las que se les conoce la reproducción sexual se distinguen por producir peritecios de color amarillo-anaranjado. La pared del ascocarpo puede mostrar una superficie algo brillante y textura escamosa o verrugosa, produciendo ascosporas que pueden ser septadas o multiseptadas. En cuanto a la reproducción asexual, las características morfológicas relevantes para la identificación de especies incluyen la forma y tamaño de las fiálides, así como el ancho y forma de las vesículas terminales. La característica más distintiva es la presencia de conidióforos ramificados con prolongaciones del filamento estéril que desarrollan una vesícula terminal. Los conidios pueden ser cilíndricos, y septados o multiseptados.

2.5.1 Características del proceso de las enfermedades causadas por *Calonectria*

Las especies de *Calonectria* se caracterizan por infectar y colonizar rápidamente a su huésped en condiciones favorables para el desarrollo del hongo. En tales condiciones, a partir del micelio rápidamente se inicia el ciclo asexual produciendo gran cantidad de conidióforos con conidios (Figura 2). Los propágulos asexuales de las especies de *Calonectria* pueden dispersarse a cortas distancias gracias a las salpicaduras de agua de lluvia o pueden hacerlo a través del agua de riego, corrientes de aire, a través de insectos vectores y herramientas agrícolas (Crous, 2002; Crous et al., 1991; Vitale et al., 2013). Los conidios son los responsables de infectar las plantas penetrando de forma directa el tejido sano en nuevos sitios de infección, incrementando así la posibilidad de generar epidemias locales (Avenot et al., 2017; Crous, 2002; Dart et al., 2015).

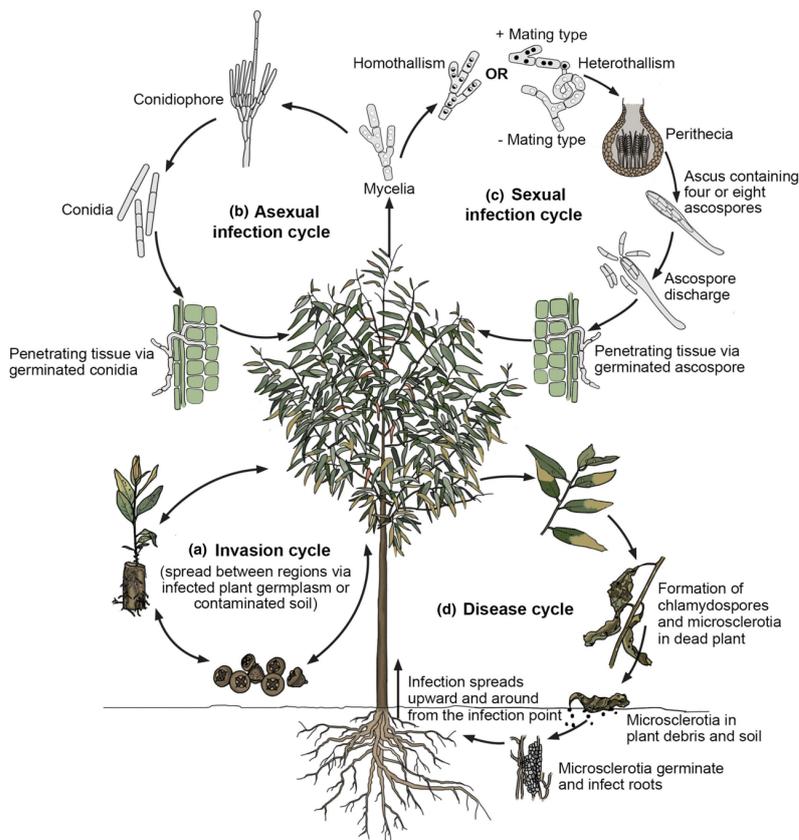
Ante condiciones desfavorables, el hongo inicia su ciclo sexual formando ascas con ascosporas. Estas, al ser dispersadas por el viento o la lluvia, pueden alcanzar nuevos tejidos vegetales sanos y dar inicio a un nuevo ciclo de infección (Li et al., 2022). La reproducción sexual es un proceso complejo específico de cada especie y fuertemente influenciado por el ambiente y la compatibilidad de los talos. Para especies de *Calonectria* se reportaron dos sistemas de apareamiento (Crous, 2002; Lombard et al., 2010a). Las especies homotálicas son auto-fértiles, lo que significa que un individuo derivado de una sola espora posee ambos idiomorfos de tipo de apareamiento, permitiéndole completar el ciclo sexual de manera independiente (Kronstad & Staben, 1997). En cambio, si se trata de especies heterotálicas, el ciclo sexual sólo se completa cuando individuos de distintos tipos de apareamiento se encuentran, lo que da lugar a la recombinación sexual. Este proceso de recombinación puede originar nuevos genotipos, los cuales podrían ser más agresivos, presentar una mayor capacidad de dispersión a largas distancias, y ser más resistentes en el ambiente (Heitman et al., 2013; Ni et al., 2011; Wilson et al., 2019). Como consecuencia, aumenta la adaptabilidad del patógeno a diferentes ambientes y su habilidad para superar los genes de resistencia en los hospederos vegetales (Ashu & Xu, 2015; McDonald & Linde, 2002).

Por otra parte, tras la colonización del huésped, *Calonectria* tiene la capacidad de formar un gran número de clamidosporas y microesclerotos (Ashu & Xu, 2015). Ambas conocidas como estructuras de resistencia, se desarrollan cuando el patógeno percibe condiciones desfavorables. Las clamidosporas, que suelen agruparse en clusters, son responsables de la formación de los microesclerotos (Pérez Sierra et al., 2007). En el caso de los microesclerotos, estos pueden sobrevivir hasta 15 años, incluso a profundidades superiores a los 66 cm bajo la superficie del suelo (Alfenas et al., 2004). Tanto las clamidosporas como los microesclerotos pueden persistir en el suelo o en tejido vegetal.

Cuando las condiciones son propicias, los microesclerotos germinan formando hifas y conidios, infectando las raíces del árbol o plantín y se desarrolla el micelio colonizando los tejidos, dando así comienzo a un nuevo ciclo de la enfermedad (Li et al., 2022).

Figura 2

Ciclo de vida de las especies patogénicas de Calonectria



Nota. Tomado de Li et al. (2022).

2.5.2 Descripción de síntomas causados por *Calonectria* en *Eucalyptus* spp.

Los principales síntomas ocasionados por *Calonectria* en *Eucalyptus* spp. en etapa de vivero son el damping-off, anillamiento de tallo, podredumbres y manchas foliares (Alfenas et al., 2009).

2.5.2.1 Damping-off

Dos diferentes tipos de damping-off están asociados a especies de *Calonectria* (Brown & Ferreira, 2002, como se cita en Crous, 2002). Puede ocurrir en pre-emergencia o post-emergencia. En el primer caso, el patógeno coloniza y mata las semillas antes de su germinación, mientras que, en el segundo caso, se produce el anillamiento del floema culminando con el vuelco de la plántula. El síntoma descrito involucra un amarronamiento en el extremo inferior del tallo cubierto por la esporulación blanca brillante del patógeno (Alfenas et al., 2009). Usualmente, las esporas del patógeno pueden dispersarse a través del riego hacia semillas sanas (Mohanani & Sharma, 1986, Ferreira, 1989, como se cita en Crous, 2002).

2.5.2.2 Anillamiento de tallo

Este síntoma es más frecuente en la etapa de rustificación, afectando los primeros diez centímetros por encima del suelo, extendiéndose a nudos y axilas provocando un corte del flujo de savia. Este síntoma también se ha detectado en plantaciones comerciales adultas, en zonas de altas precipitaciones (Alfenas et al., 2004).

2.5.2.3 Podredumbres

La podredumbre radicular comienza en el cuello del tallo y en algunas raíces secundarias, propagándose posteriormente a todo el sistema radicular. Puede generar amarronamiento del tejido afectado, marchitamiento y vuelco de las plantas (Mohanan & Sharma, 1985, como se cita en Crous, 2002).

A su vez, la podredumbre también puede comenzar en las puntas de las hojas o tallos heridos. A pesar de que la infección de los tallos puede darse en cualquier extremo, generalmente comienza en los extremos inferiores. Asimismo, se ha evidenciado que, dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad del suelo y del aire, las infecciones pueden darse aún en plantas sanas en ausencia de heridas. Las infecciones en tallo suelen caracterizarse por un incremento paulatino de coloración oscura negruzca mientras que las infecciones de hoja están asociadas con tizón marrón con esporulación en la zona infectada (Crous, 2002). Concomitantemente, las podredumbres pueden ocasionarse a nivel de estacas, en la etapa de enraizamiento, donde la lesión avanza sobre los tejidos provocando la muerte de yemas e impidiendo el enraizamiento (Aparecido & Finatti, 2012). Según lo descrito por Crous et al. (1991), el avance del hongo hacia el resto de la planta puede ocurrir a través de la colonización de las hojas, pecíolos y tallos, dando lugar a la diseminación de la enfermedad a otras plantas del vivero mediante material infectado.

2.5.2.4 Manchas foliares

Las manchas foliares varían de acuerdo a la especie de hospedero, a la edad del hospedero y a la especie de patógeno involucrado (Crous, 2002). Las manchas foliares generalmente aparecen primero como lesiones acuosas, provocando una decoloración de la lámina tendiendo a rojo violáceo que eventualmente se vuelve marrón claro u oscuro. Está rodeada por un borde rojo, marrón oscuro o violeta y un halo clorótico. Primero se caracterizan por ser pequeñas y circulares, de aproximadamente 5mm de diámetro distribuidas a lo largo del limbo foliar (Alfenas et al., 2004; Aparecido & Finatti, 2012). Con el paso del tiempo, estas manchas van adquiriendo color amarronado e incrementan su tamaño, a su vez que van adquiriendo una forma irregular, llegando a cubrir toda la superficie foliar (Alfenas et al., 2004).

2.5.3 Descripción de signos producidos por *Calonectria*

Los signos pueden visualizarse sobre las lesiones en los tejidos de la planta. En el caso del género *Calonectria* pueden observarse estructuras asexuales y sexuales. Las estructuras asexuales se caracterizan por ser estructuras blanquecinas brillantes que corresponden a los conidios y conidióforos (Alfenas et al., 2004). Las estructuras sexuales se caracterizan por ser estructuras anaranjadas-rojizas, globosas y con aspecto verrugoso que se presentan en forma aislada o en grupo sobre el tejido muerto y corresponden a peritecios. Estos últimos son menos frecuentes de visualizar que las estructuras asexuales, ya que su aparición depende de la presencia de condiciones favorables para su desarrollo y de la compatibilidad de los individuos (Alfenas et al., 2004).

2.5.4 Identificación de especies de *Calonectria*

Previo a los años 90, la identificación de especies de *Calonectria* se basaba en las características morfológicas tales como forma y diámetro de las vesículas, así como también la septación y dimensión de los conidios. Sin embargo, esta identificación presentaba como principal limitante

la escasa variación morfológica entre algunas especies, lo que resultaba en una identificación incorrecta, no pudiéndose diferenciar entre especies muy similares (especies crípticas) (Alfenas et al., 2015; Crous, 2002; Liu et al., 2020; Lombard et al., 2010a, 2010b, 2016; Schoch et al., 1999, 2000).

A partir de 1997, con el desarrollo de técnicas de identificación molecular, se comenzaron a utilizar las regiones espaciadoras internas y el gen de rRNA 5.8S (ITS) como región génica para la identificación de especies de *Calonectria* (Jeng et al., 1997). No obstante, para este género, la secuencia de ADN de esta región génica presentaba un bajo número de caracteres informativos (Crous et al., 2000; Schoch et al., 1999). En el año 2000, Crous y colaboradores proponen que el gen β -tubulina (TUB2) ofrecía una mejor resolución que el ITS para la identificación de estos hongos.

Desde entonces, las técnicas de identificación molecular (que incluyen la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa -PCR-, secuenciación y análisis filogenético de regiones genómicas) han cobrado mayor relevancia para la identificación de especies de *Calonectria* (Lombard et al., 2010c). Actualmente se utilizan hasta seis regiones genómicas para la correcta identificación de estas especies (actina, calmodulina, histona, rpb2, factor de elongación y TUB2) (Liu et al., 2020). Entre ellas, las regiones del gen TUB2 y factor de elongación (TEF-1 α), destacan por ser muy informativas y confiables para la identificación de especies dentro de este género (Liu et al., 2020).

2.5.5 Antecedentes de *Calonectria* presentes en Uruguay

En Uruguay, los estudios sobre el género de hongos *Calonectria* son recientes y se han centrado principalmente en la identificación y caracterización de especies asociadas a *Eucalyptus* spp.

La primera investigación, realizada en 2013, tuvo como objetivo identificar especies del género en cuatro viveros forestales del litoral del país (departamento de Paysandú). La identificación molecular permitió identificar cepas de *Ca. sulawesiensis*, *Ca. pauciramosa* y *Ca. humicola* (Gasparri, 2013).

Posteriormente, en 2015, una segunda investigación amplió el muestreo a plantaciones comerciales en el norte y este del país (Paysandú, Salto, Tacuarembó y Maldonado) y se logró identificar cuatro especies distintas. Una de ellas presumiblemente *Ca. seminaria* y las otras tres no se agruparon con ninguna especie descrita, pero se determinó que pertenecían al complejo de especies *Ca. cylindrospora* (Castro, 2015).

En 2017, Blanco Vieira y Romero Cardozo ajustaron distintos métodos de inoculación para caracterizar la agresividad de diversas cepas de *Calonectria* en clones de *Eucalyptus dunnii* y *E. grandis*, explorando la resistencia genética ante este género de hongos.

Finalmente, en 2023, De Benedetti llevó a cabo una investigación en la zona sureste del país para determinar la causa de muerte de árboles jóvenes de *E. smithii*. En dicho trabajo se encontró a *Ca. pauciramosa* asociada a la muerte de árboles jóvenes y de plantines en viveros, entre otros patógenos (De Benedetti et al., 2024).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MUESTREO

Durante los meses de abril y mayo del año 2024, se realizó un muestreo en tres viveros forestales de *Eucalyptus* ubicados en el norte (vivero C) y centro-este (vivero A y B) del Uruguay. La producción de plantas de los viveros A y B se realiza a partir de semilla botánica y la del vivero C a partir de estacas (producción clonal).

La recolección de muestras en los viveros seminales fue realizada en las áreas de producción dedicadas al crecimiento y rustificación, mientras que, en el vivero de producción clonal, se realizó en las áreas de minijardín, enraizamiento, crecimiento y rustificación. Dentro de cada área de producción se establecieron sitios estratégicos con alta probabilidad de detectar al patógeno, tales como, suelo o material inorgánico debajo de las mesadas, sustrato de primer uso, sustrato de pan radicular, plantines con síntomas presumiblemente causados por *Calonectria* spp. (mancha foliar, podredumbre de estaca y cuello, podredumbre radicular), agua utilizada para el riego de los plantines de distintos puntos del vivero (tajamar, tanque australiano, y de reuso), y arena proveniente de canaletones de la etapa de minijardines (Tabla 1). Cada muestra de sustrato de pan radicular y de plantín sintomático estuvo conformada por 10 individuos (Tabla 2). Se colectaron muestras de al menos tres lotes de cada área de vivero por especie y por vivero. Las especies muestreadas fueron *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus smithii*. Las muestras de agua se recolectaron en botellas plásticas de un litro de capacidad.

Tabla 1
Número de muestras colectadas en cada vivero según sitio

Vivero	Suelo	Sustrato primer uso	Sustrato pan radicular	Plantines sintomáticos	Agua	Arena de canaletones	Otros*	Total
A	11	2	13	13	2	-	-	41
B	14	2	14	14	3	-	1	48
C	8	1	10	10	2	3	-	34
Total	33	5	37	37	7	3	1	123

Nota. *La categoría "otros" corresponde a sustrato obtenido de tapa de siembra.

Tabla 2
Número de muestras de plantines sintomáticos según especie

Especie	Muestras colectadas*
<i>Eucalyptus dunnii</i>	11
<i>Eucalyptus grandis</i>	18
<i>Eucalyptus smithii</i>	8
Total	37

Nota. *Muestra compuesta de 10 plantines

3.2 AISLAMIENTO

La totalidad de las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía. Dependiendo del tipo de muestra, se utilizaron diferentes métodos con el fin de inducir la producción del signo del hongo.

En el caso de las muestras de plantines sintomáticos, se utilizó el método de cámara húmeda. Para ello se seleccionaron hojas con manchas foliares y tallos con anillamiento presumiblemente causados por *Calonectria* spp. y fueron colocadas en bandejas plásticas, desinfectadas con alcohol al 70%, cubiertas con servilleta de papel humedecidas con agua destilada estéril. Luego de colocar el material vegetal sobre el papel humedecido, las bandejas fueron cubiertas para mantener las condiciones de humedad con el objetivo de inducir la producción de estructuras reproductivas del patógeno. Concomitantemente, se colocaron 400 g de cada muestra de suelo, sustrato de primer uso o sustrato de pan radicular humedecidas con agua destilada estéril, en bandejas plásticas previamente desinfectadas con alcohol 70%.

Respecto a las muestras de agua, se prepararon bandejas plásticas con 400 g de arena esterilizada en autoclave sobre las cuales se vertieron 50 ml del agua recolectada.

En cada una de estas bandejas con suelo, sustrato o arena, se realizó un trapeo de *Calonectria* spp. utilizando hojas asintomáticas de *Eucalyptus* spp. basado en la metodología descrita por Gonçalves et al. (2001) con modificaciones. Las hojas utilizadas como cebo fueron cortadas en trozos de 1x1 cm, esterilizadas superficialmente con alcohol al 70% durante 30 segundos y enjuagadas tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se colocaron 30 trozos de hojas cebo en las muestras de manera equidistante en una disposición de cuadrícula de 5 x 6.

Todas las muestras se incubaron a 25°C en condiciones de oscuridad por un periodo mínimo de 48 horas y máximo de 15 días, con el fin de favorecer la aparición de signo del hongo. Posteriormente, se observó con lupa binocular las distintas estructuras producidas, como conidióforos con conidios característicos de especies de *Calonectria* y se realizó el aislamiento en medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA) (Oxoid Ltd., Hampshire, England) con adición de antibiótico sulfato de estreptomicina (Sigma - Aldrich, China) a la concentración de 0.4 g/l.

La obtención de cultivos puros se realizó a través del método de punta de hifa, utilizando la metodología descrita por Gasparri (2013), utilizando como medio de cultivo PDA.

Las cepas se almacenaron en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía a partir de dos métodos de conservación. Por un lado, a través de crecimiento de las cepas sobre papel de filtro esterilizado y mantenidas en freezer a -20°C y, por otro lado, crecimiento de cepas en tubos con medio de cultivo PDA a 4°C.

3.3 EXTRACCIÓN DE ADN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN

Para realizar la identificación molecular, se utilizaron 17 cepas obtenidas en esta investigación y se sumaron 15 cepas obtenidas en el año 2023 bajo el Proyecto “Etiología y epidemiología de la podredumbre radicular de *Eucalyptus* spp. causada por especies de *Calonectria* en Uruguay” (Proyecto de doctorado PEDECIBA, Biología) utilizando la misma metodología de muestreo y en los mismos viveros.

Cada una de las cepas puras se cultivaron en medio PDA a una temperatura de 25°C durante siete días. Cumplido el plazo, se hizo un raspado de micelio de cada cultivo puro y se extrajo el ADN utilizando el kit comercial ZR Fungal/Bacterial Quick DNA™ Miniprep Kit (Zymo Research, USA).

A partir del ADN extraído, se procedió a amplificar las regiones génicas TEF-1 α y TUB2 mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se preparó una mezcla de volumen final de 20 μ L que incluía 15.7 μ L de agua bidestilada, 2 μ L de solución buffer, 0.4 μ L de dNTP's y de los cebadores forward y reverse correspondientes, 0.1 μ L de TAQ polimerasa, y, por último, se agregó 1 μ L de ADN de cada muestra. Los cebadores utilizados fueron EF1-728F (Carbone & Kohn, 1999) / EF2 (O'Donnell et al., 1998), y T1F (O'Donnell & Cigelnik, 1997) / CYLTUB1 (Crous et al., 2004), para TEF-1 α y TUB2, respectivamente.

Las amplificaciones mediante PCR se realizaron utilizando los termocicladores Peltier Thermal Cycler y Labnet Multigene™ Mini. Los programas utilizados se visualizan en la Tabla 3.

Tabla 3

Programas de PCR utilizado para cada región génica

	TEF-1α	TUB2
Desnaturalización inicial	95°C - 5 min	94°C - 4 min
Número de ciclos	35	35
Desnaturalización	95°C - 30 s	94°C - 30 s
Hibridación	52°C - 45 s	57°C - 30 s
Extensión	72°C - 1 min	72°C - 1 min
Extensión final	72°C - 10 min	72°C - 10 min

Una vez finalizada la amplificación, se cargaron los productos de PCR obtenidos y el marcador de peso molecular Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (BioLabs, New England) en un gel de agarosa al 1,5% y se corrieron las muestras por electroforesis a 100 V y 400 mA por 25 minutos. Seguidamente el gel de agarosa se tiñó con GelRed™ durante 30 minutos y se observó bajo luz UV en un transiluminador (DyNA Light, Labnet) para verificar que la amplificación haya sido exitosa y corroborar el tamaño de banda obtenido. Posteriormente, los productos de PCR fueron enviados al laboratorio Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur) con el objetivo de obtener la purificación y secuenciación de las muestras.

3.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las secuencias obtenidas de cada gen se alinearon por separado usando la herramienta MUSCLE disponible en el programa MEGA X y se editaron manualmente cuando se consideró necesario. Luego se compararon con la base de datos GenBank utilizando el recurso BLAST (National Center for Biotechnology Information [NCBI], s.f.) con el objetivo de realizar una identificación preliminar de las secuencias. Se seleccionaron secuencias de aislados tipo y de aislados publicados en revistas científicas arbitradas con valores de 100% de identidad (o muy próximos)

con las obtenidas, y se incorporaron a los alineamientos. Asimismo, se incorporaron secuencias de especies filogenéticamente cercanas (Tabla 4).

Tabla 4
 Secuencias utilizadas en el análisis filogenético extraídas del GenBank

Complejo	Especie	Nombre aislado	Huésped	Número de accesión	
				TEF-1 α	TUB2
<i>Ca. cylindrospora</i>	<i>Ca. auriculiformis</i>	CMW 47178 T	Suelo (plantación de <i>A. auriculiformis</i>)	MT412721	MT412944
	<i>Ca. auriculiformis</i>	CMW 47179	Suelo (plantación de <i>A. auriculiformis</i>)	MT412722	MT412945
	<i>Ca. brasiliensis</i>	CBS 230.51 T	<i>Eucalyptus</i> sp.	MT412731	MT412953
	<i>Ca. brasiliensis</i>	CMW 32949	<i>Eucalyptus</i> sp.	MT412732	MT412954
	<i>Ca. cerciana</i>	CMW 25309 T	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	MT412742	MT412963
	<i>Ca. cerciana</i>	CMW 35180	Suelo (plantación de <i>Eucalyptus</i>)	MT412747	MT412968
	<i>Ca. cylindrospora</i>	CBS 136425 T	<i>Blephilia ciliata</i>	MT412766	MT412984
	<i>Ca. cylindrospora</i>	CMW 30978	<i>Ilex vomitoria</i>	MT412768	MT412986
	<i>Ca. hawksworthii</i>	CBS 111870 T	<i>Nelumbo nucifera</i>	MT412785	MT413003
	<i>Ca. hawksworthii</i>	CMW 14878	<i>Eucalyptus</i> sp.	MT412909	MT413119
	<i>Ca. insularis</i>	CMW 30991 T	Suelo	MT412800	MT413017
	<i>Ca. insularis</i>	CMW 30992	Suelo	MT412801	MT413018
	<i>Ca. lageniformis</i>	CBS 111324 T	<i>Eucalyptus</i> sp. (hoja)	KX784702	KX784632
	<i>Ca. maranhensis</i>	CBS 134811 T	<i>Eucalyptus</i> sp. (hoja)	KM395861	KM395948
	<i>Ca. maranhensis</i>	CBS 134812	<i>Eucalyptus</i> sp. (hoja)	KM395862	KM395949
	<i>Ca. plurilateralis</i>	CBS 111401 T	Suelo	MT412871	MT413083
	<i>Ca. propaginicola</i>	CBS 134815 T	<i>Eucalyptus</i> sp. (semilla)	KM395866	KM395953
	<i>Ca. propaginicola</i>	CBS 134816	<i>Eucalyptus</i> sp. (semilla)	KM395867	KM395954
	<i>Ca. tonkinensis</i>	CMW 47430 T	Suelo (plantación <i>Eucalyptus</i>)	MT412915	MT413122

Complejo	Especie	Nombre aislado	Huésped	Número de accesión	
				TEF-1 α	TUB2
	<i>Ca. variabilis</i>	CMW 3187 T	<i>Schefflera morototoni</i>	MT412923	MT413130
	<i>Ca. variabilis</i>	CMW 2914	<i>Theobroma grandiflorum</i>	MT412924	MT413131
<i>Ca. candelabrum</i>	<i>Ca. brassiana</i>	CBS 134855 T	Suelo de plantación de <i>Eucalyptus brassiana</i>	KM395882	KM395969
	<i>Ca. brassiana</i>	CBS 134856	Suelo de plantación de <i>Eucalyptus brassiana</i>	KM395883	KM395970
	<i>Ca. brevistipitata</i>	CBS 115671 T	Suelo	MT412734	MT412956
	<i>Ca. brevistipitata</i>	CBS 110928	Suelo	MT412735	MT412957
	<i>Ca. colombiana</i>	CBS 115127 T	Suelo	FJ972492	FJ972423
	<i>Ca. colombiana</i>	CBS 115638	Suelo	FJ972491	FJ972422
	<i>Ca. exiguispora</i>	CMW 49752 T	Suelo de plantación de <i>Eucalyptus</i>	OP822168	OP822596
	<i>Ca. exiguispora</i>	CMW 49753	Suelo de plantación de <i>Eucalyptus</i>	OP822169	OP822597
	<i>Ca. fragariae</i>	CBS 133607 T	<i>Fragaria x ananassa</i>	KM998963	KM998965
	<i>Ca. fragariae</i>	LPF 141.1	<i>Fragaria x ananassa</i>	KX500197	KX500195
	<i>Ca. hemileiae</i>	COAD 2544 T	<i>Hemileiae vastatrix</i>	MK006027	MK037391
	<i>Ca. nemoricola</i>	CBS 134837 T	Suelo de bosque tropical	KM395892	KM395979
	<i>Ca. nemoricola</i>	CBS 134838	Suelo de bosque tropical	KM395893	KM395980
	<i>Ca. pauciramosa</i>	CBS 138824 T	Suelo	MT412856	MT413068
	<i>Ca. pauciramosa</i>	CBS 9188	<i>E. grandis</i>	MT412929	MT413136
	<i>Ca. pauciramosa</i>	ES 1	<i>E. smithii</i>	OR258748	OR258763
	<i>Ca. piauiensis</i>	CBS 134850 T	Suelo de plantación de <i>Eucalyptus sp.</i>	KM395886	KM395973
	<i>Ca. piauiensis</i>	CBS 134851	Suelo de bosque tropical	KM395887	KM395974
	<i>Ca. pseudopathulata</i>	CBS 134841 T	Suelo de bosque tropical	KM395896	KM395983

Complejo	Especie	Nombre aislado	Huésped	Número de accesión	
				TEF-1 α	TUB2
	<i>Ca. pseudospathulata</i>	CBS 134840	Suelo de bosque tropical	KM395895	KM395982
	<i>Ca. silvicola</i>	CBS 135237 T	Suelo de bosque tropical	KM395891	KM395978
	<i>Ca. silvicola</i>	CBS 134836	Suelo de bosque tropical	KM395888	KM395975
	<i>Ca. spathulata</i>	CMW 16744 T	<i>E. viminalis</i>	MT412907	MT413117
	<i>Ca. spathulata</i>	CBS 112513	<i>Eucalyptus sp.</i>	MT412908	MT413118
<i>Ca. gracilipes</i>	<i>Ca. gracilipes</i>	CBS 115674 T	Suelo	MT412783	MT413001
	<i>Ca. gracilipes</i>	CBS 111141	Suelo	MT412784	MT413002

Nota. Datos tomados de GenBank utilizando el recurso BLAST (NCBI, s.f.).

Se realizaron análisis filogenéticos utilizando el método Maximum Likelihood (ML) disponible en MEGA X para cada gen por separado. Se utilizó el modelo evolutivo Kimura 2 con corrección gamma de sustitución de nucleótidos para ambos genes, de acuerdo a lo indicado por la herramienta *Find Best-Fit Substitution Model (ML)* disponible en MEGA X. Luego de verificar las topologías de los árboles filogenéticos obtenidos, los alineamientos se concatenaron y se realizó un análisis filogenético multilocus, también con el método ML en MEGA X, con 1000 iteraciones bootstrap, modelo evolutivo Kimura 2 con corrección gamma y el resto de los parámetros en la configuración predeterminada. El árbol filogenético se editó utilizando el programa Inkscape versión 1.2.2.

3.5 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

En primer lugar, todos los aislados obtenidos se repicaron en medio Malt Extract Agar (MEA) y a los cinco días de crecimiento a 25°C, se caracterizaron en base a la coloración y morfología de las colonias.

Posteriormente, los aislados fueron agrupados según su morfología de colonia y el complejo al cual pertenecen de acuerdo a la identificación molecular. Se eligieron seis aislados representantes del complejo *Ca. candelabrum* y ocho del complejo *Ca. cylindrospora*. Los aislados seleccionados se sembraron en medio Synthetic Nutrient-Poor Agar (SNA) (Nirenberg, 1981) y se expusieron a luz UV durante una semana con fotoperiodo de 12 hs y temperatura ambiente entre 22 - 25°C.

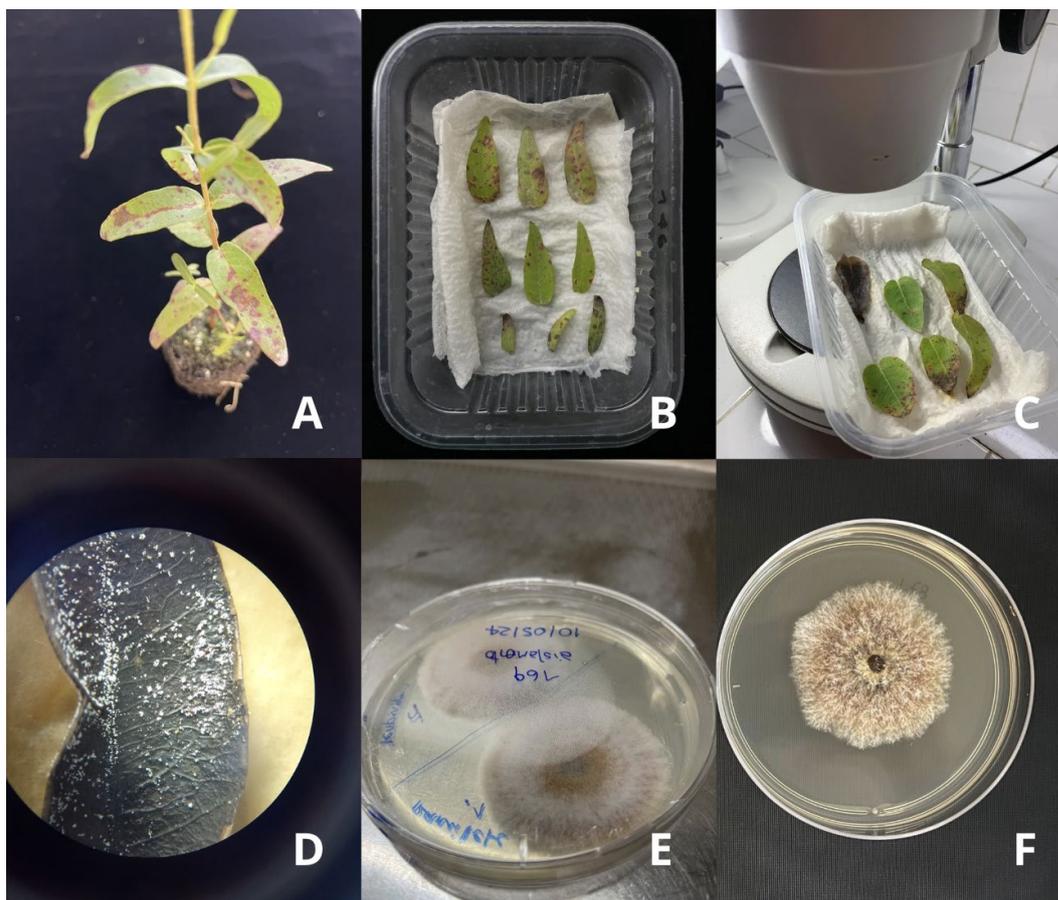
Tras dicho período de incubación, se rasparon las estructuras reproductivas, se colocaron sobre un portaobjeto con una gota de agua y se visualizaron a 40x de magnificación utilizando el microscopio óptico Nikon Eclipse Ci. Para cada aislado seleccionado, se determinó la forma y diámetro de 10 vesículas, forma y dimensiones de 10 fiálides y el número de septos y dimensiones de 30 conidios, además de visualizar presencia de clamidosporas. El software utilizado para las mediciones fue NIS-Elements D versión 5.42.02.

4. RESULTADOS

4.1 AISLAMIENTO

Del total de 123 muestras procesadas, se obtuvieron 17 aislados de *Calonectria* spp. En la Figura 3, se presentan imágenes representativas de la sintomatología encontrada y del proceso de aislamiento.

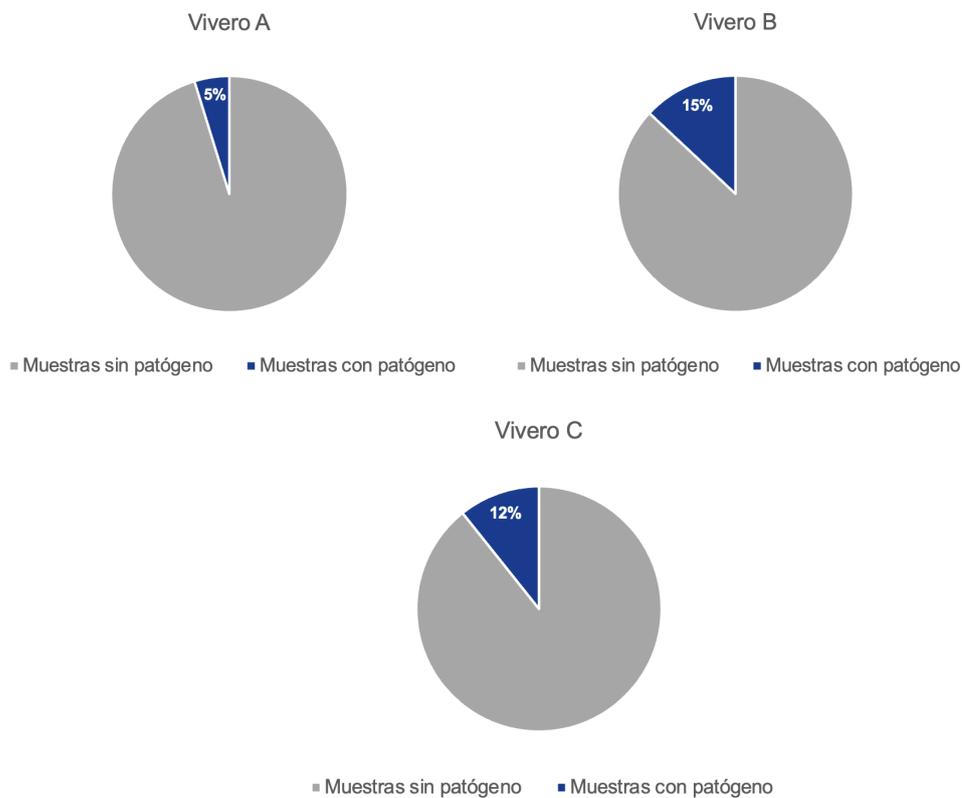
Figura 3
Sintomatología de *Calonectria* spp. y proceso de aislamiento



Nota. (A) planta sintomática; (B) cámara húmeda con hojas sintomáticas de *Eucalyptus dunnii*; (C) observación de hojas de *Eucalyptus dunnii* tras 15 días en cámara húmeda; (D) hoja de *Eucalyptus dunnii* con presencia de conidios vista en lupa binocular con aumento 50x; (E) aislamiento primario del patógeno a partir de conidios; (F) cultivo puro de *Calonectria* spp. con 7 días de crecimiento en medio de cultivo PDA.

En cuanto a la presencia del patógeno según vivero, se observó una mayor presencia del patógeno en el vivero B, habiéndose encontrado en el 15% de las muestras analizadas (n=7/48 siendo 48 el total de muestras analizadas en dicho vivero), seguido por el vivero C 12% (n=4/34) y finalmente, el vivero A con un 5% (n=2/41) (Figura 4).

Figura 4
Presencia del patógeno según el vivero



Para determinar la presencia de *Calonectria* spp. (expresada en porcentaje) según origen de muestra, se excluyeron los datos de la categoría "Otros", por ende, de las 123 muestras procesadas solo se consideraron 122. De las 122 muestras, se logró aislar *Calonectria* spp. en 13, lo que representa una incidencia general del 11% (Tabla 5). Para el análisis de presencia se consideró la presencia de *Calonectria* en las muestras analizadas independientemente del número de cepas obtenidas por muestra, ya que de algunas de las muestras de plantín sintomático se obtuvo más de una cepa por muestra.

Al desglosar la presencia del patógeno según el origen de las muestras, se observó que el 15% de las muestras de suelo presentaron el patógeno, mientras que las del sustrato pan radicular registraron un 14%. En el caso de los plantines sintomáticos, la presencia fue del 8%. En contraste, no se detectó la presencia del patógeno en las muestras de sustrato de primer uso, en las de arena de canaletones ni en las de agua.

Tabla 5
Presencia (%) del patógeno según el origen de muestra

Origen de muestra	Número total de muestras	Número muestras positivas	Presencia (%)
Suelo	33	5	15%
Sustrato primer uso	5	0	0%
Sustrato pan radicular	37	5	13%
Plantines sintomáticos	37	3	8%
Agua	7	0	0%
Arena de canaletones	3	0	0%
Total	122	13	11%

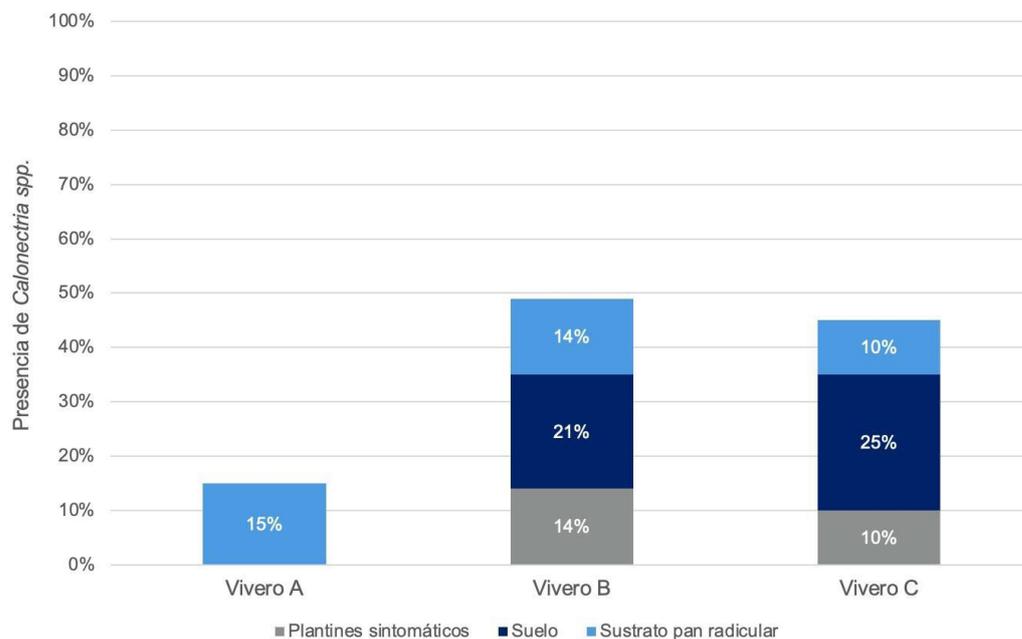
Nota. Se considera una muestra positiva cuando se obtiene al menos un aislado de *Calonectria* spp.

Al analizar la presencia del patógeno según el vivero y el tipo de muestra, se observó que, en el vivero B, las muestras de suelo presentaron la mayor presencia del patógeno con un 21% (n=3/14 siendo 14 el total de muestras analizadas de suelo en dicho vivero), seguidas de las muestras de sustrato pan radicular y plantines sintomáticos, ambas con un 14% (n=2/14), no observándose presencia de *Calonectria* spp. en las restantes muestras de este vivero (n=6). En el vivero C, el suelo fue el que presentó la mayor presencia, con un valor de 25% (n=2/8), mientras que las muestras de sustrato pan radicular y plantines sintomáticos registraron un 10% (n=1/10) cada una. Siendo que para el resto de las muestras (n=6) no se evidenció presencia del patógeno. Finalmente, en el vivero A, solamente se detectó el patógeno en el sustrato de pan radicular, con un 15% (n=2/13) mientras que en el resto de las muestras (n=28) no se presenció *Calonectria* spp. (Figura 5).

Dado que no todos los viveros producían todas las especies de *Eucalyptus* no se realizó un análisis de la presencia del patógeno por vivero y por especie.

Figura 5

Presencia de *Calonectria* spp. según el vivero y el origen de la muestra



Cabe destacar que el 83% del total de aislados ($n=20$) se encontraron en la etapa de rustificación del proceso de viverización. De estos, un 40% ($n=8/20$) corresponden a muestras de plantines sintomáticos.

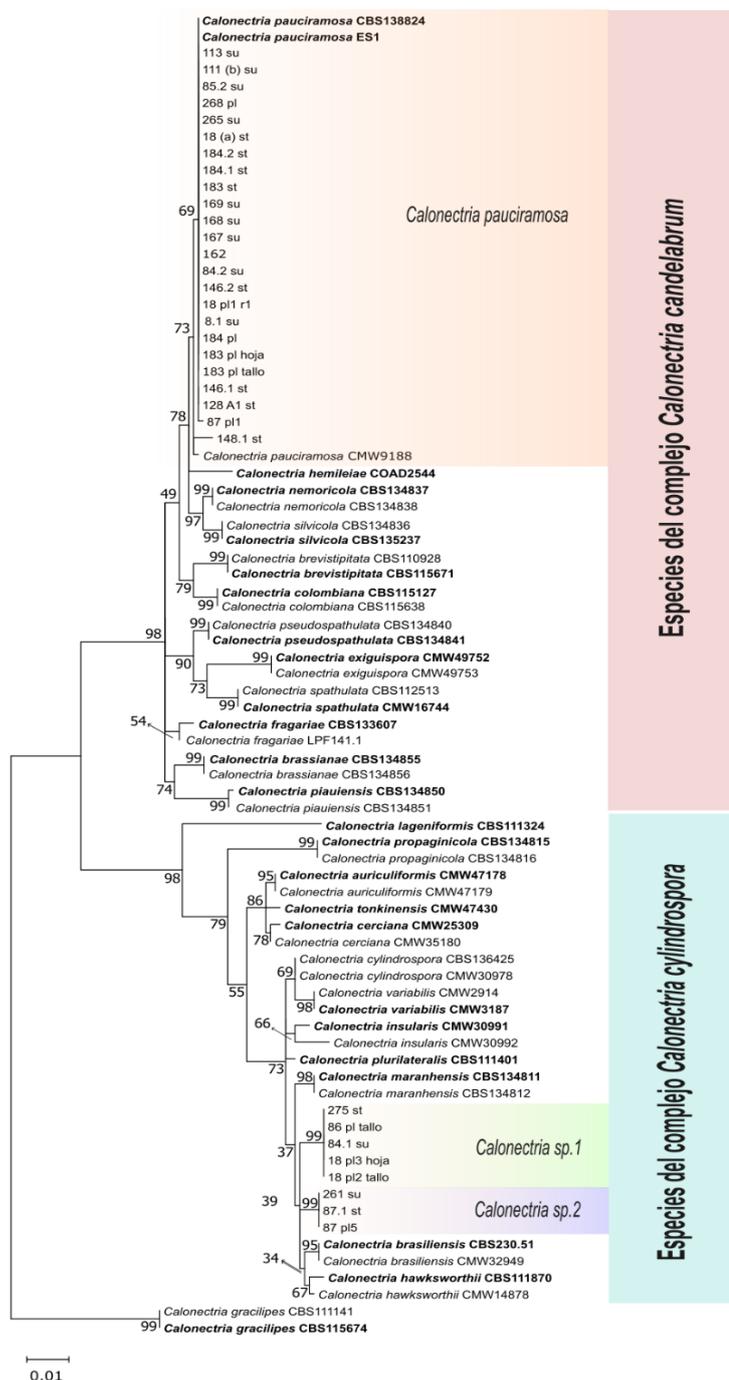
4.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se realizó la identificación molecular de las 17 cepas obtenidas en este trabajo y de las 15 cepas obtenidas en el año 2023 en el marco del proyecto “Etiología y epidemiología de la podredumbre radicular de *Eucalyptus* spp. causada por especies de *Calonectria* en Uruguay” (Proyecto de doctorado PEDECIBA, Biología).

De acuerdo con los resultados del análisis filogenético, las 32 cepas analizadas pertenecen a dos complejos de *Calonectria*, *Ca. candelabrum* y *Ca. cylindrospora*. Por un lado, 24 cepas se agruparon en un único clado con especies de *Ca. pauciramosa* (valor de nodo 73%), incluyendo el aislado tipo de dicha especie (CBS 138824 T), dentro del complejo *Ca. candelabrum*.

Las ocho cepas restantes se agruparon en dos clados bien diferenciados dentro del complejo *Ca. cylindrospora*. El primer clado agrupa cinco aislados (valor de nodo 99%), mientras que el segundo incluye tres (valor de nodo 99%). En ambos casos, los clados no incluyeron especies conocidas.

Figura 6
Árbol filogenético



Nota. Basado en Maximum Likelihood construido utilizando las secuencias concatenadas de los genes factor de elongación (TEF1- α) y β -tubulina (TUB2) de 32 secuencias de *Calonectria* obtenidas a partir de diversas muestras de viveros forestales de *Eucalyptus* del norte y centro-este de Uruguay y secuencias obtenidas del GenBank (cepas tipo indicadas con negrita). El modelo evolutivo utilizado fue Kimura 2 con corrección gamma. *Calonectria gracillipes* se usó como raíz. Las cepas correspondientes a muestras de suelo se indican como “su”, cepas correspondientes a sustrato se indican como “st” y cepas correspondientes a plantín se indican como “pl”.

En cuanto a la distribución de las especies, *Ca. pauciramosa* estuvo presente en los tres viveros muestreados, representando el 75% del total de aislados identificados molecularmente. Por otro lado, las especies no identificadas constituyeron el 25% restante, y se encontraron exclusivamente en muestras provenientes del vivero C (Tabla 6).

Cabe destacar que cuatro de los cinco aislados de *Calonectria* sp.1 provienen de un mismo clon de *E. grandis*, mientras que los tres aislados de *Calonectria* sp.2 se obtuvieron también de un clon de *E. grandis*, pero distinto al anterior.

Tabla 6*Aislados de Calonectria spp. obtenidos a partir de materiales de vivero*

Espece Fungi	Aislado	Vivero	Espece hospedero	Material	Etaa de vivero	Año de coleccion
<i>Calonectria pauciramosa</i>	87 pl 1	C	<i>E. grandis</i>	Plantín sintomático	Rustificación	2023
	146.1 st	A	<i>E. smithii</i>	Sustrato pan radicular	Rustificación	2024
	146.2 st	A	<i>E. smithii</i>	Sustrato pan radicular	Rustificación	2024
	18 (a) st	C	<i>E. grandis</i>	Sustrato pan radicular	Rustificación	2023
	85.2 su	C	<i>E. grandis</i>	Suelo bajo mesada	Rustificación	2023
	111 (b) su	B	<i>E. dunnii</i>	Suelo bajo mesada	Rustificación	2023
	113 su	B	<i>E. dunnii</i>	Suelo bajo mesada	Rustificación	2023
	128 A1 st	C	N/A	Sustrato bolsa de barrido	Bolsa de barrido	2023
	183 pl tallo	B	<i>E. dunnii</i>	Plantín sintomático	Rustificación	2024
	183 pl hoja	B	<i>E. dunnii</i>	Plantín sintomático	Rustificación	2024
	184 pl hoja	B	<i>E. dunnii</i>	Plantín sintomático	Rustificación	2024
	8.1 su	C	<i>E. grandis</i>	Suelo bajo mesada	Crecimiento	2023
	18 pl1 r1	C	<i>E. grandis</i>	Plantín sintomático	Rustificación	2023
	84.2 su	C	<i>E. grandis</i>	Suelo bajo mesada	Rustificación	2023
	162 ot	B	N/A	Sustrato tapa de siembra	Sustrato tapa de siembra	2024
	167 su	B	<i>E. dunnii</i>	Suelo bajo mesada	Rustificación	2024
	168 su	B	<i>E. dunnii</i>	Suelo bajo mesada	Rustificación	2024
	169 su	B	<i>E. dunnii</i>	Suelo bajo mesada	Rustificación	2024
	183 st	B	<i>E. dunnii</i>	Sustrato pan radicular	Rustificación	2024
	184.1 st	B	<i>E. dunnii</i>	Sustrato pan radicular	Rustificación	2024

Espece Fungi	Aislado	Vivero	Espece hospedero	Material	Etaa de vivero	Año de coleccion
	184.2 st	B	<i>E. dunnii</i>	Sustrato pan radicular	Rustificación	2024
	265 su	C	<i>E. grandis</i>	Suelo bajo mesada	Rustificación	2024
	148.1 st	A	<i>E. dunnii</i>	Sustrato pan radicular	Rustificación	2024
	268 pl	C	<i>E. grandis</i>	Plantín sintomático	Rustificación	2024
<i>Calonectria</i> sp.1	87.1 st	C	<i>E. grandis</i>	Sustrato pan radicular	Rustificación	2023
	87 pl 5	C	<i>E. grandis</i>	Plantín sintomático	Rustificación	2023
	261 su	C	<i>E. grandis</i>	Suelo bajo mesada	Crecimiento	2024
<i>Calonectria</i> sp.2	18 pl 2 tallo	C	<i>E. grandis</i>	Plantín sintomático	Rustificación	2023
	18 pl 3 hoja	C	<i>E. grandis</i>	Plantín sintomático	Rustificación	2023
	84.1 su	C	<i>E. grandis</i>	Suelo bajo mesada	Rustificación	2023
	86 tallo	C	<i>E. grandis</i>	Plantín sintomático	Rustificación	2023
	275 st	C	<i>E. grandis</i>	Sustrato pan radicular	Rustificación	2024

4.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

La morfología de las colonias analizadas mostró variabilidad entre los grupos estudiados. Los 24 aislados identificados como *Ca. pauciramosa* presentaron una amplia diversidad, evidenciada en diferencias de textura, color y margen de las colonias. En contraste, las colonias pertenecientes a *Calonectria* sp.1 exhibieron uniformidad, con características morfológicas consistentes entre los aislados. Por otro lado, los aislados de *Calonectria* sp.2 mostraron un grado considerable de diversidad, especialmente en términos de color y margen de las colonias (Figura 7).

En general, todos los aislados presentaron anverso más claro con respecto al reverso que presentó pigmentación más intensa.

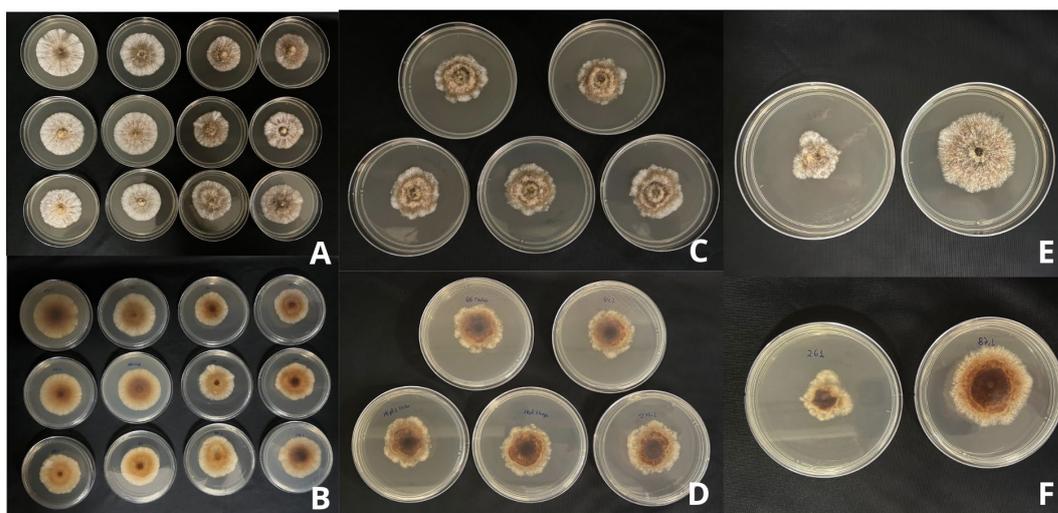
Las colonias de la especie *Ca. pauciramosa* se distinguieron por presentar un micelio abundante de textura algodonosa, inicialmente blanco, que gradualmente adquiere tonalidades marrones claro hacia el centro. En el reverso, el color varió de blanquecino en los márgenes exteriores a anaranjado oscuro, tornándose marrón claro hacia el centro. Las colonias presentaron márgenes regulares.

Por otro lado, los aislados del clado *Calonectria* sp.1 se caracterizaron por presentar textura afelpada, con una distribución de colores que comenzó con blanco en los márgenes exteriores, seguido de tonalidades marrón, ocre, y un marrón más intenso en el centro. El reverso mostró una coloración blanquecina en el borde que se tornó marrón oscuro hacia el centro. Las colonias exhibieron márgenes irregulares.

Finalmente, las colonias del clado *Calonectria* sp.2 presentaron una textura algodonosa, con una coloración amarronada. En el reverso, mostraron color blanquecino menos pronunciado en los márgenes exteriores, intensificando el tono marrón oscuro hacia el centro, ocupando una mayor proporción. Los márgenes variaron de regulares a radiados.

Figura 7

Coloración y morfología de las colonias utilizadas en la caracterización morfológica



Nota. Colonias de *Calonectria* spp. con 5 días de crecimiento en medio de cultivo MEA (A), (C) y (E) anverso de *Calonectria pauciramosa*, *Calonectria* sp.1 y *Calonectria* sp.2, respectivamente; (B), (D) y (F) reverso de *Ca. pauciramosa*, *Ca. sp.1* y *Ca. sp.2*, respectivamente

Los conidios de la especie *Ca. pauciramosa* presentaron una morfología cilíndrica y recta, con ambos extremos redondeados y un único septo. Sus dimensiones variaron entre 40 - 65 x 3 - 6 μm . Las fiálides variaron entre elipsoidal a reniforme, aseptadas y midieron entre 7 - 12 x 2 - 5 μm . Por su parte, las vesículas presentaron una morfología elipsoidal a obpiriforme con medidas entre 4,3 - 9,3 μm . Las colonias pertenecientes a *Ca. sp.1* y *Ca. sp.2* presentaron conidios cuya forma coincide con lo descrito para *Ca. pauciramosa*, no obstante, las dimensiones difieren. Los conidios de *Ca. sp. 1* midieron entre 35 - 47 x 3 - 5 μm , mientras que en *Ca. sp.2* las dimensiones oscilaron entre 35 - 49 x 4 - 5 μm . La forma de la fiálide también coincidió con lo visto para *Ca. pauciramosa*. Sin embargo, las dimensiones difieren entre 8 - 15 x 2 - 5 μm y 7 - 13 x 2 - 5 μm , respectivamente. En cuanto a las vesículas, la forma no se asemeja a *Ca. pauciramosa*, pero sí se asemejan en su dimensión, midiendo 3,8 - 7,8 μm y 4,0 - 9,9 μm , respectivamente.

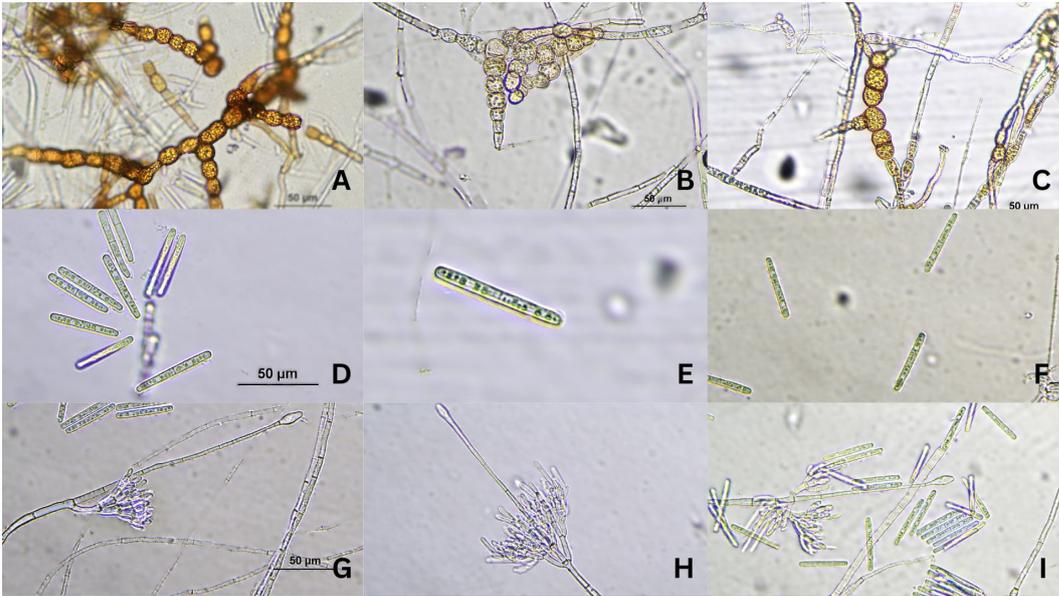
En la Tabla 7 se resume el rango de dimensiones observadas para cada una de estas estructuras, y en la Figura 8 se muestran dichas estructuras de cada una de las especies en escala 0,11 $\mu\text{m}/\text{px}$.

Tabla 7

Medidas de conidios, fiálide y vesícula para cada aislado expresado en μm .

Especie Fungi	Aislado	Conidios			Fiálide		Vesícula
		Largo	Ancho	Septas	Largo	Ancho	Ancho
<i>Calonectria pauciramosa</i>	146.1	(33 – 43) x (3 – 5)		1	(7 – 11) x (2 – 4)		4,9 – 7,7
	18 (a)	(41 – 51) x (4 – 5)		1	(7 – 12) x (2 – 4)		4,4 – 7,6
	111 (b)	(48 – 65) x (4 – 5)		1	(7 – 11) x (2 – 4)		4,3 – 8,4
	113	(40 – 51) x (4 – 5)		1	(7 – 10) x (3 – 4)		4,3 – 8,3
	183 hoja	(41 – 53) x (4 – 5)		1	(9 – 12) x (2 – 5)		4,9 – 8,3
	184.2	(46 – 52) x (4 – 6)		1	(11 – 14) x (2 – 5)		4,7 – 9,3
<i>Calonectria sp. 1</i>	86 tallo	(35 – 45) x (3 – 5)		1	(9 – 15) x (3 – 4)		3,8 – 7,8
	18 pl2 tallo	(40 – 43) x (4 – 5)		1	(8 – 12) x (2 – 5)		4,4 – 7,7
	18 pl3 hoja	(36 – 47) x (4 – 5)		1	(8 – 11) x (3 – 5)		4,3 – 7,3
	84.1	(33 – 45) x (4 – 5)		1	(8 – 11) x (3 – 4)		3,8 – 8,2
	275	(36 – 46) x (4 – 5)		1	(5 – 12) x (1 – 4)		4,4 – 7,7
<i>Calonectria sp. 2</i>	87.1	(38 – 45) x (4 – 5)		1	(7 – 13) x (3 – 5)		5,4 – 8,9
	261	(35 – 49) x (4 – 5)		1	(8 – 9) x (2 – 3)		4,0 – 9,9

Figura 8
Morfología de los aislados



Nota. (A), (B) y (C) clamidosporas de *Calonectria pauciramosa*, *Calonectria* sp.1 y *Calonectria* sp.2, respectivamente, (D), (E) y (F) conidios cilíndricos, rectos, 1-septado de *Ca. pauciramosa*, *Ca. sp.1* y *Ca. sp.2*, (G), (H) e (I) vesícula y conidióforo de *Ca. pauciramosa*, *Ca. sp.1* y *Ca. sp.2*. Barra de escala: A - I 50 µm

5. DISCUSIÓN

El presente estudio constituye una prospección exhaustiva de especies de *Calonectria* presentes en viveros forestales de *Eucalyptus* spp. en el norte y centro-este de Uruguay. Conocer la etiología de las enfermedades causadas por este patógeno en viveros es fundamental para diseñar medidas para el manejo eficiente de las mismas, destacando la relevancia de la sanidad en el primer eslabón del complejo forestal.

En cuanto a la presencia del patógeno según los viveros, el vivero A presentó el menor porcentaje de presencia del patógeno (5%) en comparación con los demás viveros evaluados. Este resultado podría deberse a que este vivero cuenta con instalaciones relativamente nuevas, inauguradas en 2022, lo que sugiere la presencia de un bajo nivel de inóculo inicial en el sitio. Es probable que la corta historia de viverización de este sitio haya resultado en una menor exposición a fuentes externas de inóculo, lo cual podría contribuir a la baja presencia de *Calonectria* spp. No obstante, también sería posible controlar el potencial de inóculo y mantenerlo en baja proporción llevando a cabo estrategias de manejo adecuadas para tales fines (Brown & Ferreira, 2000).

Del análisis de los resultados surge que el suelo debajo de las mesadas es donde se registró la mayor presencia del patógeno, coincidiendo con lo señalado por Alfenas et al. (2004). Dichos autores afirman que *Calonectria* spp. puede persistir en el suelo, incluso a profundidades superiores a los 66 cm, lo cual garantiza su supervivencia en condiciones desfavorables. El hecho de sobrevivir bajo la forma de estructuras de resistencia puede permitir que el inóculo proveniente en las bandejas de plantas situadas por encima del suelo, se acumulen en dicho medio.

La ausencia del patógeno en muestras de sustrato de primer uso evidenciada en este trabajo demuestra las propiedades de los sustratos utilizados en los viveros muestreados que garantizan la no presencia de patógenos en los mismos (sustratos inertes). Adicionalmente, dado que los tres viveros utilizan agua de fuente primaria, es razonable asumir que el nivel de inóculo en el agua es bajo a nulo, lo cual explicaría la ausencia de muestras con inóculo del patógeno en este recurso observado en este trabajo. Partir de agua libre de inóculo es muy importante ya que según Mafia et al. (2008), el reuso de agua dentro del vivero presenta un alto riesgo en términos de dispersión de patógenos de *Eucalyptus*, como *Calonectria* spp. En tal sentido, en sus estudios evidenciaron que monitoreos periódicos del agua proveniente del sistema de fertirriego, mostraron una acumulación de inóculo cuando este recurso se reutiliza.

El hecho de que solo se observaron plantines con presencia del patógeno en la fase de rustificación puede ser explicado por varios factores. En primer lugar, en esta etapa del proceso de viverización se reduce el riego y la fertilización con nitrógeno lo cual puede suponer un potencial estrés en los plantines, quedando más susceptibles al ataque de patógenos. En tal sentido, Pérez-Harguindeguy et al. (2016, como se cita en Leal et al., 2024) hacen referencia a que las plantas estresadas suelen experimentar una reducción de los mecanismos de defensa, lo que las hace más susceptibles a infecciones por patógenos. Por otro lado, como señalan Mafia et al. (2008), la multiplicación del inóculo puede ser favorecida por la acumulación de tejido vegetal muerto o en descomposición, lo cual es respaldado por la naturaleza necrotrófica del patógeno. Finalmente, dado que la fase de rustificación representa la etapa final del proceso, es

razonable suponer que la cantidad de inóculo pudo haber aumentado de forma progresiva a lo largo de las etapas previas de viverización.

Ca. pauciramosa fue la especie encontrada como predominante estando presente en las tres ubicaciones evaluadas. Este resultado coincide con lo reportado previamente por De Benedetti et al. (2024) en el sureste y Castro (2015) en el norte del país, sugiriendo una amplia distribución y adaptación de *Ca. pauciramosa* a las diferentes regiones forestales del país.

En cuanto a los aislados que no pertenecen a la especie *Ca. pauciramosa*, la amplificación de las regiones TEF-1 α y TUB2 permitió dividirlos en dos clados diferentes y consistentes, que no se agruparon con ninguna de las especies conocidas de *Calonectria*. Esto sugiere que podrían tratarse de especies nuevas no descritas, por lo cual se considera imprescindible avanzar en su caracterización genética y patogénica. Para ello, se recomienda ampliar el análisis molecular incluyendo cuatro genes más (act, cmdA, his3, rpb2), tal como sugieren Liu et al. (2020). Adicionalmente, resulta crucial cumplir con los postulados de Koch para confirmar el estatus patogénico de estas especies potenciales, reproduciendo síntomas en plántulas inoculadas y re-aislando el patógeno.

Un aspecto interesante sobre los aislados de *Ca. sp.1* y *Ca. sp.2* es que fueron obtenidos exclusivamente del vivero ubicado en el norte del país. Si bien Castro (2015) menciona la presencia de especies no descritas previamente, no fue posible determinar si estas cepas coinciden con las obtenidas en el presente estudio, ya que las secuencias de las cepas de esa investigación no fueron depositadas en la base de datos de GenBank ni se dispone de una colección de referencia para su comparación. La asociación entre las especies de *Calonectria sp.1* y *sp.2* a diferentes clones de *E. grandis* puede evidenciar la diferencia en agresividad de ambas especies o la resistencia de los diferentes materiales clonales frente a ellas. Sin embargo, la información generada en este estudio no es suficiente para dilucidar las causas por las cuales se observó este comportamiento. En este sentido, se sugiere evaluar la agresividad de las cepas asociadas a las dos nuevas especies potenciales en diferentes materiales genéticos. Este enfoque permitiría identificar variaciones en su capacidad de infección y en su impacto sobre distintos genotipos forestales.

Respecto a la caracterización morfológica, los resultados obtenidos para los aislados de *Ca. pauciramosa* son consistentes con lo reportado por De Benedetti et al. (2024). Asimismo, las dimensiones de los conidios, fiálides y vesículas estériles se encuentran dentro del rango promedio descrito por Schoch et al. (1999), lo que respalda las observaciones realizadas. En el caso de los restantes aislados, si bien presentaron características morfológicas similares a *Ca. pauciramosa*, el análisis filogenético demostró que se trata de especies diferentes, como se mencionó anteriormente. Esto refuerza el hecho de que basarse solo en criterios morfológicos para la identificación de especies representa un riesgo importante, en concordancia con Liu et al. (2020), quienes mencionan en su trabajo la dificultad de distinguir especies solamente basándose en la caracterización morfológica.

La identificación precisa de especies de *Calonectria spp.* en viveros forestales tiene particular importancia, ya que permite el diseño de estrategias concretas de manejo de las enfermedades causadas por este patógeno. Estas estrategias deben incluir medidas culturales como la limpieza y desinfección de las instalaciones, el monitoreo periódico, así como el manejo de las enfermedades a través del control genético. En cuanto a este último, existen estudios que

evidencian la existencia de variabilidad en cuanto a la resistencia al damping off causado por *Calonectria* de diferentes procedencias de especies de *Eucalyptus* en viveros (Blum et al., 1992). Estas acciones no solo contribuirán a un mejor control de *Calonectria* spp., sino que también reducirán la dependencia de métodos de control químico, minimizando así su impacto ambiental y promoviendo un manejo más sostenible.

6. CONCLUSIONES

Ca. pauciramosa sigue siendo la especie predominante en los viveros forestales de Uruguay, en concordancia con estudios previos, lo que refuerza su relevancia como uno de los principales patógenos que afectan la producción forestal.

La mayor presencia del patógeno se detectó en el suelo y en el sustrato del pan radicular, lo que indica que sería conveniente diseñar medidas de manejo en el vivero que apunten a reducir el inóculo en dichos materiales.

La metodología utilizada, que integra un enfoque molecular y morfológico, se mostró consistente y efectiva, permitiendo agrupar cepas de *Calonectria* en complejos de especies con características morfológicas similares.

Las potenciales nuevas especies, *Ca. sp.1* y *Ca. sp.2*, se encontraron solamente asociadas a *E. grandis* y en el norte del país. Sería conveniente en el futuro describir con precisión estas presumibles nuevas especies, monitorear el avance geográfico, estudiar la especificidad del huésped y la agresividad de las mismas, con el fin de actualizar la etiología de las enfermedades causadas por *Calonectria* en dicho género y determinar el riesgo potencial que representan para la producción forestal.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alfenas, A. C., Valverde Zauza, E. A., Mafia, R. G., & De Assis, T. F. (2004). *Clonagem e doenças do Eucalipto*. Universidade Federal de Viçosa.
- Alfenas, A. C., Valverde Zauza, E. A., Mafia, R. G., & De Assis, T. F. (2009). *Clonagem e doenças do Eucalipto* (2ª ed.). Universidade Federal de Viçosa.
- Alfenas, R. F., Lombard, L., Pereira, O. L., Alfenas, A. C., & Crous, P. W. (2015). Diversity and potential impact of *Calonectria* species in Eucalyptus plantations in Brazil. *Studies in Mycology*, *80*, 89-130. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.11.002>
- Alonso, R., Soria, S., Lupo, S., Bettucci, L., & Pérez, C. A. (2013). *Alternativas de manejo de enfermedades foliares en plantaciones jóvenes de Eucalyptus globulus*. INIA.
- Aparecido, C. C., & Finatti, D. (2012). *Impacto do gênero Cyindrocladium para diferentes culturas*. Instituto Biológico.
<http://repositoriobiologico.com.br/jspui/bitstream/123456789/295/2/Impacto%20do%20g%C3%aanero%20Cyindrocladium%20para%20diferentes%20culturas.pdf>
- Ashu, E. E., & Xu, J. (2015). The roles of sexual and asexual reproduction in the origin and dissemination of strains causing fungal infectious disease outbreaks. *Infection, Genetics and Evolution*, *36*, 199-209. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.09.019>
- Avenot, H. F., King, C., Edwards, T. P., Baudoin, A., & Hong, C. X. (2017). Effects of inoculum dose, temperature, cultivar, and interrupted leaf wetness period on infection of boxwood by *Calonectria pseudonaviculata*. *Plant Disease*, *101*(6), 866-873. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0742-RE>
- Blanco Vieira, M., & Romero Cardozo, P. V. (2017). *Caracterización de la agresividad Calonectria en plantines de Eucalyptus Grandis y Eucalyptus Dunnii* [Trabajo final de grado, Universidad de la República]. Colibri. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/18616>
- Blum, L. E. B., Dianese, J. C., & Costa, C. L. (1992). Comparative pathology of *Cylindrocladium clavatum* and *C. scoparium* on *Eucalyptus* spp. and screening of *Eucalyptus* provenances for resistance to *Cylindrocladium* damping-off. *Tropical Pest Management*, *38*(2), 155-159.
- Boland, D. J., Brooker, M. I. H., Chippendale, G. M., Hall, N., Hyland, B. P. M., Johnston, R. D., Kleining, D. A., & Turner, J. D. (1987). *Forest Trees of Australia* (4th ed.). CSIRO.
- Brown, B. N., & Ferreira, F. A. (2000). Disease during propagation of Eucalypts. En P. J. Keane, G. A. Kile, F. D. Podger, & B. N. Brown (Eds.), *Diseases and Pathogens of Eucalypts* (pp. 119-153). CSIRO.
- Brussa, C. A. (1994). *Eucalyptus: Especies de cultivo más frecuente en Uruguay y regiones de clima templado*. Hemisferio Sur.
- Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, *91*(3), 553-556. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>

- Castro, M. P. (2015). *Identificación de especies de Calonectria (Cylindrocladium) asociadas a la muerte de plantines de Eucalyptus en plantaciones comerciales* [Trabajo final de grado, Universidad de la República]. Colibri. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/8363>
- Centro de Estudios de la Realidad Económica y Social. (2023). *La producción forestal en Uruguay: Un sector líder y sostenible*. https://ceres.uy/index.php/estudios/ficha_estudio/95
- Crous, P. W. (2002). *Taxonomy and pathology of Cylindrocladium (Calonectria) and allied genera*. APS Press.
- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Risède, J. M., Simoneau, P., & Hywel-Jones, N. L. (2004). *Calonectria species and their Cylindrocladium anamorphs: Species with sphaeropedunculate vesicles*. *Stud Mycology*, 50, 415-430. <https://doi.org/10.3114/sim.55.1.213>
- Crous, P. W., Kang, J. C., Schoch, C. L., & Mchau, G. R. (2000). Phylogenetic relationships of *Cylindrocladium pseudogracile* and *Cylindrocladium rumohrae* with morphologically similar taxa, based on morphology and DNA sequences of internal transcribed spacers and β -tubulin. *Canadian Journal of Botany*, 77(12), 1813-1820. <http://dx.doi.org/10.1139/b99-184>
- Crous, P. W., Phillips, A. J. L., & Wingfield, M. J. (1991). The genera *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella* in South Africa, with special reference to forest nurseries. *South African Forestry Journal*, 157, 69-85. <https://doi.org/10.1080/00382167.1991.9629103>
- Cylindrocladium sp. Morgan, (1892)*. (s.f.). CONAFOR; CONABIO; GEF; PNUD. <http://sivicoff.cnf.gob.mx/ContenidoPublico/08%20Gu%C3%ADas%20de%20s%C3%ADntomas%20y%20da%C3%B1os/Gu%C3%ADas%20de%20s%C3%ADntomas%20y%20da%C3%B1os/Cylindrocladium%20sp.%20version%20extensa.pdf>
- Dart, N., Hong, C., Craig, C. A., Fry, J. T., & Hu, X. (2015). Soil inoculum production, survival, and infectivity of the boxwood blight pathogen, *Calonectria pseudonaviculata*. *Plant Disease*, 99(12), 1689-1694. <https://doi.org/10.1094/pdis-12-14-1245-re>
- De Benedetti, F., Carbone, M. J., Mondino, P., & Alaniz, S. (2024). Nectriaceae species associated to root rot of nursery and young *Eucalyptus smithii* trees in Uruguay with *Ilyonectria charruensis* as novel species. *Plant Disease*. Publicación anticipada en línea. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-24-1052-SR>
- Escobar Rodríguez, R. (2007). *Manual de viverización: Eucalyptus globulus a raíz cubierta*. INFOR. <https://doi.org/10.52904/20.500.12220/17185>
- Gasparri, P. (2013). *Identificación molecular de especies de Calonectria (Cylindrocladium) y Cylindrocladiella presentes en Viveros de Eucalipto de Paysandú, Uruguay* [Trabajo final de grado, Universidad de la República]. Colibri. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/8343>
- Gonçalves, R. C., Alfenas, A., Maffia, L. A., & Crous, P. W. (2001). Evaluation of bioassays to quantify *Cylindrocladium inocula* in soil. *Mycoscience*, 42(3), 261-264. <https://doi.org/10.1007/BF02463917>
- Heitman, J., Sun, S., & James, T. Y. (2013). Evolution of fungal sexual reproduction. *Mycologia*, 105(1), 13-30. <https://doi.org/10.3852/12-253>

- Jacobs, R. (1979). *Eucalypts for planting*. FAO.
<https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/a4c76b87-a9e4-47a3-8122-046adcb4416c/content>
- Jacobs, R. (1981). *El eucalipto en la repoblación forestal*. FAO.
<https://www.fao.org/4/ac459s/ac459s.pdf>
- Jeng, R. S., Dumas, M., Liu, F. H., Wang, C. L., & Hubbes, M. (1997). DNA analysis of *Cylindrocladium floridanum* isolates from selected forest nurseries. *Mycological Research*, 101(3), 285-291. <https://doi.org/10.1017/S0953756296002614>
- Kronstad, J. W., & Staben, C. (1997). Mating type in filamentous fungi. *Annual Review of Genetics*, 31, 245-276. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.31.1.245>
- Leal, C., Bujanda, R., Carbone, M. J., Kiss, T., Eichmeier, A., Gramaje, D., & Maldonado-González, M. M. (2024). Drought Influences the Structure, Diversity, and Functionality of the Fungal Community Inhabiting the Grapevine Xylem and Enhances the Abundance of *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytobiomes Journal*, 8(4), 529-539. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-02-24-0027-R>
- Li, J., Wingfield, M. J., Barnes, I., & Chen, S. (2022). *Calonectria* in the age of genes and genomes: Towards understanding an important but relatively unknown group of pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 23(7), 1060-1072. <https://doi.org/10.1111/mpp.13209>
- Liu, Q., Wingfield, M. J., Duong, T. A., Wingfield, B. D., & Chen, S. (2022). Diversity and Distribution of *Calonectria* species from plantation and forest soils in Fujian Province, China. *Journal of Fungi*, 8(8), Artículo 811. <https://doi.org/10.3390/jof8080811>
- Liu, Q. L., Li, J. Q., Wingfield, M. J., Duong, T. A., Wingfield, B. D., & Crous, P. W. (2020). Reconsideration of species boundaries and proposed DNA barcodes for *Calonectria*. *Studies in Mycology*, 97, 100-106. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.08.001>
- Lombard, L., Crous, P. W., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2010a). Multigene phylogeny and mating tests reveal three cryptic species related to *Calonectria pauciramosa*. *Studies in Mycology*, 66, 15-30. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.66.02>
- Lombard, L., Crous, P. W., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2010b). Phylogeny and systematics of the genus *Calonectria*. *Studies in Mycology*, 66, 31-69. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.66.03>
- Lombard, L., Crous, P. W., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2010c). Species concepts in *Calonectria* (*Cylindrocladium*). *Studies in Mycology*, 66, 1-13. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.66.01>
- Lombard, L., Wingfield, M. J., Alfenas, A. C., & Crous, P. W. (2016). The forgotten *Calonectria* collection: Pouring old wine into new bags. *Studies in Mycology*, 85, 159-198. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.004>
- Mafia, R. G., Alfenas, A. C., Ferreira, E. M., Machado, P. S., Binoti, D. H. B., Leite, F. P., & Souza, F. L. (2008). Reuse of untreated irrigation water as a vehicle of inoculum of pathogens in *Eucalyptus* clonal nursery. *Tropical Plant Pathology*, 33(2), 96-102.

- McDonald, B. A., & Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, *40*, 349-379. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2022). *Vigésima segunda encuesta de viveros forestales*. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/politicas-y-gestion/encuesta-viveros-forestales-2022-0>
- Mohali, S. R., & Stewart, J. E. (2021). *Calonectria vigiensis* sp. nov. (Hypocreales, Nectriaceae) associated with dieback and sudden-death symptoms of *Theobroma cacao* from Mérida state, Venezuela. *Botany*, *99*(11), 683-693. <http://dx.doi.org/10.1139/cjb-2021-0050>
- National Center for Biotechnology Information. (s.f.). *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*. Recuperado el 11 de diciembre de 2024, de <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE=BLASTHome>
- Ni, M., Feretzaki, M., Sun, S., Wang, X., & Heitman, J. (2011) Sex in fungi. *Annual Review of Genetics*, *45*, 405-430. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132536>
- Nirenberg, H. I. (1981). A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. *Canadian Journal of Botany*, *59*(9), 1599-1609. <http://dx.doi.org/10.1139/b81-217>
- O'Donnell, K., & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are non-orthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *7*(1), 103-116. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(5), 2044-2049. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>
- Ortega Lasuen, U., Kindelman Dantas de Oliveira, A., Hevia Cabal, A., Álvarez Ron, E., & Majada Guijo, J. P. (2006). *Control de calidad de planta forestal*. SERIDA.
- Pérez, G., Hunter, G. C., Slippers, B., Pérez, C. A., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2009). *Teratosphaeria (Mycosphaerella) nubilosa*, the causal agent of *Mycosphaerella* leaf disease (MLD): Recently introduced into Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, *125*(1), 109-118. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-009-9463-x>
- Pérez Sierra, A., Álvarez, L. A., León, M., Abad-Campos, P., Armengol, J., & García-Jiménez, J. (2007). First report of leaf spot, blight and stem lesions caused by *Cylindrocladium pauciramosum* on Callistemon in Spain. *Plant Disease*, *91*(8), 10-57. <https://doi.org/10.1094/pdis-91-8-1057c>
- Pham, N., Marincowitz, S., Chen, S., Yaparudin, Y., & Wingfield, M. J. (2022). *Calonectria* species, including four novel taxa, associated with *Eucalyptus* in Malaysia. *Mycological Progress*, *21*, 181-197. <https://doi.org/10.1007/s11557-021-01768-8>
- Rossi Cabrera, C. (2010). *Evaluación de Trichoderma Harzianum como agente biopromotor y de biocontrol en plantines de Eucalyptus dunnii Maiden* [Trabajo final de grado, Universidad de la República]. Colibri. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/27851>

- Sánchez-Gonzalez, E. I., Soares, T. D., Zarpelon, T. G., Zauza, E. A., Mafia, R. G., & Ferreira, M. A. (2022). Two new species of *Calonectria* (Hypocreales, Nectriaceae) causing *Eucalyptus* leaf blight in Brazil. *MycoKeys*, *91*, 169-197. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.91.84896>
- Schoch, C. L., Crous, P. W., Witthuhn, R. C., Cronwright, G., El-Gholl, N. E., & Wingfield, B. D. (2000). Recombination in *Calonectria morganii* and phylogeny with other heterothallic small-spored *Calonectria* species. *Mycologia*, *92*(4), 665-673. <https://doi.org/10.1080/00275514.2000.12061207>
- Schoch, C. L., Crous, P. W., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (1999). The *Cylindrocladium candelabrum* species complex includes four distinct mating populations. *Mycologia*, *91*(2), 286-298. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061019>
- Uruguay XXI. (2023). *Sector forestal en Uruguay*. <https://www.uruguayxxi.gub.uy/uploads/informacion/70ef14bbc9637d1efb63bd99ff38fc077178dc00.pdf>
- Vitale, A., Crous, P. W., Lombard, L., & Polizzi, G. (2013). *Calonectria* diseases on ornamental plants in Europe and the Mediterranean basin: An overview. *Journal of Plant Pathology*, *95*, 463-476.
- Wang, Q., Liu, Q., & Chen, S. (2019). Novel species of *Calonectria* isolated from soil near *Eucalyptus* plantations in southern China. *Mycologia*, *111*(6), 1028-1040. <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1666597>
- Wilson, A. M., Wilken, P. M., Van der Nest, M. A., Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2019). It's all in the genes: The regulatory pathways of sexual reproduction in filamentous ascomycetes. *Genes*, *10*(5), Artículo 330. <https://doi.org/10.3390/genes10050330>