

Neofusicoccum eucalyptorum (= *Botryosphaeria eucalyptorum*) Y *N. parvum*: PATÓGENOS EN PLANTACIONES DE EUCALIPTO EN MÉXICO

Neofusicoccum eucalyptorum (= *Botryosphaeria eucalyptorum*) AND *N. parvum*: PATHOGENS IN EUCALYPTUS PLANTATIONS IN MEXICO

Jesús G. De la Mora-Castañeda¹, David Cibrián-Tovar¹, Omar A. Pérez-Vera^{1*}.

¹División de Ciencias Forestales (Departamento de Ecología y Silvicultura), Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco, C. P. 56230, Chapingo, Texcoco, Edo. de México. MÉXICO. Correo-e: oalejandroversa@gmail.com

Tel.: 01(595) 9521500 ext. 5542 (* Autor para correspondencia).

RESUMEN

En el oriente de Michoacán, la muerte regresiva en plantaciones comerciales de eucalipto se presentó en árboles con daños por heladas y sequías en el 2013. En *Eucalyptus nitens* se aisló al patógeno *Neofusicoccum eucalyptorum* encontrando a su teleomorfo *Botryosphaeria eucalyptorum* en los canchros, mientras que *N. parvum* se aisló de *E. nitens* y *E. globulus*. Ambas especies de *Neofusicoccum* se identificaron por morfología y se caracterizaron molecularmente mediante PCR-ITS. Las secuencias de *N. eucalyptorum* (números de acceso: KC479184 y KC4799188) y *N. parvum* (KC479185, KC479186 y KC479187) se depositaron en el Banco de Genes del NCBI. En campo, los eucaliptos enfermos presentaron muerte regresiva, canchros fusiformes en fuste que inducen hinchamientos, flujo de resina y brotes epicórmicos. Los hongos inoculados *in vitro* en varetas de *E. nitens* y *E. globulus* causaron lesiones necróticas y abundantes picnidios inmaduros a 10 días después de la inoculación (ddi). En los árboles de *E. nitens* de tres años de edad se formó un cancro de apariencia hundida con forma fusiforme, de color café oscuro y de 13 a 21.9 cm a los 48 ddi. Este trabajo es el primer reporte de *N. eucalyptorum* y *N. parvum* en México causando enfermedad en plantaciones de eucalipto.

PALABRAS CLAVE:

Botryosphaeriaceae, canchros, endófito, *Eucalyptus* sp., muerte regresiva.

ABSTRACT

In 2013, in the east of Michoacán, die-back in commercial eucalyptus plantations appeared in trees with frost and drought damage. *Neofusicoccum eucalyptorum* was isolated on *Eucalyptus nitens*, and its teleomorph *Botryosphaeria eucalyptorum* was found on cankers; *N. parvum* isolated on *E. nitens* and *E. globulus*. Both species of *Neofusicoccum* were identified by morphology and were molecularly characterized by PCR-ITS. The sequences of *N. eucalyptorum* (access number: KC479184 and KC4799188) and *N. parvum* (KC479185, KC479186 and KC479187) were deposited in the Gene Bank of the NCBI. In the field, diseased eucalyptus showed die-back, fusiform cankers on stem, which induce bulges, resin flow and the appearance of epicormic shoots. The fungi inoculated *in vitro* in shoots of *E. nitens* and *E. globulus* provoked necrotic lesions and abundant immature pycnidia at 10 days after inoculation (dai). *E. nitens* trees of three years of age showed a fusiform canker with sunken appearance and dark brown coloration, measuring 13 to 21.9 cm at 48 dai. This study is the first report of *N. eucalyptorum* and *N. parvum* in Mexico causing disease in eucalyptus plantations.

KEYWORDS: Botryosphaeriaceae, cankers, endophyte, *Eucalyptus* sp., die-back.



Recibido: 12 de marzo, 2014
Aceptado: 18 de septiembre, 2014
doi: 10.5154/r.rchscfa.2014.03.012
<http://www.chapingo.mx/revistas>

INTRODUCCIÓN

En México existen alrededor de 25,000 ha de plantaciones comerciales de eucaliptos de rápido crecimiento establecidas en Chihuahua, Estado de México, Guerrero, Michoacán, Oaxaca, Tabasco y Veracruz (Pérez-Vera, Yáñez-Morales, Alvarado-Rosales, Cibrián-Tovar, & García-Díaz, 2005; Velázquez et al., 2013). Entre las especies plantadas se encuentran *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *E. globulus* Labill., *E. grandis* W. Hill, *E. nitens* Deane & Maiden, *E. pellita* F. Muell., *E. urophylla* S. T. Blakede y el híbrido *E. urophylla* x *grandis* (*E. urograndis*). De este conjunto de especies, destacan *E. nitens* y *E. globulus* en ambientes de mayor altitud con tendencia a heladas y *E. urophylla* en el trópico húmedo (Comisión Nacional Forestal [CONAFOR], 2011). En los años 2010, 2011 y 2012, se establecieron plantaciones con *E. nitens* y *E. globulus* en el estado de Michoacán, donde se registró mortalidad en árboles con edades de tres a cuatro años. Los organismos involucrados en los tejidos muertos o enfermos fueron hongos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae (*Botryosphaeriales*, *Ascomycetes*). Los hongos de esta familia tienen amplia distribución en el mundo y afectan un grupo diverso de plantas dicotiledóneas, monocotiledóneas y gimnospermas (Mohali, Slippers, & Wingfield, 2006; Pérez, Wingfield, Slippers, Altier, & Blanchette, 2009, 2010; Smith, Crous, Wingfield, Coutinho, & Wingfield, 2001). Los géneros *Botryosphaeria* y *Neofusicoccum* infectan el tallo, ramas, hojas y frutos del hospedante (Crous et al., 2006; Mohali et al. 2006). Este grupo de hongos son patógenos endófitos, oportunistas, que inducen canchros en tallo y ramas, muerte regresiva, pudrición de frutos, pudrición del cuello, damping-off en plántulas y gomosis (Mohali et al. 2006; Slippers & Wingfield, 2007). Recientemente, Crous et al. (2006) realizaron un estudio sobre linajes filogenéticos en Botryosphaeriaceae, por lo que reacomodaron varias especies en el género *Neofusicoccum*, el cual se caracteriza por tener conidios hialinos fusiformes a elipsoides como en *Fusicoccum Corda*, pero se separa por tener sinamorfos similares a *Dichomera*, que tiene conidios globosos a piriformes de color café. Inicialmente, en el género *Neofusicoccum* se reconocieron 13 especies, pero el número ha crecido conforme se hacen estudios adicionales (Sakalidis, Hardy, & Burgess, 2011); aunque para varias de ellas, estos estudios pueden ser complejos, como en *N. ribis* (Slippers, Crous, & M. J. Wingf.) Crous, Slippers & A. J. L. Phillips (teleomorfo *Botryosphaeria ribis* Grossenb. & Duggar), y *N. parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A. J. L. Phillips (teleomorfo *B. parva* Pennycook & Samuels) (Crous et al., 2006). En la actualidad, debido a que los teleomorfos y los anamorfos son morfológicamente muy similares y difíciles de separar, la identificación taxonómica de las especies de Botryosphaeriaceae se hace con los datos moleculares, en particular con las secuencias de ADN en combinación con las características morfológicas (Slippers & Wingfield, 2007).

Los antecedentes de Botryosphaeriales en plantaciones de eucalipto en México son escasos. Cruz, Cibrián, Ramírez, y García (2001) y Cibrián, Rosales y García, (2007) reportan a

INTRODUCTION

Mexico has about 25,000 ha of commercial plantations of fast-growing eucalyptus established in Chihuahua, Estado de México, Guerrero, Michoacán, Oaxaca, Tabasco and Veracruz (Pérez-Vera, Yáñez-Morales, Alvarado-Rosales, Cibrián-Tovar, & García-Díaz, 2005; Velázquez et al., 2013). *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *E. globulus* Labill., *E. grandis* W. Hill, *E. nitens* Deane & Maiden, *E. pellita* F. Muell., *E. urophylla* S. T. Blakede and the hybrid *E. urophylla* x *grandis* (*E. urograndis*) are among the species planted. From this set of species *E. nitens* and *E. globulus* highlight in high altitude environments prone to frost and *E. urophylla* highlights in humid tropical environment (Comisión Nacional Forestal [CONAFOR], 2011). In the years 2010, 2011 and 2012 plantations with *E. nitens* and *E. globulus* were established in the state of Michoacán, recording mortality in trees (three to four years of age). The organisms involved in dead or diseased tissues were fungi belonging to the Botryosphaeriaceae family (*Botryosphaeriales*, *Ascomycetes*). Fungi of this family are widely distributed in the world and affect a diverse group of dicotyledonous, monocots and gymnosperms plants (Mohali, Slippers, & Wingfield, 2006; Pérez, Wingfield, Slippers, Altier, & Blanchette, 2009, 2010; Smith, Crous, Wingfield, Coutinho, & Wingfield, 2001). The genus *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* infect stem, branches, leaves and fruits of the host (Crous et al., 2006; Mohali et al. 2006). These fungi are opportunistic pathogenic endophytes, inducing cankers on stems and branches, die-back, fruit rot, crown rot, damping-off in seedlings and gummosis (Mohali et al. 2006; Slippers & Wingfield, 2007). Recently, Crous et al. (2006) conducted a study on phylogenetic lineages in Botryosphaeriaceae, so they rearranged several species in the genus *Neofusicoccum*, which is characterized by having fusiform hyaline conidia to ellipsoid hyaline conidia as in the case of *Fusicoccum* Corda, but it differs by having sinamorphs similar to *Dichomera*, which has globose to brown pyriform conidia. Originally, the genus *Neofusicoccum* has 13 species, but the number has grown according to additional studies (Sakalidis, Hardy, & Burgess, 2011); although for some of these species, these studies can be complex, as in *N. ribis* (Slippers, Crous & M. J. Wingf.) Crous, Slippers & A. J. L. Phillips (teleomorfo *Botryosphaeria ribis* Grossenb. & Duggar), and *N. parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A. J. L. Phillips (teleomorfo *B. parva* Pennycook & Samuels) (Crous et al., 2006). At present, because the teleomorphs and anamorphs are morphologically very similar and difficult to separate, the taxonomic identification of the species of Botryosphaeriaceae is done with molecular data, especially DNA sequences in combination with the morphological characteristics (Slippers & Wingfield, 2007).

The background of Botryosphaeriales in eucalyptus plantations in Mexico are scarce. Cruz, Cibrián, Ramírez, and García (2001) and Cibrián, Rosales and García (2007) reported *Botryosphaeria rhodina* Berk. & M. A. Curtis and

Botryosphaeria rhodina Berk. & M. A. Curtis y su anamorfo *Lasiodiplodia theobromae* Griffon & Maubl., y a *B. dothidea* (Moug. ex Fr.) Ces & De Not (anamorfo *Fusicoccum aesculi* Corda) como causantes de canchros en árboles jóvenes de *E. camaldulensis* que estuvieron bajo una condición de estrés por inundación pluvial en la región costera de Nayarit. También Slippers et al. (2004) y Rodas, Slippers, Gryzenhout, y Wingfield (2009) encontraron que *B. dothidea*; *N. eucalyptorum* Crous, H. Smith et M. J. Wingf., *N. australe* Slippers, Crous, & M. J. Wingf.; *N. parvum* y *N. eucalypticola* Slippers, Crous, & M. J. Wingf. causaron canchros y muerte regresiva en especies de *Eucalyptus*. En el sur de Veracruz, en plantaciones de *E. urophylla* y *E. grandis* se reporta a *B. rhodina* causando muerte descendente; los árboles afectados tuvieron enredamiento de raíz, por lo que se presume que los hongos tuvieron un rol de patógeno oportunista (Cibrián, 2013).

En el oriente de Michoacán, después de heladas atípicas y sequías prolongadas se registró declinación severa en plantaciones de árboles de *E. globulus* y *E. nitens* de tres a siete años de edad. Los árboles afectados tuvieron la raíz enredada en diferente grado de daño desde que la planta estuvo en el vivero y muerte de puntas y ramas con necrosis de 10 a 100 cm de longitud. En la corteza y los troncos de los árboles muertos se observaron picnidios subcorticales de color negro. En algunos predios de las plantaciones se registró más de 50 % de mortalidad. Por la importancia del evento se planteó como objetivo principal de este estudio, identificar los organismos causantes de la enfermedad y probar su patogenicidad en árboles vivos de *E. nitens* y en varetas de *E. globulus* y *E. nitens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo

En la empresa Forestaciones Operativas de México S. A. de C. V (REXCEL), Michoacán, se muestrearon seis parcelas de eucaliptos de tres a siete años de edad. En los municipios de Ciudad Hidalgo (Agustina Correa y Agustina Correa 1), Irimbo (Maravatio) y Tuxpan (Mireya Tinoco) se muestrearon plantaciones con *E. nitens*, y en el municipio de Maravatio (Francisco Maldonado y Raúl Armas) se muestrearon plantaciones con *E. globulus*. Las parcelas se seleccionaron considerando la presencia de muerte regresiva y canchros en el fuste en los eucaliptos. En cada parcela se recolectaron cinco secciones de troncos con canchros de 30 cm de longitud y se caracterizaron los síntomas visualmente. En el Cuadro 1 se muestran las características de cada parcela.

Aislamiento e identificación morfológica del patógeno

De cada una de las secciones de troncos de los árboles recolectados, se tomaron 15 trozos de tejido sintomático de 6 mm² (450 submuestras). Las muestras se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial al 3 % por 3 min, se lavaron

its anamorph *Lasiodiplodia theobromae* Griffon & Maubl., and *B. dothidea* (Moug. ex Fr.) Ces & De Not (anamorph *Fusicoccum aesculi* Corda) as the cause of cankers on *E. camaldulensis* that were under stress by storm flooding in the coastal region of Nayarit. Also Slippers et al. (2004) and Rodas, Slippers, Gryzenhout and Wingfield (2009) found that *B. dothidea*; *N. eucalyptorum* Crous, H. Smith et M. J. Wingf., *N. australe* Slippers, Crous, & M. J. Wingf.; *N. parvum* and *N. eucalypticola* Slippers, Crous, & M. J. Wingf. provoked cankers and die-back of *Eucalyptus* species. In the south of Veracruz, plantations of *E. urophylla* and *E. grandis* report *B. rhodina* as a cause of die-back; diseased trees showed root entanglement, so it is assumed that the fungi had a role as an opportunistic pathogen (Cibrián, 2013).

In the east of Michoacán, after atypical frost and prolonged drought we recorded severe decline in tree plantations of *E. globulus* and *E. nitens* (three to seven years of age). Affected trees had root tangled in different degrees of damage since the plant was in the nursery and death of tips and branches with necrosis of 10 to 100 cm in length. The bark and the stem of dead trees showed dark black subcortical pycnidia. In some plantation land more than 50 % mortality was recorded. Because of the importance of the mortality, we proposed as the main objective of this study to identify the organisms causing the disease and test their pathogenicity in live trees of *E. nitens* and shoots of *E. globulus* and *E. nitens*.

MATERIALS AND METHODS

Sampling sites

The Company Forestaciones Operativas de México S. A. de C. V (REXCEL), Michoacán, sampled six plots of eucalyptus from three to seven years of age. In the municipalities of Ciudad Hidalgo (Agustina Correa and Agustina Correa 1), Irimbo (Maravatio) and Tuxpan (Mireya Tinoco) *E. nitens* plantations were sampled, and in the municipality of Maravatio (Francisco Maldonado and Raúl Armas) plantations with *E. globulus* were sampled. The plots were selected considering the presence of die-back and stem cankers on *Eucalyptus*. Five sections of stems with cankers of 30 cm in length were collected in each plot and symptoms were characterized visually. Table 1 shows the characteristics of each plot.

Isolation and morphological identification of the pathogen

Of each of the sections of tree stems collected, 15 pieces of symptomatic tissue of 6 mm² (450 subsamples) were taken. Samples were disinfected with commercial sodium hypochlorite at 3 % for 3 min, washed in sterile distilled water for 3 min, dried and planted in potato-dextrose agar growth medium at 2 % (PDA, Bioxon). The Petri dishes were incubated at 25 ± 2 °C for five days with laboratory daylight. Hyphal tip culture were performed and preserved in PDA inclined tubes covered with mineral oil from each isolate obtained. Six isolates (Agustina Correa = AC, Agustina Cor-

CUADRO 1. Características de las parcelas de muestreo en cuatro municipios del estado de Michoacán.

TABLE 1. Characteristics of the sample plots in four municipalities in the state of Michoacan.

Municipio/ Municipality	Localidad/ Location	Coordenadas/ Coordinates	Altitud/ Elevation (m)	Clima/ Climate
Ciudad Hidalgo	Agustina Correa	N 19° 45' 17.8" O 100° 31' 04.5"	2,500	C(w ₁)(w)b(i')
	Agustina Correa 1	N 19° 45' 17.1" O 100° 31' 04.7"	2,500	
Irimbo	Maravatío	N 19° 43' 35.2" O 100° 26' 58.3"	1,800	C(w ₁)(w)
Maravatio	Francisco Maldonado	N 19° 48' 36.1" O 100° 27' 29.9"	2,050	C(w ₁)(w)b(i')g
	Raúl Armas	N 19° 48' 11.2" O 100° 31' 46.8"	2,500	
Tuxpan	Mireya Tinoco	N 19° 33' 28.2" O 100° 24' 50.4"	2,450	(A)C(w ₁)(w)big

en agua destilada estéril por 3 min, se secaron y sembraron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar al 2 % (PDA, Bioxon). Las cajas de Petri se incubaron a 25 ± 2 °C por cinco días con luz natural de laboratorio. De cada aislamiento obtenido se realizaron cultivos de punta de hifa y se preservaron en tubos inclinados con PDA cubiertos con aceite mineral. Se seleccionaron seis aislamientos (Agustina Correa = AC, Agustina Correa1 = AC1, Francisco Maldonado = FM, Maravatio = MA, Mireya Tinoco = MT y Raúl Armas = RA) para su identificación, con base en el crecimiento del micelio, pigmentación y estructuras reproductivas (sexual o asexual). La morfología de los picnidios y pseudotecios se observó en un microscopio compuesto Carl Zeiss (Gottingen, Germany). La identificación de género se realizó con las claves de Barnett y Hunter (1998) y Sivanesan (1984), y la especie se identificó con base en lo señalado por Smith et al. (2001).

Identificación molecular del patógeno: Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

El ADN se extrajo del micelio de los aislamientos (MA, AC, AC1, MT, FM y RA) con el protocolo de Dneasy Plant Mini kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA). La amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (rRNA) se efectuó por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando los iniciadores ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990). Se utilizó un termociclador Multigene Gradient (modelo TC9600-9, Nueva Jersey, USA) con el siguiente programa: 1 ciclo 95 °C, 1 min; 35 ciclos a 94 °C, 1 min, 60 °C, 90 s 72 °C, 2 min; 1 ciclo 72 °C, 5 min. El producto amplificado se purificó con el Kit Wizard SV (Promega, USA) y se mandó a secuenciar en ambas direcciones a la compañía MacroGen (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias se compararon con las reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nih.gov) por

rea1 = AC1, Francisco Maldonado = FM, Maravatio = MA, Mireya Tinoco = MT and Raúl Armas = RA) were selected for identification, based on mycelial growth, pigmentation and reproductive structures (sexual or asexual). The morphology of pycnidia and pseudothecia was observed under a compound microscope Carl Zeiss (Gottingen, Germany). Genus identification was performed using the keys of Barnett and Hunter (1998) and Sivanesan (1984), and the species was identified based on those reported by Smith et al. (2001).

Molecular identification of the pathogen: DNA extraction, amplification and sequencing

DNA was extracted from the mycelium of the isolates (MA, AC, AC1, MT, FM and RA) using the protocol Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA). ITS1 and ITS2 regions amplification of ribosomal genes (rRNA) was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR), using the indicators ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') and ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990). A multigene Gradient thermo cycler (model TC9600-9, New Jersey, USA) was used with the following program: 1 cycle 95 °C, 1 min; 35 cycles at 94 °C, 1 min, 60 °C, 90 s 72 °C, 2 min; 1 cycle 72 °C, 5 min. The amplified product was purified using Wizard SV kit (Promega, USA) and was sequenced in both directions to the company MacroGen (Seoul, South Korea). The sequences were compared with those reported in the database of the NCBI gene bank (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nih.gov) using the program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Pathogenicity tests

In vitro. The pathogenicity of isolates of *Neofusicoccum* (MA, AC, AC1, MT, FM and RA) was verified in shoots of *E. nitens* (Michoacán) and *E. globulus* (Parque Estatal Molino

medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Pruebas de patogenicidad

In vitro. La patogenicidad de los aislamientos de *Neofusicoccum* (MA, AC, AC1, MT, FM y RA) se verificó en varetas de *E. nitens* (Michoacán) y *E. globulus* (Parque Estatal Molino de las Flores, Texcoco, Edo. de México). En cada prueba de inoculación se usaron 70 varetas (10 varetas por aislamiento y 10 varetas testigo) bajo un diseño experimental completamente al azar. Previo a la inoculación, los extremos de las varetas fueron sellados con parafinas para disminuir la desecación. Las varetas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5 % por 5 min, se lavaron tres veces por 3 min con agua destilada estéril y se secaron. La técnica de inoculación consistió en realizar una herida de 6 mm de diámetro en cada unidad experimental, luego la corteza se removió y se depositó un disco con crecimiento micelial de 12 días de edad. En la vareta testigo se colocaron discos de PDA sin el hongo. La zona inoculada de las varetas se cubrió con algodón y gasas húmedas estériles, y se selló con papel aluminio estéril; todas las varetas se mantuvieron en bandejas multiusos de 18 L (60 x 40 x 20 cm). La longitud de lesión de cada vareta experimental se evaluó a los 10 días después de la inoculación (ddi). Para completar los postulados de Koch, el hongo desarrollado en las varetas se reisoló en cultivo puro y se comparó morfológicamente con el aislamiento que fue inoculado.

In vivo. Las inoculaciones en campo fueron realizadas en *E. nitens* de tres años de edad en la parcela Ma. del Carmen Alcantar (REXCEL). Se inocularon cinco árboles de eucalipto por aislamiento y cinco árboles inoculados con discos de PDA como testigos. La inoculación se hizo a una altura de 1.80 m de la base del tallo; una superficie de 10 cm de longitud se desinfectó con alcohol al 70 % y se lavó con agua destilada estéril. La corteza se removió (8 mm de diámetro) y se aplicó la misma técnica de inoculación utilizada en las pruebas de patogenicidad en varetas. La zona inoculada se cubrió con algodón y gasas húmedas estériles, y se sellaron con papel parafilm para evitar la desecación. A los 48 ddi se evaluó la longitud de la lesión. El hongo del tejido enfermo se reisoló para completar los postulados de Koch.

Análisis Estadísticos

Las mediciones de longitud de la lesión en las varetas (*in vitro*) y en los árboles (*in vivo*) fueron sujetas a un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias por diferencia mínima significativa (DMS, $P = 0.0001$) con el programa SAS v8.1 (Statistical Analysis System [SAS], 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntomas en campo

La incidencia de la enfermedad ocasionada por especies de *Neofusicoccum* en plantaciones de eucalipto se presentó en

de las Flores, Texcoco, Edo. de México). A total of 70 shoots (10 shoots per isolation and 10 control shoots) were used in each inoculation test under a completely randomized experimental design. Before inoculation, the ends of the shoots were sealed with paraffin to reduce drying. The shoots were disinfected with sodium hypochlorite at 5 % for 5 min, washed three times for 3 min using sterile distilled water and dried. The inoculation technique consisted of a wound of 6 mm diameter in each experimental unit, and then the bark was removed and a disk with mycelial growth (12 days of age) was placed. Two PDA disks without the fungus were placed on the control shoot. The inoculated shoot area was covered with cotton and moist sterile gauze, and sealed with sterile aluminum paper; all shoots remained on 18 L multi-purpose tray (60 x 40 x 20 cm). The length of damage of each experimental shoot was assessed at 10 days after inoculation (dai). To complete Koch's postulates, the fungus developed on the shoots was reisolated on pure culture and compared morphologically with isolation that was inoculated.

In vivo. Field inoculations were performed in *E. nitens* of three years of age in the Ma. Del Carmen Alcantar (REXCEL) plot. A total of five trees of eucalyptus per isolation were inoculated and five trees were inoculated with PDA disks as control. The inoculation was made at a height of 1.80 m from the base of the stem; an area of 10 cm length was disinfected with alcohol at 70% and washed with sterile distilled water. The bark was removed (8 mm diameter) and the same inoculation technique used in the shoot pathogenicity test was applied. The inoculated area was covered with cotton and moist sterile gauze, and sealed with parafilm to prevent desiccation. The length of damage was assessed at 48 dai. The fungus from the diseased tissue was reisolated to complete Koch's postulates.

Statistical Analysis

Length measurements of the damage in shoots (*in vitro*) and trees (*in vivo*) were subjected to analysis of variance (ANOVA) and comparison of means by least significant difference (LSD, $P = 0.0001$) using the program SAS v8.1 (Statistical Analysis System [SAS], 2000).

RESULTS Y DISCUSSION

Field symptoms

The incidence of disease caused by species of *Neofusicoccum* in eucalyptus plantations appeared in the form of patches and the symptoms were die-back in the aerial part and the presence of cankers on the stem of *E. globulus* and *E. nitens* (Figure 1A). In the case of die-back, we can see necrosis of shoots, branches, leaf death and treetops reduction. We observed black fusiform cankers on the bark with, variable and sunken shape; on the surface of these we observed black stroma growing in aggregate. Cankers caused swellings on the stem, sometimes releasing red resin flow and epicormic

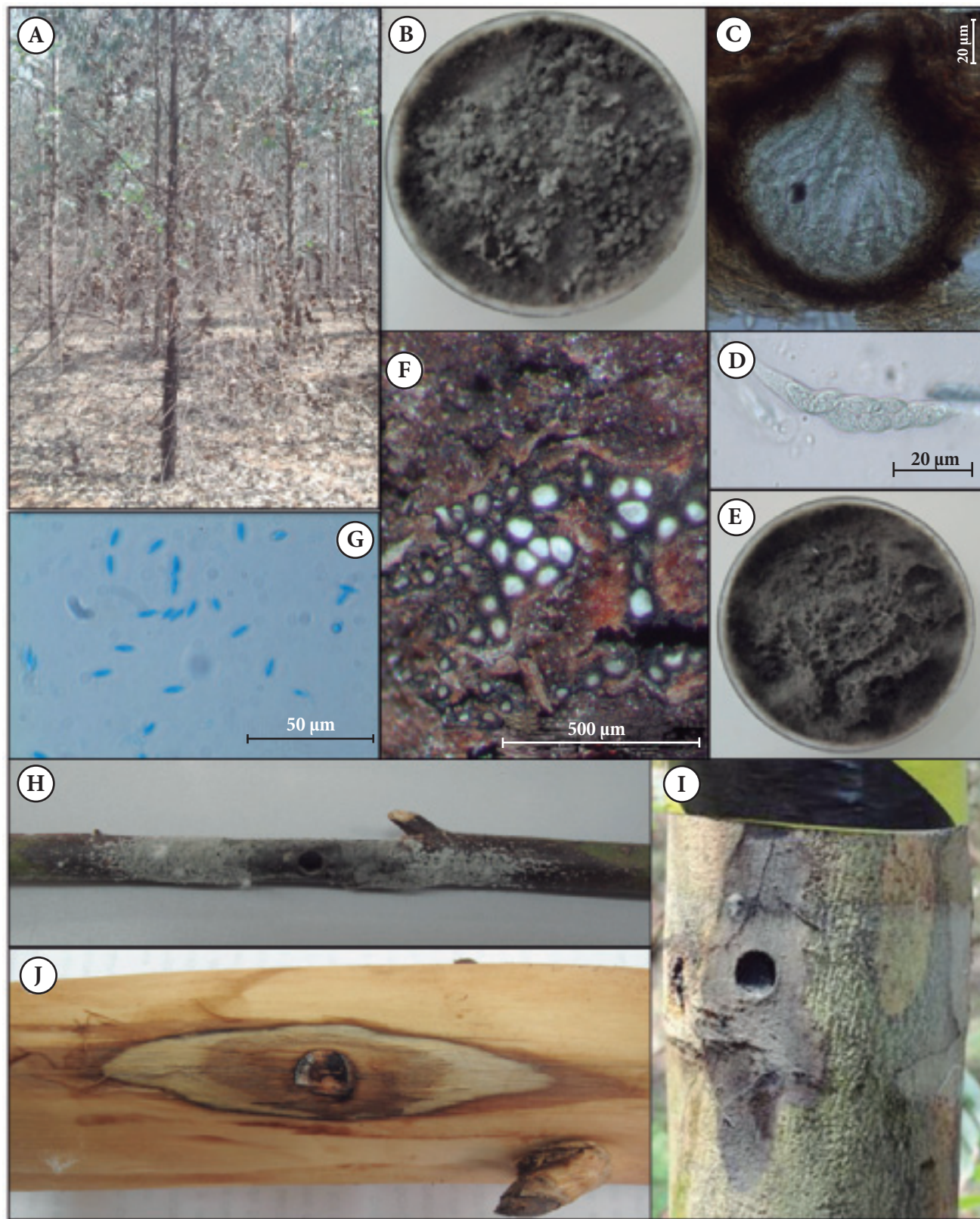


FIGURA 1. A) Árboles muertos de eucalipto por la acción de Botryosphaeriaceae. B) *Neofusicoccum eucalyptorum* en PDA a los 10 días. C) Pseudotecio. D) Asca con ocho ascosporas. E) *N. parvum* en PDA a los 10 días. F) Corte longitudinal de picnidios. G) Conidios. H) Vareta de *Eucalyptus globulus* con picnidios inmaduros. I y J) Cancro en forma de huso en *E. nitens*.

FIGURE 1. A) Eucalyptus trees killed by the action of Botryosphaeriaceae. B) *Neofusicoccum eucalyptorum* on PDA at 10 days. C) Pseudothecium. D) Ascus with eight ascospores. E) *N. parvum* on PDA at 10 days. F) Longitudinal section of pycnidia. G) Conidia. H) Shoot of *Eucalyptus globulus* with immature pycnidia. I and J) Spindle-shaped canker in *E. nitens*.

forma de manchones y los síntomas fueron la muerte regresiva en la parte aérea y la presencia de canchros en el fuste de *E. globulus* y *E. nitens* (Figura 1A). En la muerte regresiva hay necrosis de puntas, ramas, muerte de hojas y reducción de la copa de los árboles. En la corteza se observaron canchros de color negro, fusiformes, de tamaño variable y hundido; en la superficie de éstos se observaron estromas de color negro creciendo de manera agregada. Los canchros causaron hinchamientos en el fuste, algunas veces emitieron flujo de resina de color rojo y se desarrollaron brotes epicórmicos. En la parte interna se observó necrosis de color café claro a oscuro que alcanzó al xilema, causando la muerte del árbol. En México, estos síntomas son provocados por *N. parvum* en aguacate, causando canchros y muerte regresiva en ramas (Molina-Gayosso, Silva-Rojas, García-Morales, & Ávila-Quezada, 2012). También *N. parvum* induce síntomas similares en plantaciones de *E. globulus* en España (Iturrutxa, Slippers, Mesanza, & Wingfield, 2011). Por otra parte, Gezahgne, Roux, Slippers, y Wingfield (2004) describen los mismos síntomas causados por *Botryosphaeria* sp. en *E. globulus*, *E. saligna* Smith., *E. grandis* y *E. citriodora* Hook. en Etiopía.

Aislamiento e identificación morfológica del patógeno

Seis hongos de la familia Botryosphaeriaceae se aislaron de las dos especies de eucalipto (*E. nitens* y *E. globulus*). En los predios Agustina Correa, Maravatío y Mireya Tinoco se aisló *Neofusicoccum eucalyptorum* (teleomorfo *Botryosphaeria eucalyptorum* Crous, H. Smith & M. J. Wingf.) de árboles de *E. nitens*. En Agustina Correa 1 se aisló *Neofusicoccum parvum* de *E. nitens* y en Francisco Maldonado y Raúl Armas se encontró el mismo patógeno pero en plantaciones de *E. globulus*. En Agustina Correa hubo presencia de pseudotecios de *B. eucalyptorum* sobre la corteza de *E. nitens*, y en Agustina Correa 1, Francisco Maldonado y Raúl Armas se observaron picnidios de *N. parvum*.

El hongo *N. eucalyptorum* creció 8 cm en forma radial a los 10 días en medio PDA. La colonia de color blanco y aspecto algodonoso a los cuatro días, se tornó gris oscura a negra a los 10 días, con abundante micelio aéreo (Figura 1 B); al reverso de la caja de Petri, la coloración fue negra. En algunos aislamientos, a los 15 días, se formaron picnidios inmaduros agrupados de color negro. Se observó estroma de color negro de 312.15 µm inmerso en el tejido del hospedante. El hongo *N. eucalyptorum* no formó el teleomorfo en el medio de cultivo. Los pseudotecios de *N. eucalyptorum* fueron de color café oscuro a negro con diámetro de 380 a 440 µm (Figura 1C); las ascas fueron clavadas y bitunicadas de (70)40 x 15(-21) µm con ocho ascosporas (Figura 1D) e intercaladas con parafisos filiformes; las ascosporas fueron hialinas, no septadas y con apariencia granular, de forma ovoide a claviforme con el ápice obtuso o ligeramente redondeado de (20-)23-26(-28) x (7-)8-9(-11) µm.

El aislamiento de *N. parvum* creció en medio PDA, la cual se observó de color blanco a los cuatro días, se tornó blanco

shoots were developed. On the inside, we observed light to dark brown necrosis reaching the xylem, killing the tree. In Mexico, these symptoms are caused by *N. parvum* on avocado, causing cankers and die-bak in branches (Molina-Gayosso, Silva-Rojas, García-Morales, & Ávila-Quezada, 2012). *N. parvum* also induce similar symptoms in *E. globulus* plantations in Spain (Iturrutxa, Slippers, Mesanza, & Wingfield, 2011). Moreover, Gezahgne, Roux, Slippers, and Wingfield (2004) describe the same symptoms caused by *Botryosphaeria* sp. in *E. globulus*, *E. saligna* Smith., *E. grandis* and *E. citriodora* Hook. in Ethiopia.

Isolation and morphological identification of the pathogen

A total of six fungi of the family Botryosphaeriaceae were isolated from two species of Eucalyptus (*E. nitens* and *E. globulus*). *Neofusicoccum eucalyptorum* Tinoco (teleomorfo *Botryosphaeria eucalyptorum* Crous, H. Smith & M. J. Wingf.) was isolated from *E. nitens* trees in the lands Agustina Correa, Maravatío and Mireya Tinoco. In Agustina Correa 1, *Neofusicoccum parvum* was isolated from *E. nitens* and the same pathogen was found but in *E. globulus* plantations in Francisco Maldonado and Raúl Armas. In Agustina Correa we found pseudothecia of *B. eucalyptorum* on the bark of *E. nitens*, and in Agustina Correa 1, Francisco Maldonado and Raúl Armas we found pycnidia of *N. parvum*.

The fungus *N. eucalyptorum* grew 8 cm radially at 10 days on PDA. The colony of white and cottony appearance at four days became dark gray to black at 10 days, with abundant aerial mycelium (Figure 1 B); on the back of the petri dish, the color was black. In some isolates, at 15 days, black immature pycnidia were formed. Black stroma of 312.15 µm immersed in host tissue was observed. The fungus *N. eucalyptorum* did not form the teleomorph in the culture medium. Pseudothecia of *N. eucalyptorum* went from dark brown to black with a diameter of 380-440 µm (Figure 1C); ascus were nailed and bitunicate of (70) 40 x 15 (-21) µm with eight ascospores (Figure 1D) and interspersed with filiform paraphyses; ascospores were hyaline, septate and with non-granular appearance, with ovoid to clavate shape with obtuse or slightly rounded apex (20-)23-26(-28) x (7-)8-9(-11) µm.

The isolation of *N. parvum* grew on PDA medium, which was white at four days, became gray-white at six to eight days and completely black at 10 days, with abundant aerial mycelium (Figure 1E). On the surface of the culture medium the presence of dark black globular pycnidia, covered with gray mycelium at 14 days, was observed without the formation of conidia. Slippers and Wingfield (2007) mention that to induce the formation of conidia in pycnidia, the fungus must grow in water agar medium (AA) or extract-malt-agar (EMA), supplemented with pine needles or small pieces of host tissue and incubated at 25 °C. *N. parvum* development on PDA growth medium is similar to *N. eucalyptorum* under the same laboratory conditions. Moreover, *N. parvum* developed pycnidia solitary or grouped in black stroma of

grisáceo a los seis u ocho días y completamente negra a los 10 días, con abundante micelio aéreo (Figura 1E). En la superficie del medio de cultivo se observó la **presencia de picnidios globulares** de color negro oscuro, cubierto de micelio color gris a los 14 días, sin la formación de conidios. Slippers y Wingfield (2007) mencionan que para inducir la formación de conidios en picnidios, el hongo se debe cultivar en el medio de agar-agua (AA) o extracto-malta-agar (EMA), suplementado con acículas de pino o pequeños trozos de tejido del hospedante e incubar a 25 °C. El desarrollo de *N. parvum* en medio de cultivo PDA es similar a *N. eucalyptorum*, bajo las mismas condiciones de laboratorio. Además, *N. parvum* desarrolló picnidios solitarios o agrupados en estromas de color negro de 299 µm, creciendo en ramas y tallo de *E. nitens* y *E. globulus* (Figura 1 F). Los conidios son hialinos, fusiformes y aseptados de 18.9 (-23) x 4 (-4.9) µm (Figura 1 G), similar a lo reportado por Iturrutxa et al. (2011).

En campo, *N. eucalyptorum* y *N. parvum* muestran los mismos síntomas y signos causando canchros y muerte regresiva, expresándose **la enfermedad en condiciones de estrés ocasionado por las heladas y sequías prolongadas en la zona**. En medio de cultivo se observó similitud en el desarrollo con una coloración blanca que posteriormente se tornó negra y en algunas cepas hubo presencia de picnidios.

Identificación molecular del patógeno

El análisis molecular confirmó la identificación morfológica de *N. eucalyptorum* (*B. eucalyptorum* (aislamientos MA, AC y MT) y *N. parvum* (aislamientos AC1, FM y RA) como asociados a la muerte regresiva en las dos especies de eucalipto (*E. nitens* y *E. globulus*). Las secuencias genéticas de *N. eucalyptorum* (números de acceso en el NCBI: KC479184 y KC4799188) y *N. parvum* (KC479185, KC479186 y KC479187) mostraron 100 % de similaridad con las reportadas para estos hongos en el GenBank.

Pruebas de patogenicidad *in vitro* e *in vivo*

Todos los aislamientos de *Neofusicoccum* inoculados en las pruebas son patogénicos y ocasionan lesiones necróticas en las varetas de *E. nitens* y *E. globulus*. En *E. globulus*, la lesión con mayor longitud (21.7 cm) la causó el aislamiento FM de *N. parvum* y la menor longitud de lesión (18.6 cm) fue provocada por el aislamiento MA (*N. eucalyptorum*). En las varetas de *E. nitens*, el aislamiento AC1 causó la mayor lesión con longitud media de 16.63 cm y la menor fue ocasionada por el aislamiento RA con 11.5 cm; ambos identificados como *N. parvum*. No hubo desarrollo de lesión en las varetas inoculadas con discos de PDA; las lesiones desarrolladas por los aislamientos fueron diferentes significativamente respecto al testigo ($P < 0.0001$). La longitud de las lesiones producidas fue estadísticamente diferente entre algunos aislamientos ($P < 0.0001$) (Figura 2). En las zonas necróticas hubo picnidios inmaduros creciendo de forma agregada y solitaria (Figura 1H).

299 µm, growing on branches and stems of *E. nitens* and *E. globulus* (Figure 1F). Conidia are hyaline, fusiform and aseptate of 18.9 (-23) x 4 (-4.9) µm (Figure 1 G), similar to that reported by Iturrutxa et al. (2011).

In the field, *N. eucalyptorum* y *N. parvum* show the same symptoms and signs causing cankers and die-back, expressing the disease under stress caused by prolonged frost and drought in the area. The growth medium showed similarity in the development with white coloration which later turned black and in some strains there was presence of pycnidia.

Molecular identification of the pathogen

The molecular analysis confirmed the morphological identification of *N. eucalyptorum* (*B. eucalyptorum* (isolates MA, AC and MT) and *N. parvum* (isolates AC1, FM and RA) as related to die-back in the two species of eucalyptus (*E. nitens* and *E. globulus*). Genetic sequences of *N. eucalyptorum* (access number in the NCBI: KC479184 and KC4799188) and *N. parvum* (KC479185, KC479186 and KC479187) showed 100 % similarity with those reported for these fungi in GenBank.

Pathogenicity tests *in vitro* and *in vivo*

All isolates of *Neofusicoccum* inoculated in the tests are pathogenic and cause necrotic lesions on shoots of *E. nitens* and *E. globulus*. In *E. globulus*, the damage with greater length (21.7 cm) was provoked by the isolation FM of *N. parvum* and the shortest length of damage (18.6 cm) was caused by isolation MA (*N. eucalyptorum*). In the shoot of *E. nitens*, isolation AC1 provoked the most damage with average length of 16.63 cm and the least damage was caused by isolation RA with 11.5 cm; both identified as *N. parvum*. There was no development of injuries in shoot inoculated with PDA disks; injuries developed by the isolates were significantly different than the control ($P < 0.0001$). The length of the injuries was statistically different among some isolates ($P < 0.0001$) (Figure 2). In the necrotic areas, there were immature pycnidia growing in aggregate and solitary (Figure 1H).

In inoculations in the field, the range of *E. nitens* injury was 13.12 to 20.92 cm at 48 dai; spindle-shaped, with dark brown color and sunken appearance (Figure 1I and 1J). The greatest injury was caused by *N. eucalyptorum* (AC) and the shorter length of injury was caused by *N. parvum* (RA); there were no statistically significant differences between isolates but there were significant differences compared with the control ($P < 0.0001$), because the control did not develop injuries (Figure 2). Smith et al. (2001) mention that *N. eucalyptorum* cause injuries of 5.3 cm at 30 dai and was less aggressive than *B. dothidea* in *E. grandis*. The pathogen *N. eucalyptorum* has been reported in Chile, Uruguay (Pérez et al., 2009), South Africa (Smith et al., 2001) and Australia (Burgess, Sakalidis, & Hardy, 2006) to cause cankers on *E. globulus* and *E. nitens*; also Pérez et al. (2009) reported that the pathogen has endophytic shape on *E. dunnii* Maiden,

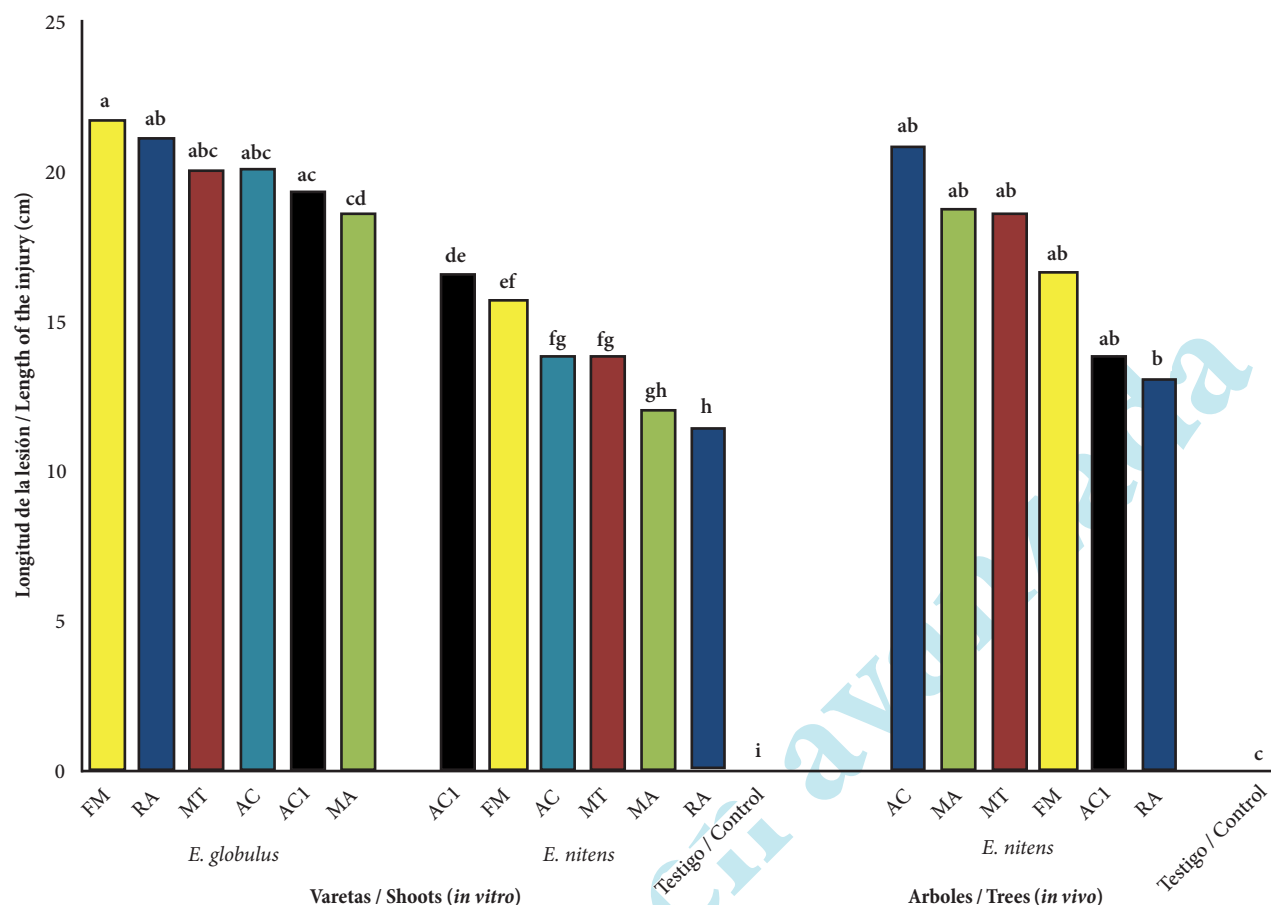


FIGURA 2. Longitud media de la lesión ocasionada por *Neofusicoccum eucalyptorum* (MA, AC, MT) y *N. parvum* (AC1, FM, RA) inoculados en *Eucalyptus globulus* y *E. nitens*. Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa (DMS, $P < 0.0001$).
 FIGURE 2. Average length caused by *Neofusicoccum eucalyptorum* (MA, AC, MT) and *N. parvum* (AC1, FM, RA) inoculated in *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. Means with the same letter are not significantly different (LSD, $P < 0.0001$).

En las inoculaciones en campo, el intervalo de lesión en *E. nitens* fue de 13.12 a 20.92 cm a los 48 ddi; de forma fusiforme, color café oscuro y de apariencia hundida (Figura 1I y 1J). La lesión mayor fue causada por *N. eucalyptorum* (AC) y la menor longitud de lesión, por *N. parvum* (RA); estadísticamente no hubo diferencias significativas entre los aislamientos pero si con respecto al testigo ($P < 0.0001$), el cual no desarrolló lesión (Figura 2). Smith et al. (2001) mencionan que *N. eucalyptorum* causa lesiones de 5.3 cm a los 30 ddi y que fue menos agresivo que *B. dothidea* en *E. grandis*. El patógeno *N. eucalyptorum* se ha reportado en Chile, Uruguay (Pérez et al., 2009), Sudáfrica (Smith et al., 2001) y Australia (Burgess, Sakalidis, & Hardy, 2006) por causar canchros en *E. globulus* y *E. nitens*; también Pérez et al. (2009) reportan que el patógeno se encuentra de forma endófito en *E. dunnii* Maiden, *E. grandis*, *E. maidenii* F. Muell, *E. tereticornis* Sm. y *E. viminalis* Labill y en otros hospedantes como *Blepharocalyx salicifolius* (Hum., Bompl. & Kunth) Berg., *Myrceugenia glaucescens* (Camb.) Legr. et Kausel, y *Myrrhinium atropurpureum* var. octandrum Benth. En Etiopía y República del Congo, *N. parvum* causa muerte regresiva, induce canchros en el fuste de *Eucalyptus* y puede llegar

E. grandis, *E. maidenii* F. Muell, *E. tereticornis* Sm. and *E. viminalis* Labill and other hosts as *Blepharocalyx salicifolius* (Hum., Bompl. & Kunth) Berg., *Myrceugenia glaucescens* (Camb.) Legr. et Kausel, y *Myrrhinium atropurpureum* var. octandrum Benth. In Ethiopia and Republic of Congo, *N. parvum* causes die-back, induces cankers on the stem of *Eucalyptus* and can even cause injuries from 2.5 to 9.2 cm in length at 48 dai (Gezahgne et al., 2004). This study sustain the ability of *N. eucalyptorum* and *N. parvum* to cause cankers and death of eucalyptus trees planted in areas affected by abiotic factors such as prolonged frost and droughts during the year (Schoeneweiss, 1981). Many species of *Botryosphaeriaceae* are endophytes that cause disease after a period of stress (Slippers & Wingfield, 2007).

CONCLUSIONS

The fungus causing cankers, die-back in eucalypt branches and stems were identified morphologically and confirmed molecularly as *N. eucalyptorum* and *N. parvum*. The fungus *B. eucalyptorum* teleomorph of *N. eucalyptorum* was found only on *E. nitens* trees and *N. parvum* on *E. globulus* and

a causar lesiones de 2.5 a 9.2 cm de longitud a los 48 ddi (Gezahgne et al., 2004). En el presente estudio se confirma la capacidad de *N. eucalyptorum* y *N. parvum* para causar canchros y muerte de eucaliptos plantados en zonas afectadas por factores abióticos como heladas y sequías prolongados durante el año (Schoeneweiss, 1981). Varias especies de Botryosphaeriaceae son endófitos que causan enfermedad después de un periodo de estrés (Slippers & Wingfield, 2007).

CONCLUSIONES

Los hongos causantes de canchros, muerte regresiva en ramas y tallos en eucaliptos fueron identificados morfológicamente, y confirmados molecularmente, como *N. eucalyptorum* y *N. parvum*. El hongo *B. eucalyptorum*, teleomorfo de *N. eucalyptorum*, sólo se encontró en árboles de *E. nitens*, y *N. parvum* en árboles de *E. globulus* y *E. nitens*. Este es el primer reporte de los hongos *N. eucalyptorum* y *N. parvum* causando enfermedad en México; además se confirma la habilidad de dichos patógenos para la infección de especies de eucalipto.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación forma parte del proyecto del Fondo Sectorial para la Investigación y Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal, CONAFOR-CONACYT 148206 (Diagnóstico y alternativas para la prevención, control y manejo de diversas plagas y enfermedades que afectan las plantaciones forestales comerciales).

REFERENCIAS

- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4th ed.). St Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Burgess, T. I., Sakalidis, M. L., & Hardy, H. E. S. (2006). Gene flow of the canker pathogen *Botryosphaeria australis* between *Eucalyptus globulus* plantations and native eucalypt forests in Western Australia. *Austral Ecology*, 31, 559–666. doi: 10.1111/j.1442-9993.2006.01596.x
- Cibrián, T. D. (2013). *Manual para la identificación y manejo de plagas en plantaciones forestales*. México: Universidad Autónoma Chapingo-CONAFOR-CONACYT.
- Cibrián, T. D., Rosales, D. A., & García, D. S. E. (2007). *Enfermedades forestales en México/Forest diseases in Mexico*. México: Universidad Autónoma Chapingo-CONAFOR-SEMARNAT; Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). (2011). Consultado 25-10-2012 en <http://www.conafor.gob.mx/portal/index.php/temas-forestales/plantaciones>
- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Phillips, A. J. L.,...Groenewald, J. Z. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55, 235–253. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2104729/pdf/0235.pdf>
- Cruz, A. J., Cibrián T. D., Ramírez M. H., & García D. S. E. (2001). Etiología y síndrome de los canchros *Cryphonectria*, *La-*

E. nitenstrees. This is the first report of the fungus *N. eucalyptorum* and *N. parvum* causing disease in Mexico; also we confirmed the ability of these pathogens to infect the eucalyptus species.

ACKNOWLEDGMENT

This study is part of the project Fondo Sectorial para la Investigación y Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal, CONAFOR-CONACYT 148206 (Diagnostic and alternatives for the prevention, control and management of various pests and diseases affecting commercial forest plantations).

End of English Version

siodiopodia y *Fusicoccum* en eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 7(1), 27–37. Obtenido de http://portal.chapingo.mx/revistas/forestales/contenido.php?id_articulo=342&id_revistas=3

- Gezahgne, A., Roux, J., Slippers, B., & Wingfield M. J. (2004). Identification of the causal agent of *Botryosphaeria* stem canker in Ethiopian eucalyptus plantations. *South African Journal of Botany*, 70(2), 241–248. Obtenido de http://www.fabnet.up.ac.za/publication/pdfs/585-2004_gezahgne_roux_slippers_wingfield_sa_j_bot.pdf
- Iturrutxa, E., Slippers, B. N., Mesanza, & Wingfield, M. J. (2011). First report of *Neofusicoccum parvum* causing canker and die-back of *Eucalyptus* in Spain *Australasian Plant Disease Notes*, 6, 57–59. doi: 10.1007/s13314-011-0019-5
- Mohali, S., Slippers B. N., & Wingfield M. J. (2006). Two new *Fusicoccum* species from *Acacia* and *Eucalyptus* in Venezuela based on morphology and DNA sequence data. *Mycological Research*, 110, 405–413. doi: 10.1016/j.mycres.2006.01.006.
- Molina-Gayosso, E., Silva-Rojas, H. V., García-Morales, S., & Ávila-Quezada, G. (2012). First report of black spots on avocado fruit caused by *Neofusicoccum parvum* in Mexico. *Plant Disease*, 96(2), 287. doi: 10.1094/PDIS-08-11-0699
- Pérez, C. A., Altier, N., Simeto, S., Wingfield, M. J., Slippers, B., & Blanchette, R. A. (2004). Botryosphaeriaceae from *Eucalyptus* and native Myrtaceae in Uruguay. *Agrociencia*, 12(2), 19–30. Obtenido de <http://www.fagro.edu.uy/~agrociencia/index.php/directorio/article/viewFile/162/104>
- Pérez, C. A., Wingfield, M. J., Slippers, B., Altier, N. A., & Blanchette, R. A. (2009). *Neofusicoccum eucalyptorum*, a *Eucalyptus* pathogen, on native Myrtaceae in Uruguay. *Plant Pathology*, 58, 964–970. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02116.x
- Pérez, C. A., Wingfield, M. J., Slippers, B., Altier, N. A., & Blanchette, R. A. (2010). Endophytic and canker-associated Botryosphaeriaceae occurring on non-native *Eucalyptus* and native Myrtaceae trees in Uruguay. *Fungal Diversity*, 41, 53–69. doi: 10.1007/s13225-009-0014-8
- Pérez-Vera, O. A., Yáñez-Morales, M. J., Alvarado-Rosales, D., Cibrián-Tovar, D., & García-Díaz, S. E. (2005). Hongos

- asociados a eucalipto, *Eucalyptus grandis* Hill: Maid. *Agrociencia*, 39, 311–318. Obtenido de <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2005/may-jun/art-8.pdf>
- Rodas, C. A., Slippers, B., Gryzenhout, M., & Wingfield, M. J. (2009). Botryosphaeriaceae associated with *Eucalyptus* canker diseases in Colombia. *Forest Pathology*, 39, 110–123. doi: 10.1111/j.1439-0329.2008.00569.x
- Sakalidis, M. L., Hardy, G. E. St. J., & Burguess, T. I. (2011). Use of the Genealogical Sorting Index (GSI) to delineate species boundaries in the *Neofusicoccum parvum*-*Neofusicoccum ribis* species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60(320), 333–344. Obtenido de http://researchrepository.murdoch.edu.au/4559/1/use_of_the_Genealogical_Sorting_Index.pdf
- Schoeneweiss, D. F. (1981). The role of environmental stress in diseases of woody plants. *Plant Disease*, 65, 308–314. Obtenido de http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1981Articles/PlantDisease65n04_308.PDF
- Sivanesan, A. (1984). The bitunicate *Ascomycetes* and their anamorphs. USA: Lubrecht & Cramer.
- Slippers, B., Fourie, G., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Carnegie, A. J., & Wingfield, M. J. (2004). Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South Africa. *Studies in Mycology*, 50, 343–358. Obtenido de http://www.fabinet.up.ac.za/publication/pdfs/661-004_slippers_fourie_crous_coutinho_wingfield_carnegie_wingfield_studies_mycol.pdf
- Slippers, B., & Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: Diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*, 21, 90–06. doi:10.1016/j.fbr.2007.06.002
- Smith, H., Crous, P. W., Wingfield, M. J., Coutinho T. A., & Wingfield, B. D. (2001). *Botryosphaeria eucalyptorum* sp. nov., a new species in the *B. dothidea*-complex on *Eucalyptus* in South Africa. *Mycologia*, 93(2), 277–285. Obtenido de <http://www.jstor.org/discover/10.2307/3761649?uid=3738664&uid=2129&uid=2&uid=70&uid=4&id=21103254300791>
- Statistical Analysis System (SAS). (2000). SAS system for Windows V8.1. Cary, NC, USA: SAS Institute.
- Velázquez, M. A., Fierros, G. A. M., Aldrete, A., Gómez, G. A., Fernández, C. S., De los Santos, P. H.,...Ramírez, H. C. (2013). *Situación actual y perspectivas de las plantaciones forestales comerciales en México*. México: Comisión Nacional Forestal (CONAFOR).
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). New York, USA: Academic Press.