

Artículo



**Susceptibilidad y prevalencia de *Eucalyptus pellita*
F.Muell. al cancro causado por *Chrysosporthe cubensis*
(Bruner) Gryzenhout & M. J. Wingf. en la Orinoquia
Colombiana**

Anagibeth Chocontá López^{1*}

Olga Patricia Pinzón Florián²

Víctor Manuel Nieto Rodríguez³

¹Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

²Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

³Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal – CONIF.

*Autor por correspondencia, email: achocontal@unal.edu.co



Resumen:

El cancro del eucalipto causado por *Chrysosporthe cubensis* es una de las enfermedades más limitantes para las plantaciones de *Eucalyptus* en la región tropical. Con el objeto de confirmar el hongo causal del cáncer observado en plantaciones comerciales de *E. pellita* en la Orinoquia Colombiana y explorar la posible diferencia en susceptibilidad de algunos clones comerciales de la región, se aisló el patógeno a partir de tejido enfermo de árboles adultos y las cepas obtenidas se inocularon en plantas jóvenes pertenecientes a diez clones, incluido un testigo de *E. urophylla* en condiciones de invernadero. Se comparó la longitud promedio de la herida desarrollada durante 53 días después de la inoculación, con dos aislamientos del patógeno. También se estimó la prevalencia del cancro en una plantación de *E. pellita* de 7 años de edad. Con base en los síntomas, y a caracteres morfológicos macro y microscópicos, los aislamientos se identificaron como *Chrysosporthe cubensis* y con el uso de los marcadores moleculares ITS5 e ITS4 como *C. cubensis* y *C. doradensis*. Todos los clones evaluados evidenciaron susceptibilidad al ataque de *Chrysosporthe*. Aun cuando el cáncer del eucalipto es una enfermedad común, constituye el primer registro de *C. cubensis* y *C. dorandensis* en plantaciones de *E. pellita* en la Orinoquia Colombiana. Dadas las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad en la región, se recomienda continuar los esfuerzos de selección y evaluación para contar con material tolerante a la enfermedad.

Palabras clave: Cáncer del eucalipto, *Chrysosporthe doradensis* Gryzenh. & M.J. Wingf., incidencia, Orinoquia Colombiana, severidad, síntomas.

Fecha de recepción/Reception date: 12 de noviembre de 2016

Fecha de aceptación/Acceptance date: 6 de febrero de 2017.

Introducción

La enfermedad conocida como cáncer o cancro del *Eucalyptus*, causada por *Chrysosporthe cubensis* Brunes Gryzenhout & M. J. Wingf., es una de las enfermedades más limitantes en plantaciones comerciales de *Eucalyptus* (Van Heerden y Wingfield, 2001; Gryzenhout *et al.*, 2004; Souza, 2008).

Chrysosporthe cubensis infecta a los árboles a través de heridas, generalmente en la base del fuste de árboles jóvenes, ocasionando retraso en el crecimiento, marchitez, anillamiento y resquebrajamiento de los tallos (Gryzenhout *et al.*, 2004; Nakabonge, 2006); además, produce exudaciones o secreciones enzimáticas que pueden ser tóxicas (Bernal *et al.*, 2009), y que en condiciones avanzadas puede llegar a ocasionar la muerte, principalmente de plantaciones jóvenes en varias especies de eucalipto (FAO, 2008).

En Colombia una de las enfermedades más frecuentemente encontrada en las plantaciones de eucalipto es el cáncer causado por *C. cubensis* en *E. grandis* W. Hill ex Maiden y la única medida efectiva de manejo consiste en la selección y siembra de clones tolerantes (Rodas *et al.*, 2005; Mizerit, 2009). En la Orinoquia Colombiana se han realizado la selección de especies del género *Eucalyptus*, a partir de diferentes especies y procedencias, de lo que se concluye que *E. pellita* F.Muell. es la especie que alcanza mayor volumen por unidad de área con 350 m³ ha⁻¹ (Reforestadora de la Costa, 2009).

La propagación clonal aunque maximiza la producción comercial de madera, tiene

igualmente factores de precaución por evaluar, como es la susceptibilidad de un clon al ataque de agentes patógenos. Es de esperarse que para esta especie, el número de hectáreas plantadas con clones en el mediano y corto plazo aumente significativamente (Nieto y Gasca, 2010). Por tal motivo, es importante incorporar la variable de resistencia a las enfermedades dentro de los programas de selección de clones de *E. pellita* aptos para plantación extensiva en la Orinoquia Colombiana, aun cuando la especie es reconocida en la literatura por su baja incidencia a plagas y enfermedades (Alfenas *et al.*, 1983; Borralho y Nieto, 2012). Por lo anterior, la presente investigación estuvo orientada a confirmar la identidad del agente causal del cancro o cáncer del *E. pellita* y estimar la susceptibilidad de algunos clones al cáncer causado por este patógeno en plántulas de 3 meses de edad, así como la prevalencia del problema en plantaciones de siete años de edad.

Materiales y Métodos

Área de estudio

El estudio se realizó en un núcleo forestal de 3 000 ha de las cuales de 265.21 ha han sido establecidas con especies del género *Eucalyptus*. Las plantaciones están ubicadas en la meseta de San Pedro en el municipio Villanueva, Departamento de Casanare, Colombia, en las coordenadas geográficas 4°57" N y 73°94" O con una altitud media de 420 m.

La zona de estudio se ubica en el bosque húmedo tropical, con un régimen de precipitación monomodal que favorece el desarrollo y dispersión del cáncer del eucalipto durante todo el año (a excepción de los meses de diciembre, enero,

febrero y marzo), toda vez que *C. cubensis* presenta crecimiento óptimo en temperaturas elevadas y precipitación de más de 2 000 mm anuales (Gryzenhout *et al.*, 2004).



Obtención de aislamientos e identificación del patógeno

Las muestras de material vegetal con síntomas y signos del cáncer del eucalipto se obtuvieron de la corteza, la madera y los meristemos apicales de árboles de *E. pellita* de dos años y *E. urophylla* S. T. Blake de cuatro años de edad. Todas se dispusieron en bolsas plásticas debidamente etiquetadas y se transportaron en una nevera portátil a una temperatura de alrededor de 4 °C (Bernal *et al.*, 2009), previo a su análisis en el Laboratorio de Sanidad de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Sede Vivero, en Bogotá.

Las treinta y un muestras recolectadas en campo se desinfectaron individualmente en una solución de hipoclorito de sodio (NaCl) al 2 %, durante dos minutos, y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril (Bernal *et al.*, 2009). De cada muestra se obtuvieron dos réplicas, de las cuales una se conservó en refrigeración a 4 °C y otra se utilizó para obtener las estructuras reproductivas del hongo y los primeros aislamientos. Cada muestra se examinó detalladamente con ayuda de estereomicroscopio (*Carl Zeiss Discovery V8*) con el cual se identificaron el ascostroma, cuello peritecial y micelio sobre el tejido vegetal. A partir de estas muestras se obtuvieron aislamientos mediante: transferencia directa de masas de conidias, cultivo monospórico a partir de suspensión de

conidias en agua destilada estéril (ADE) y siembra de secciones de tejido vegetal infectado en medio de cultivo. En todos los casos se utilizó medio de cultivo agar maltosa al 2 % (AM) marca Merck (Gryzenhout *et al.*, 2004; Nakabonge, 2006; Bernal *et al.*, 2009; Juárez *et al.*, 2013). Los aislamientos fueron preservados mediante los métodos de criopreservación, liofilización y aceite mineral estéril.

La corroboración del agente causal se basó en características macroscópicas como color y textura del micelio y morfológicas microscópicas por la observación e identificación de conidióforos y conidias. La caracterización microscópica de *C. cubensis* y *C. doradensis* Gryzenh. & M.J. Wingf. se realizó por montajes directos y tinción en azul de lactofenol. Adicionalmente, se obtuvieron cortes del material infectado de 25 μm de grosor con un micrótopo LEICA RM 2255 y se adicionó con fijador no coagulante con ácido crómico y ácido acético (adaptado de Reig *et al.*, 2002). Se realizaron cortes transversales de tejidos con Azul de Lactofenol y Fushina básica (González *et al.*, 2011). Las características macroscópicas y microscópicas se compararon con lo descrito para *C. cubensis* por Gryzenhout *et al.* (2004) y Nakabonge (2006) y *C. doradensis* se comparó con lo descrito por Gryzenhout *et al.* (2005). Adicionalmente, se obtuvieron secuencias de los marcadores moleculares ITS4 e ITS5 haciendo uso del servicio de secuenciación y análisis molecular del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia.

Con el objeto de seleccionar dos aislamientos virulentos, se compararon cuatro de los aislamientos obtenidos a partir de cultivos monospóricos y se realizó la inoculación en cien ramas proveniente de diez clones de *E. pellita* de siete años de edad siguiendo la metodología desarrollada por Juárez *et al.* (2013). Se utilizó la como variable respuesta la longitud de la lesión desarrollada a partir del punto de inoculación con *C. cubensis* y los tratamientos estuvieron determinados por el clon y por la cepa de inoculación (cepa 17, 26, 29 ,31 y testigo). Adicionalmente,

se comparó el crecimiento diario del micelio de cada aislamiento en medio de cultivo en las cajas Petri como otro parámetro equivalente a la capacidad de invasión que se utilizó como indicador de virulencia (Díaz y Lecuona, 1995; Ochoa, 2004). Con base en estas pruebas se seleccionaron los aislamientos 17 y 26 (obtenido en *E. pellita*) para realizar el ensayo.



Susceptibilidad de plántulas de *E. pellita* y *E. urophylla* a la inoculación con *C. cubensis* en condiciones de invernadero

Se inocularon plántulas de diez clones de *E. pellita* y uno de *E. urophylla* (Cuadro 1) dispuestas en macetas plásticas de 17 cm de diámetro y mantenidas en un invernadero aislado y construido para este estudio. La segunda especie fue también seleccionada para la inoculación en vivero, dada la resistencia al ataque de *C. cubensis* (Alfenas *et al.*, 1983; Van Heerden y Wingfeld, 2001).

Cuadro 1. Clones de *Eucalyptus pellita* F. Muell. y *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake utilizados para la comparación de susceptibilidad a *Chrysosporthe cubensis* Brunes Gryzenhout & M. J. Wingf.

Clon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	URO 1
------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----------

Número de plántulas	30	30	30	15	11	8	30	30	27	30	18
---------------------	----	----	----	----	----	---	----	----	----	----	----

El ensayo se dispuso en tres bloques completamente al azar determinados por el aislamiento (17 y 26) y el otro bloque para el tratamiento testigo (inoculación de plántulas con medio de cultivo AM al 2 %). Cada bloque a su vez, fue dividido en sub-bloques, los cuales correspondieron al número de repeticiones, de tal forma que en cada sub-bloque se representaran todos los clones evaluados.

A partir de los subcultivos de cada aislamiento del patógeno, se cortaron discos de micelio de 4 mm de diámetro con ayuda de un sacabocado a presión y de agujas estériles. Cada disco se almacenó dentro de pedazos de gasa estéril no adherente de, dentro de cajas Petri estériles, humedecidas con ADE.

Para realizar la inoculación, en principio se realizó una herida en la base del tallo de cada plántula, utilizando un sacabocado de 4 mm de diámetro. Posteriormente se ubicó la sección de gasa húmeda con el disco de micelio, en contacto directo con la herida realizada en el tallo de la plántula y se cubrió con Parafilm.

El desarrollo de la lesión se midió semanalmente por un mes con un calibrador (Mitutoyo, CD 6"CS de precisión de 0.01 mm) para un total de cuatro mediciones. En cada medición se tomó la precaución de utilizar guantes de nitrilo y de sellar nuevamente con Parafilm para evitar la entrada de cualquier tipo de contaminante.

Estimación de prevalencia del cáncer del eucalipto en una plantación de

***E. pellita* de siete años**

Se evaluó la prevalencia de la enfermedad (incidencia y severidad) en un rodal de 570 individuos de siete años de *E. pellita*. La incidencia correspondió al porcentaje de árboles afectados, mientras la severidad se calificó con una escala nominal para estimación de esta condición de *C. cubensis* en plantaciones de *E. pellita* con un total de seis categorías (adaptado de Paredes *et al.*, 2010) (Cuadro 2).

El cálculo de grado medio de daño, incidencia y severidad se hizo de la siguiente manera (Parra *et al.*, 1999):

Grado medio de daño (GMD)

$$GMD = \frac{\sum(N_i * CD_i)}{N}$$

Donde:

$i = 1$ a 6

N_i = Número de árboles en la categoría de daño i

CD_i = Categoría de daño i

N = Total de árboles medidos

Incidencia (INC)

$$INC = \frac{(N^\circ \text{ de árboles afectados} * 100)}{N^\circ \text{ total de plantas}}$$

Intensidad o severidad del daño

$$I = \frac{\sum(N_i * CD_i)}{K * N} * 100$$

Donde:

$i = 1$ a 6

N_i = Número de árboles en la categoría de daño i

CD = Categoría de daño i

N = Total de árboles medidos

K = Categoría mayor



Severidad	0	1	2	3	4	M
Imagen						
Criterios	Sin hinchamiento de la base del árbol ni formación de grietas superficiales en la corteza	Presencia de estructuras del hongo no visibles, solo al revisar. Presencia de pocas fisuras profundas ni presencia de exudados de tono rojizo.	Fisuras más profundas, presencia de exudado de tono rojizo; con hinchamientos no tan pronunciados en la base del árbol.	Fisuras profundas sin desprendimiento de la corteza y con presencia de exudados de tono rojizo.	Fisuras profundas con desprendimiento de corteza y presencia de exudados de tono rojo.	Muerto

Fuente: Paredes *et al.* (2010).

Cuadro 2. Escala para estimación de severidad de *Chrysosporthe cubensis* Brunes Gryzenhout & M. J. Wingf. en plantaciones de *Eucalyptus pellita* F.Muell.



Procesamiento y análisis de datos

Los datos obtenidos de crecimiento diario de micelio de los aislamientos, tamaño de lesión de ramas inoculadas y tamaño de lesión de plántulas inoculadas se organizaron y procesaron con estadística descriptiva, y se evaluaron los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia por medio de las pruebas de Kolmogorov- Smirnov y Levene, previo a la comparación mediante un análisis de varianza (ANOVA) y las prueba pos-hoc de Duncan. Cuando los datos no presentaron distribución normal, se probaron transformaciones por el método de Box Cox, utilizando del programa estadístico SPSS 15.0. En caso contrario se realizó el análisis por medio de estadística no paramétrica. Las variables respuesta evaluadas fueron diámetro de crecimiento de micelio para el caso de la evaluación diaria de aislamientos en laboratorio como factor de virulencia y longitud de la lesión desarrollada partir del punto de inoculación para la inoculación en ramas y plántulas.

Resultados

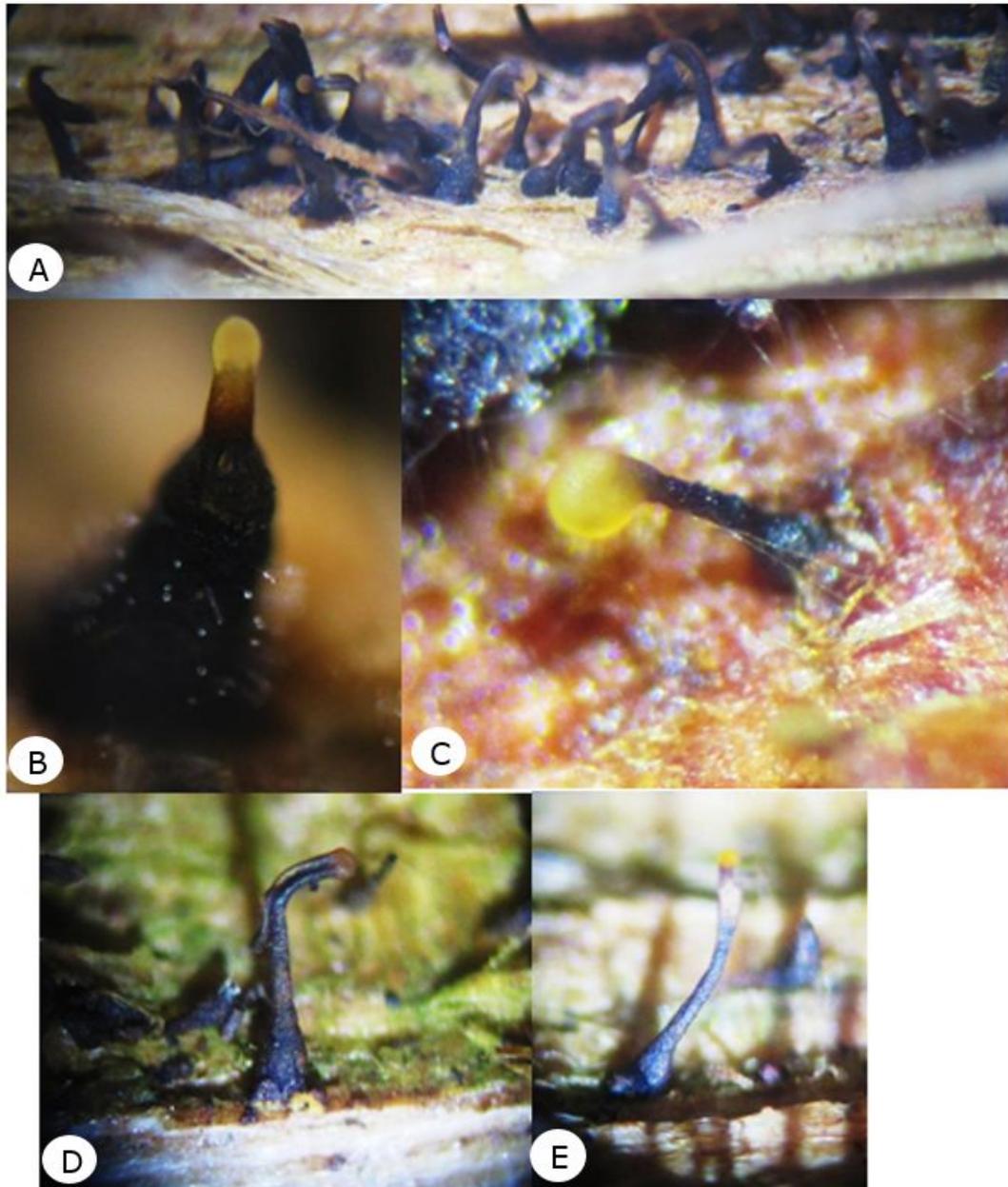
Agente patógeno

Los árboles afectados en campo y de los cuales se tomaron las muestras de material enfermo presentaron síntomas y signos característicos del cáncer causado por *C. cubensis*, tales como hinchamiento y fisuras en el fuste, gomosis de tonalidad rojiza asociados a fisuras sobre la corteza, presencia de picnidios, cuello picnidial prolongado y base globosa con tonalidad rojizo, café y negro. Además, se observó la liberación de conidios en masas mucilaginosas de tonalidad amarilla que se acumulaban sobre el ostiolo, compuestas por conidios (Figura 1). Los conidióforos con bifurcaciones, hialinos con células basales rectangulares y de apariencia globosa (Figura 2B-D). Las conidias son unicelulares, ovals, hialinos no septados, con exudados brillantes (Figura 2C), el tamaño de conidias, conidióforos y picnidios concuerda con lo descrito en la literatura (Cuadro 3). Los aislamientos obtenidos en laboratorio a partir de las muestras de campo produjeron picnidios y conidios, después de aproximadamente 30 días de incubación (a 27 °C).

Cuadro 3. Tamaño de conidias, conidióforos y picnidios de *Chrysosporthe cubensis* Brunes Gryzenhout & M. J. Wingf.

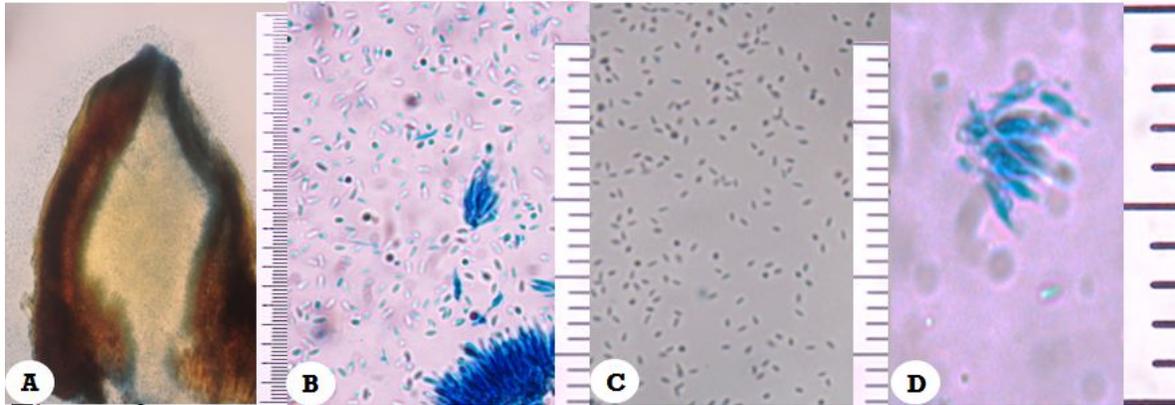
Investigaciones	Conidias (μm)	Conidióforos (μm)	Picnidia	
			Largo (μm)	Diámetro (μm)
Resultados obtenidos	2.987 \pm 0.106	8.74 \pm 0.471	288.86 \pm 141.20	195.09 \pm 83.17
Gryzenhout <i>et al.</i> (2004)	3.5 – 4.5	12-24.5	230	100-950

La identificación mediante extracción de ADN y secuenciación con los marcadores ITS concuerdan en 99.9 % con secuencias publicadas en el *GenBank* como *C. cubensis* para el aislamiento 17 obtenido en *E. urophylla* (Número de acceso JN942342.1) y *C. doradensis* para la cepa 26 (Número de acceso JN942330.1) procedente de *E. pellita*.



A. Agrupación de picnidios sobre madera. B – C. Picnidios sobre corteza con masa de conidios en ostiolo. D-E. Picnidios sobre madera con masa de conidios en ostiolo.

Figura 1. Picnidios de *Chrysoporthe cubensis* Brunes Gryzenhout & M. J. Wingf. con masa de conidios expulsados a través del ostiolo.



- A. Corte transversal de picnidios con presencia de conidios (de tono azul por la tinción con Azul de Lactofenol (10 X); B, D. Conidióforos (40 X, 100 X); C. Conidios de forma ovalada (40 X).

Figura 2. Fotomicrografías de *Chrysosporthe cubensis* Brunes Gryzenhout & M. J. Wingf.

Las colonias de los cuatro aislamientos evaluados (códigos 17, 26, 29 y 31), no se diferenciaron entre sí en cuanto a crecimiento promedio de micelio (Kolmogorov-Smirnov, para K-S de una muestra: 0.365). La cepa 17 presentó el mayor valor promedio de crecimiento diario (0.75 mm día^{-1}), seguida de la cepa 31 (0.74 mm día^{-1}). La cepa 17 exhibió colonias que alcanzaron máximo diámetro de micelio (9 cm) a los 5 días de medición, y para la cepa 31 (9 cm) a los 8 días de medición (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Crecimiento de colonias de *Chrysoporthe* en condiciones de laboratorio

Aislamiento	Especie hospedera	Diámetro (cm)	S
17	<i>Eucayptus urophylla</i>	0.75	2.7
26	<i>Eucayptus pellita</i>	0.62	1.8
29	<i>Eucayptus pellita</i>	0.65	2.3
31	<i>Eucayptus urophylla</i>	0.74	2.7

N = Cinco colonias.

La inoculación de ramas de eucalipto con los aislamientos con *Chrysoporthe* indujo el desarrollo de lesiones típicas (Figura 3) y significativamente mayores en comparación con el testigo (inoculado con AM), (gl = 4, $p > 0.05$, $p = 0.000$). La longitud promedio de las lesiones desarrolladas fue de 63.4 mm mientras en el testigo, de 26.3 mm. No se observó diferencia significativa entre las cepas en el tamaño de la lesión desarrollada ni en el de la lesión inducida en los diferentes clones (cuadro 5).



Figura 3. Lesión producida por *Chrysosporthe cubensis* Brunes Gryzenhout & M. J. Wingf. en ramas de *Eucalyptus pellita* F.Muell. en la segunda semana de inoculación. Necrosis en ramas de *E. pellita* asociada al punto de inoculación de *C. cubensis*.

En el Cuadro 5 se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. El tamaño muestral de la media armónica fue de 20.00.

Cuadro 5. Subconjuntos (1, 2) estadísticamente diferentes de longitud promedio de la lesión causada por cuatro cepas de *Chrysosporthe* sp. en ramas de eucalipto (prueba de Duncan).

Cepa	N	Subconjunto	
		1	2
Testigo	20	26.2995	
29	20		58.2363
31	20		65.0500
17	20		65.3700
26	20		66.5165
Significación	20	1.000	0.321

Duncan. Promedio

Susceptibilidad de plántulas de vivero

Todos los clones evaluados presentaron susceptibilidad a la inoculación con las cepas 17 y 26 de *Chrysosporthe* ($gl = 222$, $p < 0.05$); sin embargo, no se evidenciaron diferencias estadísticas significativas entre los 11 clones ni entre los dos aislamientos de *Chrysosporthe* evaluados (Cuadro 6).

Las plántulas desarrollaron progresiva y rápidamente síntomas avanzados de cáncer. Después de 53 días de inoculación con *Chrysosporthe* presentaron aumento en la longitud de la herida, y formando llagas de mayor tamaño. En las plántulas inoculadas a su vez, se evidenció exudación de tonalidad rojiza de textura viscosa y brillante, lo cual también es característico en árboles de *Eucalyptus* afectados por el hongo; además, estas plántulas formaron llagas adicionales al punto de inoculación, que fueron distribuidas a lo largo del tallo (Figura 4).

Cuadro 6. Longitud (mm) herida en 53 días de inoculación con *Chrysosporthe cubensis* Brunes Gryzenhout & M. J. Wingf.

Clon	Testigo			Cepa 17			Cepa 26		
	Promedio	Máx.	Min.	Promedio	Máx.	Min.	Promedio	Máx.	Min.
2909	8.86	14.84	4.62	15.09	21.59	6.07	18.82	25.46	13.23
5632	7.53	14.00	4.81	15.83	47.78	7.37	18.49	42.60	9.89
4003	7.47	12.99	4.30	19.24	56.76	7.97	25.02	65.86	8.52
5002	15.50	39.07	6.25	23.44	66.48	10.43	14.90	21.76	8.25

2904	8.06	9.82	6.30	15.59	20.54	9.14	12.14	14.04	7.94
5012	6.70	8.22	5.18	19.03	28.91	11.44	24.61	29.78	20.26
0016	7.09	12.68	4.33	18.74	41.62	6.84	14.01	28.05	5.20
1110	6.19	8.61	3.94	18.65	29.73	8.14	19.83	40.43	6.62
5026	7.27	11.09	4.53	22.79	52.88	7.41	19.47	37.48	11.22
5013	10.59	37.26	5.04	19.47	38.35	10.67	22.67	82.10	7.20
URO16	7.89	16.83	4.89	16.26	23.89	9.70	12.21	17.99	9.10



A, B, C, D. Plántulas con presencia de exudados de tonalidad rojiza en el punto de inoculación. E. Meristemos primarios bifurcados o muertos. F. Agallas a lo largo del tallo de la plántula.

Figura 4. Desarrollo de las lesiones ocasionadas por la infección con *Chrysosporthe* en plántulas de *Eucayptus pellita* F.Muell., 53 días después de ser inoculadas.

La enfermedad evolucionó de manera gradual y causó la muerte de varias de las plántulas evaluadas (Cuadro 7). El tratamiento con la cepa 26 presentó el mayor valor de individuos muertos (25). Los clones 5 026 (20 %) y 5 002 (16 %) alcanzaron los mayores porcentajes de mortalidad atribuibles al tratamiento.

Con la cepa 17 se registró un porcentaje de mortalidad de plántulas de 22.2 % que corresponde a 20 del total evaluado (90) en este tratamiento; el clon con mayor número de decesos fue el 5 013 con 30 % de las plántulas en el tratamiento descrito, seguido del 5 632 (20 %). Por último, en el testigo ocurrió la muerte de cinco plántulas en la última medición, que constituye 5.68 %, de las cuales tres eran del clon 1 110 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Mortalidad absoluta y relativa de plántulas de eucalipto inoculadas con *Chrysosporthe* por tratamiento.

	Días después de la inoculación				Total
	7	14	21	53	
Cepa 17	0	3(3.4 %)	3(3.4 %)	14(15.9 %)	20
Cepa 26	0	3(3.3 %)	2(2.2 %)	20(22.2 %)	25
Testigo	0	0	0	5(6.3 %)	5

Prevalencia de *Chrysoporthe* sp. en plantaciones

De todos los clones probados (20), 54 % tuvieron una incidencia de 90 a 100 %. A pesar de los altos valores, 51 % registraron una severidad entre 50 y 60 %, por lo que la enfermedad no estaba en etapas de desarrollo avanzado.

Los 570 árboles evaluados en la plantación de *E. pellita* revelaron un grado medio de daño (GMD), que entre 0.6 y 3.5, es decir, que con afecciones de leves a intermedias. Sin embargo, 51.3 % de los clones tuvieron valores de grado medio de daño de 2.5 a 3.0, que corresponden a fisuras profundas con exudado de tonalidad rojiza, estructuras reproductivas (picnidios) y en algunos casos, hinchamiento en la base del árbol.

En la plantación, los diez clones de *E. pellita* evaluados en invernadero presentaron un grado medio de daño entre 2.47 y 3.33. Exhibieron desprendimiento de corteza y exudaciones rojizas principalmente en los clones 1 110 y 5 026. Por otro lado, la incidencia de *C. cubensis* de estos clones en particular, está dañando entre 80 y 100 % del total de individuos, con severidad de 49 % y 67 %.

Discusión

La sintomatología y los signos del patógeno observados en la plantación de *E. pellita* y las analizadas en condiciones de laboratorio coinciden con lo expuesto en estudios previos para el ataque de *C. cubensis* (Van Heerden y Wingfield, 2001; Gryzenhout *et al.*, 2004; Nakabonge, 2006; FAO, 2008; Paredes *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2010; Juárez *et al.*, 2013).

Las manifestaciones del cáncer observadas en campo son propias de la enfermedad causada por *C. cubensis*. Igualmente, el estudio morfológico macroscópico de los cuerpos fructíferos y el patrón de fructificación, y el estudio microscópico de laboratorio coincidieron con las descripciones de Van Heerden y Wingfield (2001), Gryzenhout *et al.*, (2004) y Nakabonge (2006) para este patógeno.

La sintomatología, signos y características morfológicas de *C. cubensis* y *C. doradensis* son similares y a nivel microscópico solamente son diferenciables por discretas diferencias en la forma de las conidias y coloración de la masa conidial (Gryzenhout *et al.*, 2004; Gryzenhout *et al.*, 2005). Por lo anterior inicialmente se consideró que los dos aislamientos correspondían a dos aislamientos de *C. cubensis*. Sin embargo, con base en la secuencia de ITS fue posible determinar la presencia de *C. doradensis*, la cual se ha registrado también en plantaciones de eucalipto en el Ecuador (Gryzenhout *et al.*, 2005). A pesar de ser una enfermedad de ocurrencia común en eucaliptos, en este trabajo se da a conocer por primera vez a *C. cubensis* y a *C. doradensis* en plantaciones de *E. pellita* en la Orinoquia colombiana.

La virulencia de un patógeno depende en gran medida de la capacidad de invasión y la producción de sustancia tóxicas (Ochoa, 2004); asimismo, el crecimiento micelial permite el desarrollo del hongo ya que por medio de este se absorbe nutrientes, a su vez posibilitan la formación de nuevos micelios (Chávez *et al.*, 2011). En este estudio el tamaño de la colonia como criterio de selección de las cepas más virulentas de *C. cubensis* obtenidas en el laboratorio no resultó fácil de aplicar ya que no se evidenciaron diferencias significativas en el tamaño de la colonia en relación con el tiempo.

Probablemente las cepas de *C. cubensis* obtenidas corresponden a fuentes de inóculo de baja variación genética, toda vez que fueron recolectadas de

hospederos dentro del mismo lote o cercanos; por lo tanto, la respuesta de inoculación de ramas no presentó una diferencia significativa. Es posible que los hospederos de los cuales se obtuvieron los aislamientos hayan sido infectados por un inóculo primario común, es decir, cepas relacionadas genéticamente.

Las plántulas de *E. pellita* y *E. urophylla* estudiadas presentaron susceptibilidad al ataque de los aislamientos de *C. cubensis* y *C. doradensis*, y no se evidenciaron diferencias entre clones ni entre aislamientos del hongo. Resultados similares fueron consignados por Juárez *et al.* (2013) en los que todos los clones de *E. urophylla* y *E. grandis* evaluados fueron atacados por *C. cubensis*, pero no concuerda con otros estudios en los que se cataloga a *E. pellita* como una de las especies del género *Eucalyptus* menos susceptibles a *Chrysosporthe* (Alfenas *et al.*, 1983), ni con otros realizados en *E. urophylla* y *E. grandis* que confirman diferentes niveles de tolerancia entre clones al ataque del hongo y, a su vez, diferentes grados de virulencia entre cepas (Van Heerden y Wingfeld, 2001; Chen *et al.*, 2010; Juárez *et al.*, 2013).

La clonación de genotipos resistentes a *C. cubensis* ha permitido el control del cáncer del eucalipto (Van Heerden y Wingfeld, 2001; da Silva *et al.*, 2010). Si bien, las pruebas de laboratorio e invernadero pueden ser utilizadas como indicadores de susceptibilidad de *E. pellita*, deben interpretarse con precaución, ya que en estudios previos con estados juveniles no necesariamente representa la de plantaciones de mayor desarrollo (Juárez *et al.*, 2013), por lo que se recomienda continuar con evaluación de los clones productivos en diferentes edades de desarrollo. De confirmarse la susceptibilidad observada en plántulas de los clones evaluados, el establecimiento de plantaciones futuras de estos clones puede representar riesgos económicos y ambientales, de acuerdo con los objetivos de superficie plantada en la Orinoquia con *E. pellita* (Mizerit *et al.*, 2013).

Es importante destacar que la zona de estudio reúne las condiciones climáticas apropiadas para el desarrollo del cancro del eucalipto causado por *C. cubensis* y *C. dorandensis* como temperaturas y precipitaciones altas. Por lo tanto, es recomendable continuar con investigaciones direccionadas a establecer con más detalle el comportamiento del hongo en sus hospederos y de allí establecer cuáles de ellos son los óptimos para realizar una plantación forestal de *E. pellita* (da Silva *et al.*, 2010). A pesar de encontrar *Chrysosporthe cubensis* en las plantaciones de eucaliptos en Villanueva, no se evidenció la presencia de la enfermedad en la vegetación nativa asociada a las plantaciones.



Conclusiones

Las plántulas de los clones de *E. pellita* y *E. urograndis* evaluados presentaron respuesta similar a la inoculación con *C. cubensis* y *C. doradensis* en condiciones de invernadero. Las pruebas de laboratorio e invernadero deben interpretarse con precaución por lo que la recomendación es continuar con la evaluación de los clones productivos en diferentes edades.

La susceptibilidad observada en los clones evaluados podría representar riesgos para el establecimiento de plantaciones futuras en la región en donde

naturalmente existen, tanto el inóculo como las condiciones climáticas apropiadas para el desarrollo de la enfermedad, es decir temperaturas y precipitaciones altas, durante largos periodos.

Agradecimientos

La Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal – CONIF financió el presente estudio a través del convenio Colciencias - Reforestadora de la Costa - Refocosta S. A. S. – CONIF dentro del proyecto “Consolidación de la estrategia de mejoramiento genético de la especie *Eucalyptus pellita* F.Muell., para el establecimiento de una fuente de suministro de material clonal de alta calidad en la región de la Orinoquia colombiana” ejecutado bajo la convocatoria Cierre de Brechas # 586 de 2012 de Colciencias. La empresa Refocosta facilitó el acceso a material vegetal, plantaciones e instalación y facilitó el apoyo logístico y la Ingeniera Mónica Sarmiento apoyó la planeación y desarrollo del trabajo de campo. La Universidad Distrital Francisco José de Caldas, facilitó el uso de los equipos y espacios físicos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución por autor

Olga Patricia Pinzón Florián: elaboración de la propuesta, apoyo en trabajo de laboratorio, análisis de datos, escritura del manuscrito final; Anagibeth Chocontá López: muestreos y mediciones en campo, aislamiento, caracterización y mantenimiento de cepas en laboratorio, análisis de resultados, escritura de documento base de trabajo; Víctor Manuel Nieto Rodríguez: desarrollo y dirección de la macropropuesta, selección y producción de clones a ser evaluados, financiador de asesoría estadística, logística y materiales, observaciones al documento de resultados, y manuscrito

Referencias

- Alfenas, A., R. Jeng and M. Hubbes. 1983. Virulence of *Cryphonectria cubensis* on *Eucalyptus* species differing in resistance. *European Journal of Plant Pathology* 13:197-205.
- Bernal L., I., C. Juárez P. J., R. Santos G., L. Vázquez S., H. A. Zavaleta M., H. S. Azpiroz R., C. Parraguirre L. y Ma. P. de la Garza L. de L. 2009. Identificación del agente patógeno del cancro del eucalipto en plantaciones del sureste de México. *Revista Ciencia Forestal en México* 34 (105): 17-36.
- Borrvalho, N. y M. Nieto. 2012. *Eucalyptus* para la Orinoquia: retos y oportunidades. *El mueble y la madera* 75: 26-33.
- Chávez, K., S. Rodríguez, J. Cervantes y J. Barranco. 2011. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente* 11(22):143-160.
- Chen, S., M. Gryzenhout, J. Roux, Y. Xie, M. Wingfield and X. Zhou. 2010. Identification and Pathogenicity of *Chrysosporthe cubensis* on *Eucalyptus* and *Syzygium* spp. in South China. *The American Phytopathological Society* 94 (9): 1146-1150.

da Silva G., L., M. de Resende, D. Lau, L. Rosse, A Alves and A. Alfenas. 2010. Genetic control of *Eucalyptus urophylla* and *E. grandis* resistance to canker caused by *Chrysosporthe cubensis*. *Genetics and Molecular Biology* 33(3): 525-531.

Díaz, B. y R. Lecuona. 1995. Evaluación de cepas nativas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill.) (Deuteromicotina) como base para la selección de bioinsecticidas contra el barrenador *Diatraea saccharalis* (F.). *Revista Agriscientia* 12: 33-38.

Drumond, M., S.Á. Iêdo B., M. C. Oliveira y E. M. Leite. 2001. Selección de especies y procedencias del género *Eucalyptus* para la región costera de Bahía, Brasil. *In: Proceedings of IUFRO International Symposium. 3 -15 September. Valdivia, Chile. CD-ROM.*

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2008. Forest pest species profile, *Chrysosporthe cubensis* (Bruner) Gryzenhout & M. J. Wingfield. <http://www.fao.org/forestry/13579-02412a08b7a10ee4b3bfc2aa0f8754d82.pdf> (24 de julio de 2013).

González, M., D. Diamont y B. Gutiérrez. 2011. Técnica de tinción de estructuras fúngicas con colorantes vegetales como una alternativa no contaminante. *Revista Biagro* 23(1): 65-68.

Gryzenhout, M., H. Myburg, A. Van der Merwe, B. Wingfield and M. Wingfield. 2004. *Chrysosporthe*, a new genus to accommodate *Cryphonectria cubensis*. *Studies in Mycology* 50: 119-142.

Gryzenhout, M., H. Myburg, B. Wingfield, F. Montenegro and M. Wingfield. 2005. *Chrysosporthe doradensis* sp. nov. pathogenic. *Fungal Diversity* 20: 39-57.

Juárez P., J. C., J. A. Honorato S., L. Vázquez S y J. F. Conrado P. L. 2013. Patogenicidad de *Chrysosporthe cubensis* en clones de *Eucalyptus grandis* y *E.*

urophylla en el sureste de México. Revista Madera y Bosques 19(1): 17-31.

Mizerit T., L. H. 2009. Estudio comparativo en dos áreas semilleras establecidas en plantaciones de *Eucalyptus urophylla* en Oaxaca. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Montecillo, Edo. de Méx. pp. 53-70.

Mizerit T., L. H., J. Jasso M., J. López Upton, D. Alvarado R. y A. M. Fierros G. 2013. Impacto de *Chrysosporthe cubensis* (Bruner) Gryzenhout & M. J. Wingfield en dos áreas semilleras de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake en Santiago Yaveo, Oaxaca. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 4(16): 64-75.

Nakabonge, G. 2006. A study of *Chrysosporthe* and *Cryphonectria* species on Myrtales in Southern and Eastern Africa. Doctoral dissertation. University of Pretoria. Pretoria, South Africa. 158 p.

Nieto, V. y G. Gasca. 2010. Experiencias y avances en el manejo de *Eucalyptus pellita* F. Mell. en la Orinoquia Colombiana. CONIF, Ministerio de Agricultura, Refocosta S.A. Bogotá, Colombia. 98 p.

Ochoa A., N. A. 2004. Evaluación de los factores de virulencia de hongos infecciosos en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de Maestría en Manejo de Recursos Marinos. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. La Paz, BCS., México. 85 p.

Paredes D., E., J. Jasso M., J. López U. y D. Alvarado R. 2010. *Chrysosporthe cubensis* (Bruner) Gryzenhout & M. J. Wingf. en plantaciones de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden en Oaxaca. Revista Mexicana de Ciencia Forestales 1(2): 17-36.

Parra, P., J., Valencia y M. González. 1999. Manual de detección y evaluación sanitaria en eucalipto. INFOR. Santiago de Chile, Chile. Manual 24. 124 p.

Reforestadora de la Costa. 2009. Programa generación de una estrategia de manejo tecnológico para *Eucalyptus pellita* F. Muell., una especie de rápido

crecimiento. CONIF, Ministerio de Agricultura, Refocosta S.A. Bogotá, Colombia. 2 p.

Reig, J., F. García, A. Ibars y E. Estrelles. 2002. Aproximación al estudio anatomo-histológico y de la micorriza de *Ophioglossum lusitanicum* L. Butil. Sociedad Micológica de Madrid 7: 55-197.

Rodas, C. A., M. Gryzenhout, H. Myburg, B. Wingfield and M. Wingfield. 2005. Discovery of the *Eucalyptus* canker pathogen *Chrysosporthe cubensis* on native Miconia (Melastomataceae) in Colombia. Plant Pathology 54 (4): 460-470.

Souza, H. G. 2008. Resistencia do Eucalipto ao cancro de *Chrysosporthe cubensis* e *Botryosphaeria* sp. Dissertação (mestrado) em Agronomia (Proteção de Plantas). Faculdade de Ciências Agronômicas. Câmpus de Botucatu. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". Botucatu, São Paulo, Brasil. 109 p.

Van Heerden, S. W. and M. J. Wingfeld. 2001. Genetic diversity of *Cryphonectria cubensis* isolates in South Africa. Mycology Research 105(1): 94-99.