



Universidad de Valladolid

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL
Y RECURSOS FORESTALES

TESIS DOCTORAL

**IMPACTO DE MYCOSPHAERELLA EN URUGUAY Y VARIABILIDAD
GENÉTICA PARA RESISTENCIA A LA ENFERMEDAD EN
Eucalyptus globulus Y *Eucalyptus maidenii***

Presentada por Gustavo Balmelli Hernández para optar al grado de doctor por
la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dr. Julio Javier Diez Casero

Página de Contenido

Resumen	3
Lista de artículos originales	5
Introducción	6
Objetivos	14
Materiales y Métodos	15
Resultados	18
Discusión	22
Conclusiones	31
Referencias	33
Artículos originales	46
• Artículo I	47
• Artículo II	70
• Artículo III	96
• Artículo IV	120

Resumen

Balmelli, G. 2014. Impacto de *Mycosphaerella* en Uruguay y variabilidad genética para resistencia a la enfermedad en *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus maidenii*.

La madera de *Eucalyptus globulus* tiene un alto valor y gran demanda en el mercado internacional. En Uruguay esta especie es la más utilizada comercialmente, mientras que *E. maidenii* se utiliza como especie alternativa por su mejor sanidad. Desde hace algunos años las plantaciones jóvenes de ambas especies están siendo severamente afectadas por la enfermedad conocida como Mancha Foliar por *Mycosphaerella* (o MLD por sus siglas en Inglés). La defoliación provocada por esta enfermedad, causada principalmente por *Teratosphaeria nubilosa*, constituye la principal limitante productiva para ambas especies de eucaliptos en Uruguay. Por tal motivo, los objetivos de esta tesis se orientan a determinar las pérdidas productivas ocasionadas por MLD y a conocer las posibilidades de selección de genotipos resistentes a la enfermedad. El trabajo se basa en la evaluación de dos pruebas de progenies de *Eucalyptus globulus* y *E. maidenii* que fueron infectadas naturalmente por MLD. Se ha determinado en esta tesis que en condiciones intensivas de producción, *E. globulus* puede tolerar una defoliación por MLD de hasta el 40%, pero que defoliaciones más severas y/o repetidas en etapas tempranas del cultivo pueden ocasionar una significativa reducción del crecimiento y de la supervivencia, limitando por tanto la productividad de las plantaciones afectadas. La defoliación provocada por *T. nubilosa* generó pérdidas de crecimiento al año de iniciada la epidemia de hasta 44% en *E. globulus* y de hasta 32% en *E. maidenii*. Si bien se demostró que el follaje juvenil de *E. globulus* es más susceptible que el de *E. maidenii*, el cambio a follaje adulto comienza más temprano en *E. globulus*, por lo cual el período de susceptibilidad a la enfermedad es más corto en esta especie. De hecho, en *E. globulus* el cambio precoz de follaje redujo la severidad de la enfermedad, lo que mejoró el crecimiento y la supervivencia posterior. Por otro lado, el análisis de la variabilidad genética permitió determinar que en *E. globulus* existe variación, tanto para resistencia del follaje juvenil como para precocidad en el cambio de follaje, a varios niveles: entre fuentes de semilla, entre procedencias y entre familias. En las condiciones actuales, donde ocurren infecciones repetidas de *T. nubilosa*, el control genético de la resistencia del follaje juvenil de *E. globulus* es bajo (heredabilidad de 0.24) y el del inicio del cambio de follaje es alto (heredabilidad de 0.64). Estos resultados sugieren que si bien es posible seleccionar por resistencia en el follaje juvenil, para obtener genotipos de *E. globulus* de buen comportamiento frente a *T. nubilosa* es más eficiente la selección por precocidad en el cambio de follaje. En el caso de *E. maidenii*, la escasa variabilidad genética para resistencia del follaje juvenil y el tardío cambio de follaje determinan que las posibilidades de selección sean más limitadas que para *E. globulus*. Esta tesis constituye el primer estudio fuera de Australia, particularmente bajo las condiciones intensivas de producción utilizadas en Uruguay, del impacto de MLD en eucaliptos. También se analiza por primera vez el efecto que tiene el cambio de follaje sobre el crecimiento y la supervivencia luego de una infección severa de la enfermedad. A su vez, y dada la escasa utilización de *E.*

maidenii a nivel mundial, la presente tesis constituye el primer trabajo en que se analizan tanto los impactos de MLD como la variabilidad genética de la resistencia a la enfermedad en esta especie de eucalipto.

Palabras clave: defoliación, cambio de follaje, *Teratosphaeria nubilosa*, heredabilidad, correlaciones genéticas, pérdidas productivas.

Lista de artículos originales

La tesis está basada en los siguientes artículos, los cuales en el texto serán referidos por su correspondiente numeral romano (I-IV).

- I. Balmelli, G.; Simeto, S.; Altier, N.; Marroni, V.; Diez, J.J. 2013. Long term losses caused by foliar diseases on growth and survival of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *New Forests* 44: 249-263.

- II. Balmelli, G.; Simeto, S.; Marroni, V.; Altier, N.; Diez, J.J. 2014. Genetic variation for resistance to *Mycosphaerella* leaf disease and Eucalyptus rust on *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 43: 97-107.

- III. Balmelli, G.; Simeto, S.; Torres, D.; Castillo, A.; Altier, N.; Diez, J.J. 2014. Susceptibility to *Teratosphaeria nubilosa* and precocity of vegetative phase change in *Eucalyptus globulus* and *E. maidenii* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* 61: 583-591.

- IV. Balmelli, G.; Simeto, S.; Torres, D.; Castillo, A.; Altier, N.; Núñez, P.; Rodríguez, F.; González, W.; Pérez, G.; Diez, J.J. Efecto de *Teratosphaeria nubilosa* sobre el crecimiento de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus maidenii*. Manuscrito.

Introducción

El sector forestal en el Uruguay

Uruguay ha sido históricamente un país agrícola-ganadero, con menos de un 5% de su superficie cubierta por bosque nativo. En las últimas décadas, y a partir de la promulgación en 1987 de una ley tendiente a promover la actividad forestal (Ley Forestal N° 15939), el Uruguay experimentó una explosiva expansión del área forestada con fines comerciales (MGAP 2013). Las plantaciones forestales pasaron de 45.000 hectáreas en 1990 a 990.000 hectáreas en 2012, con aproximadamente 240.000 hectáreas de pinos y 750.000 hectáreas de eucaliptos (MGAP 2013) (Figura 1). El rubro forestal se ha orientado principalmente a la producción de madera para pulpa de celulosa y de madera para aserrío y debobinado, siendo *Eucalyptus globulus*, *E. grandis* y *Pinus taeda* las especies más utilizadas. La expansión de la forestación comercial resultó en un marcado incremento de las exportaciones de productos forestales, las cuales a partir del 2008 posicionan al sector forestal como el tercer rubro exportador, detrás de los granos y la carne (SPF 2011). En el año 2010 las exportaciones del sector forestal, incluyendo celulosa, alcanzaron los 1.081 millones de dólares, representando el 15% del total de las exportaciones del país (DIEA 2011).

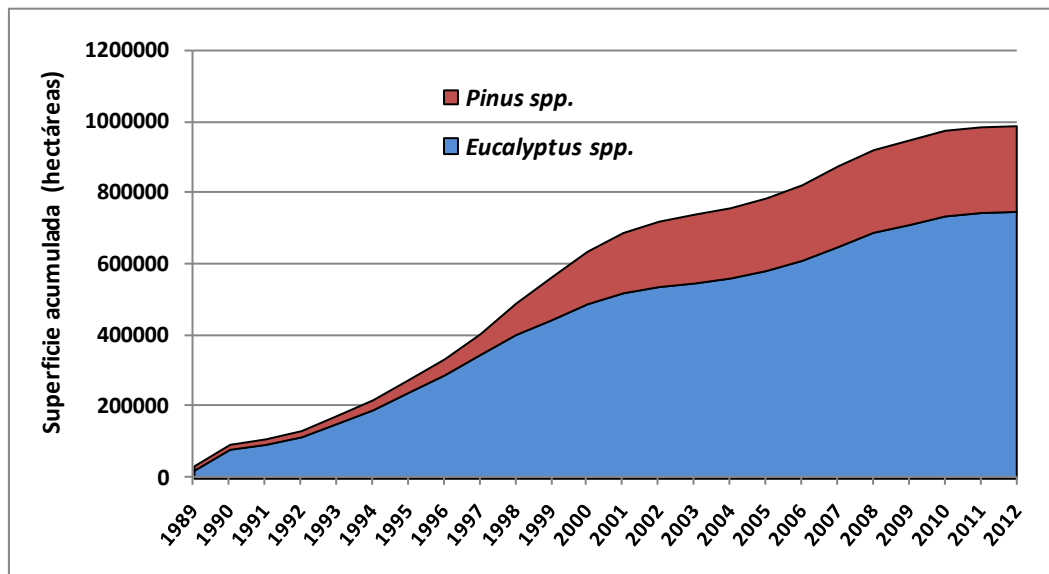


Figura 1. Superficie plantada con especies forestales en Uruguay a partir de la promulgación de Ley Forestal 15939. Fuente: Dirección General Forestal, MGAP.

Las plantaciones de eucaliptos en Uruguay estuvieron durante la década de 1990 relativamente libres de problemas sanitarios, lo cual se explica por el hecho de ser especies exóticas y por lo tanto de crecer aisladas de sus enemigos naturales (Wingfield *et al.* 2008; Paine *et al.* 2011). Sin embargo, el incremento del área forestada trajo aparejado un aumento en la concentración de inóculo de diversas enfermedades y en la densidad poblacional de diferentes plagas. A su vez, la introducción de germoplasma desde varias partes del mundo generó un incremento en el ingreso accidental de plagas y enfermedades forestales al país (Pérez 2012). Este hecho se vio acelerado a partir del año 2000, habiéndose reportado desde entonces la presencia en plantaciones de eucaliptos en Uruguay de los siguientes insectos: *Costalimaita ferruginea*, *Glycaspis brimblecombei*, *Leptocybe invasa*, *Thaumastocoris peregrinus* (Martínez 2010; Martínez y Bianchi 2010; Bollazzi 2011, 2013) y de los siguientes patógenos: *Ceratocystis fimbriata*, *Erwinia psidii*, *Inocutis jamaicensis*, *Mycosphaerella aurantia*, *M. heimii*, *M. lateralis*, *M. marksii*, *M. scytalidii*, *M. walkeri*, *Pseudocercospora norchiensis*, *Puccinia psidii*, *Teratosphaeria gauchensis*, *T. molleriana*, *T. nubilosa*, *T. ohnowa*, *T. pluritubularis*, *T. suberosa*, *T. pseudoeucalypti* (Wingfield 2000; Barnes *et al.* 2003; Telechea *et al.* 2003; Martínez 2005; Cortinas *et al.* 2006; Crous *et al.* 2006; Pérez *et al.* 2009a, 2009b; Coutinho *et al.* 2011; Simeto *et al.* 2013).

La forestación con *Eucalyptus globulus* y *E. maidenii*

La excelente calidad de la madera de *Eucalyptus globulus* para la producción de pulpa de celulosa y papel (alta densidad, bajo contenido de extractivos y alto rendimiento de celulosa) determina que sea una de las especies de mayor demanda en el mercado internacional (Tibbits *et al.* 1997; Villena 2003). El valor de su madera y su velocidad de crecimiento impulsaron fuertemente la plantación de *E. globulus* en Uruguay, siendo actualmente la especie forestal con mayor superficie plantada en el país. El *E. maidenii*, especie muy emparentada a *E. globulus*, ha sido utilizada frecuentemente como especie alternativa debido a su mayor resistencia al frío y mejor sanidad. Entre ambas especies ocupan un área superior a las 350.000 mil hectáreas (MGAP 2013).

Durante la década de 1990 se registraron importantes tasas de plantación anual con *E. globulus* y *E. maidenii* en todas las zonas de prioridad forestal. Sin embargo, su falta de adaptación a zonas sin influencia marítima y su alta susceptibilidad a enfermedades y plagas, determinaron que las plantaciones establecidas en el Norte, Oeste y Centro del país tuviesen una productividad muy por debajo de lo esperado (Balmelli y Resquín

2002). Por tal motivo, desde comienzos de la década de 2000 la plantación de *E. globulus* y *E. maidenii* se fue desplazando hacia la región Sureste del país. En el caso de *E. globulus* se generalizó la utilización de semilla de origen Jeeralang (Australia), reconocida por su buen comportamiento sanitario (Resquín y Balmelli 1999, 2005; Balmelli 2002), y algunas empresas comenzaron a utilizar clones.

Si bien inicialmente ambas medidas demostraron ser exitosas, permitiendo mejorar la sanidad y productividad de las plantaciones, en los últimos años la enfermedad conocida como Mancha Foliar por *Mycosphaerella* (o MLD por sus siglas en Inglés) ha venido afectando seriamente a la totalidad de las plantaciones jóvenes de *E. maidenii* y *E. globulus*, incluidas las establecidas con el origen Jeeralang y las plantaciones clonales (Balmelli *et al.* 2009a, 2009b; Simeto *et al.* 2010; Pérez *et al.* 2013) (Figura 2). La magnitud del problema en *E. globulus*, que en ocasiones llega a provocar pérdidas de área foliar superiores al 80% (Balmelli *et al.* 2011; Pérez *et al.* 2013), ha provocado en los últimos años la sustitución de esta especie por otras más resistentes, como *E. dunnii* y *E. grandis*. De hecho, el área plantada anualmente con *E. globulus* ha sufrido una drástica reducción, pasando de 11600 hectáreas en 2006 a 706 hectáreas en 2011 (MGAP 2013).



Figura 2. Plantaciones de *Eucalyptus globulus* afectadas por MLD: defoliación severa en plantación clonal de un año (izquierda) y productividad comprometida en plantación seminal de dos años (derecha).

***Teratosphaeria nubilosa*, patógeno forestal más importante en Uruguay**

Más de 150 especies de *Mycosphaerellaceae* y *Teratosphaeriaceae* han sido identificadas causando enfermedades en eucaliptos (Burgess *et al.* 2007; Crous *et al.* 2007; Andjic *et al.* 2010; Carnegie *et al.* 2011; Hunter *et al.* 2011), la mayor parte de las

cuales provocan manchas foliares. Como se mencionó anteriormente, varios patógenos que causan MLD (*M. aurantia*, *M. heimii*, *M. lateralis*, *M. marksii*, *M. scytalidii*, *M. walkeri*, *T. molleriana*, *T. nubilosa*, *T. ohnowa*, *T. pluritubularis*, *T. pseudoeucalypti*, *T. suberosa*) han sido identificados en plantaciones de eucaliptos en Uruguay. Aunque la mayoría de dichos patógenos son patógenos secundarios, colonizando tejidos necróticos o senescentes (Crous 1998; Crous *et al.* 2006), *T. nubilosa* es un patógeno primario, siendo considerada como una de las especies de MLD más destructivas a nivel mundial (Mohammed *et al.* 2003; Hunter *et al.* 2009). Se encuentra presente en bosques nativos y en plantaciones de *Eucalyptus* en la mayor parte de Australia (Dungey *et al.* 1997; Milgate *et al.* 2001; Carnegie 2007; Barber *et al.* 2008; Jackson *et al.* 2008; Pérez *et al.* 2012), así como en plantaciones de *Eucalyptus* en Sudáfrica (Crous y Wingfield 1996; Hunter *et al.* 2004); Kenia, Tanzania, Zambia (Hunter *et al.* 2008), Etiopía (Gezahgne *et al.* 2006), Nueva Zelanda (Mohammed *et al.* 2003), España (Crous *et al.* 2004), Portugal (Crous *et al.* 2006), Uruguay y Brasil (Pérez *et al.* 2009b, 2009c).

Teratosphaeria nubilosa ha sido reportada en numerosas especies de eucalipto, como *E. bicostata*, *E. botryoides*, *E. bridgesiana*, *E. camaldulensis*, *E. cypellocarpa*, *E. darlympleana*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis*, *E. gunnii*, *E. macarthurii*, *E. maidenii*, *E. nitens*, *E. quadrangulata*, *E. saligna*, *E. smithii*, *E. tereticornis* y *E. viminalis* (Hunter *et al.* 2009, 2011). Sin embargo, es en plantaciones comerciales de *E. globulus* en varios países donde ha causado los mayores daños (Hunter *et al.* 2009), llevando al abandono de esta especie en Sudáfrica (Lundquist y Purnell 1987) y en zonas de alto riesgo de la enfermedad en Tasmania, Australia (Mohammed *et al.* 2003). Aunque *T. nubilosa* puede encontrarse en hojas adultas de *E. globulus* (Kularatne *et al.* 2004; Pérez *et al.* 2009c), principalmente afecta el follaje juvenil y el follaje intermedio, causando manchas necróticas, defoliación prematura y, en infecciones severas, muerte de ápices y ramas (Crous 1998; Park *et al.* 2000; Carnegie y Ades 2002) (Figura 3).

Teratosphaeria nubilosa fue identificada por primera vez en Uruguay en 2007 en plantaciones de *E. globulus* (Pérez *et al.* 2009b). El hecho de que se encontró un único haplotipo, y que el mismo es el único existente en España y Portugal, hace suponer que la introducción de este patógeno al país haya ocurrido desde la Península Ibérica, probablemente en material de propagación de *E. globulus* (Pérez *et al.* 2009b). Relevamientos sanitarios sistemáticos realizados en plantaciones comerciales de eucaliptos demostraron que *T. nubilosa* se dispersó rápidamente a todo el país, constituyendo actualmente el principal problema sanitario para el sector forestal

uruguayo (Balmelli *et al.* 2009a, 2009b). En plantaciones de *E. globulus*, relevadas a los 6, 12 y 24 meses de edad, se registraron pérdidas promedio de área foliar de 12%, 46% y 76%, respectivamente (Balmelli *et al.* 2009b; Simeto *et al.* 2010; Pérez *et al.* 2013). La frecuencia y gran severidad de los daños provocados por *T. nubilosa* en Uruguay son consecuencia de la alta susceptibilidad del follaje juvenil de *E. globulus* y *E. maidenii* (Carnegie *et al.* 1994, 1998), del gran volumen de inóculo producido por el patógeno (Park 1988a) y de que las condiciones ambientales predisponentes (varios días de lluvia y/o alta humedad relativa y temperaturas de 10-15°C, Park 1988b) son frecuentes en el país (Balmelli *et al.* 2013).



Figura 3. Manchas necróticas de *Teratosphaeria nubilosa* en hojas nuevas (izquierda) y defoliación severa con muerte de ramas en plantación de *Eucalyptus globulus* (derecha).

Impacto de las manchas foliares por MLD

Las manchas foliares y la defoliación provocadas por MLD en eucaliptos reducen el área fotosintéticamente activa, lo cual afecta negativamente el crecimiento, y pueden conducir a la malformación del árbol, resultando en pérdidas de productividad en las plantaciones afectadas (Lundquist y Purnell 1987; Carnegie *et al.* 1998; Mohammed *et al.* 2003; Milgate *et al.* 2005; Hunter *et al.* 2009). A su vez, el estrés ocasionado por la enfermedad predispone al árbol a otros patógenos, al ataque de insectos y/o a factores abióticos adversos (Carnegie *et al.* 1994). Diversos estudios han demostrado que el umbral de daño foliar que provoca pérdidas de crecimiento en eucaliptos y la magnitud de las pérdidas, dependen de la severidad, del patrón, del momento y de la frecuencia de los daños sufridos por los árboles (Candy *et al.* 1992; Abbott *et al.* 1993; Stone *et al.*

1998; Collett y Neumann 2002; Wills *et al.* 2004; Pinkard *et al.* 2006b). El efecto del daño sobre el crecimiento también depende de la capacidad de recuperación del árbol, lo cual a su vez está influenciado por la edad, el estado nutricional, la calidad del sitio y la ocurrencia de estreses abióticos, como sequía o temperaturas extremas (Pinkard y Beadle 1998a; Carnegie y Ades 2001; Smith 2006).

Existen evidencias de que los eucaliptos toleran eventos aislados de defoliación sin que se vea afectado el crecimiento. Por ejemplo defoliaciones de 25% en *E. nitens* de 3 años (Lundquist y Purnell 1987), 40% en *E. globulus* de un año (Eyles *et al.* 2009a), 49% en *E. regnans* de 3 años (Candy *et al.* 1992) o 50% en *E. nitens* de 2 años (Rapley *et al.* 2009), no redujeron significativamente el crecimiento. Sin embargo, Pinkard *et al.* (2006a) reportan que un 10% de daño foliar es suficiente para causar pérdidas de crecimiento en *E. globulus*, mientras que Carnegie y Ades (2003), Milgate *et al.* (2005) y Smith (2006) registraron, para daños foliares del 20%, reducciones del crecimiento de entre 4% y 17%. De acuerdo a Smith (2006), en *E. globulus* los daños foliares menores al 80% provocan una pérdida inicial en el crecimiento, retomándose posteriormente el crecimiento normal, mientras que daños mayores al 80% provocan una reducción permanente del crecimiento. Defoliaciones muy severas y/o repetidas en el tiempo pueden provocar mortalidad. Wilkinson y Neilsen (1995) registraron reducciones significativas en la supervivencia de *E. nitens* y *E. regnans* menores a un año cuando la defoliación fue superior a 50% y Candy *et al.* (1992) en *E. regnans* de 3 años con defoliaciones del 100% durante 2 años consecutivos.

Alternativas de manejo de enfermedades foliares en eucaliptos

Se han propuesto diferentes medidas de manejo tendientes a minimizar los efectos de las enfermedades foliares en plantaciones de eucaliptos, por ejemplo la elección del sitio (es decir, evitar plantar en sitios de alto riesgo de infección) (Carnegie 2007), el incremento del vigor y la tolerancia de los árboles mediante una silvicultura intensiva o mediante la aplicación de activadores de las defensas de la planta (Stone 2001; Mohammed *et al.* 2003), la aplicación de fungicidas (Carnegie y Ades 2003; Alonso *et al.* 2013) y la re-fertilización para acelerar la recuperación de los árboles afectados (Wardlaw *et al.* 2005; Pinkard *et al.* 2006a, 2006b, 2007; Carnegie 2007). Sin embargo, dichas alternativas presentan importantes limitaciones, tanto económicas como ambientales y operacionales, y hasta el momento no han demostrado ser eficientes en el control de MLD en plantaciones a escala comercial.

Por tales motivos, existe consenso a nivel internacional en cuanto a que la forma más efectiva para reducir el daño de enfermedades foliares en eucaliptos es la utilización de especies y/o materiales de propagación resistentes (Carnegie *et al.* 1994; Dungey *et al.* 1997; Tibbits *et al.* 1997; Alfenas *et al.* 2004; Milgate *et al.* 2005; Hunter *et al.* 2009). En el caso de especies de eucalipto con follaje marcadamente heteroblástico, como *E. globulus* y *E. maidenii* cuyas hojas juveniles y adultas presentan características morfológicas y anatómicas muy diferentes (James y Bell 2001), y dado que el follaje adulto es resistente a la mayoría de los patógenos (Park *et al.* 2000), la utilización de materiales de propagación que inicien precozmente el cambio de follaje ha sido sugerida como otra alternativa para reducir el daño de enfermedades foliares (Milgate *et al.* 2005). El éxito de esta estrategia estará determinado por la posibilidad de obtener materiales de propagación resistentes o con cambio precoz de follaje, lo cual en última instancia dependerá de la variación genética existente para estas características.

Variabilidad genética para resistencia a enfermedades foliares

Numerosos trabajos han estudiado la variabilidad genética en eucaliptos para resistencia a patógenos foliares, por ejemplo para *Aulographina eucalypti* (Carnegie y Keane 2003; Carnegie *et al.* 2004), *Puccinia psidii* (Dianese *et al.* 1984; Carvalho *et al.* 1998; Zauza *et al.* 2010); *Quambalaria pitereka* (Dickinson *et al.* 2004; Johnson *et al.* 2009). Se ha reportado variabilidad genética para resistencia a MLD, tanto a nivel de especies como de procedencias y familias (Wilcox 1982; Carnegie *et al.* 1994, 1998; Dungey *et al.* 1997; Hood *et al.* 2002; Carnegie y Ades 2005).

Ensayos de evaluación de especies han demostrado que *E. globulus* es una de las especies más susceptibles a MLD (Carnegie *et al.* 1994; Hood *et al.* 2002). Dentro de esta especie se han reportado diferencias entre procedencias para resistencia a MLD (Reinoso 1992; Carnegie *et al.* 1994; Dungey *et al.* 1997; Hood *et al.* 2002; Carnegie y Ades 2005), siendo las procedencias de Tasmania generalmente más susceptibles que las procedencias de Victoria (Hamilton *et al.* 2013).

En varios trabajos se ha reportado variación genética a nivel de familias para susceptibilidad a MLD en *E. globulus* (Carnegie y Ades 2005; Milgate *et al.* 2005; Tejedor 2007; Hamilton *et al.* 2013). La resistencia del follaje juvenil presenta un moderado control genético, aunque los valores de heredabilidad reportados en la bibliografía son bastante heterogéneos, variando entre 0.12 y 0.60 (Reinoso 1992; Dungey *et al.* 1997; Carnegie y Ades 2005; Milgate *et al.* 2005; Hamilton *et al.* 2013).

En *E. globulus* también se ha reportado variabilidad genética para el momento en que ocurre el cambio de follaje de juvenil a adulto, presentando las procedencias de Victoria mayor precocidad en dicho cambio que las procedencias de Tasmania (Hamilton *et al.* 2011). El inicio del cambio de follaje en *E. globulus* presenta heredabilidades que varían entre 0.30 y 0.74 (Reinoso 1992; Ipinza *et al.* 1994; Jordan *et al.* 1999; López *et al.* 2002).

Objetivos

La defoliación causada por MLD constituye la principal limitante para el cultivo de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus maidenii* en Uruguay. Por tal motivo, los objetivos generales de esta tesis fueron analizar las pérdidas ocasionadas por MLD, especialmente las provocadas por *Teratosphaeria nubilosa*, y conocer las posibilidades de selección de genotipos resistentes en dichas especies de eucaliptos.

Los objetivos específicos fueron:

1. Establecer el umbral de daño y cuantificar las pérdidas productivas a largo plazo provocadas por MLD en *E. globulus* (I).
2. Conocer el comportamiento de diferentes fuentes de semilla de *E. globulus* en condiciones de infección de MLD (II).
3. Cuantificar el grado de control genético de la resistencia del follaje juvenil a MLD y de la precocidad del cambio de follaje en *E. globulus* (II).
4. Estimar las ganancias genéticas esperadas mediante selección por resistencia a MLD en *E. globulus* (II).
5. Determinar la susceptibilidad de *E. globulus* y *E. maidenii* frente a *T. nubilosa* (III y IV).
6. Cuantificar los efectos del daño provocado por *T. nubilosa* y del cambio de follaje sobre el crecimiento y la supervivencia de *E. globulus* y *E. maidenii* (IV).
7. Cuantificar el grado de control genético de la resistencia a *T. nubilosa* en *E. globulus* y *E. maidenii* (III).

Materiales y Métodos

La presente tesis se basa en el análisis de dos ensayos de campo de *Eucalyptus globulus* y *E. maidenii*, instalados por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) en el Sureste de Uruguay (Figura 4), los cuales fueron infectados naturalmente por enfermedades foliares.

- Prueba de progenies de *E. globulus* instalada en 2002 en el Departamento de Rocha, afectada por MLD y Roya del Eucalipto (**I y II**).
- Prueba de progenies de *E. globulus* y *E. maidenii* instalada en Marzo de 2011 en el Departamento de Llavalleja, afectada por *Teratosphaeria nubilosa* (**III y IV**).



Figura 4. Principales zonas forestales del Uruguay (en verde) y ubicación de los ensayos analizados (puntos rojos).

Material genético evaluado

- 230 familias de polinización abierta de *E. globulus*, procedentes de 3 fuentes de semilla: Australia (9 procedencias), Chile (4 procedencias) y Uruguay (3 procedencias) (**I y II**).
- 194 familias de polinización abierta de *E. globulus* y 86 familias of *E. maidenii*, procedentes de las poblaciones de cría del Programa de Mejoramiento del INIA (**III y IV**).

Diseño experimental

- Bloques completos al azar, con 24 repeticiones y parcelas de un árbol, lo que hace un total de 5520 árboles (**I y II**).
- Bloques completos al azar, con 3 repeticiones y parcelas de 8 árboles, lo que hace un total de 6720 árboles (**III y IV**).

Características medidas

- Defoliación por MLD (porcentaje de hojas caídas, en el total de la copa de cada árbol) a los 8 meses de edad (**I y II**).
- Crecimiento en altura a los 8 meses, a los 3 años (**I y II**) y a los 9 años (**II**).
- Crecimiento en diámetro a la altura del pecho (DAP) a los 3, 5 y 7 años (**I y II**) y a los 9 años (**II**).
- Volumen por árbol a los 9 años (**II**).
- Supervivencia a los 8 meses, a los 3, 5 y 7 años (**I y II**) y a los 9 años (**II**).
- Precocidad del cambio de follaje (porcentaje de follaje adulto, en el total de la copa de cada árbol) a los 20 meses (**II**).
- Severidad de manchas y defoliación por *T. nubilosa* a los 14 meses (**III y IV**) y a los 21 meses (**IV**).
- Precocidad del cambio de follaje (porcentaje de follaje adulto, en el total de la copa de cada árbol) a los 14 meses (**III y IV**) y a los 21 y 26 meses (**IV**).
- Crecimiento en altura a los 14 meses (**III y IV**) y a los 26 meses (**IV**).
- Crecimiento en diámetro a la altura del pecho (DAP) a los 26 meses (**IV**).
- Supervivencia a los 14, 21 y 26 meses (**IV**).

Efectos fenotípicos analizados

- Efecto de la defoliación a los 8 meses sobre el crecimiento (altura y diámetro) y sobre la supervivencia hasta los 7 años (**I**).
- Efecto de la defoliación a los 14 meses sobre el crecimiento (altura y diámetro) y sobre la supervivencia hasta los 26 meses (**IV**).
- El efecto del porcentaje de follaje adulto a los 14 meses sobre el crecimiento (altura y diámetro) y sobre la supervivencia hasta los 26 meses (**IV**).

Efectos genéticos analizados

- Especie de eucalipto (**III**).
- Fuente de semilla en *E. globulus* (**II**).
- Procedencia en *E. globulus* (**II**).

Parámetros genéticos estimados

- Varianza aditiva (**II** y **III**).
- Heredabilidad individual (**II** y **III**).
- Correlaciones genéticas (**II** y **III**).

Ganancias genéticas esperadas

- Para defoliación y para porcentaje de follaje adulto, mediante selección directa por dichas características (**II**).
- Para supervivencia y para volumen por árbol a los 9 años, mediante selección temprana por defoliación y por porcentaje de follaje adulto (**II**).
- Para supervivencia y para volumen por árbol a los 9 años, mediante selección directa por dichas características (**II**).

Análisis estadísticos

- Análisis de varianza (ANOVA) mediante los procedimientos GLM (**I**, **III** y **IV**) y MIXED (**II**) del SAS (SAS Institute 1997).
- Contrastes de medias mediante el test de Tukey-Kramer (**I** y **IV**).
- Regresiones (**I**) y correlaciones fenotípicas (**II**, **III** y **IV**) mediante los procedimientos REG y CORR del SAS.
- Parámetros genéticos estimados mediante máxima verosimilitud restringida en ASREML (Gilmour *et al.* 2009) (**II** y **III**).

Resultados

1. Umbral de daño y pérdidas productivas provocadas por MLD en *Eucalyptus globulus* (I)

A los 8 meses de edad el ensayo presentó una alta incidencia de MLD (94% de los árboles), registrándose una defoliación media del 37%. Los daños provocados por la enfermedad afectaron tanto el crecimiento como la supervivencia, registrándose el mayor efecto en los primeros dos años posteriores a la infección. Aquellos árboles que sufrieron una defoliación inferior al 40% no vieron afectada significativamente su tasa de crecimiento en ningún período. Sin embargo, el diámetro al año 7 de los árboles más severamente afectados (defoliación del 80%) fue un 20% inferior que el diámetro de los árboles sanos (0% de defoliación). Si bien la enfermedad sólo afectó significativamente la supervivencia cuando la defoliación fue superior al 60%, los árboles más severamente dañados (80% de defoliación) registraron una mortalidad acumulada al año 7 del 74%. Los resultados obtenidos demuestran que, al menos en las condiciones intensivas de producción de Uruguay, las plantaciones de *E. globulus* pueden tolerar un relativamente alto nivel de daño por MLD, pero que daños foliares severos en los primeros meses del cultivo pueden ocasionar considerables pérdidas productivas.

2. Comportamiento de diferentes fuentes de semilla de *Eucalyptus globulus* en condiciones de infección de MLD (II)

Las tres poblaciones analizadas presentaron diferente comportamiento frente a MLD. La semilla uruguaya fue la más susceptible (mayor defoliación a los 8 meses), mientras que la semilla chilena fue la que comenzó más tarde el cambio de follaje (menor porcentaje de follaje adulto a los 20 meses). Sin embargo, estas diferencias no se vieron reflejadas en la productividad a largo plazo, ya que tanto la supervivencia como el volumen individual a los 9 años fueron similares en las diferentes fuentes de semilla. También se encontraron diferencias significativas entre procedencias para el porcentaje de defoliación, para porcentaje de follaje adulto y para volumen individual a los 9 años, siendo las procedencias australianas las de mejor comportamiento. Isla Flinders y Norte de Yarram fueron las procedencias más resistentes, mientras que Kennett River y Otways SF & Yuulong fueron las que cambiaron el follaje más temprano. A su vez, Otways SF & Yuulong y Norte de Yarram, ambas del estado de

Victoria, fueron las procedencias que alcanzaron mayor volumen individual al año 9. Estos resultados demuestran la importancia de la elección de la fuente de semilla como alternativa de manejo para el establecimiento de plantaciones de *E. globulus* en sitios con riesgo de infección de MLD.

3. Control genético de la resistencia del follaje juvenil a MLD y de la precocidad del cambio de follaje en *Eucalyptus globulus* (II)

Todas las características evaluadas (susceptibilidad a MLD, precocidad del cambio de follaje, supervivencia y crecimiento) presentaron significativa variación genética aditiva. La heredabilidad individual para defoliación a los 8 meses y para proporción de follaje adulto a los 20 meses fue moderadamente alta, con valores de 0.43 y 0.41, respectivamente. La supervivencia hasta los 9 años también presentó valores moderadamente altos de heredabilidad (entre 0.33 y 0.45), mientras que la heredabilidad para el crecimiento hasta los 9 años fue moderada, variando entre 0.21 y 0.34. La correlación genética entre la defoliación y el crecimiento posterior fue negativa (variando entre -0.33 y -0.44), mientras que la correlación entre el porcentaje de follaje adulto y el crecimiento posterior fue positiva (0.34 a 0.41), indicando que los árboles que son genéticamente susceptibles crecen menos que los árboles resistentes y que los árboles que cambian el follaje precozmente crecen más que los que lo cambian tarde. La supervivencia también se correlacionó genéticamente en forma negativa con la defoliación (-0.32 a -0.45) y en forma positiva con el porcentaje de follaje adulto (0.29 a 0.37), indicando que la supervivencia es genéticamente dependiente tanto de la susceptibilidad del follaje juvenil como de la precocidad del cambio de follaje. Estos resultados sugieren que es posible obtener materiales de propagación de *E. globulus* para sitios con riesgo de infección de MLD mediante la selección de genotipos de buena resistencia en el follaje juvenil y/o con cambio precoz de follaje.

4. Ganancias genéticas esperadas mediante selección por resistencia a MLD en *Eucalyptus globulus* (II)

Las ganancias genéticas esperadas mediante la transformación de la prueba de progenies en un huerto semillero fueron altas, variando entre 37 y 42% para diferentes esquemas de selección si se selecciona por baja defoliación y entre 46 y 52% si se selecciona por alta proporción de follaje adulto. A su vez, la selección temprana por estas características permitiría obtener incrementos en volumen individual (entre 2.2 y

6.0%) y en supervivencia al año 9 (entre 18.5 y 24.9%). Estos resultados sugieren que mediante la selección de las mejores familias e individuos es posible mejorar la resistencia a MLD o lograr un cambio de follaje más precoz, lo cual se traducirá en un incremento en el volumen y en la supervivencia a la edad de cosecha.

5. Susceptibilidad de *Eucalyptus globulus* y *E. maidenii* frente a *Teratosphaeria nubilosa* (III & IV)

Tres meses después de iniciada la epidemia de *T. nubilosa* prácticamente el 100% de los árboles de ambas especies presentaban síntomas de la enfermedad. El nivel de daño fue significativamente más alto en *E. globulus* que en *E. maidenii*, presentando mayor severidad de manchas foliares (10.6 y 5.6%, respectivamente) y mayor defoliación (31.9 y 22.9%, respectivamente). A los 10 meses de iniciada la infección la diferencia en el nivel de daño de ambas especies fue aún mayor, registrándose una defoliación media de 52.5% en *E. globulus* y de 28.8% en *E. maidenii*. Por el contrario, el cambio de follaje, de juvenil a adulto, comenzó significativamente más temprano en *E. globulus* que en *E. maidenii*. A los 14 meses de edad un 34.1% de los árboles de *E. globulus* ya había comenzado el cambio de follaje, mientras que en *E. maidenii* sólo tenían hojas adultas el 2.8% de los árboles. Los resultados obtenidos demuestran que el follaje juvenil de *E. globulus* es más susceptible a *T. nubilosa* que el de *E. maidenii*. Sin embargo, debido a la mayor precocidad en el cambio de follaje, el período de susceptibilidad en *E. globulus* es más corto que en *E. maidenii*.

6. Efecto del daño provocado por *Teratosphaeria nubilosa*, y efecto del cambio de follaje, sobre el crecimiento y la supervivencia de *Eucalyptus globulus* y *E. maidenii* (IV)

En ambas especies se registró una relación inversa entre el nivel de defoliación a los 14 meses y el crecimiento en diámetro a los 26 meses. El crecimiento en *E. globulus* se vio afectado significativamente cuando los árboles tenían al menos un 20% de defoliación, mientras que en *E. maidenii* el crecimiento se vio afectado en los árboles que tenían al menos un 30% de defoliación. La diferencia de crecimiento en diámetro entre los árboles más dañados y los menos dañados, es decir la pérdida de crecimiento en los niveles de mayor defoliación, fue de 44% en *E. globulus* y de 32% en *E. maidenii*. El daño provocado por *T. nubilosa* no afectó la supervivencia posterior en *E. maidenii*, pero sí en *E. globulus*, donde los árboles más dañados (defoliación de 50 y 60%)

presentaron mortalidades significativamente mayores que los árboles menos afectados. En el caso de *E. globulus* se registró una relación directa entre el porcentaje de follaje adulto a los 14 meses y el crecimiento en diámetro a los 26 meses. Los árboles que tenían al menos un 10% de follaje adulto tuvieron un crecimiento en DAP significativamente mayor que los que aún no habían comenzado a cambiar el follaje. A su vez, los árboles de *E. globulus* que a los 14 meses ya habían comenzado a cambiar el follaje presentaron menor mortalidad que aquellos que solamente presentaban follaje juvenil. Estos resultados demuestran que el efecto perjudicial de las infecciones de *T. nubilosa* es mayor en *E. globulus* que en *E. maidenii*. Demuestran también la importancia de la precocidad en el cambio de follaje como forma de escape a nuevas infecciones.

7. Control genético de la resistencia a *Teratosphaeria nubilosa* en *Eucalyptus globulus* y *E. maidenii* (III)

Tanto la severidad de las manchas foliares como la defoliación provocadas por *T. nubilosa* presentaron significativa variación genética aditiva en *E. globulus*, con valores de heredabilidad individual de 0.40 y 0.24, respectivamente. La variación genética en *E. maidenii* fue menor en ambas características, siendo significativa solamente para defoliación, con una heredabilidad de 0.21. En *E. globulus* la proporción de follaje adulto a los 14 meses presentó muy alta heredabilidad (0.64). En *E. globulus* se registró una correlación genética negativa entre la altura del árbol y la defoliación (-0.39) y una correlación positiva entre la altura y la proporción de follaje adulto (0.49). El control genético de la resistencia a *T. nubilosa* tuvo una estrecha relación con el de la precocidad del cambio de follaje, registrándose una correlación genética entre defoliación y proporción de follaje adulto de -0.71. Estos resultados sugieren que en *E. globulus* es posible seleccionar genotipos que presenten cierta resistencia en el follaje juvenil, pero que la respuesta a la selección será mayor si se selecciona por cambio precoz de follaje. En cambio, las posibilidades de mejorar el comportamiento frente a *T. nubilosa* mediante selección son bastante limitadas en *E. maidenii*.

Discusión

Impacto de MLD en eucaliptos

Las manchas foliares y la caída prematura de las hojas, provocadas por enfermedades como MLD, reducen el área fotosintéticamente activa, afectando por lo tanto el crecimiento posterior de los árboles. Si bien la magnitud de la reducción del área foliar se correlaciona negativamente con el crecimiento (**I** y **IV**), tanto el umbral de daño como la duración del efecto son difíciles de predecir debido a que la respuesta de los árboles depende de la interacción de diversos factores bióticos y abióticos (Eyles *et al.* 2013). Los factores relacionados a la propia enfermedad, como la severidad, frecuencia y patrón de defoliación, así como el momento del año en que ésta ocurre, tienen diferente impacto dependiendo de la edad de los árboles y de características del ambiente, como disponibilidad de nutrientes y agua. Frecuentemente los eventos de defoliación por MLD se repiten en el tiempo (**IV**), lo cual provoca mayor impacto en el crecimiento que una defoliación aislada (Abbott *et al.* 1993; Wills *et al.* 2004; Pinkard *et al.* 2006b). A su vez, la pérdida de follaje en la parte superior de la copa tiene un mayor efecto sobre el crecimiento que la pérdida de follaje en la parte baja (Collett y Neumann 2002; Pinkard *et al.* 2006b) y defoliaciones que ocurren a fines del verano o en otoño tienen mayor efecto que cuando ocurre a fines del invierno o en primavera (Cremer 1973; Abbott y Wills 1996).

Aunque la defoliación causada por MLD tiene un importante efecto sobre la producción de biomasa en el corto plazo, se ha demostrado que los eucaliptos tienen una gran capacidad de recuperación (Eyles *et al.* 2009a; Quentin *et al.* 2011; Barry *et al.* 2012). Existen diferentes mecanismos por los cuales los árboles afectados pueden mantener o recuperar tasas de crecimiento similares a las de árboles sanos. La defoliación comúnmente resulta en un incremento de la tasa fotosintética por unidad de área en el follaje remanente (Pinkard y Beadle 1998b; Pinkard *et al.* 2007; Turnbull *et al.* 2007; Quentin *et al.* 2012), así como también en un rejuvenecimiento de las hojas viejas no dañadas, restaurando su capacidad fotosintética a valores cercanos a los de las hojas nuevas (Pinkard *et al.* 1998; Forrester *et al.* 2012). Otros mecanismos, como retrasar la senescencia de las hojas viejas no dañadas, producir hojas más grandes o acelerar el desarrollo de las hojas nuevas, son utilizados por el árbol para aumentar la captura de

luz y por lo tanto recuperar la tasa de crecimiento luego de una defoliación (Pinkard *et al.* 1998; Pinkard y Beadle 1998c).

Umbral de daño en *Eucalyptus globulus* y *E. maidenii* (I y IV)

En *E. globulus* el umbral de daño por MLD, es decir, el nivel de defoliación que provoca una reducción significativa en el crecimiento, fue del 40% en el primer ensayo analizado (I) y del 20% en el segundo ensayo (IV). Dado que estos ensayos fueron instalados en diferentes momentos y en diferentes sitios, no es posible comparar entre sí los resultados obtenidos en ambos casos. Sin embargo, algunas de sus características pueden ayudar a interpretar la diferencia observada en el umbral de daño. El tipo de suelo y el manejo silvicultural utilizado en ambos ensayos es comparable y en ninguno de los dos casos existieron períodos de déficit hídrico que pudiese limitar la recuperación de los árboles. El primer ensayo sufrió una infección combinada de MLD y Roya del Eucalipto, mientras que en el segundo ensayo la infección fue únicamente de MLD causada por *T. nubilosa*. Sin embargo, dado que la Roya del Eucalipto no provoca la caída de las hojas afectadas, la defoliación en ambos ensayos se debió exclusivamente a MLD. La edad de los árboles al momento en que se inició la infección de MLD fue de aproximadamente 6 meses en el primer ensayo, donde el 100% del follaje era juvenil, y de 12 meses en el segundo ensayo, donde algunos árboles ya habían comenzado a cambiar el follaje. En ambos ensayos la infección comenzó a fines del verano o inicio del otoño (Febrero-Marzo) y en ambos casos se registró el mismo patrón de daño, defoliándose la parte inferior de la copa. La diferencia más importante entre ambas situaciones fue la frecuencia de la infección. En el primer ensayo ocurrió un único evento de defoliación, mientras que en el segundo se registró un aumento continuo de la defoliación como consecuencia de re-infecciones (ciclos secundarios de la enfermedad) durante los meses de Febrero a Mayo, lo que se coincide con los patrones de infección de *T. nubilosa* (Smith, 2006). Aunque en determinadas condiciones los eucaliptos pueden tolerar eventos aislados de defoliación del 40 o 50% (Eyles *et al.* 2009a; Quentin *et al.* 2011), estudios realizados en *E. marginata*, *E. regnans* y *E. globulus* han demostrado que defoliaciones repetidas tienen mayor efecto sobre el crecimiento que eventos aislados de defoliación (Candy *et al.* 1992; Abbott *et al.* 1993; Collett y Neumann 2002; Wills *et al.* 2004). Es probable entonces, que la recuperación de los árboles afectados haya comenzado más rápidamente en el primer ensayo y por lo tanto hayan tolerado un mayor nivel de daño que los árboles del segundo ensayo.

Bajo las mismas condiciones, el nivel de defoliación que representa el umbral de daño por MLD fue del 20% en *E. globulus* y del 30% en *E. maidenii* (IV). La mayor tolerancia a la defoliación demostrada por *E. maidenii* podría estar explicada por diversos factores, como por ejemplo una mayor eficiencia en la tasa de fotosíntesis del follaje remanente o una mayor capacidad para producir nuevas hojas. Dado que *E. maidenii* no es una especie muy utilizada en plantaciones comerciales, prácticamente no existen estudios a nivel mundial sobre esta especie que permitan entender las causas de su mayor tolerancia a la enfermedad.

Pérdida de crecimiento en *Eucalyptus globulus* y *E. maidenii* (I & IV)

En el primer ensayo los árboles de *E. globulus* más afectados por MLD sufrieron una defoliación de 80% (I), mientras que en la primera evaluación de daño realizada en el segundo ensayo el nivel más alto de defoliación fue de 60% (IV). Con estos niveles de daño sería dable esperar un mayor impacto de la enfermedad en el primer ensayo. Sin embargo, las pérdidas de crecimiento en diámetro es decir, la diferencia de crecimiento entre los árboles más dañados y los árboles sanos, fue de 33% en el primer ensayo (I) y de 44% en el segundo ensayo (IV). Esta aparente contradicción probablemente esté explicada por las características de la infección. Como se mencionó anteriormente, el segundo ensayo sufrió varias infecciones sucesivas, incrementándose marcadamente el nivel de defoliación en los meses siguientes a la primera evaluación de daño, lo cual no ocurrió en el primer ensayo. Por otra parte, en el primer ensayo el efecto de la defoliación sobre el crecimiento se evaluó por primera vez a los dos años de ocurrida la epidemia, mientras que en el segundo ensayo se evaluó al año del inicio de la epidemia. Por lo tanto, es muy factible que en el segundo ensayo el efecto perjudicial de la defoliación sobre el crecimiento aún no se hubiese manifestado en su totalidad. Los resultados obtenidos por Smith (2006), quien no observó pérdidas de crecimiento provocadas por MLD en *E. globulus* hasta los 14 meses después de ocurrido el daño, parecen respaldar esta hipótesis.

En las condiciones del segundo ensayo, los árboles de *E. maidenii* que fueron más afectados por la enfermedad registraron una pérdida de crecimiento en diámetro de 32%, mientras que la pérdida de crecimiento en *E. globulus* fue de 44% (IV). Podría pensarse que esta diferencia estuviese dada por una mayor tolerancia de *E. maidenii*; sin embargo, es muy probable que se explique simplemente por los niveles máximos de defoliación registrados en ambas especies: 40% en *E. maidenii* y 60% en *E. globulus*. En

otras palabras, en *E. globulus* el nivel de daño foliar provocado por MLD fue mayor que en *E. maidenii*, lo que se tradujo en una mayor pérdida de crecimiento.

En el primer ensayo, la pérdida de crecimiento en diámetro de los árboles que sufrieron una defoliación del 80% fue de 44% a los dos años y de 20% a los 7 años (I). Estos resultados indican que en *E. globulus* las pérdidas de crecimiento provocadas por la enfermedad se atenúan con el tiempo, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en *E. nitens* por Rapley *et al.* (2009), quienes reportaron que defoliaciones de hasta 50% generaron una reducción significativa del crecimiento a los 24 meses pero no a los 75 meses. Estimaciones realizadas por Wardlaw (2004) para *E. globulus*, establecen que pérdidas de follaje de 88% generan al final de la rotación, una pérdida en diámetro equivalente a 1.5 años de crecimiento. Estas estimaciones son muy similares a las pérdidas obtenidas en el primer ensayo de esta tesis, ya que si la pérdida del 20% en diámetro a los 7 años se mantiene hasta los 9 años (edad de cosecha para celulosa en Uruguay) equivaldría a una pérdida de 2 años de crecimiento.

Mortalidad en *Eucalyptus globulus* y *E. maidenii* (I & IV)

La pérdida de follaje en los niveles más altos de daño por MLD también afectó significativamente la supervivencia posterior de *E. globulus* (I y IV). En el primer ensayo, la mortalidad de los árboles que no sufrieron defoliación fue de 3% a los dos años de ocurrida la infección y de 17.5% a los 7 años, mientras que los árboles que sufrieron una defoliación del 80% registraron una mortalidad del 54% a los dos años y una mortalidad acumulada al año 7 del 74% (I). En el segundo ensayo, la mortalidad al año de iniciada la infección registrada en los árboles de *E. globulus* más afectados por *T. nubilosa* (defoliación del 50 y 60%) fue significativamente mayor que la de los árboles levemente afectados. En este mismo ensayo, el daño provocado por *T. nubilosa* no afectó la supervivencia en *E. maidenii*, probablemente porque en esta especie los niveles más altos de daño no superaron el 40% de defoliación (IV).

Existen muy escasos antecedentes en eucaliptos que reporten efectos significativos de la defoliación sobre la supervivencia: Jordan *et al.* (2002) en *E. globulus* con defoliación por insectos; Wilkinson y Neilsen (1995) en *E. nitens* y *E. regnans* y Candy *et al.* (1992) en *E. regnans*, en ambos casos con defoliación artificial. Si bien en los ensayos analizados en esta tesis no es posible atribuir directamente la muerte de árboles a MLD, de acuerdo a Carnegie *et al.* (1994), la reducción del crecimiento en los árboles

afectados los deja en desventaja para competir con sus vecinos y aumenta la susceptibilidad tanto a otros patógenos como a factores abióticos adversos.

Importancia del cambio de follaje en *Eucalyptus globulus* (IV)

Los efectos de la proporción de follaje adulto al momento de iniciada la infección de MLD, tanto directamente sobre el nivel de daño, como indirectamente sobre el crecimiento y la supervivencia, quedan de manifiesto en los resultados del segundo ensayo. Los árboles de *E. globulus* que al momento de iniciarse la infección de *T. nubilosa* tenían al menos 30% de follaje adulto registraron una defoliación significativamente menor que los árboles que solamente tenían follaje juvenil (IV). A su vez, los árboles que al momento de iniciada la infección ya habían comenzado a cambiar el follaje tuvieron mayor crecimiento y registraron menor mortalidad que aquellos que solamente presentaban follaje juvenil (IV). Cuando comenzó la infección casi todos los árboles de *E. maidenii* solo tenían follaje juvenil, por lo cual no fue posible analizar el efecto del follaje adulto en el comportamiento posterior de esta especie. Sin embargo, en el caso de *E. globulus*, en el cual el follaje juvenil es muy susceptible a *T. nubilosa*, los resultados obtenidos demuestran que la precocidad en el cambio de follaje es determinante en el comportamiento de los árboles frente a la enfermedad.

Selección de genotipos de buen comportamiento frente a MLD

El mejoramiento genético como herramienta para aumentar la resistencia a enfermedades en especies forestales es ampliamente utilizado a nivel mundial (Zobel y Talbert 1984; Eldridge *et al.* 1994). Si bien pueden utilizarse diferentes estrategias para obtener material de propagación resistente a enfermedades, como la elección de la especie y fuente de semilla, la selección y clonación de individuos resistentes o los cruzamientos controlados entre genotipos resistentes, en todos los casos el éxito estará determinado por la variabilidad genética existente para resistencia a la enfermedad. En el caso de MLD en eucaliptos, enfermedad que principalmente afecta árboles jóvenes ya que el follaje adulto es bastante resistente (Crous 1998), existen dos estrategias posibles para obtener genotipos de buen comportamiento: seleccionar por resistencia del follaje juvenil y seleccionar por precocidad en el cambio de follaje (Milgate *et al.* 2005). En la presente tesis se encontró variación genética para ambas características a varios niveles: diferencias entre especies (III y IV), entre fuentes de semilla (II), entre

procedencias (II) y entre familias (II y III), lo que sugiere que es posible seleccionar materiales de propagación que presenten buen comportamiento frente a MLD.

Comportamiento de *Eucalyptus globulus* y *E. maidenii* frente a *Teratosphaeria nubilosa* (III y IV)

Teratosphaeria nubilosa es considerada como una de las especies de MLD más destructivas a nivel mundial (Mohammed *et al.* 2003; Hunter *et al.* 2009) y es sin duda la principal limitante productiva para *E. globulus* y *E. maidenii* en Uruguay (Balmelli *et al.* 2011). En el segundo ensayo analizado en esta tesis la enfermedad tuvo una incidencia del 100% en ambas especies (III y IV), lo cual, teniendo en cuenta el amplio pool genético evaluado, evidencia la gravedad del problema. Existen solo dos antecedentes que comparan la resistencia a MLD entre estas especies, Carnegie *et al.* (1994) en Australia y Hood *et al.* (2002) en Nueva Zelanda, y ambos demuestran que *E. globulus* es más susceptible que *E. maidenii*. Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman que el follaje juvenil de *E. globulus* es significativamente más susceptible a la enfermedad que el de *E. maidenii*, diferencia que se acentúa a medida que aumenta la severidad de la infección. Por el contrario, en *E. globulus* el cambio de follaje comienza significativamente más temprano que en *E. maidenii* (III y IV), lo que determina un menor período de susceptibilidad a la enfermedad.

De acuerdo a Smith *et al.* (2007), la mayor resistencia a MLD que presenta *E. nitens* respecto a *E. globulus* está determinada por la presencia de parénquima en empalizada en ambas caras de la hoja (y solamente en la cara inferior en *E. globulus*) y a la eficiente formación de peridermis necrofiláctica luego de la infección, lo cual restringe la propagación intracelular del patógeno. Si bien en *E. globulus* y *E. maidenii* la diferencia en la susceptibilidad del follaje juvenil podría estar explicada por diversas características de las hojas, como espesor de la cutícula, tamaño y densidad de estomas, tipo y densidad del parénquima o concentración de metabolitos secundarios (Eyles *et al.* 2013), no existen estudios de anatomía foliar en *E. maidenii* que permitan determinarlo. Independientemente de las causas que lo expliquen, la mayor resistencia a MLD en *E. maidenii* podría deberse a una mayor adaptación a la enfermedad. La zona de ocurrencia natural de *E. maidenii* presenta veranos más cálidos y húmedos que la de *E. globulus* (Jordan *et al.* 1993), condiciones que generan una mayor presión de inóculo, lo que podría haber inducido el desarrollo de mayor resistencia a través de un proceso más intenso de selección natural (Carnegie *et al.* 1994; Hood *et al.* 2002).

Comportamiento de diferentes procedencias de *Eucalyptus globulus* frente a MLD (II)

El área de distribución natural de *E. globulus* incluye buena parte de Tasmania, las islas del estrecho de Bass y el Sur del estado de Victoria (Australia). Dicha zona cubre un rango latitudinal que va desde los 38°26'S hasta los 43°30'S y un rango de altitud que va desde el nivel del mar hasta los 500 m, lo que genera diferencias climáticas, tanto en temperaturas como en precipitaciones, las cuales varían entre los 500 y los 1500 mm anuales (Jordan *et al.* 1994). De hecho, se han reportado importantes diferencias entre procedencias para varias características productivas, incluida la resistencia a MLD (Carnegie *et al.* 1994; Hamilton *et al.* 2013).

En la presente tesis el nivel de daño por MLD de las procedencias australianas de *E. globulus* fue menor que el de las procedencias locales. A su vez, se encontraron diferencias significativas entre las procedencias australianas, tanto en la resistencia del follaje juvenil como en la precocidad del cambio de follaje (II). De acuerdo a Hamilton *et al.* (2013), en *E. globulus* existe una variación latitudinal en resistencia a MLD, siendo las procedencias más resistentes las ubicadas más al norte del área de distribución de la especie. A su vez, Jordan *et al.* (2000) y Hamilton *et al.* (2011), reportan que las procedencias de Victoria cambian el follaje más tempranamente que las procedencias de Tasmania. Estos antecedentes y los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que la utilización en plantaciones comerciales de procedencias de Victoria, como Otways SF & Yuulong o Norte de Yarram, podrían reducir los daños por MLD en Uruguay. A su vez, su utilización como fuente de germoplasma en programas de mejoramiento contribuiría a mejorar el comportamiento de *E. globulus* frente a la enfermedad.

Control genético de la resistencia del follaje juvenil a MLD y de la precocidad del cambio de follaje en *Eucalyptus globulus* (II & III)

Tanto la susceptibilidad a MLD como la precocidad del cambio de follaje en *E. globulus* presentaron heredabilidades significativas, con valores moderados para defoliación (entre 0.24 y 0.43) y altos para proporción de follaje adulto (entre 0.41 y 0.64) (II y III). Estos valores de heredabilidad están dentro del rango de valores para resistencia a MLD en *E. globulus* (0.12 a 0.48) reportados por Reinoso (1992), Dungey *et al.* (1997), Carnegie y Ades (2005), Milgate *et al.* (2005), Hamilton *et al.* (2013) y Costa e Silva *et*

al. (2013) y dentro del rango de valores para precocidad del cambio de follaje en *E. globulus* (0.43 a 0.74) reportados por Jordan *et al.* (1999), López *et al.* (2002) y Hamilton *et al.* (2011). Los dos últimos trabajos mencionados también demuestran que la interacción genotipo-ambiente del cambio de follaje en *E. globulus* es muy baja, lo que confirma el alto control genético que presenta esta característica. Estos antecedentes y los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que si bien es posible obtener una aceptable respuesta a la selección por resistencia a MLD, la ganancia genética será mayor si se selecciona por precocidad en el cambio de follaje. A su vez, la selección por esta característica tiene la ventaja de que la misma puede efectuarse independientemente de las condiciones ambientales y de la presencia del patógeno. De todas formas, la alta correlación genética entre defoliación y proporción de follaje adulto (-0.71) (III), indica que la selección por una de estas características tendrá un efecto indirecto deseable sobre la otra.

En los ensayos analizados en esta tesis existió una correlación genética negativa entre la defoliación y el crecimiento posterior y una correlación positiva entre el porcentaje de follaje adulto y el crecimiento posterior. A su vez, la supervivencia se correlacionó en forma negativa con la defoliación y en forma positiva con el porcentaje de follaje adulto. Si bien en general dichas correlaciones fueron bajas a moderadas (variando entre -0.45 y 0.49) (II y III), demuestran que tanto el crecimiento como la supervivencia están genéticamente relacionadas a la susceptibilidad del follaje juvenil y a la proporción de follaje adulto. Esto sugiere que la selección por resistencia del follaje juvenil y/o por precocidad en el cambio de follaje, tendrá un efecto positivo sobre la productividad. De hecho, las ganancias genéticas esperadas mediante la transformación de la prueba de progenies en un huerto semillero demuestran que la selección por baja defoliación o por alta proporción de follaje adulto permitiría obtener incrementos en volumen al año 9 de entre 2.2 y 6.0% e incrementos en supervivencia de entre 18.5 y 24.9% (II).

Sin embargo, la pobre producción de semilla que presenta *E. globulus* en Uruguay constituye una importante limitante para obtener material de propagación de buen comportamiento frente a MLD. El volumen de semilla producido por un huerto semillero de 4 hectáreas permitiría forestar aproximadamente 600 hectáreas por año, lo cual es un pequeño porcentaje del volumen de semilla requerido para cubrir las necesidades del país si se pretende mantener el área ocupada por *E. globulus*. Una alternativa a esta u otra estrategia de selección basada en la producción de semilla mejorada es la selección y clonación de los mejores árboles de las pruebas de

progenies. En este caso la limitante principal es la pobre capacidad de enraizamiento que presenta *E. globulus* (Le Roux y Van Staden 1991; Tejedor 2007), pero tiene la ventaja de que una vez que se identifican clones con buena capacidad de enraizamiento estos pueden multiplicarse en forma indefinida (Le Roux y Van Staden 1991).

Control genético de la resistencia a *Teratosphaeria nubilosa* en *Eucalyptus maidenii* (III)

En *E. maidenii* tanto la severidad de las manchas foliares como la defoliación provocadas por *T. nubilosa* presentaron muy escasa variación genética aditiva, siendo significativa solamente para defoliación, con una heredabilidad de 0.21. Esto podría ser una característica intrínseca de la especie o estar explicado por la relativamente estrecha base genética de la población analizada. Al momento de la primera evaluación solo un 3% de los árboles de *E. maidenii* presentaban follaje adulto, por lo cual no fue posible analizar la variación genética para precocidad del cambio de follaje. Tampoco existen antecedentes bibliográficos sobre el control genético de la resistencia a MLD ni sobre el control genético del cambio de follaje en esta especie. La pobre variabilidad genética para resistencia del follaje juvenil y el tardío cambio a follaje adulto sugieren que las posibilidades de obtener mejores genotipos mediante selección son bastante escasas en *E. maidenii*, quedando reducidas a la selección y clonación de algunos individuos con cambio precoz de follaje.

Conclusiones

1. En las condiciones intensivas de producción del Uruguay, previo al ingreso de *T. nubilosa*, las plantaciones de *E. globulus* fueron capaces de tolerar una defoliación por MLD de hasta el 40%. Sin embargo, una defoliación de 80% en los primeros meses del cultivo resultó en una reducción de 20% en el crecimiento a largo plazo y una mortalidad acumulada, al año 7, de 74%.
2. Las procedencias australianas Isla Flinders y Norte de Yarram fueron las que presentaron mayor resistencia en el follaje juvenil a MLD, mientras que Kennett River y Otways SF & Yuulong fueron las que cambiaron el follaje más temprano. Estas procedencias podrían utilizarse como fuente de semilla para el establecimiento de plantaciones de *E. globulus* en sitios en los que la enfermedad está presente y como fuente de germoplasma en programas de mejoramiento genético.
3. El moderadamente alto control genético, tanto de la defoliación como de la proporción de follaje adulto (heredabilidades de 0.43 y 0.41, respectivamente), demuestra que es posible obtener materiales de propagación de *E. globulus* para sitios con riesgo de infección de MLD mediante la selección de genotipos de buena resistencia en el follaje juvenil y/o con cambio precoz de follaje.
4. Las ganancias genéticas esperadas mediante la transformación de una prueba de progenies de *E. globulus* en un huerto semillero son altas, variando entre 37 y 42% cuando se selecciona por baja defoliación y entre 46 y 52% cuando se selecciona por alta proporción de follaje adulto. A su vez, la selección temprana por estas características permitiría obtener a la edad de cosecha un leve incremento en volumen individual (entre 2.2 y 6.0%) y una mejora importante en la supervivencia (entre 18.5 y 24.9%).
5. El follaje juvenil de *E. globulus* es más susceptible a *T. nubilosa* que el de *E. maidenii*, y las diferencias entre ambas especies se acentúan a medida que aumenta la severidad de la infección. Por el contrario, el cambio de follaje

comienza más temprano en *E. globulus*, por lo cual el período de susceptibilidad a la enfermedad es más corto en esta especie.

6. El umbral de daño por *T. nubilosa* en *E. globulus* se alcanzó con una defoliación de 20%, mientras que en *E. maidenii* el crecimiento se vio afectado con una defoliación de al menos 30%. *T. nubilosa* provocó pérdidas de crecimiento al año de la infección de hasta 44% en *E. globulus* y de hasta 32% en *E. maidenii*. La supervivencia en *E. maidenii* no se vio afectada por la enfermedad, pero si en *E. globulus*. Al momento de la infección, la presencia de follaje adulto en *E. globulus* mejora el crecimiento y reduce la mortalidad posterior.
7. Bajo condiciones de infección repetidas de *T. nubilosa*, el control genético de la resistencia del follaje juvenil de *E. globulus* y *E. maidenii* es bajo (con heredabilidades de 0.24 y 0.21, respectivamente), mientras que el inicio del cambio de follaje en *E. globulus* presenta un alto control genético (heredabilidad de 0.64). Estos resultados demuestran que tanto en *E. globulus* como en *E. maidenii* es posible seleccionar por resistencia en el follaje juvenil, pero que en *E. globulus* la respuesta a la selección será mayor si se selecciona por cambio precoz de follaje.

Referencias

- Abbott, I.; Van Heurck, P.; Burbridge, T. 1993. Impact of frequency and intensity of defoliation on growth of jarrah (*Eucalyptus marginata*): an experimental study with saplings. *Forest Ecology and Management* 56: 175-183.
- Abbott, I.; Wills, A. 1996. Growth of young *Eucalyptus globulus* in plantations after manual defoliation simulating insect herbivory. *CALMScience* 2: 129-132.
- Alfenas, A.C.; Zauza, E.A.; Mafia, R.G.; Assis, T.F. 2004. Clonagem e Doenças do Eucalipto. 4ª ed. Editora UFV, Vicosa, MG, Brasil. 500p.
- Alonso, R.; Soria, S.; Lupo, S.; Bettucci, L.; Pérez, C. 2013. Alternativas de manejo de enfermedades foliares en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus*. En: V Jornada Técnica de Protección Forestal. *Serie Técnica INIA* 209: 39-44.
- Andjic, V.; Whyte, G.; Hardy, G.; Burgess, T. 2010. New *Teratosphaeria* species occurring on eucalypts in Australia. *Fungal Diversity* 43: 27-38.
- Balmelli, G. 2002. Avances en Mejoramiento Genético de *Eucalyptus globulus* en el Programa Nacional Forestal del INIA. Evaluación de fuentes de semilla de *E. globulus* en Zona 2. *Serie Actividades de Difusión INIA* 289: 14-25. Tacuarembó, Uruguay.
- Balmelli, G.; Resquín, F. 1999. Evaluación de orígenes de *Eucalyptus globulus* al séptimo año. *Serie Técnica INIA* 103. Montevideo. Uruguay. 15p.
- Balmelli, G.; Resquín, F. 2002. Evaluación del crecimiento de especies de *Eucalyptus* en diferentes zonas de prioridad forestal. *Serie Aftercare Forestal INIA-JICA* Nº 14. Montevideo. Uruguay. 20p.
- Balmelli, G.; Resquín, F. 2005. Evaluación productiva de orígenes de *Eucalyptus globulus* en Zonas Litoral y Norte. *Serie Técnica INIA* 149. Montevideo. Uruguay. 15p.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Martínez, G.; Torres, D.; Pérez, C.; Fros, D.; Bentancur, O. 2009a. Incidencia y severidad de enfermedades y plagas en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* en las regiones Sureste y Litoral Oeste de Uruguay. *Serie Actividades de Difusión INIA* 567: 51-65. Tacuarembó, Uruguay.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Martínez, G.; Torres, D.; González, P.; Fros, D.; Bentancur, O. y Pérez, C. 2009b. Relevamiento sanitario de otoño en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus dunnii* en el Sureste y Litoral Oeste. *Serie Actividades de Difusión INIA* 594: 49-70. Tacuarembó, Uruguay.

- Balmelli, G.; Simeto, S.; Martínez, G.; Torres, D.; Pérez, C.A.; Bentancur, O. 2011. Incidence and severity of pests and diseases on young plantations of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. En: IUFRO Forest Protection Joint Meeting: pathogens, insects and their associations affecting forestry worldwide. 8-11 Noviembre. Colonia del Sacramento, Uruguay.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Torres-Dini, D.; Castillo, A.; Altier, N.; Perez, G.; Mac Gregor, J.; Peverelli, A.; Diez, J.J. 2013. Mejoramiento genético en *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus maidenii* por resistencia a *Teratosphaeria nubilosa*. En: V Jornada Técnica de Protección Forestal. *Serie Técnica INIA* 209: 55-65. Montevideo, Uruguay.
- Barber, P.A.; Carnegie, A.J.; Burgess, T.I.; Keane, P.J. 2008. Leaf diseases caused by *Mycosphaerella* species in *Eucalyptus globulus* plantations and nearby native forest in the Green Triangle Region of southern Australia. *Australasian Plant Pathology* 37: 472-481.
- Barnes, I.; Roux, J.; Wingfield, B.D.; O'Neill, M.; Wingfield, M.J. 2003. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 32: 361-366.
- Barry, K.M.; Quentin, A.G.; Eyles, A.; Pinkard, E.A. 2012. Consequences of resource limitation for recovery from repeated defoliation in *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology* 32: 24-35.
- Bollazzi, M. 2011. Presence of *Costalimaita ferruginea* (Coleoptera: Chrysomelidae) defoliating young *Eucalyptus* plantations in Uruguay. En: IUFRO Forest Protection Joint Meeting. Pathogens, insects, and their associations affecting forestry worldwide. 8-11 Noviembre. Colonia del Sacramento, Uruguay.
- Bollazzi, M. 2013. Detección de *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) en plantaciones de *Eucalyptus* en Uruguay. Reporte presentado ante la DGSSAA - MGAP, Uruguay.
- Burgess, T.I.; Barber, P.A.; Sufaati, S.; Xu, D.; Hardy, G.E.St.J.; Dell, B. 2007 *Mycosphaerella* spp. on *Eucalyptus* in Asia; new species; new hosts and new records. *Fungal Diversity* 24: 135-157.
- Candy, S.G.; Elliot, H.J.; Bashford, R.; Greener, A. 1992. Modelling the impact of defoliation by the leaf beetle, *Chrysophtharta bimaculata* (Coleoptera: Chrysomelidae), on height growth of *Eucalyptus regnans*. *Forest Ecology and Management* 54: 69-87.

- Carnegie, A.J. 2007. Forest health condition in New South Wales, Australia, 1996-2005. II. Fungal damage recorded in eucalypt plantations during forest health surveys and their management. *Australasian Plant Pathology* 36: 225-239.
- Carnegie, A.J.; Ades, P.K. 2001. Added phosphorus is associated with reduced severity of *Mycosphaerella cryptica* in *Eucalyptus globulus*. *Australian Forestry* 64:203-208.
- Carnegie, A.J.; Ades, P.K. 2002. The proportion of leaf spots caused by *Mycosphaerella cryptica* and *M. nubilosa* on *Eucalyptus globulus*, *E. nitens* and their F1 hybrids in a family trial in Tasmania, Australia. *Australasian Mycologist* 21: 53-63.
- Carnegie, A.J.; Ades, P.K. 2003. Mycosphaerella leaf disease reduces growth of plantation-grown *Eucalyptus globulus*. *Australian Forestry* 66: 113-119.
- Carnegie, A.J.; Ades, P.K. 2005. Variation in *Eucalyptus globulus* Labill. and *E. nitens* Dean and Maiden in susceptibility of adult foliage to disease caused by *Mycosphaerella cryptica* (Cooke) Hansf. *Silvae Genetica* 54: 174-184.
- Carnegie, A.J.; Keane, P.J. 2003. Variation in severity of target spot, caused by *Aulographina eucalypti*, in a eucalypt species and provenances trial in Victoria. *Australasian Plant Pathology* 32:393-402.
- Carnegie, A.J.; Keane, P.J.; Ades, P.K.; Smith, I.W. 1994. Variation in susceptibility of *Eucalyptus globulus* provenances to Mycosphaerella leaf disease. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 1751-1757.
- Carnegie, A.J.; Ades, P.K.; Keane, P.J.; Smith, I.W. 1998. Mycosphaerella disease of juvenile foliage in a eucalypt species and provenance trial in Victoria, Australia. *Australian Forestry* 61: 190-194.
- Carnegie, A.J.; Johnson, I.G.; Henson, M. 2004. Variation among provenances and families of blackbutt (*Eucalyptus pilularis*) in early growth and susceptibility to damage from leaf spot fungi. *Canadian Journal of Forest Research* 34: 2314-2326.
- Carnegie, A.J.; Pegg, G.S.; White, D.; Burgess, T.I. 2011. Species within Mycosphaerellaceae and Teratosphaeriaceae from eucalypts in eastern Australia. *Australasian Plant Pathology* 40: 366-384.
- Carvalho, A.O.; Alfenas, A.C.; Maffia, L.A.; Carmo, M.G.F. 1998. Resistencia de especies, progenies e procedencias de *Eucalyptus* a ferrugem causada por *Puccinia psidii* Winter. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 33: 139-147.
- Chambers, P.G.S.; Borralho, N.M.G.; Potts, B.M. 1995. Genetic analysis of survival in *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus*. *Silvae Genetica* 45: 107-112.

- Collett, N.G.; Neumann, F.G. 2002. Effects of simulated chronic defoliation in summer on growth and survival of blue gum (*Eucalyptus globulus* Labill.) within young plantations in northern Victoria. *Australian Forestry* 65: 99-106.
- Cortinas, M.N.; Crous, P.W.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J. 2006. Multi-gene phylogenies and phenotypic characters distinguish two species within the *Colletogloeopsis zuluensis* complex associated with *Eucalyptus* stem cankers. *Studies in Mycology* 55: 113-146.
- Costa e Silva, J.; Potts, B.M.; Tilyard, P. 2013. Stability of genetic effects across clonal and seedling populations of *Eucalyptus globulus* with common parentage. *Forest Ecology and Management* 291: 427-435.
- Coutinho, T.A.; Brady, C.L.; van der Vaart, M.S.; Venter, N.; Telechea, N.; Rolfo, M.; Perez, C.; Wingfield, M.J. 2011. A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. *Australasian Plant Pathology* 40: 55-60.
- Cremer, K.W. 1973. Ability of *Eucalyptus regnans* and associated evergreen hardwoods to recover from cutting or complete defoliation in different seasons. *Australian Journal of Forest Research* 12: 9-22.
- Crous, P.W. 1998. *Mycosphaerella* species and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. The American Phytopathological Society, St Paul, MN, USA.
- Crous, P.W.; Wingfield, M.J. 1996. Species of *Mycosphaerella* and their anamorphs associated with leaf blotch disease of *Eucalyptus* in South Africa. *Mycology* 88: 441-458.
- Crous, P.W.; Groenewald, J.Z.; Mansilla, J.P.; Hunter, G.C.; Wingfield, M.J. 2004. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. *Studies in Mycology* 50: 195-214.
- Crous, P.W.; Wingfield, M.J.; Mansilla, J.P.; Alfenas, A.C.; Groenewald, J.Z. 2006. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus* II. *Studies in Mycology* 55: 99-131.
- Crous, P.W.; Groenewald, J.Z.; Braun, U. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology* 58: 1-32.
- Dianese, J.C.; Moraes, T.S.A.; Silva, A.R. 1984. Response of *Eucalyptus* species to field infection by *Puccinia psidii*. *Plant Disease* 68: 314-316.
- Dickinson, G.R.; Lee, D.J.; HUTH, J.R. 2004. Early plantation growth and tolerance to Quambalaria Shoot Blight of provenances of three spotted gum taxa on a range of sites in Queensland. *Australian Forestry* 67: 122-130.

- DIEA. 2011. División estadísticas agropecuarias, Anuario Estadístico Agropecuario. <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,583,O,S,0,MNU;E;42;9;MNU>. (verificado 22/01/2013).
- Dungey, H.S.; Potts, B.M.; Carnegie, A.J.; Ades, P.K. 1997. Mycosphaerella leaf disease – genetic variation in damage to *Eucalyptus nitens*, *Eucalyptus globulus*, and their F-1 hybrid. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 750-759.
- Eldridge, K.G.; Davidson, J.; Hardwood, C.E.; Van Wyk, G. 1994. Eucalypt Domestication and Breeding. Oxford Press. 288p.
- Eyles, A.; Pinkard, E.A.; Mohammed, C. 2009a. Shifts in biomass and resource allocation patterns following defoliation in *Eucalyptus globulus* growing with varying water and nutrient supplies. *Tree Physiology* 29: 753-764.
- Eyles, A.; Pinkard, E.A.; O’Grady, A.P.; Worledge, D.; Warren, C.R. 2009b. Role of corticular photosynthesis following defoliation in *Eucalyptus globulus*. *Plant Cell and Environment* 32: 1004-1014.
- Eyles, A.; Barry, K.M.; Quentin, A.; Pinkard, E.A. 2013. Impact of defoliation in temperate eucalypt plantations: Physiological perspectives and management implications. *Forest Ecology and Management* 304: 49-64.
- Forrester, D.I.; Collopy, J.J.; Beadle, C.L.; Warren, C.R.; Baker, T.G. 2012. Effect of thinning, pruning and nitrogen fertiliser application on transpiration, photosynthesis and water-use efficiency in a young *Eucalyptus nitens* plantation. *Forest Ecology and Management* 266: 286-300.
- Gezahgne, A.; Roux, J.; Hunter, G.C.; Wingfield, M.J. 2006. *Mycosphaerella* species associated with leaf disease of *Eucalyptus globulus* in Ethiopia. *Forest Pathology* 36: 253-263.
- Gilmour, A.R.; Gogel, B.J.; Cullis, B.R.; Thompson, R. 2009. ASReml User Guide Release 3.0. VSN International Ltd, Hemel Hempstead, UK.
- Hamilton, M.G.; Tilyard, P.A.; Williams, D.R.; Vaillancourt, R.E.; Wardlaw, T.J.; Potts, B.M. 2011. The genetic variation in the timing of heteroblastic transition in *Eucalyptus globulus* is stable across environments. *Australian Journal of Botany* 59: 170-175.
- Hamilton, M.G.; Williams, D.R.; Tilyard, P.A.; Pinkard, E.A.; Wardlaw, T.J.; Glen, M.; Vaillancourt, R.E.; Potts, B.M. 2013. A latitudinal cline in disease resistance of a host tree. *Heredity* 110: 372-379.

- Hood, I.A.; Gardner, J.F.; Kimberley, M.O.; Molony, K. 2002. Variation among eucalypt species in early susceptibility to the leaf spot fungi *Phaeophleospora eucalypti* and *Mycosphaerella* spp. *New Zealand Journal of Forestry Science* 32: 235-255.
- Hunter, G.C.; Crous, P.W.; Roux, J.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J. 2004. Identification of *Mycosphaerella* species associated with *Eucalyptus nitens* leaf defoliation in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 33: 349-355.
- Hunter, G.C.; van der Merwe, N.A.; Burgess, T.I.; Carnegie, A.J.; Wingfield, B.D.; Crous, P.W.; Wingfield, M.J. 2008. Global movement and population biology of *Mycosphaerella nubilosa* infecting leaves of cold-tolerant *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. *Plant Pathology* 57: 235-242.
- Hunter, G.C.; Crous, P.W.; Carnegie, A.J.; Wingfield, M.J. 2009. *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of *Eucalyptus* spp. in native and introduced areas. *Molecular Plant Pathology* 10: 1-14.
- Hunter, G.C.; Crous, P.W.; Carnegie, A.J.; Burgess, T.I.; Wingfield, M.J. 2011. *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* disease of *Eucalyptus*; easily confused and with serious consequences. *Fungal Diversity* 50: 145-166.
- Ipinza, R.H.; García, X. ; Apiolaza, L.A.; Molina, M.P.; Chung, P.; Parra, P. 1994. Variación juvenil de un ensayo de procedencias y familias de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill, en la séptima región, Chile. *Ecología* 8: 259-270.
- Jackson, S.L.; Maxwell, A.; Burgess, T.I.; Hardy, G.E.; Dell, B. 2008. Incidence and new records of *Mycosphaerella* species within a *Eucalyptus globulus* plantation in Western Australia. *Forest Ecology and Management* 255: 3931-3937.
- James, S.A.; Bell, D.T. 2001. Leaf morphological and anatomical characteristics of heteroblastic *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* 49: 259-269.
- Johnson, I.G.; Carnegie, A.J.; Henson, M. 2009. Growth, form and Quambalaria Shoot Blight tolerance of spotted gum in North-eastern New South Wales, Australia. *Silvae Genetica* 58: 180-191.
- Jordan, G.J.; Potts, B.M.; Kirkpatrick, J.B.; Gardiner, C. 1993. Variation in the *Eucalyptus globulus* complex revisited. *Australian Journal of Botany* 41: 763-785.
- Jordan, G.J.; Borralho, N.M.G.; Tilyard, P.G.; Potts, B.M. 1994. Identification of races in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* Labill. based on growth characteristics in Tasmania and geographic distribution. *Silvae Genetica* 43: 292-298.

- Jordan, G.J.; Potts, B.M.; Wiltshire, R. 1999. Strong, independent quantitative genetic control of vegetative phase change and first flowering in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* (Tasmanian Blue Gum). *Heredity* 83: 179-187.
- Jordan, G.J.; Potts, B.M.; Chalmers, P.; Wiltshire, R.J.E. 2000. Quantitative genetic evidence that the timing of vegetative phase change in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* is an adaptive trait. *Australian Journal of Botany* 48: 561-567.
- Jordan, G.J.; Potts, B.M.; Clarke, A.R. 2002. Susceptibility of *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* to sawfly (*Perga affinis* ssp. *insularis*) attack and its potential impact on plantation productivity. *Forest Ecology and Management* 160:189-199.
- Kularatne, H.A.G.C.; Lawrie, A.C.; Barber, P.A.; Keane, P.J. 2004. A specific primer PCR and RFLP assay for the rapid detection and differentiation in planta of some *Mycosphaerella* species associated with foliar diseases of *Eucalyptus globulus*. *Mycological Research* 108: 1476-1493.
- Le Roux, J.J.; Van Staden, J. 1991. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus* - a review. *Tree Physiology* 9: 435-477.
- López, G.A.; Potts, B.M.; Dutkowski, G.W.; Apiolaza, L.A.; Gelid, P.E. 2002. Genetic variation and inter-trait correlations in *Eucalyptus globulus* base population trials in Argentina. *Forest Genetics* 9: 217-231.
- Lundquist, J.E.; Purnell, R.C. 1987. Effects of *Mycosphaerella* leaf spot on growth of *Eucalyptus nitens*. *Plant Disease* 71: 1025-1029.
- Martínez, S. 2005. *Inocutis jamaicensis*, the causal agent of eucalypt stem rot in Uruguay. *Mycotaxon* 91: 165-171.
- Martínez, G. 2010. Insectos plaga en plantaciones jóvenes de eucalipto: hacia un modelo. *Serie Actividades de Difusión INIA* 629: 9-24. Tacuarembó, Uruguay.
- Martínez, G.; Bianchi, M. 2010. Primer registro para Uruguay de la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellappé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae). *Agrociencia* 14: 15-18.
- MGAP. 2013. Dirección General Forestal, Bosques plantados registrados. <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,20,441,O,S,O,MNU;E;134;2;MN> U. (verificado 22/01/2013).
- Milgate, A.W.; Yuan, Z.Q.; Vaillancourt, R.E.; Mohammed, C. 2001. *Mycosphaerella* species occurring on *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* plantations of Tasmania, Australia. *Forest Pathology* 31: 53-63.

- Milgate, A.W.; Potts, B.M.; Joyce, K.; Mohammed, C.; Vaillancourt, R.E. 2005. Genetic variation in *Eucalyptus globulus* for susceptibility to *Mycosphaerella nubilosa* and its association with tree growth. *Australasian Plant Pathology* 34: 11-18.
- Mohammed, C.; Wardlaw, T.; Smith, A.; Pinkard, E.; Battaglia, M.; Glen, M.; Tommerup, I.; Potts, B.; Vaillancourt, R. 2003. Mycosphaerella leaf diseases of temperate eucalypts around the southern Pacific rim. *New Zealand Journal of Forestry Science* 33: 362-372.
- Paine, T.D.; Steinbauer, M.J.; Lawson, S.A. 2011. Native and Exotic Pests of *Eucalyptus*: A Worldwide Perspective. *Annual Review of Entomology* 56: 181-201.
- Park, R.F. 1988a. Epidemiology of *Mycosphaerella nubilosa* and *M. cryptica* on *Eucalyptus* spp. in South-Eastern Australia. *Transactions of the British Mycological Society* 91: 261-266.
- Park, R.F. 1988b. Effect of certain host, inoculum, and environmental factors on infection of *Eucalyptus* species by two *Mycosphaerella* species. *Transactions of the British Mycological Society* 90: 221-228.
- Park, R.F.; Keane, P.J.; Wingfield, M.J.; Crous, P.W. 2000. Fungal diseases of eucalypt foliage. In: Keane PJ, Kile GA, Podger FD, Brown BN (eds). Diseases and pathogens of eucalypts. CSIRO Publishing, Melbourne, Australia. p. 153–239.
- Pérez, C.A. 2012. El desarrollo forestal y su implicancia sobre la dinámica de las enfermedades. 2da Jornada Bianual de Fitopatología. Libro de resúmenes. SUFIT. 10 de agosto del 2012. Montevideo, Uruguay.
- Pérez, C.A.; Wingfield, M.J.; Altier, N.A.; Blanchette, R.A. 2009a. Mycosphaerellaceae and Theratosphaeraceae associated with *Eucalyptus* leaf diseases and stem cankers in Uruguay. *Forest Pathology* 39: 349-360.
- Pérez, G.; Hunter, G.; Slippers, B.; Pérez, C.A.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J. 2009b. *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa*, the causal agent of *Mycosphaerella* leaf disease (MLD), recently introduced into Uruguay. *European Journal of Plant Pathology* 125: 109-118.
- Pérez, G.; Slippers, B.; Wingfield, B.D.; Finkenauer, E.; Wingfield, M.J. 2009c. *Mycosphaerella* leaf disease (MLD) outbreak on *Eucalyptus globulus* in Brazil caused by *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa*. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 302-306.
- Pérez, G.; Slippers, B.; Wingfield, M.J.; Wingfield, B.D.; Carnegie, A.; Burgess, T. 2012. Cryptic species, native populations and biological invasions by a eucalypt forest pathogen. *Molecular Ecology* 21: 4452-4471.

- Pérez, C.; Martínez, G.; Simeto, S.; Torres, D.; Palladino, C.; Langone, F.; Bentancur, O.; Balmelli, G. 2013. Prospección sanitaria en plantaciones jóvenes de eucalipto. Primavera 2008 – Otoño 2012. En: V Jornada Técnica de Protección Forestal. *Serie Técnica INIA 209*: 23-28. Montevideo, Uruguay.
- Pinkard, E.A.; Beadle, C.L. 1998a. Effects of green pruning on growth and stem shape of *Eucalyptus nitens* (Deane and Maiden) Maiden. *New Forest* 15: 107-126.
- Pinkard, E.A.; Beadle, C.L. 1998b. Regulation of photosynthesis in *Eucalyptus nitens* (Deane and Maiden) Maiden following green pruning. *Trees* 12: 366-376.
- Pinkard, E.A.; Beadle, C.L. 1998c. Aboveground biomass partitioning and crown architecture of *Eucalyptus nitens* following green pruning. *Canadian Journal of Forest Research* 28: 1419-1428.
- Pinkard, E.A.; Beadle, C.L.; Davidson, N.J.; Battaglia, M. 1998. Photosynthetic responses of *Eucalyptus nitens* (Deane and Maiden) Maiden to green pruning. *Trees* 12: 119-129.
- Pinkard, E.A.; Baillie, C.C.; Patel, V.; Mohammed, C.L. 2006a. Effects of fertilizing with nitrogen and phosphorus on growth and crown condition of *Eucalyptus globulus* Labill. experiencing insect defoliation. *Forest Ecology and Management* 231: 131-137.
- Pinkard, E.A.; Baillie, C.C.; Patel, V.; Paterson, S.; Battaglia, M.; Smethurst, P.J.; Mohammed, C.L.; Wardlaw, T.; Stone, C. 2006b. Growth responses of *Eucalyptus globulus* Labill. to nitrogen application and severity, pattern and frequency of artificial defoliation. *Forest Ecology and Management* 229: 378-387.
- Pinkard, E.A.; Battaglia, M.; Mohammed, C. 2007. Defoliation and nitrogen effects on photosynthesis and growth of *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology* 27: 1053-1063.
- Quentin, A.G.; Beadle, C.L.; O'Grady, A.P.; Pinkard, E.A. 2011. Effects of partial defoliation on closed canopy *Eucalyptus globulus* Labilladiere: Growth, biomass allocation and carbohydrates. *Forest Ecology and Management* 261: 695-702.
- Quentin, A.G.; O'Grady, A.P.; Beadle, C.L.; Mohammed, C.L.; Pinkard, E.A. 2012. Interactive effects of water supply and defoliation on photosynthesis, plant water status and growth of *Eucalyptus globulus* Labill. *Tree Physiology* 32: 958-967.
- Rapley, L.P.; Potts, B.M.; Battaglia, M.; Patel, V.S.; Allen, G.R. 2009. Long-term realised and projected growth impacts caused by autumn gum moth defoliation of 2-

- year-old *Eucalyptus nitens* plantation trees in Tasmania, Australia. *Forest Ecology and Management* 258: 1896-1903.
- Reinoso, C. 1992. Variation in *Eucalyptus globulus* in susceptibility to *Mycosphaerella* leaf diseases. Master of Forest Science thesis, University of Melbourne, Australia.
- Resquín, F.; Balmelli, G. 2005. *Eucalyptus globulus*: Importancia de la elección de la fuente de semilla. *Revista INIA* 3: 26-29. Montevideo, Uruguay.
- SAS Institute. 1997. SAS/STAT software: changes and enhancements through Release 6.12. SAS Institute, Cary, NC.
- Simeto, S.; Balmelli, G.; Martínez, G.; Torres, D.; González, P.; Fros, D.; Bentancur, O.; Pérez, C.A. 2010. Relevamiento sanitario de *Eucalyptus* spp. en el Sureste y Litoral Oeste del país. *Serie Actividades de Difusión INIA* 629: 41-51. Tacuarembó, Uruguay.
- Simeto, S.; Torres-Dini, D.; Balmelli, G.; Pérez, C. 2013. Detección de *Teratosphaeria pseudoecalypti* Andjic & T.I. Burgess asociada a plantaciones de *Eucalyptus* en Uruguay. Reporte presentado ante la DGSSAA - MGAP, Uruguay.
- Smith, A. 2006. The development of strategies for the management and research of foliar pathogens on eucalypt plantations: using *Mycosphaerella* as a case of study. PhD thesis, University of Tasmania.
- Smith, A.H.; Gill, W.M.; Pinkard, E.A.; Mohammed, C.L. 2007. Anatomical and Histochemical defence responses induced in juvenile leaves of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* by *Mycosphaerella* infection. *Forest Pathology* 37: 361-373.
- Snowdon, P. 2002. Modelling type 1 and type 2 growth responses in plantations after application of fertilizer or other silvicultural treatments. *Forest Ecology and Management* 163: 229-244.
- SPF. 2011. Forestación en Uruguay. Productos Forestales. <http://www.spf.com.uy/forestacion-en-uruguay/productos-forestales/>. (verificado 22/01/2013).
- Stone, C. 2001. Reducing the impact of insect herbivory in eucalypt plantations through management of extrinsic influences on tree vigour. *Australian Ecology* 26: 482-488.
- Stone, C.; Simpson, J.A.; Eldridge, R.H. 1998. Insect and fungal damage to young eucalypt plantings in northern New South Wales. *Australian Forestry* 61: 7-20.
- Tejedor, C. 2007. Selección de una variedad clonal de *Eucalyptus globulus* spp. *globulus*

- tolerante a la enfermedad foliar *Mycosphaerella* sp. en el Norte de España. Centro de Investigación y Documentación del Eucalipto 3: 57-66.
- Telechea, N.; Rolfo, M.; Coutinho, T.A.; Wingfield, M.J. 2003. *Puccinia psidii* on *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *Plant Pathology* 52: 427.
- Tibbits, W.N.; Boomsna, D.B.; Jarvis, S. 1997. Distribution, biology, genetics and improvement programs for *Eucalyptus globulus* and *E. nitens* around the world. En: 24th Southern Forest Tree Improvement Conference. 9-12 June 1997. Orlando, Florida, USA. 15p.
- Turnbull, T.L.; Adams, M.A.; Warren, C.R. 2007. Increased photosynthesis following partial defoliation of field-grown *Eucalyptus globulus* seedlings is not caused by increased leaf nitrogen. *Tree Physiology* 27: 1481-1492.
- Villena, J. 2003. Calidad de la madera de *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* como materia prima para la industria pastero-papelera. En: 1º Simposio Iberoamericano de *Eucalyptus globulus*. Montevideo, Uruguay, Octubre 2003.
- Wardlaw, T. 2004. The Impact of a Single Epidemic of *Mycosphaerella* Leaf Blight on the Growth of *Eucalyptus globulus*. Forestry Tasmanian Technical Report 15. Forestry Tasmania.
- Wardlaw, T.; Pinkard, E.A.; Mohammed, C. 2005. Can fertilisation with nitrogen and phosphorus lessen impacts of *Mycosphaerella* leaf blight in *Eucalyptus globulus*? En: Carnegie, A. (Ed.), 15th Australasian Plant Pathology Society Conference, *Mycosphaerella* leaf diseases of eucalypts workshop. Australasian Plant Pathology Society, Geelong, Australia.
- Wilcox, M.D. 1982. Preliminary selection of suitable provenances of *Eucalyptus regnans* for New Zealand. *New Zealand Journal of Forestry Science* 12: 468-479.
- Wills, J.A.; Burbidge, T.E.; Abbott, I. 2004. Impact of repeated defoliation on jarrah (*Eucalyptus marginata*) saplings. *Australian Forestry* 67: 194-198.
- Wilkinson, G.R.; Neilsen, W.A. 1995. Implications of early browsing damage on the long term productivity of eucalypt forests. *Forest Ecology and Management* 74: 117-124.
- Wingfield, M.J. 2000. Internal Report on Diseases of Plantation *Eucalyptus* in Uruguay. 28p.
- Wingfield, M.J.; Slippers, B.; Hurley, B.P.; Coutinho, T.A.; Wingfield, B.D.; Roux, J. 2008. Eucalypt pests and diseases: growing threats to plantation productivity. *Southern Forests* 70: 139-144.

- Zauza, E.A.V.; Alfenas, A.C.; Old, K.; Couto, M.M.F.; Graca, R.N.; Maffia, L.A. 2010. Myrtaceae species resistance to rust caused by *Puccinia psidii*. *Australasian Plant Pathology* 39: 406-411.
- Zobel, B.; Talbert, J. 1984. Applied Forest Tree Improvement. Wiley, New York. 505p.

Artículos originales

ARTÍCULO I

RESUMEN

Pérdidas de largo plazo en crecimiento y supervivencia causadas por enfermedades foliares en *Eucalyptus globulus* en Uruguay

Eucalyptus globulus es la especie forestal más importante en Uruguay, con más de 250.000 hectáreas de plantaciones comerciales. A pesar de su alta susceptibilidad a enfermedades, las pérdidas productivas causadas por enfermedades foliares no han sido adecuadamente cuantificadas en este país. Este estudio analiza los efectos del daño foliar sobre el crecimiento y la supervivencia utilizando la información obtenida en una prueba de progenies de *E. globulus* naturalmente infectada por manchas de *Teratosphaeria* (TLD) y Roya del eucalipto (*Puccinia psidii*). La severidad de las manchas foliares y la defoliación fueron cuantificadas a los 8 meses de establecida la plantación y el crecimiento de los árboles y su mortalidad fueron evaluados 2, 4 y 6 años después. El ensayo tuvo un alto nivel de daño foliar, con una media de severidad de manchas de 28.7% y una media de defoliación de 37%. El mayor impacto del daño foliar, tanto en crecimiento como en mortalidad, ocurrió en los primeros dos años posteriores a la evaluación del daño. Durante este período, una severidad de manchas menor al 40% y una defoliación por debajo del 50% no afectaron el crecimiento, mientras que la supervivencia fue afectada cuando el daño foliar fue del 70% o superior. Al sexto año tanto el crecimiento como la supervivencia fueron afectados por daños foliares severos (manchas o defoliación del 80% o superior), con una pérdida de hasta el 25% en diámetro y una mortalidad acumulada superior al 70%. Se ha establecido por primera vez que, bajo las condiciones intensivas de producción de Uruguay, los árboles de *E. globulus* pueden tolerar relativamente altos niveles de manchas foliares o defoliación, pero que un severo daño foliar en los primeros meses puede causar considerables pérdidas productivas, poniendo en riesgo la viabilidad económica de esta especie.

Palabras clave: enfermedades foliares, severidad de la enfermedad, respuesta del crecimiento, *Puccinia psidii*, *Teratosphaeria* spp.

Long term losses caused by foliar diseases on growth and survival of *Eucalyptus globulus* in Uruguay

Gustavo Balmelli^{A,D}, Sofía Simeto^A, Nora Altier^A, Virginia Marroni^B, Julio J. Diez^C

^A Programa Nacional Forestal. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Ruta 5, Km 386. Tacuarembó, Uruguay.

^B Plant and Food Research. Private Bag 4704. Christchurch, New Zealand.

^C Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. Instituto de Gestión Forestal Sostenible. Universidad de Valladolid. Avenida Madrid 44. Palencia, España.

ABSTRACT

Eucalyptus globulus is the most important forest species in Uruguay, with more than 250,000 ha of commercial plantations. Despite its high susceptibility to diseases, production losses caused by foliar diseases have not been properly quantified in this country. This study analyzes the effects of foliar damage on growth and survival using data from a progeny test of *E. globulus* naturally infected by *Teratosphaeria* leaf disease (TLD) and eucalypt rust (*Puccinia psidii*). The severity of leaf spots and defoliation were quantified eight months after planting and tree growth and mortality were evaluated two, four and six years later. The trial had a high incidence of foliar damage, with a mean leaf spot severity of 28.7% and a mean defoliation of 37%. The greatest impact of foliar damage, both on growth rate and mortality, occurred in the first two years after damage was assessed. During this period, leaf spot severity less than 40% and defoliation below 50% did not affect growth, while survival was affected when leaf damage was 70% or greater. By the sixth year both stem growth and survival were affected by severe foliar damage (spotting or defoliation of 80% or more), with a loss of up to 25% in diameter and an accumulated mortality over 70%. It has been established for the first time that under the intensive Uruguayan productive conditions, *E. globulus* trees can tolerate a relatively high degree of leaf spotting or defoliation but severe foliar damage in the first months can cause considerable production losses, putting at risk the economical viability of this species.

Keywords: disease severity, foliar diseases, growth response, *Puccinia psidii*, *Teratosphaeria* spp.

INTRODUCTION

Several pathogens affect the foliage of eucalypts. Some of them, like *Teratosphaeria cryptica* (= *Mycosphaerella cryptica*), *Teratosphaeria nubilosa* (= *Mycosphaerella nubilosa*) and *Puccinia psidii*, are considered serious threats in various countries due to the extent of damage caused in young plantations of different *Eucalyptus* species (Coutinho *et al.* 1998; Park *et al.* 2000; Mohammed *et al.* 2003; Smith 2006; Barber *et al.* 2008; Hunter *et al.* 2009). Various species of *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* cause the diseases known as *Mycosphaerella* leaf disease (MLD) and *Teratosphaeria* leaf disease (TLD) (Crous 1998; Crous *et al.* 2007; Hunter *et al.* 2011). These diseases produce necrotic spots of different size, shape and colour, premature defoliation and, in the case of severe infection, death of apical buds, twigs and branches (Park *et al.* 2000). The eucalypt rust, *Puccinia psidii*, produces yellow pustules on new leaves, petioles and buds, and on highly susceptible hosts it causes necrosis and deformation of the affected tissues (Ferreira 1983).

A reduction of photosynthetic area produced by foliar diseases can cause a loss of growth and it also predisposes the plant to other pathogens or adverse abiotic factors (Carnegie *et al.* 1994). The effects of leaf diseases on growth of *Eucalyptus* species have been quantified in naturally infected plantations or in controlled experiments (Lundquist and Purnell 1987; Stone *et al.* 1998; Carnegie *et al.* 1994; Carnegie and Ades 2001). However, in most cases the impact of defoliation on tree growth of *Eucalyptus* has been studied after insect damage (Jordan *et al.* 2002; Pinkard *et al.* 2006a; Rapley *et al.* 2009) or by artificial defoliation tests (Abbott *et al.* 1993; Collett and Neumann 2002; Pinkard *et al.* 2006b, 2007). Some of these studies have shown that 10% leaf damage is enough to cause loss of growth on *E. globulus* (Carnegie and Ades 2003; Pinkard *et al.* 2006a). However, Rapley *et al.* (2009), found no effects on growth of *E. nitens* when leaf damage was less than 60%. Growth reductions between 4% and 17% in *E. globulus* have been reported with leaf damage levels of 20% (Carnegie and Ades 2003; Milgate *et al.* 2005; Smith 2006).

The degree of leaf damage on young eucalypts required to cause growth losses and the magnitude of the losses are influenced by severity, pattern, timing and frequency of leaf damage (Wills *et al.* 2004; Pinkard *et al.* 2006b). Studies on *E. marginata*, *E. regnans* and *E. globulus* showed that repeated or chronic defoliations have greater effects on tree growth than an isolated defoliation event (Candy *et al.* 1992; Abbott *et al.* 1993;

Collett and Neumann 2002; Wills *et al.* 2004). Growth losses caused by leaf damage are also related to tree age, site quality and nutritional status (Pinkard and Beadle 1998; Smith 2006). The long term growth response to defoliation has been classified as Type 1, when there is an initial decline in tree growth and a subsequent recovery of the growth rate of a healthy tree, and Type 2, when the reduction of growth rate is permanent (Snowdon 2002). According to Smith (2006), growth rate of *E. globulus* damaged by *Mycosphaerella* spp. follows a Type 1 response with less than 80% foliar damage and a Type 2 response when damage is above that degree of damage.

There are currently more than 500,000 hectares of commercial plantations of *Eucalyptus* in Uruguay, with *E. globulus* the most planted species, covering approximately 250,000 hectares (Petraglia and Dell'Acqua 2006). Susceptibility to diseases is the major productive limitation of this species and this has restricted its planting to more suitable areas in the southeast region (Balmelli *et al.* 2004). The presence of various species of *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* affecting eucalypts, including *M. marksii*, *M. walkeri*, *M. vespa*, *M. aurantia*, *M. heimii*, *M. lateralis*, *M. scytalidii*, *T. suberosa*, *T. ohnowa* and *T. pluritubularis* has been reported in Uruguay (Wingfield 1999; Balmelli *et al.* 2004; Pérez *et al.* 2009a). Similarly, eucalypt rust (*P. psidii*) also affects these trees in the country (Telechea *et al.* 2003). However, it was only since 2007, when *T. nubilosa* was first recorded (Pérez *et al.* 2009b), that significant damage began to appear in first and second year *E. globulus* plantations. Systematic surveys conducted since 2008 in *E. globulus* plantations in Uruguay have shown that foliar diseases, mainly due to *T. nubilosa*, are widely distributed in the country and are causing high degree of defoliation (Balmelli *et al.* 2009a; Pérez *et al.* 2009b; Simeto *et al.* 2010). Despite the economic importance of *E. globulus* in Uruguay, its susceptibility to various diseases and the severity of damage recorded in commercial plantations, the production losses caused by foliar diseases have not been adequately quantified. On the other hand, as most studies that analyze the impact of the loss of foliage are based on defoliation by insects or by artificial defoliation, there is a relatively small body of literature quantifying impacts of leaf diseases on eucalypt growth. The present work was performed on a field trial of *E. globulus* in southeastern Uruguay naturally infected by TLD and eucalypt rust (*Puccinia psidii*). To better understand the long term effects of foliar diseases and the need to implement control strategies, the objectives of the study were: a) to establish a threshold of damage for

both leaf spotting and defoliation and b) to quantify tree growth and survival losses over a period of six years.

MATERIALS AND METHODS

Study site and population assessed

Data were obtained from a progeny test of *E. globulus* established in September 2002 in Rocha (Lat. 34°10'19.65"S; Long. 54°2'4.27"O; Alt.170 m) by the National Institute of Agricultural Research in Uruguay (INIA). The trial was established on a loamy sandy soil, which had been previously used for animal production on natural pastures. Soil preparation consisted of: herbicide application (glyphosate, 3 L/ha), tillage made in bands and pre-planting herbicide application (glyphosate, 2.25 L/ha). Fertilizer (140 g/plant 16:27:2 N:P:K + microelements) and herbicide (Goal + Arnes: 1.5 + 1.5 L/ha on 1.4 m wide planted band) were applied immediately after planting. Trees were planted at a spacing of 3.65 m x 2.0 m (1370 stems/ha). In the following autumn, glyphosate was applied (3 L/ha) beneath the trees, with a low volume applicator (Micromax). Grass control was subsequently performed by cattle grazing. The genetic material consisted of 230 open pollination families of different seed sources (INIA's breeding population, local selections and introductions from Australia and Chile). The experimental design for the trial was a randomized complete block with single-tree plots and 24 replications. In this way, each block had 230 plants and the full test originally had 5520 plants occupying an area of 4.0 ha.

Disease assessment and growth measurements

In May 2003 (8 months after planting) the severity of symptoms caused by TLD and by eucalypt rust was assessed. The degree of damage was quantified on each tree, using two parameters: I) severity of leaf spots (percentage of leaf area affected) and II) defoliation (percentage of leaves prematurely abscised). The evaluations were carried out for the whole crown, using visual scales adapted from Lundquist and Purnell (1987) and from Carnegie *et al.* (1994). For both, severity of leaf spots and defoliation, trees were categorized according to disease classes of 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80% or more. Although rust symptoms are different to those of TLD, the severity of spotting was jointly assessed because it was not possible to separate both symptoms accurately. On the other hand, as eucalypt rust does not produce leaf fall, defoliation relates only to the damage caused by TLD (Coutinho *et al.* 1998). A second inspection

undertaken during foliar change, at 20 months after planting, revealed that in the meantime there were no new outbreaks of disease. The total height of all trees was measured in May 2003 (together with damage evaluation) and again in May 2005 (2 years after damage assessment). Thereafter, growth was assessed by measuring diameter at breast height in May 2005, June 2007 and June 2009 (2, 4 and 6 years after damage assessment, respectively). After each measurement of tree growth, percentage of survival (number of living trees divided by number of trees originally planted) was calculated.

Data analyses

The effects of foliar damage on growth and mortality were analyzed at the phenotypic level, considering the population as a genetically heterogeneous unit. Tree heights and diameters at each measurement date were used to calculate the growth rate from the time when disease assessment was performed. Height increment was calculated for the first 2 years and diameter increments were calculated for two different periods: from 2 to 4 years and from 4 to 6 years after damage assessment. The number of plants surviving at each measurement date was used to calculate the mortality between measurements and the cumulative mortality.

Normality of the data set was tested using Normal Probability Plots, which showed no important departures from normality, and homogeneity of variance was tested by predicted versus residual plots, which showed constant error variance. Analysis of variance (ANOVA) were carried out to test the effect of foliar damage (spot severity and defoliation scores) on growth traits (mean tree height and diameter and mean height and diameter increments) and on mean mortality between consecutive measurements. Undamaged trees, i.e. trees in disease class 0, were considered as disease free controls. Multiple mean comparisons were made with the Tukey-Kramer test. A threshold model was used to describe the relationship between foliar damage (spot severity and defoliation) at 8 months and tree diameter 6 years after damage. Statistical analyses were performed using the GLM and REG procedures in SAS (SAS Institute 1997).

RESULTS

Effects of foliar damage on growth

The trial had a very high incidence of leaf disease at the time of damage assessment, 8 months after planting. Of the total trees, 88.2% showed some leaf spots and 94.4% had

some defoliation. The mean spot severity for all trees in the trial was 28.7% and the mean defoliation was 37%. However, the damage was highly variable and ranged from trees with no damage to trees with the foliage almost completely spotted or shed (Table 1).

Table 1. Number of trees of *Eucalyptus globulus* with each level of damage (spot severity and defoliation), caused by foliar diseases at 8 months of age, in a trial installed in 2002 in Rocha, Uruguay.

Disease class spot severity (%)	N° of trees	Disease class defoliation (%)	N° of trees
0	536	0	254
10	614	10	230
20	1320	20	708
30	511	30	393
40	748	40	1919
50	201	50	320
60	341	60	489
70	75	70	58
80+	204	80+	179
Total	4550		4550

Spot severity. Significant differences between spot severity classes were found for tree heights and diameters in all evaluations. For the growth increments, significant differences were found in all periods except for diameter increments at the last evaluation period (4 to 6 years after damage assessment) (Table 2). At the time of foliar damage assessment, the mean tree height of undamaged trees (0% spot severity) did not differ significantly from that of trees with leaf spotting class equal or less than 70%, but heavily spotted trees (at least 80% spot severity) had a mean height significantly lower than undamaged trees. Tree measurements taken 2 and 4 years after damage assessment showed that trees within spot severity classes of 40% to 80% were significantly shorter and had a significantly smaller diameter than trees of lower leaf spotting classes. At the final growth evaluation (6 years after damage) the mean diameter of trees in spotting classes of 50% and above was significantly smaller than that of undamaged or lightly damaged trees.

Tree height increment during the first 2 years after damage assessment was affected by leaf disease. Undamaged and lightly damaged trees (up to 30% leaf spots class) had similar height increments, being significantly greater than those on trees with more

severe damage. Between 2 and 4 years after damage was assessed, diameter increments of undamaged or lightly damaged trees only differed significantly from those recorded in the more severely damaged trees (leaf spot class of 80% or higher). At the last evaluation period (4 to 6 years after damage), growth rate was not significantly affected by foliar damage.

Table 2. Comparisons between spot severity classes (0 to 80%) of *E. globulus* trees for mean \pm SE tree height at damage assessment and 2 years after damage assessment (a.d.a.), mean \pm SE tree diameter (2, 4 and 6 years a.d.a.), mean \pm SE height increment (first 2 years a.d.a.) and mean \pm SE diameter increment (2 to 4 and 4 to 6 years a.d.a.).

Spot severity class (%)	Height (m) At damage assessment	Height (m) 2 years a.d.a.	Diameter (cm) 2 years a.d.a.	Diameter (cm) 4 years a.d.a.	Diameter (cm) 6 years a.d.a.	Height increment (m) first 2 years a.d.a.	Diameter increment (cm) 2 to 4 years a.d.a.	Diameter increment (cm) 4 to 6 years a.d.a.
0	2.53abc ± 0.06	9.88a ± 0.09	11.53a ± 0.18	16.02a ± 0.19	18.04a ± 0.22	7.31a ± 0.05	4.28ab ± 0.08	1.71a ± 0.07
10	2.55ab ± 0.06	9.79a ± 0.09	11.38a ± 0.19	16.00a ± 0.17	17.97a ± 0.19	7.20a ± 0.07	4.31ab ± 0.09	1.68a ± 0.06
20	2.51abc ± 0.05	9.80a ± 0.06	11.28a ± 0.13	15.92a ± 0.11	17.97a ± 0.12	7.24a ± 0.03	4.49a ± 0.08	1.74a ± 0.04
30	2.59a ± 0.04	9.86a ± 0.06	11.38a ± 0.12	16.00a ± 0.11	18.11a ± 0.15	7.23a ± 0.05	4.46ab ± 0.12	1.76a ± 0.06
40	2.47bc ± 0.05	9.51b ± 0.07	10.67b ± 0.15	15.35b ± 0.17	17.55ab ± 0.18	6.98b ± 0.04	4.39ab ± 0.09	1.75a ± 0.06
50	2.49abc ± 0.06	9.37bc ± 0.14	10.36b ± 0.25	14.73bc ± 0.30	16.59bc ± 0.36	6.78bc ± 0.10	4.11abc ± 0.17	1.49a ± 0.09
60	2.40c ± 0.05	9.01cd ± 0.11	9.60c ± 0.20	14.16cd ± 0.35	16.30cd ± 0.44	6.54cd ± 0.10	4.11bc ± 0.15	1.70a ± 0.10
70	2.33bc ± 0.06	8.55d ± 0.13	8.69c ± 0.22	13.10de ± 0.38	14.71de ± 0.49	6.10d ± 0.13	4.14abc ± 0.22	1.45a ± 0.15
80+	2.01d ± 0.05	7.67e ± 0.20	7.27d ± 0.28	11.57e ± 0.39	13.50e ± 0.43	5.37e ± 0.17	3.45c ± 0.21	1.34a ± 0.10

The means within each column designated by different letters are significantly different ($P < 0.05$). SE = standard error ($n = 24$).

Growth curves of average diameter of trees with different severities of leaf spotting were divergent until the third year (2 years after damage) and thereafter were approximately parallel (Figure 1). Therefore, following an initial detrimental effect of leaf spots, the growth rate of trees with different severities of leaf spotting was similar. Although the impact of leaf spots on growth decreased over time, the cumulative loss of

diameter of severely spotted trees (leaf spot class of 80% or higher), expressed as percentage of diameter of undamaged trees, was 25.2% after 6 years.

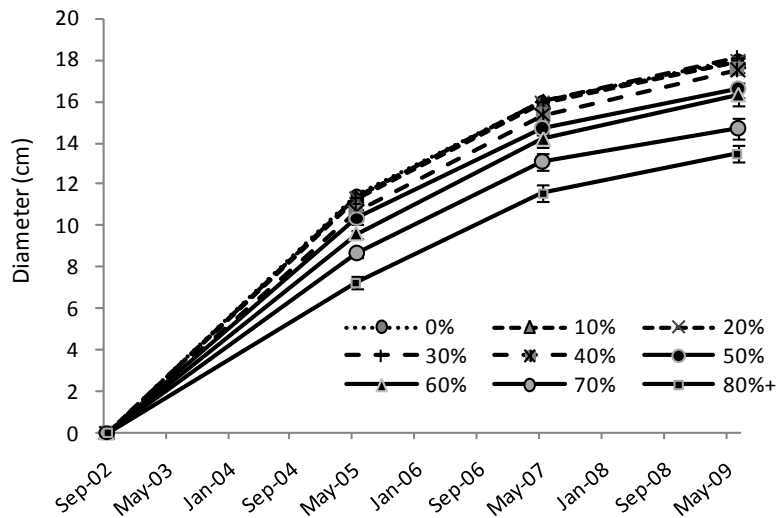


Figure 1. Mean diameter (\pm SE) of *E. globulus* trees with different severity of leaf spotting (classes 0 to 80%) caused by foliar diseases, at 2, 4 and 6 years after damage assessment.

Defoliation. The premature fall of affected leaves also had a detrimental effect on growth, with significant differences between defoliation classes for all growth traits (mean tree height at damage assessment and 2 years later, mean diameter at 2, 4 and 6 years after damage) and for all growth rate traits (height increment on the first 2 years after damage and diameter increment from 2 to 4 and from 4 to 6 years after damage) (Table 3). Initial growth was affected in those trees which suffered heavy defoliation. At the time of damage assessment, mean tree height of heavily defoliated trees (defoliation of 80% or more) differed significantly to the height of trees with lower levels of defoliation or without defoliation. At 2, 4 and 6 years after damage assessment, trees that suffered a defoliation of 50% or more were significantly shorter and had smaller diameters than undefoliated or lightly defoliated trees.

During the first 2 years after damage assessment, the height increment was significantly affected when the defoliation class was equal to or greater than 50%. From 2 to 4 years after damage, diameter increments only were significantly reduced in trees that were 60% defoliated. On the last evaluation period (from 4 to 6 years after damage assessment) diameter increments of undamaged trees significantly differed from trees that presented 60 and 70% defoliation.

Table 3. Comparisons between defoliation classes (0 to 80%) of *E. globulus* trees for mean \pm SE height at damage assessment and 2 years after damage assessment (a.d.a.), mean \pm SE tree diameter (2, 4 and 6 years a.d.a.), mean \pm SE height increment (first 2 years a.d.a.) and mean \pm SE diameter increment (2 to 4 and 4 to 6 years a.d.a.).

Defoliation class (%)	Height (m) at damage assessment	Height (m) 2 years a.d.a.	Diameter (cm) 2 years a.d.a.	Diameter (cm) 4 years a.d.a.	Diameter (cm) 6 years a.d.a.	Height increment (m) first 2 years a.d.a.	Diameter increment (cm) 2 to 4 years a.d.a.	Diameter increment (cm) 4 to 6 years a.d.a.
0	2.53bcd ± 0.07	9.90ab ± 0.13	11.56ab ± 0.24	16.19ab ± 0.20	18.42a ± 0.24	7.34ab ± 0.09	4.38a ± 0.13	1.81a ± 0.10
10	2.70ab ± 0.05	9.89ab ± 0.13	11.64a ± 0.26	16.07ab ± 0.32	18.15ab ± 0.43	7.19ab ± 0.10	4.10a ± 0.15	1.67ab ± 0.11
20	2.60abc ± 0.05	9.91a ± 0.09	11.62a ± 0.19	16.14ab ± 0.19	18.22a ± 0.22	7.27ab ± 0.05	4.28a ± 0.09	1.71ab ± 0.08
30	2.63bcd ± 0.04	10.07a ± 0.07	11.89a ± 0.15	16.36a ± 0.18	18.42a ± 0.23	7.38a ± 0.05	4.39a ± 0.13	1.82a ± 0.08
40	2.47d ± 0.04	9.69b ± 0.04	11.02b ± 0.09	15.68bc ± 0.09	17.74ab ± 0.09	7.15b ± 0.03	4.45a ± 0.06	1.74ab ± 0.04
50	2.52bcd ± 0.05	9.39c ± 0.11	10.37c ± 0.20	15.05c ± 0.33	17.10b ± 0.40	6.82c ± 0.09	4.48a ± 0.19	1.67ab ± 0.11
60	2.32e ± 0.05	8.80d ± 0.12	9.23d ± 0.19	13.77d ± 0.32	15.79c ± 0.26	6.41d ± 0.12	4.10b ± 0.18	1.51bc ± 0.09
70	2.36cde ± 0.09	8.79cd ± 0.14	9.04de ± 0.25	13.06d ± 0.49	14.39c ± 0.47	6.28cde ± 0.17	3.89ab ± 0.31	1.18c ± 0.11
80+	1.96f ± 0.05	7.90e ± 0.22	7.69e ± 0.28	12.65d ± 0.42	14.65c ± 0.54	5.66e ± 0.20	4.18a ± 0.27	1.51abc ± 0.14

The means within each column designated by different letters are significantly different ($P < 0.05$). SE = standard error (n=24).

The impact of early defoliation on subsequent tree growth declined with time. Growth curves of average diameter of trees in high defoliation classes diverged from the curves of those with low or no defoliation for the first two years but thereafter remained approximately parallel (Figure 2). Even so, the accumulated reduction in diameter of trees severely defoliated (70 or 80% defoliation), expressed as percentage of diameter of undamaged trees, reached 20.0% after six years.

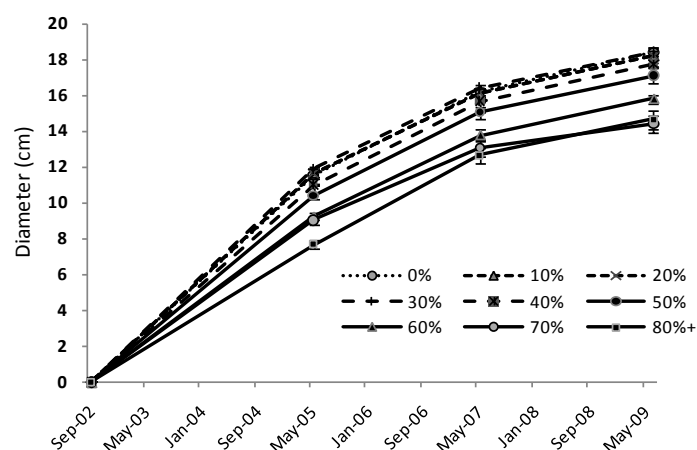


Figure 2. Mean diameter (\pm SE) of *E. globulus* trees with different severity of defoliation (classes 0 to 80%) caused by foliar diseases, at 2, 4 and 6 years after damage assessment.

Spot severity and defoliation. A negative correlation was observed between severity of leaf spots at 8 months and tree diameter 6 years after damage ($r = -0.175$; $p < 0.001$) and between defoliation at 8 months and tree diameter 6 years after damage ($r = -0.190$; $p < 0.001$). The threshold model revealed that at the last growth evaluation (6 years after damage assessment) an average diameter of 17.7 cm was maintained up until 40% of foliar damage (spot severity and defoliation) (Figure 3). When foliar damage exceeded 40% a negative relationship was observed, with a reduction of diameter of 0.88 cm with each 10% increase in spot severity and a reduction of 0.90 cm with each 10% increase in defoliation (Figure 3).

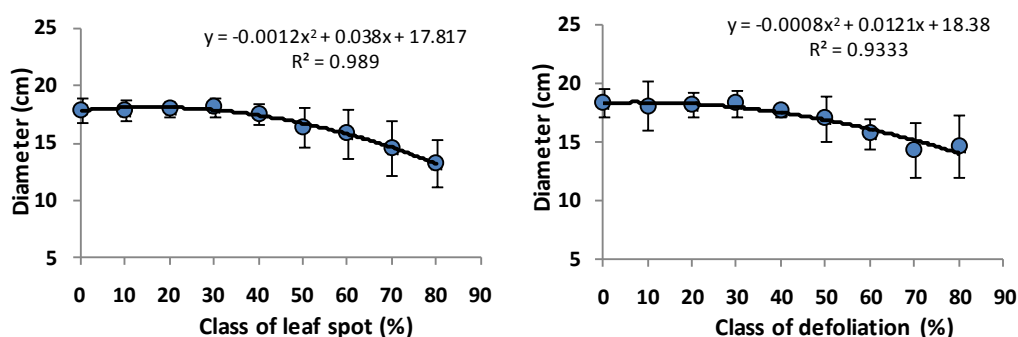


Figure 3. Threshold model fitted between severity of leaf spots (left) and defoliation (right) and tree diameter of *E. globulus* six years after damage assessment.

Effects of foliar damage on mortality

Spot severity. Leaf disease at 8 months after planting significantly affected average mortality in all subsequent assessed periods (Table 4). In the first 2 years after damage, the trees in 0% severity class had on average a mortality rate of 4.2%. Mortality values were similar up to 60% of spot severity class and increased, significantly differing, in trees in higher spotting classes (70 and 80%). From 2 to 4 years and from 4 to 6 years after damage, mortality was significantly higher only on the more severely damaged trees (leaf spot class of 80% or more). Trees with that class of damage had, at the final evaluation (6 years after damage assessment), an accumulated mortality of 71.7%, being significantly higher than the mortality of undamaged or lightly damaged trees (Figure 4).

Table 4. Comparisons between classes of spot severity (0 to 80%) of *E. globulus* trees for mortality \pm SE on the first 2 years, from 2 to 4 years and from 4 to 6 years after damage assessment and for accumulated mortality \pm SE at six years after damage.

Spot severity class (%)	Mortality (%) first 2 years after damage	Mortality (%) 2 to 4 years after damage	Mortality (%) 4 to 6 years after damage	Mortality (%) 6 years after damage
0	4.2a \pm 1.37	6.5a \pm 1.29	4.2a \pm 0.87	14.2a \pm 1.91
10	5.4a \pm 1.35	6.9a \pm 1.14	4.1a \pm 1.04	15.4a \pm 2.18
20	6.0a \pm 0.84	4.8a \pm 0.58	5.3a \pm 0.58	15.2a \pm 1.03
30	3.5a \pm 1.07	5.1a \pm 1.02	7.4a \pm 1.10	15.2a \pm 1.58
40	7.7ab \pm 1.31	6.4a \pm 1.06	6.9a \pm 0.98	19.6ab \pm 1.65
50	12.3ab \pm 2.72	8.8a \pm 2.79	6.6a \pm 1.78	25.8ab \pm 3.22
60	11.5ab \pm 2.25	9.8a \pm 2.11	10.3a \pm 1.94	28.4b \pm 2.84
70	19.8b \pm 5.60	4.6a \pm 2.05	3.3a \pm 2.37	25.6ab \pm 5.61
80+	49.8c \pm 4.97	31.2b \pm 5.63	22.6b \pm 5.23	71.7c \pm 13.99

The means within each column designated by different letters are significantly different ($P < 0.05$). SE = standard error (n=24).

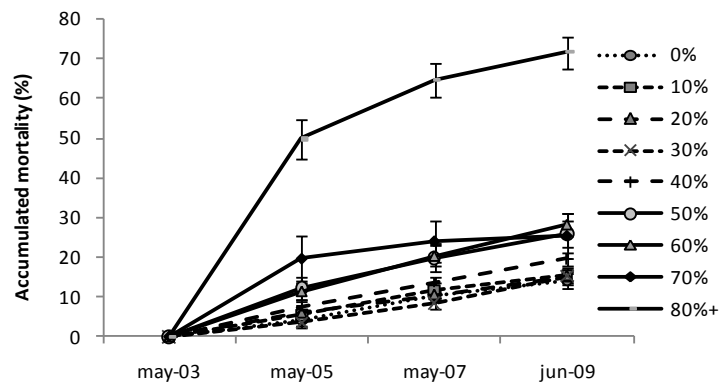


Figure 4. Average mortality (\pm SE) of *E. globulus* trees with different severity of leaf spotting (classes 0 to 80%) caused by foliar diseases, accumulated at 2, 4 and 6 years after damage assessment.

Defoliation. Significant differences in average mortality between defoliation classes were found in the first 2 years, and from 2 to 4 years after damage assessment, but not in the last period of evaluation (from 4 to 6 years after damage) (Table 5). In the first 2 years, mortality of trees without defoliation did not significantly differ from mortality of trees in defoliation classes up to 60%. Between 2 and 4 years after damage, trees in the highest defoliation class (80% or more) had a mortality rate significantly higher than trees in any other class of defoliation. At the final evaluation (6 years after damage) accumulated mortality values for trees in defoliation classes up to 50% were similar and increased, significantly differing, for trees in higher defoliation classes (60 to 80%). The accumulated mortality of the more severely defoliated trees (80% defoliation class) reached 74.3%, being also significantly higher than that of trees with 60 and 70% defoliation (Figure 5).

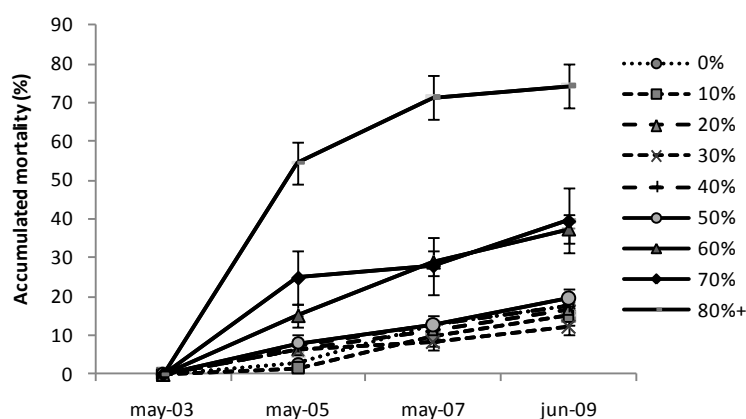


Figure 5. Average mortality (\pm SE) of *E. globulus* trees with different severity of defoliation (classes 0 to 80%) caused by foliar diseases, accumulated at 2, 4 and 6 years after damage assessment.

Table 5. Comparisons between classes of defoliation (0 to 80%) of *E. globulus* trees for mortality \pm SE on the first 2 years, from 2 to 4 years and from 4 to 6 years after damage assessment and for accumulated mortality \pm SE at six years after damage.

Defoliation class (%)	Mortality (%) first 2 years after damage	Mortality (%) 2 to 4 years after damage	Mortality (%) 4 to 6 years after damage	Mortality (%) 6 years after damage
0	3.0a \pm 0.96	9.9a \pm 4.42	5.5a \pm 1.65	17.5a \pm 4.46
10	1.6a \pm 0.88	8.0a \pm 2.24	5.9a \pm 1.51	14.9a \pm 2.36
20	6.2a \pm 2.18	5.8a \pm 1.22	6.1a \pm 0.75	16.7a \pm 2.48
30	6.3a \pm 1.47	2.2a \pm 0.76	4.0a \pm 1.47	12.0a \pm 1.90
40	7.1a \pm 0.66	5.7a \pm 0.56	5.8a \pm 0.60	17.5a \pm 0.92
50	8.0a \pm 2.44	5.0a \pm 1.32	8.0a \pm 1.63	19.6a \pm 2.62
60	15.1ab \pm 2.97	15.8a \pm 2.87	13.6a \pm 4.08	37.3b \pm 3.69
70	24.9b \pm 6.96	4.6a \pm 3.40	16.1a \pm 7.15	39.5b \pm 8.31
80+	54.5c \pm 5.42	41.6b \pm 7.33	11.2a \pm 4.13	74.3c \pm 5.50

The means within each column designated by different letters are significantly different ($P < 0.05$). SE = standard error (n=24).

DISCUSSION

Eucalypt rust (*Puccinia psidii*) and TLD were both present in the trial during the first months; therefore, the severity of leaf spotting measured at 8 months included the symptoms of both diseases. In contrast, as *P. psidii* does not cause defoliation in eucalypts (Ferreira 1983; Coutinho *et al.* 1998), and because the canopies had not yet

closed (which can result in shading of lower leaves and subsequent leaf fall), the defoliation recorded was only the result of TLD. The severity of the leaf spotting and defoliation caused by these diseases were assessed when plants had been in the field for 8 months, although symptoms had probably begun to appear some months earlier. The fact that severely damaged trees had less growth at the time of evaluation indicates that by that time they had already begun to express the negative effect of disease on growth.

The greatest impact of early foliar damage (both leaf spotting and defoliation) on the growth rate of trees occurred during the first 2 years after damage. This could be explained by the fact that both eucalypt rust and TLD mainly affect juvenile foliage, which in *E. globulus* is replaced by adult foliage between the second and third year. While the growth rate declined in trees with a leaf spot severity of 40% or more, or when the defoliation was 50% or more, trees that had low damage were not affected. In this way, 30% of leaf spots or 40% of defoliation seem to be the limits of tolerance for growth. Since defoliation implies a total loss of photosynthetic area, a greater effect on growth, compared with the effect of leaf spots, would be expected. However, the effects of leaf spots and defoliation on tree growth were very similar. This could be explained by the shed of severely spotted leaves occurred after disease assessment, which could potentially confound the results, or by a higher light entry in defoliated crowns, which increases the rate of photosynthesis of surviving leaves and promotes bud sprouting, thus allowing to some degree the compensation of the loss of leaf area (Pinkard *et al.* 2007). There are several studies that report effects on growth at degrees of damage well below those found here. Carnegie and Ades (2003) and Pinkard *et al.* (2006a) found that growth of *E. globulus* was affected with a foliar damage as low as 10%. Similar results were reported by Smith (2006), also for *E. globulus*, and by Lundquist and Purnell (1987) for *E. nitens*, who found negative effects on growth when defoliation produced by *Mycosphaerella* spp. exceeded 20% and 25%, respectively. However, on sites of high productivity, Pinkard (2003) found no growth losses in *E. globulus* with up to 40% defoliation, while Rapley *et al.* (2009) found no effect on growth with less than 60% defoliation in *E. nitens*.

The impact to early foliar damage, even for spotting and defoliation of 80%, was no permanent (Type 1 response according with Snowdon 2002) since the reduction in growth was significant only for 2 years in the case of defoliation and for 4 years in the case of leaf spotting. This result contrasts with those reported by Smith (2006) who

found on *E. globulus* a permanent reduction of growth (Type 2 response) when foliar damage by *Mycosphaerella* was 80% or higher. However, after 6 years, trees with more than 40% of foliar damage had a reduction of approximately 0.90 cm in diameter for each 10% increase of damage. Thus by year seven, very close to the average harvest age of 9 years for cellulose production in Uruguay, trees that suffered severe foliar damage (80% or greater) during the first months of growth, had an accumulated diameter reduction of 20 to 25% compared with undamaged trees. Several authors have reported growth losses in *E. globulus* of between 4 and 17% for leaf damage of only 20% (Carnegie and Ades 2003; Milgate *et al.* 2005; Smith 2006). The differences among results of different studies may be related to the influence of site factors, such as the availability of water and nutrients (Smith 2006). Pinkard (2003) suggested that the effects of damage caused by *Mycosphaerella* leaf disease might be reduced on sites of high productivity because trees have a greater opportunity to recover. Carnegie and Ades (2001) reported lower *Mycosphaerella* effects on trees fertilized with phosphorus and Pinkard *et al.* (2006a, 2007) observed lower effects of defoliation on trees fertilized with nitrogen than on unfertilized trees. The trial used for this study was located on a fertile well drained soil and received a very intensive silvicultural management, evidenced by the high growth rates achieved. All of these factors could have contributed to minimize the negative effects of the diseases.

In addition to the effect on growth, severe foliar damage during the first eight months had a detrimental impact on survival, mainly in the immediate 2 years, indicating that the first months of growth are a critical period for trees. However, Collett and Neumann (2002) found no effect of defoliation, even up to 100%, on *E. globulus* survival up to 11 months post damage. In this study, mortality up to 2 years after damage was not affected in those trees that had low severity of spots or low defoliation. However, when either leaf spotting or defoliation exceeded 70%, mortality increased sharply, reaching values of 50% in severely damaged trees. Thus, 60% of foliar spotting or defoliation seems to be the threshold after which the survival of trees begins to be compromised. Carnegie *et al.* (1994) suggest that the loss of leaf area leads to a reduction in growth rate and this in turn puts the tree on disadvantage to compete with their neighbors and it increases their susceptibility to other pathogens and/or adverse abiotic factors. Considering the whole period of evaluation, leaf spotting affected the subsequent survival only when the severity was 80% or more, while a defoliation of 60% was enough to affect survival. Although the death of the trees cannot be attributed directly

to the leaf diseases, the accumulated mortality 6 years after damage of trees with more severe foliar damage, both leaf spots and defoliation, exceeded 70%, being four times higher than mortality of undamaged trees. This aspect is of great importance in Uruguay, where the productivity of *E. globulus* depends mainly on the number of trees per hectare which survive until harvest (Balmelli and Resquin 2005).

In recent years in Uruguay there has been severe damage in young plantations of *Eucalyptus*, caused by *T. nubilosa*. Although this pathogen was not present when the assessment of damage took place in this study (its presence in Uruguay was reported in 2007, Pérez *et al.* 2009b), disease surveys conducted since 2008 have shown that *T. nubilosa* is widely distributed in the country, causing an average foliage loss of 40% in spring 2008 and 46% in spring 2009 in the southeast region, the area of greatest importance for *E. globulus* (Balmelli *et al.* 2009a and Simeto *et al.* 2010). According to the results obtained in the present study, *E. globulus* trees could withstand this degree of leaf damage without a significant long term loss of growth. However, *T. nubilosa* is currently causing a progressive increase of foliar damage throughout the year (in autumn 2009 the average damage in the above-mentioned survey was 12%, reaching 46% in spring (Balmelli *et al.* 2009b and Simeto *et al.* 2010) and in the second year, with 80% defoliation being common (Balmelli *et al.* 2011). Several authors have shown that repeated defoliation has a greater detrimental effect on *Eucalyptus* growth than an isolated defoliation event (Candy *et al.* 1992; Abbott *et al.* 1993; Collett and Neumann 2002; Wills *et al.* 2004). According to Landsberg and Ohmart (1989), the worst scenario is a chronic, severe loss of functional foliage, causing the cessation of growth, followed by crown dieback and finally tree mortality. In this study there was a single event of damage, so our results do not allow predicting the effects caused by the occurrence of repeated or chronic infections. However, it is very likely that the severity and high frequency of damage events currently recording by *T. nubilosa* in the first and second year in *E. globulus* commercial plantations causes considerable production losses, putting at risk the economical viability of this species.

Eucalyptus globulus used to be planted in all forestry zones of Uruguay, but during the last years, due to the increase of the incidence and severity of diseases, the species has been replaced by *E. grandis* and *E. dunnii* in all but the southeast region. The extent of damage now being suffered in that region, mainly due to *T. nubilosa*, suggests that if effective disease management methods are not found, in a few years the species could no longer be planted in Uruguay. This already happened in South Africa in the 1930's

and more recently in high risk areas in Tasmania where *E. globulus* was replaced by *E. nitens* (Lundquist 1987; Mohammed *et al.* 2003). Due to economic, environmental and operational constraints, silvicultural options for minimizing the effects of disease damage in eucalypt plantations are very limited. Various strategies have been proposed, including site selection (i.e. avoid planting on high-risk sites) (Carnegie 2007), the application of fungicides (Carnegie and Ades 2003), the increase of tree vigour and tolerance through intensive forestry or by plant defense activators (Stone 2001; Mohammed *et al.* 2003) or accelerating recovery of trees by remedial fertilizer applications (Pinkard *et al.* 2006a, 2006b, 2007; Carnegie 2007). However, the most economical and feasible approach to reducing diseases to an acceptable level in eucalypt plantations is the use of resistant planting stock (Carnegie *et al.* 1994; Dungey *et al.* 1997; Tibbits *et al.* 1997; Alfenas *et al.* 2004; Milgate *et al.* 2005). With the objective of developing genotypes of *E. globulus* resistant to foliar diseases, INIA and a group of forestry companies initiated a collaborative program of selection and evaluation of clones. Thus, it is expected that deployment of disease resistant clones will reduce the incidence and severity of foliar diseases, allowing the continuity of *E. globulus* cultivation in Uruguay.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Redalco forestry enterprise, especially Marcelo Fredes, for providing the location and for performing the soil preparation and maintenance of the trial. Also to Valentin Pando for his support on statistical analyses. The study was partially funded by a grant (Programa de Formación del Sistema de los INIA de Iberoamérica) awarded to the first author for the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) of Spain.

REFERENCES

- Abbott, I.; Van Heurck, P.; Burbridge, T. 1993. Impact of frequency and intensity of defoliation on growth of jarrah (*Eucalyptus marginata*): an experimental study with saplings. *Forest Ecology and Management* 56: 175-183.
- Alfenas, A.C.; Zauza, E.A.; Mafia, R.G.; Assis, T.F. 2004. Clonagem e doenças do eucalipto. Editora UFV Viçosa, MG. Brasil.

- Balmelli, G.; Marroni, V.; Altier, N.; García, R. 2004. Potencial del mejoramiento genético para el manejo de enfermedades en *Eucalyptus globulus*. *Serie Técnica INIA* 143: 1-43. Montevideo, Uruguay.
- Balmelli, G.; Martínez, G.; Simeto, S.; Torres, D.; Pérez, C.A.; Fros, D.; Bentancur, O. 2009a. Daño foliar causado por enfermedades y plagas en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* en Uruguay. Póster en XIII Congreso Forestal Mundial. 18-23 Octubre. Buenos Aires, Argentina.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Martínez, G.; Torres, D.; González, P.; Fros, D.; Bentancur, O.; Pérez, C. 2009b. Relevamiento sanitario de otoño en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus dunnii* en el Sureste y Litoral Oeste. *Serie Actividades de Difusión INIA* 594: 49-70. Tacuarembó, Uruguay.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Martínez, G.; Torres, D.; Pérez, C.; Bentancur, O. 2011. Incidence and severity of pests and diseases on young plantations of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. IUFRO Forest Protection Joint Meeting. 8-11 November. Colonia, Uruguay. <http://www.iufrouuguay2011.org/dissertation/>
- Balmelli, G.; Resquin, F. 2005. Evaluación productiva de orígenes de *Eucalyptus globulus* en zonas Litoral y Norte. *Serie Técnica INIA* 149: 1-16. Montevideo, Uruguay.
- Barber, P.A.; Carnegie, A.J.; Burgess, T.I.; Keane, P.J. 2008. Leaf diseases caused by *Mycosphaerella* species in *Eucalyptus globulus* plantations and nearby native forest in the Green Triangle Region of southern Australia. *Australasian Plant Pathology* 37: 472-481.
- Candy, S.G.; Elliot, H.J.; Bashford, R.; Greener, A. 1992. Modelling the impact of defoliation by the leaf beetle, *Chrysophtharta bimaculata* (Coleoptera: Chrysomelidae), on height growth of *Eucalyptus regnans*. *Forest Ecology and Management* 54: 69-87.
- Carnegie, A.J. 2007. Forest health condition in New South Wales, Australia, 1996-2005. II. Fungal damage recorded in eucalypt plantations during forest health surveys and their management. *Australasian Plant Pathology* 36: 225-239.
- Carnegie, A.J.; Ades, P.K. 2001. Added phosphorus is associated with reduced severity of *Mycosphaerella cryptica* in *Eucalyptus globulus*. *Australian Forestry* 64: 203-208.
- Carnegie, A.J.; Ades, P.K. 2003. *Mycosphaerella* leaf disease reduces growth of plantation-grown *Eucalyptus globulus*. *Australian Forestry* 66: 113-119.
- Carnegie, A.J.; Keane, P.J.; Ades, P.K.; Smith, I.W. 1994. Variation in susceptibility of *Eucalyptus globulus* provenances to *Mycosphaerella* leaf disease. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 1751-1757.

- Collett, N.G.; Neumann, F.G. 2002. Effects of simulated chronic defoliation in summer on growth and survival of blue gum (*Eucalyptus globulus* Labill.) within young plantations in northern Victoria. *Australian Forestry* 65: 99-106.
- Coutinho, T.A.; Wingfield, M.J.; Alfenas, A.C.; Crous, P.W. 1998. *Eucalyptus* rust: a disease with the potential for serious international implications. *Plant Disease* 82: 819-825.
- Crous, P.W. 1998. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. The American Phytopathological Society, St Paul, MN, USA.
- Crous, P.W.; Groenewald, J.Z.; Braun, U. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology* 58: 1-32.
- Dungey, H.S.; Potts, B.M.; Carnegie, A.J.; Ades, P.K. 1997. *Mycosphaerella* leaf disease - genetic variation in damage to *Eucalyptus nitens*, *Eucalyptus globulus*, and their F-1 hybrid. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 750-759.
- Ferreira, F.A. 1983. Ferrugem do Eucalipto. *Revista Arvore* 7: 91-109.
- Hunter, G.C.; Crous, P.W.; Carnegie, A.J.; Wingfield, M.J. 2009. *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of *Eucalyptus* spp. in native and introduced areas. *Molecular Plant Pathology* 10: 1-14.
- Hunter, G.C.; Crous, P.W.; Carnegie, A.J.; Burgess, T.I.; Wingfield, M.J. 2011. *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* disease of *Eucalyptus*; easily confused and with serious consequences. *Fungal Diversity* 50: 145-166.
- Jordan, G.J.; Potts, B.M.; Clarke, A.R. 2002. Susceptibility of *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* to sawfly (*Perga affinis* ssp. *insularis*) attack and its potential impact on plantation productivity. *Forest Ecology and Management* 160: 189-199.
- Landsberg, J.; Ohmart, C. 1989. Levels of insect defoliation in forests: patterns and concepts. *Trends in Ecology and Evolution* 4: 96-100.
- Lundquist, J.E. 1987. A History of Five Forest Diseases in South Africa. *South African Forestry Journal* 140: 51-59.
- Lundquist, J.E.; Purnell, R.C. 1987. Effects of *Mycosphaerella* leaf spot on growth of *Eucalyptus nitens*. *Plant Disease* 71: 1025-1029.
- Milgate, A.W.; Potts, B.M.; Joyce, K.; Mohammed, C.; Vaillancourt, R.E. 2005. Genetic variation in *Eucalyptus globulus* for susceptibility to *Mycosphaerella nubilosa* and its association with tree growth. *Australasian Plant Pathology* 34: 11-18.
- Mohammed, C.; Wardlaw, T.; Smith, A.; Pinkard, E.; Battaglia, M.; Glen, M.; Tommerup, I.; Potts, B.; Vaillancourt, R. 2003. *Mycosphaerella* leaf diseases of temperate

- eucalypts around the southern Pacific rim. *New Zealand Journal of Forestry Science* 33: 362-372.
- Park, R.F.; Keane, P.J.; Wingfield, M.J.; Crous, P.W. 2000. Fungal diseases of eucalypt foliage. In 'Diseases and Pathogens of Eucalypts.' (Eds PJ Keane, GA Kile, FD Podger, BN Brown) pp. 153-239. CSIRO Publishing: Melbourne, Australia.
- Pérez, C.A.; Wingfield, M.J.; Altier, N.A.; Blanchette, R.A. 2009a. Mycosphaerellaceae and Theratosphaeraceae associated with *Eucalyptus* leaf diseases and stem cankers in Uruguay. *Forest Pathology* 39: 349-360.
- Pérez, G.; Hunter, G.; Slippers, B.; Pérez, C.A.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J. 2009b. *Teratosphaeria (Mycosphaerella) nubilosa*, the causal agent of *Mycosphaerella* leaf disease (MLD), recently introduced into Uruguay. *European Journal of Plant Pathology* 125: 109-118.
- Petraglia, C.; Dell'Acqua, M. 2006. Actualización de la cartografía forestal del Uruguay con imágenes del año 2004. *En: XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*. Florianópolis, Brasil. pp. 1801-1808.
- Pinkard, E.A. 2003. Physiological and growth responses related to pattern and severity of pruning in young *Eucalyptus globulus*. *Forest Ecology and Management* 182: 231-245.
- Pinkard, E.A.; Beadle, C.L. 1998. Effects of green pruning on growth and stem shape of *Eucalyptus nitens* (Deane and Maiden) Maiden. *New Forests* 15: 107-126.
- Pinkard, E.A.; Baillie, C.C.; Patel, V.; Mohammed, C.L. 2006a. Effects of fertilizing with nitrogen and phosphorus on growth and crown condition of *Eucalyptus globulus* Labill. experiencing insect defoliation. *Forest Ecology and Management* 231: 131-137.
- Pinkard, E.A.; Baillie, C.C.; Patel, V.; Paterson, S.; Battaglia, M.; Smethurst, P.J.; Mohammed, C.L.; Wardlaw, T.; Stone, C. 2006b. Growth responses of *Eucalyptus globulus* Labill. to nitrogen application and severity, pattern and frequency of artificial defoliation. *Forest Ecology and Management* 229: 378-387.
- Pinkard, E.A.; Battaglia, M.; Mohammed, C. 2007. Defoliation and nitrogen effects on photosynthesis and growth of *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology* 27: 1053-1063.
- Rapley, L.P.; Potts, B.M.; Battaglia, M.; Patel, V.S.; Allen, G.R. 2009. Long-term realised and projected growth impacts caused by autumn gum moth defoliation of 2-year-old *Eucalyptus nitens* plantation trees in Tasmania, Australia. *Forest Ecology and Management* 258: 1896-1903.

- SAS Institute. 1997. SAS/STAT software: changes and enhancements through Release 6.12. SAS Institute: Cary, NC.
- Simeto, S.; Balmelli, G.; Martínez, G.; Torres, D.; González, P.; Fros, D.; Bentancur, O.; Pérez, C.A. 2010. Relevamiento sanitario de *Eucalyptus* spp. en el Sureste y Litoral Oeste del país. *Serie Actividades de Difusión INIA* 629: 41-51. Tacuarembó, Uruguay.
- Smith, A. 2006. The Development of Strategies for the Management and Research of Foliar Pathogens on Eucalypt Plantations: Using *Mycosphaerella* as a Case of Study. PhD Thesis, University of Tasmania.
- Snowdon, P. 2002. Modelling Type 1 and Type 2 growth responses in plantations after application of fertilizer or other silvicultural treatments. *Forest Ecology and Management* 163: 229-244.
- Stone, C. 2001. Reducing the impact of insect herbivory in eucalypt plantations through management of extrinsic influences on tree vigour. *Australian Ecology* 26: 482-488.
- Stone, C.; Simpson, J.A.; Eldridge, R.H. 1998. Insect and fungal damage to young eucalypt plantings in northern New South Wales. *Australian Forestry* 61: 7-20.
- Stone, C.; Matsuki, M.; Carnegie, A. 2003. Pest and disease assessment in young eucalypt plantations: field manual for using the Crown Damage Index. National Forest Inventory, Bureau of Rural Sciences: Canberra.
- Telechea, N.; Rolfo, M.; Coutinho, T.A.; Wingfield, M.J., 2003. *Puccinia psidii* on *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *Plant Pathology* 52: 427.
- Tibbits, W.N.; Boomsma, D.B.; Jarvis, S. 1997. Distribution, biology, genetics and improvement programs for *Eucalyptus globulus* and *E. nitens* around the world. *Proceedings of the 24th Biennial Southern Forest Tree Improvement Conference* pp. 81-95.
- Wills, J.A.; Burbidge, T.E.; Abbott, I. 2004. Impact of repeated defoliation on jarrah (*Eucalyptus marginata*) saplings. *Australian Forestry* 67: 194-198.
- Wingfield, M.J. 1999. Internal Report on Diseases of Plantation *Eucalyptus* in Uruguay. 28p.

ARTÍCULO II

RESUMEN

Variación genética para resistencia a *Mycosphaerella* y Roya del eucalipto en *Eucalyptus globulus* en Uruguay

En los últimos cinco años las enfermedades foliares han causado daños devastadores en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* en Uruguay. La sostenibilidad de esta especie, la más importante en el país con más de 270.000 hectáreas de plantaciones comerciales, depende del rápido desarrollo de material de propagación resistente. La variación genética para la resistencia del follaje juvenil a enfermedades y para el cambio de follaje fueron examinados en un ensayo de campo de *E. globulus* infectado naturalmente por *Mycosphaerella* (*Mycosphaerella* spp. y *Teratosphaeria* spp.) y Roya del eucalipto (*Puccinia psidii*). El material genético incluyó 226 lotes de semilla de polinización abierta, de 16 procedencias de Australia, Chile y Uruguay. La severidad del daño de enfermedades (% de manchas foliares y % de defoliación) fue evaluado a los 8 meses de edad y la precocidad del cambio de follaje (% de follaje adulto) se evaluó a los 20 meses. El crecimiento de los árboles y su supervivencia fueron evaluados cada dos años hasta el noveno año. Se encontraron diferencias significativas en severidad del daño y en precocidad del cambio de follaje entre países de origen y entre procedencias. Dentro de procedencias, los valores de heredabilidad individual en sentido estricto para severidad de manchas foliares (0.37), defoliación (0.41) y proporción de follaje adulto (0.40) fueron mayores que los obtenidos para crecimiento (0.19 a 0.33) y similares a los obtenidos para sobrevivencia (0.33 a 0.45). Las correlaciones genéticas entre severidad de la enfermedad y crecimiento fueron negativas (-0.20 a -0.44) y fueron también negativas entre severidad de la enfermedad y sobrevivencia (-0.28 a -0.51). Se encontraron correlaciones genéticas positivas entre precocidad del cambio de follaje y crecimiento (0.34 a 0.41) y entre precocidad del cambio de follaje y sobrevivencia (0.29 a 0.37). Nuestros resultados demuestran que tanto la selección por resistencia a la enfermedad en el primer año, como por alta proporción de follaje adulto en el segundo año, son factibles para obtener material de propagación para sitios con riesgo de infección de *Mycosphaerella* y Roya del eucalipto.

Palabras clave: Resistencia, heteroblastia, procedencia, heredabilidad.

Genetic variation for resistance to *Mycosphaerella* leaf disease and *Eucalyptus* rust on *Eucalyptus globulus* in Uruguay

Gustavo Balmelli^{A*}, Sofía Simeto^A, Virginia Marroni^B, Nora Altier^A and Julio J. Diez^C

^A Programa Nacional Forestal. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Ruta 5, Km 386. Tacuarembó, Uruguay.

^B Plant and Food Research. Private Bag 4704. Christchurch, New Zealand.

^C Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible. Universidad de Valladolid e INIA. Avenida Madrid 44. Palencia, España.

ABSTRACT

Over the last five years foliar diseases had caused devastating damages in young plantations of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. The sustainability of this species, the most important in the country with more than 270,000 ha of commercial plantations, depends on the rapid development of resistant genetic stock. The genetic variation in resistance of juvenile foliage to diseases and in the onset to adult foliage were examined in a field trial of *E. globulus* naturally infected by *Mycosphaerella* leaf disease (*Mycosphaerella* spp. and *Teratosphaeria* spp.) and *Eucalyptus* rust (*Puccinia psidii*). The genetic material included 226 open pollinated seed lots from 16 provenances of Australia, Chile and Uruguay. Disease severity (% of leaf spots and % defoliation) was assessed 8 months after planting and precocity of phase change (% of adult foliage) at 20 months. Tree growth and survival were evaluated every two years up to the ninth year. Differences in disease severity and in precocity of phase change were significant among countries of origin and provenances. Within provenances, the narrow-sense individual tree heritabilities for leaf spot severity (0.37), defoliation (0.41) and proportion of adult foliage (0.40) were higher than those obtained for tree growth (0.19 to 0.33) and similar to those obtained for survival (0.33 to 0.45). Genetic correlations between disease severity and growth traits were negative (-0.20 to -0.44) and were also negative between disease severity and survival (-0.28 to -0.51). There were positive genetic correlations between precocity of phase change and growth traits (0.34 to 0.41) and between precocity of phase change and survival (0.29 to 0.37). Our results demonstrate that selection for low disease severity in the first year and for high

proportion of adult foliage in the second year are feasible in order to obtain genetic material for sites at risk of infection of both *Mycosphaerella* leaf disease and *Eucalyptus* rust.

Keywords: disease resistance, heteroblastic transition, provenances, heritability.

INTRODUCTION

There are more than 630,000 hectares of commercial plantations of *Eucalyptus* in Uruguay. Due to the excellent quality of its wood for pulp production, and its high economic value, *E. globulus* is the most planted species, covering approximately 270,000 hectares (MGAP 2012; Petraglia and Dell'Acqua 2006). However, the high susceptibility of *E. globulus* to diseases has restricted their planting to the most suitable areas in the Southeast region of the country (Balmelli *et al.* 2004). Various species of *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* are economically important pathogens on commercial plantations of *Eucalyptus* species around the world (Barber *et al.* 2008; Hunter *et al.* 2009; Hunter *et al.* 2011; Mohammed *et al.* 2003; Park *et al.* 2000). In Uruguay *M. aurantia*, *M. grandis*, *M. lateralis*, *M. marksii*, *M. scytalidii*, *M. walkeri*, *Pallidocercospora heimii* (cited as *M. heimii*), *Pseudocercospora norchiensis*, *T. gauchensis*, *T. molleriana* (cited as *M. vespa*), *T. nubilosa*, *T. ohnowa*, *T. pluritubularis* and *T. suberosa* have been reported on eucalypts (Balmelli *et al.* 2004; Pérez *et al.* 2009a, 2009b; Wingfield 1999). *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* leaf diseases (hereafter referred as MLD) produce necrotic leaf spots, premature defoliation and, in the case of severe infection, death of apical buds, twigs and branches (Crous 1998; Park *et al.* 2000). *Puccinia psidii* has also been reported in Uruguay causing severe leaf damage on *E. globulus* (Telechea *et al.* 2003). *P. psidii* is considered a serious threat to biodiversity in Australia and to the *Eucalyptus* forest industry worldwide (Carnegie *et al.* 2010; Coutinho *et al.* 1998; Glen *et al.* 2007; Grgurinovic *et al.* 2006). It causes the disease known as *Eucalyptus* rust, producing yellow pustules on new leaves, petioles and buds, and on highly susceptible hosts it causes necrosis and deformation of the affected tissues (Ferreira 1983). The reduction of photosynthetic area produced by foliar diseases not only causes growth losses but also predisposes the plant to other pathogens and adverse abiotic factors (Carnegie *et al.* 1994).

Systematic surveys conducted since 2008 in young eucalypt plantations have shown that foliar diseases are widely distributed in Uruguay and are causing severe defoliation in *E. globulus* (Balmelli *et al.* 2009; Balmelli *et al.* 2011; Simeto *et al.* 2010). The increase in the incidence and severity of foliar diseases suffered by *E. globulus* plantations in recent years is causing its replacement by more resistant species, such as *E. grandis*, *E. dunnii* and *E. maidenii*, suggesting that if an effective management strategy for foliar diseases is not developed, in few years *E. globulus* could be totally abandoned in Uruguay. Due to economic, environmental and operational constraints, silvicultural options for minimizing the effects of diseases in eucalypt plantations are very limited. The most economical and effective approach to reducing diseases to an acceptable level in eucalypt plantations is by deployment of resistant planting stock (Alfenas *et al.* 2004; Carnegie *et al.* 1994; Dungey *et al.* 1997; Milgate *et al.* 2005; Tibbits *et al.* 1997).

Eucalyptus globulus is one of the most susceptible species to MLD (Carnegie *et al.* 1998) and is also susceptible to *Eucalyptus* rust (Alfenas *et al.* 2003; Perez *et al.* 2011; Telechea *et al.* 2003). According to Milgate *et al.* (2005), there are two mechanisms to avoid foliar damage due to diseases on *E. globulus*: resistance of the juvenile foliage and early change to the adult foliage, which is more resistant to most pathogens (Park *et al.* 2000). There are several studies that analyze the genetic variation in *E. globulus* for susceptibility to different species causing MLD (Carnegie and Ades 2005; Carnegie *et al.* 1994; Dungey *et al.* 1997; Hamilton *et al.* 2013; Milgate *et al.* 2005; Reinoso 1992; Tejedor 2007). Genetic variation for heteroblastic transition (phase change from juvenile to adult leaves) has also been reported in *E. globulus* (Hamilton *et al.* 2011; Jordan *et al.* 1999; Lopez *et al.* 2002; Reinoso 1992). However, as *P. psidii* was not present until recently in Australia and is not yet present in other countries where *E. globulus* is important (Spain, Portugal, Chile), there is extremely limited information on genetic variation in this species for susceptibility to that pathogen.

Despite the economic importance of *E. globulus* in Uruguay and extent of disease damage recorded in commercial plantations, the selection of resistant genotypes is still pending in the country. Most of the planting stock comes from seed imported from Australia, mainly from the Jeeralang region, which has proven to be very susceptible to foliar diseases (Balmelli *et al.* 2009; Balmelli *et al.* 2011; Simeto *et al.* 2010), and from clones not selected for disease resistance but for growth and wood quality. The present work was performed on a progeny test of *E. globulus* in southeastern Uruguay naturally infected by *Eucalyptus* rust and MLD. The objectives of the study were to estimate: a)

the susceptibility to leaf diseases and the precocity of phase change of different seed sources; b) the heritability of leaf spotting, defoliation and phase change, c) the genetic correlation of these traits with tree growth and survival, and d) the genetic gains expected through early selection for resistance to leaf disease and precocity of phase change.

MATERIALS AND METHODS

Field trial and genetic material

Genetic variation in susceptibility to foliar diseases and in the onset to adult foliage was studied on a progeny test of *E. globulus* established in September 2002 by the National Institute of Agricultural Research (INIA), in Rocha, Uruguay (Lat. 34°10'19.65"S; Long. 54°2'4.27"W; Alt.170 m) (see Balmelli *et al.* 2013 for details). The genetic material included 5520 trees from 226 open-pollinated families obtained from three populations: Australian native provenances, Chilean landrace selections and Uruguayan landrace selections (Table 1), and four commercial seed lots (excluded from analyses). The Uruguayan seedlots correspond to plus trees selected by growth in commercial plantations.

The experimental design for the trial was a randomized complete block with single-tree plots in 24 replications. Trees were planted at a spacing of 3.65 m x 2.0 m (1370 trees/ha) and the whole trial was surrounded by two buffer rows. It was established on a well drained loamy sandy soil, previously used for cattle production on natural pastures. Soil preparation consisted of: herbicide application (Glyphosate 50%, 3 L/ha), tillage made in bands and pre-planting herbicide application (Glyphosate 50%, 2.25 L/ha). Fertilizer (140 g/plant 16:27:2 N:P:K + microelements) and herbicide (Oxifluorfen 23.5% + Acetochlor 90%: 1.5 + 1.5 L/ha on 1.4 m wide planted band) were applied immediately after planting. In the following autumn, glyphosate was applied (3 L/ha) beneath the trees.

Table 1. *Eucalyptus globulus* genetic material included in a trial installed in 2002 in Rocha (Uruguay), showing population, provenance, latitude (Lat), longitude (Long), altitude (Alt.) and number of open pollinated families.

Population	Provenance ^a	Lat.	Long.	Alt.	OP families
Australia	SW of Lorne, VIC	38° 36'S	143° 54'E	230	12
Australia	WSW of Kennett River, VIC	38° 40'S	143° 50'E	130	4
Australia	Otways SF & Yuulong, VIC	38° 42'S	143° 33'E	250	13
Australia	Otway National Park, VIC	38° 48'S	143° 37'E	150	13
Australia	Jeeralang North, VIC	38° 19'S	146° 33'E	220	13
Australia	N of Yarram, VIC	38° 22'S	146° 41'E	480	9
Australia	Flinders Island, TAS	40° 07'S	148° 01'E	90	8
Australia	Moogara, TAS	42° 47'S	146° 55'E	500	7
Australia	Geeveston, TAS	43° 13'S	146° 54'E	360	7
Chile	Chillán	36° 43'S	72° 03'W	180	4
Chile	Concepción	36° 50'S	72° 48'W	200	8
Chile	Lota	37° 04'S	73° 03'W	270	7
Chile	Osorno	40° 34'S	72° 22'W	190	8
Uruguay	Lavalleja	32° 20'S	55° 09'W	150	28
Uruguay	Migues	34° 29'S	55° 45'W	50	79
Uruguay	Canelones	34° 40'S	55° 50'W	50	6
Total					226

^a VIC Victoria, TAS Tasmania

Measurements

Foliar damage caused by MLD and *Eucalyptus* rust was assessed in May 2003 (8 months after planting). A preliminary survey of the field trial based on a random sampling of leaves had indicated that 55% of the spots were attributable to *Eucalyptus* rust, 43.1% to MLD and the remainder 1.9% to other unidentified pathogens. The degree of damage was quantified on each tree, using two parameters: I) severity of leaf spots (percentage of leaf area affected by spots and pustules) and II) defoliation (percentage of leaves prematurely abscised). The evaluations were carried out for the whole crown, using visual scales adapted from Lundquist and Purnell (1987) and from Carnegie *et al.* (1994). For both, severity of leaf spots (SEV) and defoliation (DEF), trees were categorized according to disease classes of 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80% or more. Although the symptoms of *Eucalyptus* rust and MLD are initially different, as the pustules of rust get older they evolve to spots similar to those of MLD, being almost impossible to visually separate both symptoms accurately. Therefore, the severity of

spotting was jointly assessed. The proportion of adult foliage (ADFO) was assessed in May 2004 (at 20 months after planting) using a four-point scale: 0=all juvenile; 1=1 to 30% of intermediate or adult foliage; 2=31-50% of intermediate or adult foliage and 3=51-70% of intermediate or adult foliage (class mid-point values were used in data analyses). Growth was assessed by measuring the total height (HT) in May 2003 (at 8 months) and in June 2011 (at ninth year) and the diameter at breast height (DBH) in May 2005, June 2007, June 2009 and June 2011 (at third, fifth, seventh and ninth year, respectively). Survival (SURV), after the disease damage assessment, was determined at each measurement of growth (3, 5, 7 and 9 year old trees). Individual tree commercial volume (VOL) (under bark and up to 5 cm of stem diameter) was calculated for the ninth year using a specific equation developed for *E. globulus* by Methol (2006).

Data analysis

Analyses of variance were carried out using the SAS MIXED procedure (SAS Institute, 1997). To determine the significance of differences among populations for each trait, and to estimate least squares means for populations, the following model was used:

$$Y = MU + REP + POP + PROV + FAM + ERROR \quad (1)$$

where Y is the observation; MU is the overall mean; *REP* is the random replicate effect; POP is fixed population effect; *PROV* is the random provenance within population effect; *FAM* is the random family within provenance effect; *ERROR* is the residual. The provenance term was used as error term for testing the population effect. To test the significance of provenance differences and to estimate least squares means for provenances, population was excluded from model (1), provenance was treated as a fixed effect and the family term was used as the error term. No important departures from normality and homoscedasticity were observed for severity of leaf spots and for defoliation. Square root transformation of proportion of adult foliage was used in the analyses to achieve normality and homogeneity of residuals.

Variance components for each trait were estimated with model (1), using restricted maximum likelihood implemented in ASReml (Version 3.0) (Gilmour *et al.* 2009). A binomial model was fitted to survival (absence/presence 0/1) with a probit link function. The additive variance within provenances (σ_a^2), phenotypic variance (σ_p^2) and open-pollinated narrow-sense heritability (h_{op}^2) were calculated as:

$$\sigma_a^2 = \frac{\sigma_f^2}{r} \quad (2)$$

$$\sigma_p^2 = \sigma_f^2 + \sigma_e^2 \quad (3)$$

$$h_{op}^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_p^2} \quad (4)$$

where: σ_f^2 is the family within provenance variance; σ_e^2 is the residual variance; and r is the coefficient of relationship, fixed to 0.4 to adjust the deviations from the half-sib relatedness (assuming a selfing rate of 30%) (Volker *et al.* 1990).

Bivariate analyses were also implemented in ASReml, fitting the same model (Eqn 1), using the variance components derived from univariate analyses as starting values. Additive genetic correlations between two different traits ($r_{a(i,j)}$) were calculated from additive variances and covariances as:

$$r_{a(i,j)} = \frac{\sigma_{a(i,j)}}{\sqrt{\sigma_{a(i)}^2 \sigma_{a(j)}^2}} \quad (5)$$

where $\sigma_{a(i)}^2$ and $\sigma_{a(j)}^2$ are the estimated additive genetic variances for the traits i and j , respectively, and $\sigma_{a(i,j)}$ is the estimated additive covariance between traits i and j . The standard errors of parameters were estimated by ASReml from the average information matrix, using a standard truncated Taylor series approximation (Gilmour *et al.* 2009). The significance of the deviation of the variance components from zero were tested using a one-tailed likelihood ratio test (LRT) (Stram and Lee 1994). As likelihood ratio tests are not appropriate for binomial models, equivalent z-tests were used to test the significance of the variance components for survival. Heritabilities were assumed to be significant if the additive variances were significantly greater than zero. The significance of the deviation of the genetic correlations estimates from zero was based on two-tailed likelihood ratio tests (LRT) (Gilmour *et al.* 2009).

The genetic gains expected through selection for disease related traits (spot severity, defoliation and adult foliage) and the indirect expected gain on survival and individual tree commercial volume at harvest were calculated by a retrospective analysis of a simulated early conversion of the progeny test into a seedling seed orchard. Assuming retention of 600 trees (about 150 trees per hectare) for seed production, different schemes of combined selection (family and within family) were analyzed: a) selection

of the best 40 families and 15 trees per family; b) selection of the best 60 families and 10 trees per family; c) selection of the best 120 families and 5 trees per family. To estimate the genetic gains for the different selection alternatives all families were considered as a single base population. The families and trees within families were ranked with the breeding values for parents and progeny estimated by the univariate analyses implemented in ASReml using the equation (1). The pedigree file qualifier SELF was used in the *.as* ASReml file to incorporate a self-pollination rate of 0.3. The genetic gains (ΔG) expected through truncation selection for each selection alternative were calculated as the mean of the individual tree breeding values of the selected individuals expressed in percentage of the population mean. The efficiencies of early selection were calculated as the ratio of the gain expected from early selection (indirect selection) to the gain expected from direct selection at rotation age, and were expressed in percentage.

RESULTS

Genetic variation in resistance to foliar diseases, precocity of phase change, survival and tree growth

Eight months after planting, the trial had a high incidence of leaf diseases. Foliar damage was uniform throughout the site, with a mean spot severity for all trees in the trial of 28.8% and a mean defoliation of 37.1%. Disease severity was highly variable and ranged from trees with no damage to trees with the foliage almost completely spotted or shed. At 20 months, 72% of trees had begun the phase change, but the mean percentage of adult foliage at that moment was only 18.4%. Significant differences among populations were found for defoliation and percentage of phase change to adult foliage, but not for spot severity, survival and individual tree volume at 9 years (Table 2). The Uruguayan population was the most susceptible to foliar diseases, with significantly higher defoliation than the Australian population. The Chilean population had the lower proportion of adult foliage, differing significantly from the other two populations.

Table 2 Least-square means (Mean) and standard error (SE) for leaf spot severity (SEV) and defoliation (DEF) at 8 months, square root of the proportion of adult foliage (ADFO) at 20 months, survival (SURV) and individual tree volume (VOL) at 9 years, for three populations of *E. globulus* grown in a trial in Uruguay.

Population	SEV (%)	DEF (%)	ADFO	SURV (%)	VOL (dm ³)
	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE
Australia	26.5 ± 1.64 a	33.4 ± 1.97 b	3.77 ± 0.19 a	76.4 ± 1.99 a	288.9 ± 15.2 a
Chile	27.8 ± 2.54 a	39.2 ± 2.59 ab	2.65 ± 0.29 b	70.9 ± 3.56 a	218.9 ± 23.4 a
Uruguay	31.8 ± 2.40 a	39.9 ± 2.54 a	3.83 ± 0.28 a	69.5 ± 1.96 a	249.9 ± 25.2 a

Means within each column followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$, Tukey-Kramer multiple range test).

There were significant differences among provenances for leaf spot severity, defoliation, proportion of adult foliage and individual tree volume at 9 years, but not for survival at 9 years (Table 3). Lavallega and Osorno provenances presented the highest values of severity of leaf spotting and defoliation, while North of Yarram and Flinders Island were the most resistant provenances. The provenances with the highest proportion of adult foliage at 20 months were Kennett River, Otways SF & Yuulong, Otways National Park and Migués, being significantly different from Osorno and Chillan. The provenances with the highest individual tree volumes at harvest age were Otways & Yuulong, North of Yarram, Otway National Park and SW of Lorne, differing statistically from most of the other provenances.

Significant additive genetic variation within provenances was found for all traits. The individual narrow-sense heritabilities for leaf spot severity and defoliation at 8 months and for proportion of adult foliage at 20 months were moderately high ($h^2 = 0.38$; 0.43 and 0.41, respectively). Tree growth had moderate heritability (h^2 ranging from 0.21 to 0.34) and survival after disease damage assessment had moderately high heritabilities (0.33 to 0.45) (Table 4).

Table 3. Least-square means (Mean) and standard errors (SE) of *E. globulus* provenances for leaf spot severity (SEV) and defoliation (DEF) at 8 months, square root of the proportion of adult foliage (ADFO) at 20 months, survival (SURV) and individual tree volume (VOL) at 9 years.

Provenance ^a	SEV (%)	DEF (%)	ADFO	VOL (dm ³)	SURV (%)
	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE
Lavalleja (U)	35.4 ± 1.82 a	42.7 ± 2.02 a	3.70 ± 0.20 ab	232.6 ± 10.7 bc	65.4 ± 3.43 a
Osorno (C)	33.1 ± 3.25 ab	45.5 ± 3.02 a	2.23 ± 0.36 b	183.9 ± 20.6 c	55.3 ± 6.42 a
Moogara (A)	32.2 ± 3.42 ab	39.2 ± 3.14 abc	3.17 ± 0.37 ab	195.9 ± 20.1 bc	72.1 ± 6.74 a
SW of Lorne (A)	32.0 ± 2.62 ab	33.3 ± 2.56 bc	3.34 ± 0.29 ab	325.9 ± 14.8 a	81.3 ± 5.11 a
Canelones (U)	30.3 ± 3.73 ab	35.4 ± 3.38 abc	3.64 ± 0.41 ab	249.4 ± 22.0 bc	72.8 ± 7.40 a
Migues (U)	29.5 ± 1.22 ab	39.7 ± 1.68 ab	4.04 ± 0.13 a	267.0 ± 6.67 b	70.9 ± 2.10 a
Otway Nat. Park (A)	29.2 ± 2.54 ab	35.9 ± 2.50 abc	4.13 ± 0.28 a	327.5 ± 14.5 a	76.6 ± 4.93 a
Geeveston (A)	29.1 ± 3.39 ab	37.8 ± 3.13 abc	3.47 ± 0.37 ab	221.1 ± 19.8 bc	71.3 ± 6.68 a
Concepción (C)	27.3 ± 3.26 ab	40.2 ± 3.02 ab	2.60 ± 0.36 b	217.1 ± 19.0 bc	77.7 ± 6.44 a
Jeeralang North (A)	27.3 ± 2.53 ab	34.3 ± 2.50 abc	3.72 ± 0.28 ab	287.0 ± 14.6 ab	78.7 ± 4.91 a
Lota (C)	26.7 ± 3.40 ab	33.6 ± 3.14 abc	3.45 ± 0.37 ab	219.4 ± 20.0 bc	72.7 ± 6.72 a
Kennett River (A)	24.7 ± 4.45 ab	30.8 ± 3.94 bc	4.87 ± 0.48 a	308.6 ± 26.3 ab	71.6 ± 8.82 a
Otways & Yuulong (A)	23.1 ± 2.55 b	32.9 ± 2.51 bc	4.53 ± 0.28 a	340.9 ± 14.7 a	77.0 ± 4.96 a
Chillán (C)	22.2 ± 4.62 b	36.7 ± 4.07 abc	2.19 ± 0.50 b	260.3 ± 26.7 bc	85.4 ± 9.25 a
Flinders Island (A)	21.4 ± 3.20 b	27.2 ± 2.98 c	3.86 ± 0.35 ab	245.1 ± 18.6 bc	74.4 ± 6.30 a
N of Yarram (A)	18.5 ± 3.02 b	28.6 ± 2.85 bc	3.02 ± 0.33 ab	337.4 ± 17.8 a	76.9 ± 5.92 a

^a (A) Australia, (C) Chile, (U) Uruguay. Means within each column followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$, Tukey-Kramer multiple range test).

Table 4. Individual narrow-sense heritability estimates (h^2) and standard error (SE) for spot severity (SEV), defoliation (DEF), square root of the proportion of adult foliage (ADFO), tree height (HT), diameter at breast height (DBH), survival after damage assessment (SURV) and individual tree commercial volume (VOL) on *E. globulus*. Trait names are followed by the age of measurement in months (m) or years (y).

Trait	Unit	n	Mean ± SD ^A	h^2 ± SE
SEV_8m	%	4526	28.8 ± 20.8	0.38 ± 0.04
DEF_8m	%	4526	37.1 ± 18.0	0.43 ± 0.04
ADFO_20m	%	4301	18.4 ± 17.1	0.41 ± 0.04
HT_8m	m	4526	2.5 ± 0.6	0.34 ± 0.04
DBH_3y	cm	4078	10.9 ± 2.4	0.30 ± 0.04
DBH_5y	cm	3813	15.6 ± 3.4	0.29 ± 0.04
DBH_7y	cm	3570	17.6 ± 3.9	0.26 ± 0.04
DBH_9y	cm	3309	19.7 ± 4.4	0.22 ± 0.04
VOL_9y	dm ³	3309	273 ± 144	0.21 ± 0.03
SURV_3y	%	4526	90.1 ± 29.9	0.33 ± 0.05
SURV_5y	%	4526	84.3 ± 36.4	0.35 ± 0.05
SURV_7y	%	4526	78.9 ± 40.8	0.38 ± 0.05
SURV_9y	%	4526	73.0 ± 44.4	0.45 ± 0.05

^A SD = standard deviation. Heritabilities are all highly significantly greater than zero ($P < 0.01$).

Relationship between resistance to foliar diseases and early transition to adult foliage with survival and tree growth

The phenotypic and genetic correlations between leaf spot severity and defoliation were high and significant (0.62 and 0.75, $P < 0.01$), which means that trees and families with higher levels of leaf spotting had also more defoliation. Conversely, the phenotypic and genetic correlations between disease damage (leaf spot severity and defoliation) at 8 months and proportion of adult foliage at 20 months were slightly negative and non-significant in the case of genetic correlations. In other words, the susceptibility of the juvenile foliage to diseases and the precocity of phase change to adult foliage are almost independent traits (Table 5).

Table 5. Phenotypic and genetic correlations between disease-related traits on *E. globulus* and their significance from zero. The trait codes for spot severity (SEV), defoliation (DEF) and proportion of adult foliage (ADFO) are followed by the age of measurement in months.

Traits	Phenotypic	Genetic
SEV_8m v. DEF_8m	0.62 (0.01) **	0.75 (0.05) **
SEV_8m v. ADFO_20m	-0.10 (0.02) **	-0.19 (0.10) ns
DEF_8m v. ADFO_20m	-0.14 (0.02) **	-0.26 (0.10) ns

The significances are noted as ns = not significant; ** $P < 0.01$.

The phenotypic correlations between disease damage (leaf spot severity and defoliation) and tree growth were low and significant (-0.14 to -0.33, $P < 0.01$), with the most damaged trees growing more slowly (Table 6). There was no indication that disease damage was genetically correlated with tree height at the moment of damage assessment, but the genetic correlations between foliar damage and subsequent growth were significant (-0.33 to -0.48), meaning that the trees that were genetically more susceptible to foliar diseases grew less than those more resistant (Table 6). Both phenotypic and genetic correlations between foliar damage and subsequent survival were negative and significant and indicate that mortality was dependent on susceptibility to diseases (Table 6). The proportion of adult foliage at 20 months and tree growth also showed low and significant phenotypic and genetic correlations, which means that trees with an early transition to adult foliage grew faster than those with a late transition (Table 6). There were low to moderate and significant phenotypic correlations (0.31 to 0.32) and genetic correlations (0.29 to 0.37) between the proportion of adult foliage at 20 months and subsequent survival, which means that

mortality was also dependent on the precocity of phase change to adult foliage (Table 6).

Table 6. Phenotypic and genetic correlations (standard errors) between disease traits on *E. globulus* and subsequent tree growth and survival. Trait codes for spot severity (SEV), defoliation (DEF), square root of proportion of adult foliage (ADFO), height (HT), diameter at breast height (DBH), survival (SURV) and individual tree commercial volume (VOL) are followed by the age of measurement in months (m) or years (y).

Trait	SEV_8m		DEF_8m		ADFO_20m	
	Phenotypic	Genetic	Phenotypic	Genetic	Phenotypic	Genetic
Height_8m	-0.14(0.02)**	-0.22(0.10)ns	-0.15(0.02)**	-0.20 (0.10)ns	0.35 (0.02)**	0.39 (0.09)**
DBH_3y	-0.33 (0.02)**	-0.48 (0.08)**	-0.31 (0.02)**	-0.44 (0.09)**	0.36 (0.02)**	0.40 (0.09)**
DBH_5y	-0.24 (0.02)**	-0.40 (0.09)**	-0.22 (0.02)**	-0.35 (0.10)*	0.29 (0.02)**	0.41 (0.10)**
DBH_7y	-0.21 (0.02)**	-0.43 (0.10)**	-0.21 (0.02)**	-0.38 (0.10)**	0.23 (0.02)**	0.39 (0.11)**
DBH_9y	-0.18 (0.03)**	-0.42 (0.11)**	-0.17 (0.03)**	-0.37 (0.11)*	0.19 (0.03)**	0.34 (0.12)*
SURV_3y	-0.24 (0.02)**	-0.51 (0.08)**	-0.21 (0.02)**	-0.45 (0.08)**	0.31 (0.02)**	0.29 (0.09)*
SURV_5y	-0.23 (0.02)**	-0.43 (0.08)**	-0.21 (0.02)**	-0.39 (0.08)**	0.31 (0.02)**	0.32 (0.08)*
SURV_7y	-0.22 (0.02)**	-0.32 (0.08)*	-0.20 (0.02)**	-0.32 (0.08)*	0.32 (0.02)**	0.35 (0.08)**
SURV_9y	-0.21 (0.02)**	-0.28 (0.08)*	-0.21 (0.02)**	-0.32 (0.08)*	0.31 (0.02)**	0.37 (0.08)**
VOL_9y	-0.16 (0.03)**	-0.38 (0.11)*	-0.15 (0.03)**	-0.33 (0.12)*	0.18 (0.03)**	0.34 (0.12)*

The significances are noted as ns = not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Genetic gains expected through selection for disease-related traits, individual tree volume and survival

The genetic gains in the selection trait expected through a conversion of the progeny test into a seedling seed orchard were high, ranging from 37.5 to 51.7% for the different selection schemes, when selecting by low leaf spot severity or by low defoliation at 8 months (Table 7). When selection is made by high proportion of adult foliage at 20 months the expected gains are also high, from 46.3 to 52.2% (Table 7).

Table 7. Genetic gains (%) in selection traits expected through a conversion of the progeny test into a seedling seed orchard with different schemes of selection for spot severity (SEV), defoliation (DEF) or adult foliage (ADFO).

	40 families 15 trees/fam.	60 families 10 trees/fam.	120 families 5 trees/fam.
SEV	47.4	51.7	51.6
DEF	37.5	41.0	42.0
ADFO	46.3	52.2	46.3

The genetic gains expected on individual tree volume at harvest through indirect selection for leaf spot severity, defoliation or adult foliage after an early conversion of the progeny test into a seedling seed orchard are low, ranging from 1.5 to 6.0% for the different selection schemes analyzed (Table 8). Higher genetic gains are expected on survival at harvest age, ranging from 18.5 to 24.9% for the same selection criteria and selection schemes (Table 8). The genetic gains expected for a late conversion of the progeny test selecting directly for individual tree volume at harvest age ranged from 22.1 to 24.2% and selecting directly for survival at harvest age ranged from 29.2 to 44.5% (Table 8). Intermediate gains on individual tree volume at harvest are expected by indirect selection on DBH at ages 3 or 5 years (data not shown).

Table 8. Genetic gains (%) on individual tree commercial volume at harvest age (VOL) and on survival at harvest age (SURV) expected through a conversion of the progeny test into a seedling seed orchard with different schemes of early selection for spot severity (SEV), defoliation (DEF) or adult foliage (ADFO) and expected gains for direct selection on individual tree volume and survival at harvest.

Selection criteria	40 families 15 trees/fam.		60 families 10 trees/fam.		120 families 5 trees/fam.	
	VOL	SURV	VOL	SURV	VOL	SURV
SEV	5.6	22.6	4.0	20.6	1.5	18.7
DEF	2.7	18.7	3.0	20.2	2.2	18.5
ADFO	6.0	24.3	4.2	24.9	6.0	24.3
VOL	22.1		24.2		23.2	
SURV	41.5		44.5		29.2	

On average for the different schemes of selection analyzed, the efficiency of an early selection for resistance to foliar diseases or for precocity of phase change, with respect to the gain expected through direct selection for individual tree volume at harvest age, was 16.7% for spot severity, 10.9% for defoliation and 23.3% for adult foliage. In the case of survival at harvest age, the efficiency of an early selection for resistance to foliar diseases or for precocity of phase change was 54.9% for spot severity, 51.3% for defoliation and 65.9% for adult foliage.

DISCUSSION

The genetic base of *E. globulus* analyzed on this work showed significant genetic variation at population, provenance and family levels, both in severity of leaf spots and in defoliation. MLD and *Eucalyptus* rust had similar incidence in the trial assessed, thus the variation in severity of leaf spots represents the variation in resistance to both diseases, while the variation in defoliation is exclusive to MLD since *Eucalyptus* rust does not cause leaf drop (Coutinho *et al.* 1998; Ferreira 1983).

The Australian population analyzed here showed significantly less defoliation than the local population. Within the Australian population, North of Yarram and Flinders Island were the provenances with less severity of leaf spots and less defoliation. Provenance differences in MLD resistance have been reported on *E. globulus* by Carnegie *et al.* (1994), Dungey *et al.* (1997) and Hamilton *et al.* (2013), and provenance differences in resistance to *Eucalyptus* rust by Xavier *et al.* (2007). In a range wide screening of *E. globulus* provenances, Hamilton *et al.* (2013) found a latitudinal cline in MLD damage, with the most resistant provenances occurring on mainland Australia, i.e. the northern part of the species natural distribution. In the present work there was no clear relationship between disease damage and latitude, with the provenances from Tasmania showing similar disease severity than some provenances from Victoria.

Some Australian provenances from Victoria, as Kennett River, Otways SF & Yuulong and Otways National Park, showed the highest proportion of adult foliage. This agrees with Jordan *et al.* (2000) and Hamilton *et al.* (2011), who found that the mainland provenances of *E. globulus* have a more precocious phase change than provenances from Tasmania. Those results suggest that the provenances North of Yarram, Flinders Island, Kennett River and Otways SF & Yuulong could be considered good seed sources of *E. globulus* for sites with risk of mixed infections of MLD and *Eucalyptus* rust. Assuming similar conditions to those recorded in the evaluated trial, i.e. the same diseases and severity of damage, with the use of seed from North of Yarram it could be expected during the first year a reduction on leaf spotting of about 35% (from the actual mean of 28.8% to 18.7%) and a reduction on defoliation of 23% (from 37.1% to 28.6%). Similarly, the use of seed from Kennett River would increase the proportion of adult foliage at 20 months by 51.6% (from the actual mean of 18.4% to 27.9%). There were significant differences among provenances for individual tree volume at harvest age. The more productive provenances, i.e. those that combine good survival and tree

growth at harvest age, were also from Australia: North of Yarram, Otways & Yuulong, SW of Lorne and Otway National Park. These provenances, particularly North of Yarram (for its resistance) and Otways & Yuulong (for its precocious phase change), are the most suitable for the Uruguayan conditions. However, the importation of large volumes of seed (an annual planting area of 20,000 hectares of *E. globulus* requires about 100 kilograms of seed) involves risks related to the availability of the desired source, and it represents also a possible route of entry for diseases not present in the country yet (Wingfield *et al.* 2008).

Significant additive genetic variation was identified in resistance to foliar diseases and in timing of phase change. The within provenance individual tree heritability estimates for spot severity (0.38) and defoliation (0.43) at 8 months and for proportion of adult foliage (0.41) at 20 months were higher than the heritabilities obtained for tree growth (0.21 to 0.34) and similar to those obtained for survival (0.33 to 0.45). These differences could be even higher because the narrow-sense heritabilities for growth traits may be biased upwards because were estimated from open-pollinated progeny (Hardner and Potts 1995; Hodge *et al.* 1996). In contrast, open-pollinated versus controlled-cross estimates are very similar for disease resistance and for precocity of phase change (Dungey *et al.* 1997; Jordan *et al.* 1999). The heritability estimates for leaf spot severity and for defoliation derived from this trial refer to disease caused by a complex of MLD and *Eucalyptus* rust. Thus, the presence of different pathogens may have masked the genetic association between the host and each pathogen, causing, at least for leaf spot severity, a reduction of the heritability. Our heritability values are lower than the 0.60 obtained by Milgate *et al.* (2005) for severity to *T. nubilosa* on *E. globulus*, but they are similar or higher than those reported by other authors. Thus, Reinoso (1992) estimated heritabilities for severity to MLD from 0.23 to 0.48; Dungey *et al.* (1997) from 0.12 to 0.21 for damage by *T. nubilosa* and *T. cryptica* and Carnegie and Ades (2005) from 0.17 to 0.36 for damage by *T. cryptica*; Hamilton *et al.* (2013) from 0.13 to 0.35 for severity to MLD; Costa e Silva *et al.* (2013a, 2013b) from 0.31 to 0.39 for susceptibility to *T. nubilosa* on *E. globulus*. Although there are no published results on genetic control in resistance to *Puccinia psidii* on *E. globulus*, our heritability estimate for leaf spot severity suggests that it is possible to obtain acceptable responses to selection for resistance to mixed infections of MLD and *Eucalyptus* rust.

The proportion of adult foliage at 20 months presented also a moderately high heritability (0.41), although it is lower than the heritabilities reported by Lopez *et al.*

(2002) for proportion of adult foliage on *E. globulus* (0.54 to 0.65) or those reported for height of phase change by Jordan *et al.* (1999) (0.43 to 0.74) and Hamilton *et al.* (2011) (0.44 to 0.65). Another indication of the strong genetic control of phase change in *E. globulus* is the very high inter-trial genetic correlation, i.e. very low genotype-by-environment interaction, recorded by Lopez *et al.* (2002) (0.88 to 0.96) and by Hamilton *et al.* (2011) (0.39 to 1.02). The high genetic control for the timing of phase change and its stability across environments imply that there are ample opportunities for selection and breeding to obtain genetic stock with a more precocious change to adult foliage. This, as stated by Carnegie *et al.* (1994), represents a mean of escape from diseases, as MLD and *Eucalyptus* rust, which mainly affect juvenile foliage (Ferreira 1983; Park *et al.* 2000). Our results suggest that both the increment in resistance of the juvenile foliage (by selection for low leaf spotting or defoliation in the first year) and the reduction of the juvenile phase (by selection for high proportion of adult foliage in the second year), are feasible to reduce the risk of MLD and *Eucalyptus* rust on *E. globulus* plantations. The increase in resistance has the advantage of reducing the damage during the early stages of cultivation, which are most critical to the trees (Balmelli *et al.* 2013), and the disadvantage of having low success if the pathogens affecting new plantations are different to those for which resistance of the genetic pool was assessed. Conversely, reducing the juvenile phase allows to early escape to any pathogen that does not affect the adult foliage, but the trees maintain a high risk of damage during their most critical stages.

The relationship between leaf spot severity and defoliation was high, with a genetic correlation of 0.75, which can be explained by the fact that defoliation is a secondary symptom of foliar spots due to MLD, but no significant relationship was found between the genetic control for these traits and the genetic control for proportion of adult foliage at 20 months. This means that the selection by leaf spot severity will indirectly reduce defoliation, and vice versa, and no effect is expected on the timing of phase change. This agrees with Milgate *et al.* (2005) and Costa e Silva (2013a), who found that the severity of the damages caused by *T. nubilosa* in juvenile foliage of *E. globulus* was neither significantly correlated with the timing of transition to adult foliage nor with the height of transition to adult foliage. Both phenotypic and genetic correlations between susceptibility to foliar diseases (leaf spotting and defoliation) with survival and tree growth were negative (-0.14 to -0.51) and significant, except for the early height measurement. Higher genetic correlations on *E. globulus* between severity of

damage due to *T. nubilosa* and DBH at four and seven years (-0.66 to -0.77) were reported by Milgate *et al.* (2005) and for DBH at 12 years (-0.53) by Costa e Silva (2013a). Conversely, the relationships, both phenotypic and genetic, between the proportion of adult foliage at 20 months with survival and tree growth were positive, but low (0.18 to 0.41). López *et al.* (2002), in absence of foliar diseases, reported genetic correlations between percentage of adult foliage at two years and DBH at three or four years ranging from -0.24 to 0.37 for *E. globulus* and Milgate *et al.* (2005), in presence of *T. nubilosa*, report genetic correlations between height to phase change and DBH at four and seven years from -0.17 to 0.11. According to Jordan *et al.* (2000) the genetic association of the timing of vegetative phase change with growth rate range from positive to negative at different sites and depends on the presence or absence of diseases or pests that preferentially affect juvenile foliage. Based on our results, we can expect an increase in tree growth by selecting for disease resistance or by selecting for an early transition to adult foliage.

Different breeding strategies are available for long-term genetic improvement of trees involving various combinations of breeding and production population, mating designs and selection schemes (Cotterill 1986; Eldridge *et al.* 1994; Shelbourne 1992). In the short term, one of the simplest strategies to obtain improved seed for sites prone to foliar diseases is converting a progeny test, previously damaged and assessed by resistance to diseases, into a seedling seed orchard. In this study the increment in resistance to MLD and *Eucalyptus* rust expected by selecting the less damaged families and trees was high, with an average of 50.2% when leaf spot severity was used as selection criteria and 40.2% when the selection criteria was defoliation. Similar gains, with an average of 48.3%, could be expected if the conversion of the progeny test into a seedling seed orchard is done based on the selection of the families and trees that had higher proportion of adult foliage at 20 months. Although the time to start changing the foliage cannot be estimated, it is likely that plantations using this seed would have a period of susceptible juvenile foliage several months shorter than the original population. In addition, low increments in individual tree volume (ranging from 1.5 to 6.0%) and moderate increments in survival at harvest age (ranging from 18.5 to 24.9%) could be obtained by the conversion of the progeny test into a seedling seed orchard by either selecting for disease resistance or for early phase change. Although an early selection allows obtaining the improved seed various years in advance, the expected gains in individual tree volume at harvest age are low if compared with those

expected for a conversion of the progeny test selecting directly for individual tree volume (22.1 to 24.2%). However, the expected gain on individual tree volume at harvest age by early selection could be biased due to between-tree competition, especially in the present case based on a disease infected trial with single tree plots, which enhance the growth of resistant trees due to the lack of competition, which would not occur in large block plantings where individuals compete with genetically similar material (Callister *et al.* 2012). In addition, according to Costa e Silva (2013b), indirect genetic effects, i.e. heritable effects of individuals on trait values of their conspecifics, are negative for growth and positive for disease damage, determined respectively by increased competition among neighbours and by decreased infection among neighbours. This suggests that the response to selection for growth is likely to be lower than predicted and the response to selection for disease resistance is likely to be higher than predicted.

An important limitation of this strategy to obtain genetic stock resistant to diseases is the poor production of seeds that *E. globulus* has in Uruguay. A well-managed seed orchard produces an annual average of 0.8 kg per hectare of clean seed, with a strong interannual variation (unpublished data). About 200 hectares of *E. globulus* can be planted with one kilogram of seed (considering a typical planting density of 1400 trees per hectare). Thus, the total production on the 4 hectares of this hypothetical seed orchard would be 3.2 kg per year, enough for 640 hectares of plantation. In other words, this strategy is fast and low cost but the production of improved seed would only represent 3% of that required in Uruguay for a plantation of 20,000 hectares per year. The alternative to any strategy based on the production of improved seed is the selection and cloning of the best trees of the progeny test. The poor rooting capacity of *E. globulus* (Le Roux and Van Staden 1991; Tejedor 2007) is a clear limitation of this strategy. However, it has the advantage that the whole process to obtain clones at a commercial scale, i.e. cloning the candidates, testing their resistance to diseases and the multiplication of the resistant clones, can be achieved in a five to six year period. In addition, Costa e Silva (2013a) reported that clones of *E. globulus* exhibited a slightly less disease damage and change to adult foliage at a lower height than seedlings produced from the same families.

Since the entry of *T. nubilosa* into Uruguay in 2007 (Pérez *et al.* 2009b), young plantations of *E. globulus* have been suffering severe damage, often with more than 80% of defoliation (Balmelli *et al.* 2011). According to Balmelli *et al.* (2013) this degree

of damage during the first year causes a loss of up to 25% in diameter and an accumulated mortality over 70% by the sixth year. Thus, the sustainability of *E. globulus* production in the country depends on the rapid development of genetic stock of acceptable resistance to this pathogen. For this reason, INIA in collaboration with forestry companies, are now analyzing the resistance/susceptibility of their genetic pool to *T. nubilosa* with the objective to select and clone trees that simultaneously show good resistance to this disease and an early phase change, ensuring a large base of clonal selections for future breeding.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Redalco forestry enterprise, especially Marcelo Fredes, for providing the location, and for performing the soil preparation and maintenance of the trial, and to Carlos Pérez and Guillermo Pérez for comments on the manuscript. The study was partially funded by a grant (Programa de Formación del Sistema de los INIA de Iberoamérica) awarded to the first author for the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) of Spain.

REFERENCES

- Alfenas, A.C.; Zauza, E.A.V.; Assis, T.F. 2003. First record of *Puccinia psidii* on *Eucalyptus globulus* and *E. viminalis* in Brazil. *Australasian Plant Pathology* 32: 325-326.
- Alfenas, A.C.; Zauza, E.A.; Mafia, R.G.; Assis, T.F. 2004. Clonagem e Doenças do Eucalipto. 4a. Edição. Editora UFV: Vicosa, MG, Brazil. 500 pp.
- Balmelli, G.; Marroni, V.; Altier, N.; García, R. 2004. Potencial del mejoramiento genético para el manejo de enfermedades en *Eucalyptus globulus*. *Serie Técnica INIA* 143. Montevideo, Uruguay.
- Balmelli, G.; Martínez, G.; Simeto, S.; Torres, D.; Pérez, C.A.; Fros, D.; Bentancur, O. 2009. Daño foliar causado por enfermedades y plagas en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* en Uruguay. Poster in XIII Congreso Forestal Mundial. 18-23 Octubre. Buenos Aires, Argentina.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Martínez, G.; Torres, D.; Pérez, C.; Bentancur, O. 2011. Incidence and severity of pests and diseases on young plantations of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. En: IUFRO Forest Protection Joint Meeting: pathogens, insects and

- their associations affecting forestry worldwide. 8-11 Noviembre. Colonia del Sacramento, Uruguay.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Altier, N.; Marroni, V.; Diez, J.J. 2013. Long term losses caused by foliar diseases on growth and survival of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *New Forests* 44: 249-263.
- Barber, P.A.; Carnegie, A.J.; Burgess, T.I.; Keane, P.J. 2008. Leaf diseases caused by *Mycosphaerella* species in *Eucalyptus globulus* plantations and nearby native forest in the Green Triangle Region of southern Australia. *Australasian Plant Pathology* 37: 472-481.
- Callister, A.N.; England, N.; Collins, S. 2012. Predicted genetic gain and realized gain in stand volume of *Eucalyptus globulus*. *Tree Genetics and Genomes* Doi:10.1007/s11295-012-0558-8.
- Carnegie, A.J.; Ades, P.K. 2005. Variation in *Eucalyptus globulus* Labill. and *E. nitens* Dean and Maiden in susceptibility of adult foliage to disease caused by *Mycosphaerella cryptica* (Cooke) Hansf. *Silvae Genetica* 54: 174-184.
- Carnegie, A.J.; Ades, P.K.; Keane, P.J.; Smith, I.W. 1998. Mycosphaerella disease of juvenile foliage in a eucalypts species and provenance trial in Victoria, Australia. *Australian Forestry* 61: 190-194.
- Carnegie, A.J.; Keane, P.J.; Ades, P.K.; Smith, I.W. 1994. Variation in susceptibility of *Eucalyptus globulus* provenances to Mycosphaerella leaf disease. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 1751-1757.
- Carnegie, A.J.; Lidbetter, J.R.; Walker, J.; Horwood, M.A.; Tesoriero, L.; Glen, M.; Priest, M.J. 2010. *Uredo rangelii*, a taxon in the guava rust complex, newly recorded on Myrtaceae in Australia. *Australasian Plant Pathology* 39: 463-466.
- Costa e Silva, J.; Potts, B.M.; Tilyard, P. 2013a. Stability of genetic effects across clonal and seedling populations of *Eucalyptus globulus* with common parentage. *Forest Ecology and Management* 291: 427-435.
- Costa e Silva, J.; Potts, B.M.; Bijma, P.; Kerr, R.J.; Pilbeam, D.J. 2013b. Genetic control of interactions among individuals: contrasting outcomes of indirect genetic effects arising from neighbour disease infection and competition in a forest tree. *New Phytologist* 197: 631-641.
- Cotterill, P.P. 1986. Genetic gains expected from alternative breeding strategies including simple low cost options. *Silvae Genetica* 35: 212-223.

- Coutinho, T.A.; Wingfield, M.J.; Alfenas, A.C.; Crous, P.W. 1998. *Eucalyptus* rust: a disease with the potential for serious international implications. *Plant Disease* 82: 819-825.
- Crous, P.W. 1998. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. The American Phytopathological Society, St Paul, MN, USA.
- Dungey, H.S.; Potts, B.M.; Carnegie, A.J.; Ades, P.K. 1997. Mycosphaerella leaf disease - genetic variation in damage to *Eucalyptus nitens*, *Eucalyptus globulus*, and their F-1 hybrid. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 750-759.
- Eldridge, K.G.; Davidson, J.; Hardwood, C.E.; Van Wyk, G. 1994. *Eucalypt Domestication and Breeding*. Oxford University Press. 288 pp.
- Ferreira, F.A. 1983. Ferrugem do Eucalipto. *Revista Arvore* 7: 91-109.
- Gilmour, A.R.; Gogel, B.J.; Cullis, B.R.; Thompson, R. 2009. ASReml User Guide Release 3.0. VSN International Ltd: Hemel Hempstead, UK.
- Glen, M.; Alfenas, A.C.; Zauza, E.A.V.; Wingfield, M.J.; Mohammed, C. 2007. *Puccinia psidii*: A threat to the Australian environment and economy – A review. *Australasian Plant Pathology* 36: 1-16.
- Grgurinovic, C.A.; Walsh, D.; Macbeth, F. 2006. *Eucalyptus* rust caused by *Puccinia psidii* and the threat it poses to Australia. *EPPA Bulletin* 36: 486-489.
- Hamilton, M.G.; Tilyard, P.A.; Williams, D.R.; Vaillancourt, R.E.; Wardlaw, T.J.; Potts, B.M. 2011. The genetic variation in the timing of heteroblastic transition in *Eucalyptus globulus* is stable across environments. *Australian Journal of Botany* 59: 170-175.
- Hamilton, M.G.; Williams, D.R.; Tilyard, P.A.; Pinkard, E.A.; Wardlaw, T.J.; Glen, M.; Vaillancourt, R.E.; Potts, B.M. 2013. A latitudinal cline in disease resistance of a host tree. *Heredity* 110: 372-379.
- Hardner, C.M.; Potts, B.M. 1995. Inbreeding depression and changes in variation after selfing *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus*. *Silvae Genetica* 44: 46-54.
- Hodge, G.R.; Volker, P.W.; Potts, B.M.; Owen, J.V. 1996. A comparison of genetic information from open-pollinated and control-pollinated progeny tests in two eucalypt species. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 53-63.
- Hunter, G.C.; Crous, P.W.; Carnegie, A.J.; Wingfield, M.J. 2009. *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of *Eucalyptus* spp. in native and introduced areas. *Molecular Plant Pathology* 10: 1-14.

- Hunter, G.C.; Crous, P.W.; Carnegie, A.J.; Burgess, T.I.; Wingfield, M.J. 2011. *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* disease of *Eucalyptus*; easily confused and with serious consequences. *Fungal Diversity* 50: 145-166.
- Jordan, G.J.; Potts, B.M.; Wiltshire, R. 1999. Strong, independent quantitative genetic control of vegetative phase change and first flowering in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* (Tasmanian Blue Gum). *Heredity* 83: 179-187.
- Jordan, G.J.; Potts, B.M.; Chalmers, P.; Wiltshire, R.J.E. 2000. Quantitative genetic evidence that the timing of vegetative phase change in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* is an adaptive trait. *Australian Journal of Botany* 48: 561-567.
- Le Roux, J.J.; Van Staden, J. 1991. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus* – a review. *Tree Physiology* 9: 435-477.
- López, G.A.; Potts, B.M.; Dutkowski, G.W.; Apiolaza, L.A.; Gelid, P.E. 2002. Genetic variation and inter-trait correlations in *Eucalyptus globulus* base population trials in Argentina. *Forest Genetics* 9: 217-231.
- Lundquist, J.E.; Purnell, R.C. 1987. Effects of *Mycosphaerella* leaf spot on growth of *Eucalyptus nitens*. *Plant Disease* 71: 1025-1029.
- Methol, R. 2006. SAG globulus: sistema de apoyo a la gestión de plantaciones de *Eucalyptus globulus*. *Serie Técnica INIA* 158. Montevideo, Uruguay.
- MGAP. 2012. Recurso Forestal: bosques plantados registrados. Available at: <http://www.mgap.gub.uy> (verified 5 November 2012).
- Milgate, A.W.; Potts, B.M.; Joyce, K.; Mohammed, C.; Vaillancourt, R.E. 2005. Genetic variation in *Eucalyptus globulus* for susceptibility to *Mycosphaerella nubilosa* and its association with tree growth. *Australasian Plant Pathology* 34: 11-18.
- Mohammed, C.; Wardlaw, T.; Smith, A.; Pinkard, E.; Battaglia, M.; Glen, M.; Tommerup, I.; Potts, B.; Vaillancourt, R. 2003. *Mycosphaerella* leaf diseases of temperate eucalypts around the southern Pacific rim. *New Zealand Journal of Forestry Science* 33: 362-372.
- Park, R.F.; Keane, P.J.; Wingfield, M.J.; Crous, P.W. 2000. Fungal diseases of eucalypt foliage. In: *Diseases and Pathogens of Eucalypts*. Ed. by PJ Keane, GA Kile, FD Podger, BN Brown. pp. 153-239. CSIRO Publishing: Melbourne, Australia.
- Pérez, C.A.; Wingfield, M.J.; Altier, N.A.; Blanchette, R.A. 2009a. *Mycosphaerellaceae* and *Teratosphaeraceae* associated with *Eucalyptus* leaf diseases and stem cankers in Uruguay. *Forest Pathology* 39: 349-360.
- Pérez, G.; Hunter, G.; Slippers, B.; Pérez, C.A.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J. 2009b. *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa*, the causal agent of *Mycosphaerella*

- leaf disease (MLD), recently introduced into Uruguay. *European Journal of Plant Pathology* 125: 109-118.
- Pérez, C.A.; Wingfield, M.J.; Altier, N.A.; Simeto, S.; Blanchette, R.A. 2011. *Puccinia psidii* infecting cultivated *Eucalyptus* and native myrtaceae in Uruguay. *Mycological Progress* 10: 273-282.
- Petraglia, C.; Dell'Acqua, M. 2006. Actualización de la cartografía forestal del Uruguay con imágenes del año 2004. In: XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. Florianópolis, Brasil. pp. 1801-1808.
- Reinoso, C. 1992. Variation in *Eucalyptus globulus* in susceptibility to *Mycosphaerella* leaf diseases. Master of Forest Science thesis, University of Melbourne, Australia.
- SAS Institute. 1997. SAS/STAT software: changes and enhancements through Release 6.12. SAS Institute: Cary, NC.
- Shelbourne, C.J.A. 1992. Genetic gains from different kinds of breeding population and seed or plant production population. *South African Forestry Journal* 160: 49-65.
- Simeto, S.; Balmelli, G.; Martínez, G.; Torres, D.; González, P.; Fros, D.; Bentancur, O.; Pérez, C.A. 2010. Relevamiento sanitario de *Eucalyptus* spp. en el Sureste y Litoral Oeste del país. *Serie Actividades de Difusión INIA* 629: 41-51. Tacuarembó, Uruguay.
- Stram, D.O.; Lee, J.W. 1994. Variance components testing in the longitudinal mixed effects model. *Biometrics* 50: 1171-1177.
- Tejedor, C. 2007. Selección de una variedad clonal de *Eucalyptus globulus* spp. *globulus* tolerante a la enfermedad foliar *Mycosphaerella* sp. en el Norte de España. Centro de Investigación y Documentación del Eucalipto (CIDEU) 3: 57-66.
- Telechea, N.; Rolfo, M.; Coutinho, T.A.; Wingfield, M.J. 2003. *Puccinia psidii* on *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *Plant Pathology* 52: 427.
- Tibbits, W.N.; Boomsma, D.B.; Jarvis, S. 1997. Distribution, biology, genetics and improvement programs for *Eucalyptus globulus* and *E. nitens* around the world. In: Proc. 24th Southern Forest Tree Improvement Conference. Orlando, USA, pp. 81-95.
- Volker, P.W.; Dean, C.A.; Tibbits, W.N.; Ravenwood, I.C. 1990. Genetic parameters and gains expected from selection in *Eucalyptus globulus* in Tasmania. *Silvae Genetica* 39: 18-21.
- Wingfield, M.J. 1999. Internal Report on Diseases of Plantation *Eucalyptus* in Uruguay. 28p.

- Wingfield, M.J.; Slippers, B.; Hurley, B.P.; Coutinho, T.A.; Wingfield, B.D.; Roux, J. 2008. Eucalypt pests and diseases: Growing threats to plantation productivity. *Southern Forests* 70: 139-144.
- Xavier, A.A.; Sanfuentes, E.V.; Junghans, D.T.; Alfenas, A.C. 2007. Resistência de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens* a ferrugem (*Puccinia psidii*). *Revista Arvore* 31: 731-735.

ARTÍCULO III

RESUMEN

Susceptibilidad a *Teratosphaeria nubilosa* y precocidad del cambio de fase vegetativo en *Eucalyptus globulus* y *E. maidenii* (Myrtaceae)

Desde el primer reporte de *Teratosphaeria nubilosa* en Uruguay en 2007, las plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* y *E. maidenii* han sufrido severos daños por *Mycosphaerella*. La variación genética para resistencia y para el momento del cambio de fase fue examinado en 194 familias de polinización abierta de *E. globulus* y 86 familias de *E. maidenii* en un ensayo naturalmente infectado por *T. nubilosa* en el sureste de Uruguay. La severidad de la enfermedad, la precocidad del cambio de follaje y el crecimiento de los árboles fueron evaluados a los 14 meses. *Eucalyptus globulus* fue significativamente más susceptible a *T. nubilosa* que *E. maidenii*, presentando mayor severidad de manchas foliares (10.6 y 5.6%, respectivamente), mayor defoliación (31.9 y 22.9%, respectivamente) y mayor índice de daño de copa (39.1 y 27.4%, respectivamente). Sin embargo, el cambio de follaje comenzó significativamente más temprano en *E. globulus* que en *E. maidenii*, con 34.1% y 2.8% de los árboles presentando follaje adulto en parte de la copa, respectivamente. En *E. globulus* la heredabilidad individual en sentido estricto fue significativa para severidad de manchas foliares (0.40), defoliación (0.24), índice de daño de copa (0.30) y proporción de follaje adulto (0.64). La variación genética aditiva en *E. maidenii* solo fue significativa para defoliación y para el índice de daño de copa, con una heredabilidad moderada (0.21 y 0.20, respectivamente). Aunque *E. maidenii* fue más resistente a *T. nubilosa* que *E. globulus*, el grado de resistencia no fue suficiente para considerar esta especie como una alternativa a *E. globulus* para sitios con alto riesgo de la enfermedad. Además, la escasa variabilidad genética para resistencia del follaje juvenil y el tardío cambio a follaje adulto sugieren que las posibilidades de selección temprana en *E. maidenii* son bastante limitadas. Por contraste, la variación genética en *E. globulus* claramente indica que a través de selección por resistencia del follaje juvenil, y especialmente mediante selección por precocidad del cambio de follaje, es posible obtener material de propagación apropiados para sitios con alto riesgo de infección por *T. nubilosa*.

Palabras clave: patógenos, daño de *Mycosphaerella*, transición heteroblástica.

Susceptibility to *Teratosphaeria nubilosa* and precocity of vegetative phase change in *Eucalyptus globulus* and *E. maidenii* (Myrtaceae)

Gustavo Balmelli ^{AC}, Sofía Simeto ^A, Diego Torres ^A, Alicia Castillo ^A, Nora Altier ^A, Julio J. Diez ^B

^A Programa Forestal. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Ruta 5, Km 386. Tacuarembó, Uruguay.

^B Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. Instituto de Gestión Forestal Sostenible. Universidad de Valladolid. Avenida Madrid 44. Palencia, España.

ABSTRACT

Since the first report of *Teratosphaeria nubilosa* (Cooke) Crous and U.Braun in Uruguay in 2007, young plantations of *Eucalyptus globulus* Labill. and *E. maidenii* F.Muell. have been severely damaged by Mycosphaerella leaf disease. The genetic variation in disease resistance and in the timing of heteroblastic phase change was examined in 194 open pollinated families of *E. globulus* and 86 families of *E. maidenii* growing in a field trial in southeast Uruguay naturally infected by *T. nubilosa*. Disease severity, precocity of vegetative phase change and tree growth were assessed at 14 months. *E. globulus* was significantly more susceptible to *T. nubilosa* than was *E. maidenii*, presenting higher severity of leaf spots (10.6 and 5.6%, respectively), higher defoliation (31.9 and 22.9%, respectively) and higher crown damage index (39.1 and 27.4%, respectively). However, the heteroblastic transition began significantly earlier in *E. globulus* than in *E. maidenii*, with 34.1% and 2.8% of the trees having some proportion of their crown with adult foliage at 14 months, respectively. Significant individual narrow-sense heritabilities were found in *E. globulus* for severity of leaf spots (0.40), defoliation (0.24), crown damage index (0.30) and proportion of adult foliage (0.64). Additive genetic variation in *E. maidenii* was only significant for defoliation and crown damage index, with a moderate heritability (0.21 and 0.20, respectively). Although *E. maidenii* was more resistant to *T. nubilosa* than *E. globulus*, the degree of resistance was not enough to consider this species as an alternative to *E. globulus* for high-risk disease sites. In addition, the small genetic variability for resistance on the juvenile foliage and the late transition to adult foliage suggest that the chances for early selection in *E. maidenii* are quite limited. By contrast, the genetic variation in *E. globulus* clearly indicates that

through selection by resistance of the juvenile foliage, and especially by selecting for early phase change, it is possible to obtain genetic stock suitable for sites with high risk of *T. nubilosa* infection.

Keywords: forest pathology, disease damage, heteroblastic transition, *Mycosphaerella* leaf disease

INTRODUCTION

More than 150 species of *Mycosphaerellaceae* and *Teratosphaeriaceae* have been identified causing diseases in *Eucalyptus* (Burgess *et al.* 2007; Crous *et al.* 2007; Andjic *et al.* 2010; Carnegie *et al.* 2011; Hunter *et al.* 2011), being collectively referred to as *Mycosphaerella* leaf disease (MLD). *Teratosphaeria nubilosa* is considered one of the most destructive MLD species worldwide (Mohammed *et al.* 2003; Hunter *et al.* 2009). It is present in native forests and *Eucalyptus* plantations of most states of Australia (Dungey *et al.* 1997; Milgate *et al.* 2001; Carnegie 2007; Barber *et al.* 2008; Jackson *et al.* 2008; Pérez *et al.* 2012). *T. nubilosa* is also present as an invasive pathogen of *Eucalyptus* plantations in many countries including South Africa (Crous and Wingfield 1996; Hunter *et al.* 2004); Kenya, Tanzania, Zambia (Hunter *et al.* 2008), Ethiopia (Gezahgne *et al.* 2006), New Zealand (Mohammed *et al.* 2003), Spain (Crous *et al.* 2004), Portugal (Crous *et al.* 2006), Uruguay and Brazil (Pérez *et al.* 2009a, 2009b), commonly causing severe damage in *E. globulus* commercial plantations (Hunter *et al.* 2009). Although *T. nubilosa* has been found on adult leaves (Kularatne *et al.* 2004; Pérez *et al.* 2009b), it affects primarily juvenile and intermediate foliage (Crous 1998; Carnegie and Ades 2002). It is capable of causing severe leaf spotting, premature defoliation and shoot blight, which is highly detrimental to growth and can lead to poor tree form, resulting in significant productivity losses (Lundquist and Purnell 1987; Carnegie *et al.* 1998; Mohammed *et al.* 2003; Milgate *et al.* 2005; Hunter *et al.* 2009).

There are more than 700,000 hectares of commercial plantations of *Eucalyptus* in Uruguay (MGAP 2013). *E. globulus* is the most widely planted species, covering approximately 280,000 hectares, and *E. maidenii* covers more than 50,000 hectares in the country. The high susceptibility of the juvenile foliage of *E. globulus* and *E. maidenii* to *T. nubilosa* (Carnegie *et al.* 1994, 1998), coupled with the large volume of inoculum produced by this pathogen (Park 1988a) and the frequent occurrence of environmental conditions predisposing to the disease (i.e. 5-7 days of wetting at 10-20 °C, Park

1988b), results in a high risk of outbreaks of MLD in Uruguay. Indeed, since its appearance in 2007 (Perez *et al.* 2009a), *T. nubilosa* has had devastating consequences for plantations up to 2 years old, mainly those of *E. globulus*, which often experiences defoliations over 80% (Balmelli *et al.* 2009a, 2009b, 2011; Simeto *et al.* 2010). This has led to a drastic reduction in the area reforested annually with *E. globulus*, which dropped from 11,600 hectares in 2006 to 706 hectares in 2011 (MGAP 2013), and its replacement by more resistant species such as *E. grandis* and *E. dunnii* in Uruguay (Balmelli *et al.* 2013b). This fact, and similar antecedents on other countries, for example in South Africa (Lundquist and Purnell 1987) and in high-risk areas of Tasmania, Australia (Mohammed *et al.* 2003), suggests that if effective management methods for this disease are not developed, in a few years the planting of *E. globulus* and *E. maidenii* could be completely abandoned in Uruguay.

Due to economical, environmental and operational constraints, silvicultural options for minimizing the effects of MLD in eucalypt plantations are very limited. Several strategies have been proposed, including site selection (i.e. avoidance of planting on high-risk sites) (Carnegie 2007), the application of fungicides (Carnegie and Ades 2003), the increase of tree vigor and tolerance through intensive forest management or by plant defense activators (Stone 2001; Mohammed *et al.* 2003) and accelerating the recovery of trees by remedial fertiliser applications (Pinkard *et al.* 2006a, 2006b, 2007; Carnegie 2007). However, these alternatives have not proven to be effective in the control of *T. nubilosa* in plantations at a commercial scale. Therefore, it has been proposed that the use of resistant species and the deployment of resistant planting stock are the most effective approaches to prevent the disease or to reduce the risk of damage to acceptable levels in eucalypt plantations (Carnegie *et al.* 1994; Dungey *et al.* 1997; Tibbits *et al.* 1997; Alfenas *et al.* 2004; Milgate *et al.* 2005; Hunter *et al.* 2009; Pérez *et al.* 2009a).

Many eucalypts, including *E. globulus* and *E. maidenii*, are heteroblastic, with juvenile foliage present in young trees and adult foliage developing at a later stage (James and Bell 2001). As adult foliage is more resistant to most pathogens (Park *et al.* 2000), high incidence and severity of MLD is observed on juvenile foliage, making MLD a problem mainly of young eucalypt plantations (Pinkard and Mohammed 2006). For this reason, two mechanisms to reduce foliar damage have been proposed by Milgate *et al.* (2005): i) improving disease resistance of the juvenile foliage and ii) selecting for early change to adult foliage. Several studies analyze the genetic variation in *E. globulus* for

susceptibility to MLD (Reinoso 1992; Carnegie *et al.* 1994; Dungey *et al.* 1997; Carnegie and Ades 2005; Milgate *et al.* 2005; Costa e Silva *et al.* 2013a, 2013b; Hamilton *et al.* 2013) and the genetic variation for timing of heteroblastic transition (Reinoso 1992; Jordan *et al.* 1999; Lopez *et al.* 2002; Hamilton *et al.* 2011). However, as *E. maidenii* is rarely commercially used worldwide, there is almost no information on genetic variation in this species either for susceptibility to MLD or for the timing of heteroblastic transition. The present work was performed on a progeny test of *E. globulus* and *E. maidenii* in southeastern Uruguay naturally infected by *T. nubilosa*. The objectives of the study were to: a) determine the relative susceptibility of *E. globulus* and *E. maidenii* to *T. nubilosa*, b) determine the precocity of vegetative phase change, and c) estimate the genetic variability of leaf spotting, defoliation and timing of phase change on each *Eucalyptus* species.

MATERIALS AND METHODS

Field trial and genetic material

A progeny test of *E. globulus* and *E. maidenii* was established in March 2011 by the National Institute of Agricultural Research (INIA), in Lavalleja, Uruguay (Lat. 34° 11' S; Long. 54° 54' W; Alt. 206 m). This region experiences a temperate climate, with a mean annual temperature of 17°C and an average annual rainfall of 1200 mm (Castaño *et al.* 2011). The genetic material included 6720 trees derived from 194 open-pollinated families of *E. globulus* and 86 families of *E. maidenii*. This material was obtained from INIA's seed orchards at Canelones and Tacuarembó, provinces of Uruguay (Table 1). The trial was established as three randomised complete blocks of eight-tree line plots. Trees were planted at a spacing of 3.5 m x 2.0 m (1428 trees/ha), on a well-drained loamy sandy soil of moderate fertility. The land use prior to the establishment of the trial was an *E. globulus* plantation. Soil preparation consisted of ripping, herbicide application (Glyphosate 50%, 3 L/ha) and ploughing in bands. At planting, 80 g of 12:48:8 N:P:K fertiliser was applied to each plant and herbicide (Oxifluorfen 23.5% + Acetochlor 90%: 1.5 + 1.5 L/ha) applied on 1.2 m wide planted band. After 12 months, Glyphosate was applied (3 L/ha) between rows.

Table 1. Origin and number of grandparents and parents (female parent of open-pollinated families) of *Eucalyptus globulus* and *E. maidenii* grown in a progeny test in south-eastern Uruguay. The Uruguayan land races of both species correspond to plus trees selected in commercial plantations with unknown seed origin. Vic., Victoria; Tas., Tasmania; NSW, New South Wales; URU, Uruguay; and CHI, Chile.

Species	Provenance ^a	Number of grandparents	Number of parents
<i>E. globulus</i>	Jeeralang N (Vic.)	20	35
<i>E. globulus</i>	SW Lorne (Vic.)	3	3
<i>E. globulus</i>	Flinders Is. (Tas.)	6	9
<i>E. globulus</i>	NE Coast (Tas.)	2	3
<i>E. globulus</i>	Moogara (Tas.)	2	2
<i>E. globulus</i>	Geeveston (Tas.)	3	3
<i>E. globulus</i>	Boncini (URU)	40	88
<i>E. globulus</i>	Diano (URU)	16	36
<i>E. globulus</i>	Doña Pancha (URU)	4	11
<i>E. globulus</i>	Osorno (CHI)	4	4
		Total	194
<i>E. maidenii</i>	Bolaro Mountain (NSW)	10	21
<i>E. maidenii</i>	Mt Dromedary (NSW)	3	3
<i>E. maidenii</i>	Bañado Medina (URU)	4	8
<i>E. maidenii</i>	Gregorio Aznárez (URU)	17	32
<i>E. maidenii</i>	Migues (URU)	6	13
<i>E. maidenii</i>	Minas (URU)	6	9
		Total	86

Pathogen identification

In February 2012, when the trees were about 1 year old, there were several consecutive days of rain and high humidity, causing a severe infection of MLD (Fig. 1a-b). Diseased leaves were collected from 40 *E. globulus* and 40 *E. maidenii* trees throughout the trial in April 2012. Small, round, pale-brown spots surrounded by a thin brown margin and the presence of hypophylous black pseudothecia containing ascospores were consistent with *T. nubilosa* symptoms (Fig. 1c-d). To confirm the identity of the causal agent, 30 single-spore cultures were obtained from leaf spots according to Crous (1998). Germination pattern was observed after 24 h incubation of ascospores on 2% malt extract agar (MEA) at 25°C and colony morphology was recorded once mycelia had developed.

Genomic DNA was extracted from monosporic isolates by scraping mycelia directly from cultures and transferring it to 2 ml Eppendorf tubes with three sterile 3 mm borosilicate beads and 25 mg of diatomaceous earth. Subsequently, 500 µl of extraction

buffer (200 mM Tris HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) was added. The mycelium was ground to powder using a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) for 3 minutes at 30 Hz. The rest of the procedure was as described by Raeder and Broda (1985). The ITS region was amplified using primers ITS1 and ITS4 (White *et al.* 1990). The PCR amplifications were performed in a Corbett Research CG1-96 PalmCycler (Mortlake NSW, Australia), with a total volume of 20 µl containing: 25 ng genomic DNA, 0.2 mM of each primer; buffer 1x; 1.5 mM MgCl₂; 1.0 U *Taq* polymerase (Invitrogen, Brazil) and 0.4 mM of each dNTP (Fermentas, EU) and deionised-distilled water to complete the volume. The cycling program consisted of an initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50°C, 1 min at 72°C; followed by a final elongation step of 10 min at 72°C. The amplicons were sequenced at MacroGen sequencing service (MacroGen Inc., Seoul, Korea). The resulting sequences were analyzed using the BLASTn algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, accessed 05/05/2012). The thirty sequences obtained were deposited in GenBank (accession numbers KF369944 to KF369973).

Measurements

Severity of MLD damage, timing of heteroblastic transition and tree growth, were recorded in May 2012 (age 14 months), coinciding with an outbreak of MLD caused by *T. nubilosa*. Disease incidence (% of trees showing leaf spots) in the trial was very high, reaching almost 100% for both *E. globulus* and *E. maidenii*. The degree of foliar damage was quantified for each tree, using two parameters: I) severity of leaf spots (percentage of leaf area affected by spots) and II) defoliation (percentage of leaves prematurely abscised). The evaluations were carried out for the whole crown (juvenile and adult foliage), using visual scales adapted from Lundquist and Purnell (1987) and from Carnegie *et al.* (1994). There were no trees with over 40% of the leaf surface spotted and 60% defoliation, thus leaf spot severity (SEV) was classified according to classes of diseases of 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40% and defoliation (DEF) according to classes of 0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60%. Using these parameters, a crown damage index (ranging from 0 to 100) was calculated to estimate the total foliar damage caused by the disease. The crown damage index (CDI), adapted from Stone *et al.* (2003), was calculated as:

$$CDI = DEF + ((1 - DEF/100) \times SEV/100)$$

The precocity of vegetative phase change was assessed on each tree as the proportion of the crown with adult foliage (petiolate, alternate, shiny green and pendulous leaves). The proportion of adult foliage (ADFO) was quantified using percentage intervals of 10% (Fig. 1e-g). Tree growth was assessed by measuring the total height (HT).

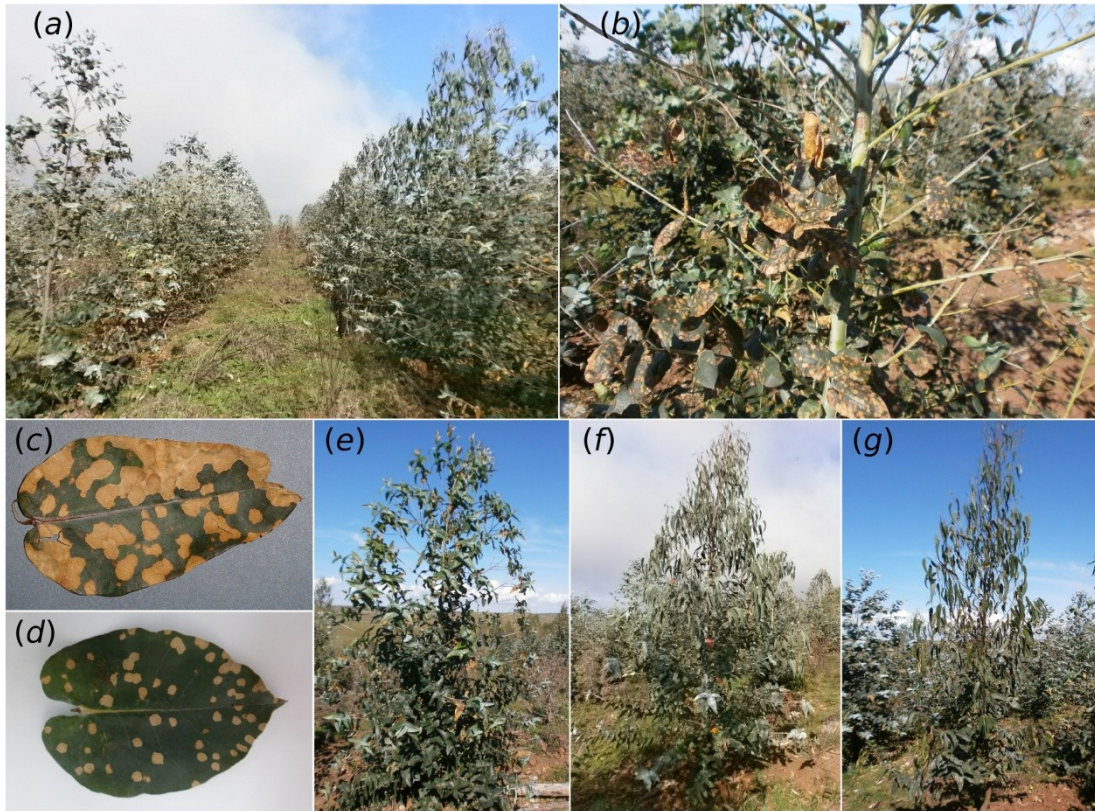


Figure 1. (a) General view of the trial at the assessment time (14 months). (b) Leaf spots and defoliation by *Mycosphaerella* leaf disease. (c, d) Typical symptoms of *Teratosphaeria nubilosa* in (c) *Eucalyptus globulus* and (d) *E. maidenii*. (e-g) Vegetative phase change in *E. globulus*. (e) Tree with 100% juvenile foliage, (f) tree with 40% adult foliage and (g) tree with 70% adult foliage.

Data analysis

ANOVAs were carried out for SEV, DEF, CDI, ADFO and HT to test for differences between eucalypt species using the GLM procedure of SAS (SAS Institute 1997). No important departures from homoscedasticity and normality were observed for DEF, CDI and TH. To achieve normality and homogeneity of residuals, data from SEV and ADFO were log transformed for analysis.

For each eucalypt species, variance components for every trait were estimated with an individual tree mixed model, using restricted maximum likelihood implemented in ASREML (Version 3.0) (Gilmour *et al.* 2009). As the trees in the trial were derived from seed orchards, with some open-pollinated families sharing common grandparents, the individual tree model used included known pedigree information to construct an additive relationship matrix from which additive effects are estimated directly (Gilmour *et al.* 2009). The pedigree file included the grandparent and a common pollen parent representing the pollen environment of the seed orchard. The univariate model fitted was:

$$Y = MU + REP + FAM + REP*FAM + ERROR \quad (1)$$

where Y is the observation; MU is the general mean; REP is the fixed replicate effect; FAM is the random family effect; REP*FAM is the random family-replicate interaction; and ERROR is the residual. The additive variance (σ_a^2), phenotypic variance (σ_p^2) and open-pollinated narrow-sense heritability (h_{op}^2) were calculated as:

$$\sigma_a^2 = \frac{\sigma_f^2}{r} \quad (2)$$

$$\sigma_p^2 = \sigma_f^2 + \sigma_{fb}^2 + \sigma_e^2 \quad (3)$$

$$h_{op}^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_p^2} \quad (4)$$

where σ_f^2 is the family within provenance variance; σ_{fb}^2 is the family-replicate interaction variance; σ_e^2 is the residual variance; and r is the coefficient of relationship, fixed to 0.4 to adjust the deviations from the half-sib relatedness (assuming a selfing rate of 30%) (Volker *et al.* 1990). As the damage assessment was performed on the whole crown, in those trees with adult foliage (which is less affected by the pathogen) the disease resistance may be overestimated. Therefore, the genetic variation for SEV, DEF and CDI in *E. globulus* (species in which there were many trees with some proportion of adult foliage, see Results) was analyzed using the ADFO as a covariate.

Phenotypic correlations (r_p) among traits were analyzed using the CORR procedure of SAS (SAS Institute 1997). Additive genetic correlations (r_g) between pairs of traits were estimated using ASREML (Version 3.0) (Gilmour *et al.* 2009), fitting the same model (Eqn 1), with the variance components derived from univariate analyses as starting values. The standard errors of parameters were estimated by ASREML from the

average information matrix, using a standard truncated Taylor series approximation (Gilmour *et al.* 2009). The significance of the deviation of the variance components from zero were tested using a one-tailed likelihood ratio test (LRT) (Stram and Lee 1994). Heritabilities were assumed to be significant if the additive variances were significantly greater than zero. The significance of the deviation of the genetic correlations estimates from zero was based on two-tailed likelihood ratio tests (LRT) (Gilmour *et al.* 2009).

RESULTS

Pathogen identification

Germination pattern of ascospores after 24 h at 25°C was type C (according to Crous 1998) and culture characteristics on MEA (greyish aerial mycelia with irregular edges and colonies attaining 10-15 mm diameter in one month) were identical to those described for *T. nubilosa* (Crous 1998). All sequences analyzed using BLASTn showed 100% homology with other *T. nubilosa* sequences previously reported (Crous *et al.* 2006; Pérez *et al.* 2009a; 2012), confirming that *T. nubilosa* was the causal agent of MLD in the trial.

Overall performance of *E. globulus* and *E. maidenii*

Average survival was 80.7% for *E. globulus* and 83.5% for *E. maidenii*, with tree height of *E. globulus* being slightly higher than that of *E. maidenii* (Table 2). The damage caused by *T. nubilosa* was moderately high, with a mean total foliar damage (CDI) of 39.1% on *E. globulus* and 27.4% on *E. maidenii*. Defoliation was responsible for 81.6% of the CDI in *E. globulus* and 83.6% in *E. maidenii*. SEV, DEF and CDI were significantly higher for *E. globulus* than for *E. maidenii* (Table 2). The percentage of trees that had begun the phase change was 34.1% in *E. globulus* and only 2.8% in *E. maidenii*, with an average ADFO significantly higher for *E. globulus* than for *E. maidenii* (Table 2).

Table 2. Comparison of growth, disease damage and precocity of phase change between *Eucalyptus globulus* and *E. maidenii* grown in a progeny test affected by *Teratosphaeria nubilosa* in south-eastern Uruguay. HT, tree height; ADFO, log-transformed percentage of adult foliage; SEV, log-transformed severity of leaf spots; DEF, defoliation; CDI, crown-damage index. *n* = number of individuals. Values are least-squares (LS) means \pm standard errors.

Trait (unit)	<i>E. globulus</i> (<i>n</i> = 3756)	<i>E. maidenii</i> (<i>n</i> = 1723)	Significance of the difference between LS means
HT (cm)	286 \pm 0.89	275 \pm 1.30	<i>P</i> = 0.009
ADFO (%) ^A	9.5 \pm 0.19	0.6 \pm 0.27	<i>P</i> = 0.004
SEV (%) ^A	10.6 \pm 0.05	5.6 \pm 0.07	<i>P</i> = 0.035
DEF (%)	31.9 \pm 0.13	22.9 \pm 0.20	<i>P</i> = 0.002
CDI (%)	39.1 \pm 0.13	27.4 \pm 0.20	<i>P</i> = 0.008

^A Values are back-transformed from analysed log-transformed data.

Genetic variation in tree growth, disease damage and precocity of phase change

Significant additive genetic variation was found in *E. globulus* for all traits. HT, log transformed SEV, DEF and CDI at 14 months had moderately high or moderate individual narrow-sense heritabilities ($h^2 = 0.33$; 0.40; 0.24 and 0.30, respectively), and log transformed ADFO had a high heritability ($h^2 = 0.64$) (Table 3). The additive genetic variation for *E. maidenii* was smaller than for *E. globulus* for all traits (Table 3). In *E. maidenii*, the individual narrow-sense heritabilities for DEF and CDI were significant and moderate ($h^2 = 0.21$ and 0.20, respectively), but TH and log transformed SEV had very low, and non-significant, heritabilities (Table 3). Since less than 3% of the trees of *E. maidenii* had begun the phase change at the time of assessment, genetic variation for the ADFO was not estimated for this species.

Table 3. Phenotypic variance (σ_p^2), additive variance (σ_a^2), individual narrow-sense heritability estimates (h_{op}^2) and standard errors (s.e.) of assessed traits on *Eucalyptus globulus* and *E. maidenii*. HT, tree height; ADFO, log-transformed percentage of adult foliage; SEV, log-transformed severity of leaf spots; DEF, defoliation; CDI, crown-damage index. For heritability estimates, ***P* < 0.01, n.s. *P* > 0.05.

Trait	<i>E. globulus</i> (<i>n</i> = 3756)			<i>E. maidenii</i> (<i>n</i> = 1723)		
	$\sigma_p^2 \pm$ s.e.	$\sigma_a^2 \pm$ s.e.	$h_{op}^2 \pm$ s.e.	$\sigma_p^2 \pm$ s.e.	$\sigma_a^2 \pm$ s.e.	$h_{op}^2 \pm$ s.e.
HT (cm)	3459 \pm 125	1128 \pm 260	0.33 \pm 0.07**	2663 \pm 132	125 \pm 230	0.05 \pm 0.09n.s.
ADFO (%) ^A	3.64 \pm 0.13	2.32 \pm 0.29	0.64 \pm 0.06**	-	-	-
SEV (%) ^A	0.11 \pm 0.003	0.04 \pm 0.01	0.40 \pm 0.06**	0.32 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.04 \pm 0.05n.s.
DEF (%)	75.44 \pm 2.15	17.75 \pm 3.96	0.24 \pm 0.05**	55.3 \pm 2.23	11.3 \pm 3.84	0.21 \pm 0.07**
CDI (%)	74.91 \pm 2.19	22.12 \pm 4.24	0.30 \pm 0.05**	58.9 \pm 2.40	11.8 \pm 4.16	0.20 \pm 0.07**

^A The parameter estimates are given for log-transformed data.

Relationship between disease resistance, early transition to adult foliage and tree growth

All phenotypic and genetic correlations in *E. globulus*, except between HT and log transformed SEV, were statistically significant ($P < 0.01$) (Table 4). The phenotypic correlation between log transformed SEV and DEF were low and positive ($r_p = 0.27$) and the genetic correlation between these traits was moderate and positive ($r_g = 0.52$). HT was negatively correlated with DEF and CDI ($r_p = -0.21$ and -0.19 ; $r_g = -0.39$ and -0.37). HT was moderately correlated with log transformed ADFO ($r_p = 0.41$, $r_g = 0.49$). The phenotypic correlations between log transformed ADFO and disease traits (log transformed SEV, DEF and CDI) were moderately low and negative ($r_p = -0.17$ to -0.35) and the genetic correlations were moderate or moderately high and negative ($r_g = -0.31$ to -0.71) (Table 4). The phenotypic correlations between the assessed traits in *E. maidenii* were all statistically significant ($P < 0.01$), presenting the same sign and similar values than in *E. globulus* (Table 4). As previously stated, only a small number of trees in *E. maidenii* had begun the phase change and therefore phenotypic and genetic correlations between the proportion of adult foliage and other traits were not estimated for this species. In addition, as the additive variances for tree height and severity of leaf spots were not significant in *E. maidenii* (Table 3), genetic correlations between these traits were also not estimated in this species.

Table 4. Phenotypic and genetic correlations, and standard errors, between traits on *Eucalyptus globulus* and *E. Maidenii*. The traits assessed comprised tree height (HT), log-transformed percentage of adult foliage (ADFO), log-transformed severity of leaf spots (SEV), defoliation (DEF) and crown-damage index (CDI). ** $P < 0.01$; n.s., $P > 0.05$.

Trait comparison	<i>E. globulus</i> ($n = 3756$)		<i>E. maidenii</i> ($n = 1723$)
	Phenotypic	Genetic	Phenotypic
SEV vs DEF	$0.27 \pm 0.02^{**}$	$0.52 \pm 0.09^{**}$	$0.26 \pm 0.03^{**}$
HT vs SEV	0.01 ± 0.02 n.s.	-0.11 ± 0.13 n.s.	$-0.07 \pm 0.03^{**}$
HT vs DEF	$-0.21 \pm 0.02^{**}$	$-0.39 \pm 0.12^{**}$	$-0.19 \pm 0.03^{**}$
HT vs CDI	$-0.19 \pm 0.02^{**}$	$-0.37 \pm 0.12^{**}$	$-0.20 \pm 0.03^{**}$
HT vs ADFO	$0.41 \pm 0.02^{**}$	$0.49 \pm 0.09^{**}$	–
ADFO vs SEV	$-0.17 \pm 0.02^{**}$	$-0.31 \pm 0.09^{**}$	–
ADFO vs DEF	$-0.34 \pm 0.02^{**}$	$-0.71 \pm 0.07^{**}$	–
ADFO vs CDI	$-0.35 \pm 0.02^{**}$	$-0.67 \pm 0.06^{**}$	–

DISCUSSION

Three months after the outbreak of MLD caused by *T. nubilosa*, disease incidence (% of trees infected) in the trial was very high, reaching almost 100% in both species. *E. globulus* was significantly more susceptible to *T. nubilosa* than *E. maidenii*, presenting higher severity of leaf spots and higher defoliation. Conversely, the heteroblastic transition in *E. globulus* began significantly earlier than in *E. maidenii*. Although adult leaves presented some leaf spots of *T. nubilosa*, the disease primarily affected juvenile leaves, which are highly susceptible (Park *et al.* 2000; Milgate *et al.* 2001).

Therefore, although *E. globulus* is more susceptible than *E. maidenii*, the more precocious phase change of *E. globulus* implies a shorter period of susceptibility, allowing this species an earlier escape from the disease. Higher resistance of the juvenile foliage to *T. nubilosa* in *E. maidenii* than in *E. globulus* was reported by Hood *et al.* (2002) in two different trials of *E. globulus* subspecies and provenances in New Zealand. Similar results, but for a mix infection of *T. nubilosa* and *T. cryptica*, were found by Carnegie *et al.* (1994) in a trial of subspecies and provenances of *E. globulus* in south-eastern Australia (Victoria). In another study that included this trial, and in a second trial in Victoria, Carnegie and Ades (2005) also found higher resistance on the adult foliage of *E. maidenii* to *T. cryptica*. As suggested by Carnegie *et al.* (1994) and by Hood *et al.* (2002), the differences of resistance between *E. maidenii* and *E. globulus* to *T. nubilosa* might be explained by natural adaptation to the disease. As *E. maidenii* occurs on areas of warmer and wetter summers than *E. globulus* (Jordan *et al.* 1993), the higher inoculum pressure induced by these conditions could have led to the development of higher resistance through a more intense natural selection. According to Jordan *et al.* (2000), early phase change in heteroblastic species might be also favored in warm and wet environments in response to leaf diseases. However, this does not explain, and in fact is contradictory with, the higher precocity of vegetative phase change observed in *E. globulus*. This apparent contradiction could be the result of different processes of natural selection against foliar diseases in both species.

Genetic variation for resistance to *T. nubilosa* was found in *E. globulus* and *E. maidenii*. In both species, the genetic variation for defoliation and crown damage index was higher than for severity of leaf spots. Although the additive variance for severity of leaf spots was statistically significant in *E. globulus*, it was very low, probably explained by

the high susceptibility of this species (Carnegie *et al.* 1998). In the case of *E. maidenii*, significant additive variance was found for defoliation and crown damage index, but not for severity of leaf spots. This could be an intrinsic characteristic of the species or could be explained by the more reduced genetic base of the assessed population. While there are no published results on genetic control for resistance to *T. nubilosa* in *E. maidenii*, our individual tree narrow-sense heritability estimates for defoliation (0.21) and crown damage index (0.20) suggests that it is possible to obtain acceptable responses to selection for resistance to this pathogen.

In *E. globulus* the heritability estimate was moderately high for severity of leaf spots (0.40) and moderate for defoliation (0.24) and crown damage index (0.30). Although these values are lower than the heritability obtained by Milgate *et al.* (2005) for severity to *T. nubilosa* (0.60), they are similar to those reported also in *E. globulus* by the following authors: Reinoso (1992) estimated heritabilities for severity to MLD from 0.23 to 0.48; Dungey *et al.* (1997) from 0.12 to 0.21 for damage by *T. nubilosa* and *T. cryptica*; Carnegie and Ades (2005) from 0.17 to 0.36 for damage by *T. cryptica*; Hamilton *et al.* (2013) from 0.13 to 0.35 for severity to MLD, and Costa e Silva *et al.* (2013a) from 0.31 to 0.34 for susceptibility to *T. nubilosa*. In the present work, the severity of leaf spots showed higher heritability than did defoliation, however, because the latter characteristic had higher genetic variation and accounted for over 80% of total foliar damage, selection by defoliation should be prioritised in order to seek resistant genetic stock.

The proportion of adult foliage in *E. globulus* at 14 months presented a high heritability (0.64). This value agrees with the heritabilities reported for this species in Australia by Lopez *et al.* (2002) for proportion of adult foliage (0.54-0.65) and for height of phase change by Jordan *et al.* (1999) (0.43-0.74) and Hamilton *et al.* (2011) (0.44-0.65) and is also higher than the heritability obtained for *E. globulus* in other trials in Uruguay (0.41) (Balmelli *et al.* 2013a). The strong genetic control of the timing of phase change in *E. globulus* is confirmed by the very high inter-trial genetic correlation, i.e. very low genotype-by-environment interaction, reported by Lopez *et al.* (2002) (0.88-0.96) and by Hamilton *et al.* (2011) (0.39-1.02). These results suggest that there are excellent opportunities for selection and breeding to obtain genetic stock with an earlier change to adult foliage, which represents a form of escape from diseases such as MLD primarily affecting juvenile foliage (Carnegie *et al.* 1994; Park *et al.* 2000).

The relationship between leaf spot severity and defoliation was moderately low, with significant phenotypic correlations (0.27 and 0.26) on both species and significant genetic correlation (0.52) in *E. globulus*. Considering that *T. nubilosa* was the cause of defoliation (leaves that were falling were heavily infected, the canopies had not closed at the time of assessment and no other disease or possible cause was evident), these values are lower than expected. However, the fact that more heavily spotted leaves are those that generally fall, which reduces the spot severity on the tree and its variation among trees, could explain the relatively low phenotypic correlation between both characteristics. Other authors had also found low correlations between disease severity and defoliation in *E. globulus* (Reinoso 1992, $r_p = -0.02$ to 0.30 and $r_g = 0.09$ to 0.20; Carnegie *et al.* 1994, $r_p = 0.53$; Milgate *et al.* 2005, $r_p = 0.45$), suggesting that the timing of assessment has an important effect on the relative degree of severity of leaf spots and defoliation caused by MLD.

Tree height was phenotypically correlated with defoliation (-0.21 and -0.19) and crown damage index (-0.19 and -0.20) in both *E. globulus* and *E. maidenii*, indicating that the faster the initial growth the lower the degree of damage caused by the disease. A significant relationship was found on *E. globulus* between the genetic control for tree height and defoliation ($r_g = -0.39$) and between tree height and crown damage index ($r_g = -0.37$). Comparable genetic correlations (-0.52) between height at 2 years and severity of damage due to *T. nubilosa* were reported on *E. globulus* in Australia by Milgate *et al.* (2005). These results argue that selection for initial growth on *E. globulus* could improve resistance for sites affected by *T. nubilosa*, and *vice versa*.

There were moderate but significant phenotypic ($r_p = 0.41$) and genetic ($r_g = 0.49$) correlations between tree height and proportion of adult foliage in *E. globulus*, indicating that those trees and families that grew faster tended to change the foliage earlier and therefore that selection by tree growth would reduce the juvenile phase. These results are comparable with previous findings on *E. globulus* growing in Uruguay reported by Balmelli *et al.* (2013a), who found positive phenotypic (0.35) and genetic (0.39) correlations between tree height at the age of 8 months and the proportion of adult foliage at the age of 20 months. Jordan *et al.* (2000) suggested that the onset of phase change is determined by the developmental age (the number of nodes set) and, thus, it would be expected that phase change occur sooner in fast growing plants. However, other authors have reported more variable correlations between growth and the timing of phase change in *E. globulus*: López *et al.* (2002) reported genetic

correlations ranging from -0.01 to 0.27 between tree height and the percentage of adult foliage and Milgate *et al.* (2005) found no significant genetic correlations between growth and height to phase change. Jordan *et al.* (2000) found that the genetic association between the growth rate and the timing of phase change ranged across sites from positive values to negative values.

The relationships between disease damage (leaf spot severity, defoliation and crown damage index) and the proportion of adult foliage were significant and negative on *E. globulus*, with phenotypic correlations ranging from -0.17 to -0.35 and genetic correlations from -0.31 to -0.71. Although some studies have found no significant genetic correlations between the severity of damage and the timing of transition to adult foliage (Milgate *et al.* 2005; Costa e Silva *et al.* 2013a), our estimates are comparable with those obtained by Dungey *et al.* (1997), also on *E. globulus*, who report a positive genetic relationship (0.54) between disease severity and height of phase change. These correlations indicate that the trees and families with lower levels of damage had higher proportion of adult foliage and thus we can expect a more precocious shift to adult foliage by selecting for resistance to *T. nubilosa*, and *vice versa*.

This study showed that the juvenile foliage of *E. maidenii* is more resistant to *T. nubilosa* than is that of *E. globulus*. However, the degree of damage recorded in *E. maidenii* suggests that this species is not suitable for sites at risk of severe infections. In addition, the small genetic variability for resistance and the late transition from juvenile to adult foliage observed in *E. maidenii* suggest that the chances of obtaining better genotypes through selection are quite limited in this species. Conversely, to obtain genetic stock of *E. globulus* for sites with risk of damage by *T. nubilosa*, it is possible to select both for resistance of the juvenile foliage and for a precocious change to adult foliage. However, both the phenotypic variation and the heritability for timing of phase change are higher than for resistance, indicating that higher genetic gains would be expected through selection for proportion of adult foliage, i.e. selecting for an early escape to the disease. In addition, selection for this characteristic can be performed irrespective of environmental conditions and the presence of the pathogen. This is especially important for countries like Chile, where *E. globulus* is utilised commercially and *T. nubilosa* is not yet present, since it allows the selection of genetic stocks preventatively.

With the aim to obtain planting stock of *E. globulus* and *E. maidenii* with good performance in the presence of *T. nubilosa*, the parents with the most precocious phase change in the INIA's breeding populations are currently being used on intra-specific and inter-specific controlled crosses. At the same time, the individuals of both species with the highest proportion of adult foliage in the progeny test are being selected for cloning. Both the controlled crosses and the clones obtained will be assessed in the near future for their resistance to *T. nubilosa*. It is expected that in the medium term it will be possible to obtain clones that minimise the amount of damage caused by this disease on young plantations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Sierras Calmas forestry company, especially Juan Mac Gregor, for providing the location and performing the soil preparation and maintenance of the trial. We also thank INIA's Forestry Program technicians, Pablo Núñez, Federico Rodríguez, Wilfredo González and Marcelo Alfonso, for their help in plant production, trial installation and assessment; Dr. Ignacio Aguilar for his assistance in statistical analyses and Dr. Carlos Pérez and Dr. Guillermo Pérez for their comments on the manuscript. The study was partially funded by a grant (Programa de Formación del Sistema de los INIA de Iberoamérica) awarded to the first author by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) of Spain.

REFERENCES

- Alfenas, A.C.; Zauza, E.A.; Mafia, R.G.; Assis, T.F. 2004. Clonagem e Doenças do Eucalipto. Universidade Federal do Viçosa, MG. Brasil.
- Andjic, V.; Whyte, G.; Hardy, G.; Burgess, T. 2010. New *Teratosphaeria* species occurring on eucalypts in Australia. *Fungal Diversity* 43: 27-38.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Martínez, G.; Torres, D.; Pérez, C.; Fros, D.; Bentancur, O. 2009a. Incidencia y severidad de enfermedades y plagas en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* en las regiones sureste y litoral oeste de Uruguay. *INIA Serie Actividades de Difusión* 567: 51-65. Tacuarembó, Uruguay.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Martínez, G.; Torres, D.; González, P.; Fros, D.; Bentancur, O.; Pérez, C. 2009b. Relevamiento sanitario de otoño en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus dunnii* en el Sureste y Litoral Oeste. Seminario

- Técnico de Sanidad Forestal. *INIA Serie Actividades de Difusión* 594: 51-72. Tacuarembó, Uruguay.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Martínez, G.; Torres, D.; Pérez, C.A.; Bentancur, O. 2011. Incidence and severity of pests and diseases on young plantations of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. En 'IUFRO Forest Protection Joint Meeting: pathogens, insects and their associations affecting forestry worldwide' Noviembre 2011. Colonia del Sacramento, Uruguay.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Marroni, V.; Altier, N.; Diez, J.J. 2013a. Genetic variation for resistance to *Mycosphaerella* leaf disease and *Eucalyptus* rust on *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 43: 97-107.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Altier, N.; Marroni, V.; Diez, J.J. 2013b. Long term losses caused by foliar diseases on growth and survival of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *New Forests* 44: 249-263.
- Barber, P.A.; Carnegie, A.J.; Burgess, T.I.; Keane, P.J. 2008. Leaf diseases caused by *Mycosphaerella* species in *Eucalyptus globulus* plantations and nearby native forest in the Green Triangle Region of southern Australia. *Australasian Plant Pathology* 37: 472-481.
- Burgess, T.I.; Barber, P.A.; Sufaati, S.; Xu, D.; Hardy, G.E.St.J.; Dell, B. 2007. *Mycosphaerella* spp. on *Eucalyptus* in Asia; new species; new hosts and new records. *Fungal Diversity* 24: 135-157.
- Carnegie, A.J. 2007. Forest health condition in New South Wales, Australia, 1996-2005. II. Fungal damage recorded in eucalypt plantations during forest health surveys and their management. *Australasian Plant Pathology* 36: 225-239.
- Carnegie, A.J.; Ades, P.K. 2002. The proportion of leaf spots caused by *Mycosphaerella cryptica* and *M. nubilosa* on *Eucalyptus globulus*, *E. nitens* and their F1 hybrids in a family trial in Tasmania, Australia. *Australasian Mycologist* 21: 53-63.
- Carnegie, A.J.; Ades, P.K. 2003. *Mycosphaerella* leaf disease reduces growth of plantation-grown *Eucalyptus globulus*. *Australian Forestry* 66: 113-119.
- Carnegie, A.J.; Ades, P.K. 2005. Variation in *Eucalyptus globulus* Labill. and *E. nitens* Dean and Maiden in susceptibility of adult foliage to disease caused by *Mycosphaerella cryptica* (Cooke) Hansf. *Silvae Genetica* 54: 174-184.
- Carnegie, A.J.; Keane, P.J.; Ades, P.K.; Smith, I.W. 1994. Variation in susceptibility of *Eucalyptus globulus* provenances to *Mycosphaerella* leaf disease. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 1751-1757.

- Carnegie, A.J.; Ades, P.K.; Keane, P.J.; Smith, I.W. 1998. *Mycosphaerella* disease of juvenile foliage in a eucalypt species and provenance trial in Victoria, Australia. *Australian Forestry* 61: 190-194.
- Carnegie, A.J.; Pegg, G.S.; White, D.; Burgess, T.I. 2011. Species within *Mycosphaerellaceae* and *Teratosphaeriaceae* from eucalypts in eastern Australia. *Australasian Plant Pathology* 40: 366-384.
- Castaño, J.P.; Giménez, A.; Ceroni, M.; Furest, J.; Aunchayna, R. 2011. Caracterización agroclimática del Uruguay 1980-2009. *INIA Serie Técnica* 193: 1-34. Montevideo, Uruguay.
- Costa e Silva, J.; Potts, B.M.; Tilyard, P. 2013a. Stability of genetic effects across clonal and seedling populations of *Eucalyptus globulus* with common parentage. *Forest Ecology and Management* 291: 427-435.
- Costa e Silva, J.; Potts, B.M.; Bijma, P.; Kerr, R.J.; Pilbeam, D.J. 2013b. Genetic control of interactions among individuals: contrasting outcomes of indirect genetic effects arising from neighbour disease infection and competition in a forest tree. *New Phytologist* 197: 631-641.
- Crous, P.W. 1998. *Mycosphaerella* species and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. The Mycological Society of America mycological memoir N° 21. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Crous, P.W.; Wingfield, M.J. 1996. Species of *Mycosphaerella* and their anamorphs associated with leaf blotch disease of *Eucalyptus* in South Africa. *Mycologia* 88: 441-458.
- Crous, P.W.; Groenewald, J.Z.; Mansilla, J.P.; Hunter, G.C.; Wingfield, M.J. 2004. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. *Studies in Mycology* 50: 195-214.
- Crous, P.W.; Wingfield, M.J.; Mansilla, J.P.; Alfenas, A.C.; Groenewald, J.Z. 2006. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. II. *Studies in Mycology* 55: 99-131.
- Crous, P.W.; Groenewald, J.Z.; Braun, U. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology* 58: 1-32.
- Dungey, H.S.; Potts, B.M.; Carnegie, A.J.; Ades, P.K. 1997. *Mycosphaerella* leaf disease - genetic variation in damage to *Eucalyptus nitens*, *Eucalyptus globulus*, and their F-1 hybrid. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 750-759.

- Gezahgne, A.; Roux, J.; Hunter, G.C.; Wingfield, M.J. 2006. *Mycosphaerella* species associated with leaf disease of *Eucalyptus globulus* in Ethiopia. *Forest Pathology* 36: 253-263.
- Gilmour, A.R.; Gogel, B.J.; Cullis, B.R.; Thompson, R. 2009. ASReml User Guide Release 3.0. VSN International Ltd: Hemel Hempstead, UK.
- Hamilton, M.G.; Tilyard, P.A.; Williams, D.R.; Vaillancourt, R.E.; Wardlaw, T.J.; Potts, B.M. 2011. The genetic variation in the timing of heteroblastic transition in *Eucalyptus globulus* is stable across environments. *Australian Journal of Botany* 59: 170-175.
- Hamilton, M.G.; Williams, D.R.; Tilyard, P.A.; Pinkard, E.A.; Wardlaw, T.J.; Glen, M.; Vaillancourt, R.E.; Potts, B.M. 2013. A latitudinal cline in disease resistance of a host tree. *Heredity* 110: 372-379.
- Hood, I.A.; Gardner, J.F.; Kimberley, M.O.; Molony, K. 2002. Variation among eucalypt species in early susceptibility to the leaf spot fungi *Phaeophleospora eucalypti* and *Mycosphaerella* spp. *New Zealand Journal of Forestry Science* 32: 235-255.
- Hunter, G.C.; Crous, P.W.; Roux, J.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J. 2004. Identification of *Mycosphaerella* species associated with *Eucalyptus nitens* leaf defoliation in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 33: 349-355.
- Hunter, G.C.; van der Merwe, N.A.; Burgess, T.I.; Carnegie, A.J.; Wingfield, B.D.; Crous, P.W.; Wingfield, M.J. 2008. Global movement and population biology of *Mycosphaerella nubilosa* infecting leaves of cold-tolerant *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. *Plant Pathology* 57: 235-242.
- Hunter, G.C.; Crous, P.W.; Carnegie, A.J.; Wingfield, M.J. 2009. *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of *Eucalyptus* spp. in native and introduced areas. *Molecular Plant Pathology* 10: 1-14.
- Hunter, G.C.; Crous, P.W.; Carnegie, A.J.; Burgess, T.I.; Wingfield, M.J. 2011. *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* disease of *Eucalyptus*; easily confused and with serious consequences. *Fungal Diversity* 50: 145-166.
- Jackson, S.L.; Maxwell, A.; Burgess, T.I.; Hardy, G.E.; Dell, B. 2008. Incidence and new records of *Mycosphaerella* species within a *Eucalyptus globulus* plantation in Western Australia. *Forest Ecology and Management* 255: 3931-3937.
- James, S.A.; Bell, D.T. 2001. Leaf morphological and anatomical characteristics of heteroblastic *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* 49: 259-269.

- Jordan, G.J.; Potts, B.M.; Kirkpatrick, J.B.; Gardiner, C. 1993. Variation in the *Eucalyptus globulus* complex revisited. *Australian Journal of Botany* 41: 763-785.
- Jordan, G.J.; Potts, B.M.; Wiltshire, R. 1999. Strong, independent quantitative genetic control of vegetative phase change and first flowering in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* (Tasmanian Blue Gum). *Heredity* 83: 179-187.
- Jordan, G.J.; Potts, B.M.; Chalmers, P.; Wiltshire, R.J.E. 2000. Quantitative genetic evidence that the timing of vegetative phase change in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* is an adaptive trait. *Australian Journal of Botany* 48: 561-567.
- Kularatne, H.A.G.C.; Lawrie, A.C.; Barber, P.A.; Keane, P.J. 2004. A specific primer PCR and RFLP assay for the rapid detection and differentiation in planta of some *Mycosphaerella* species associated with foliar diseases of *Eucalyptus globulus*. *Mycological Research* 108: 1476-1493.
- López, G.A.; Potts, B.M.; Dutkowski, G.W.; Apiolaza, L.A.; Gelid, P.E. 2002. Genetic variation and inter-trait correlations in *Eucalyptus globulus* base population trials in Argentina. *Forest Genetics* 9: 217-231.
- Lundquist, J.E.; Purnell, R.C. 1987. Effects of *Mycosphaerella* leaf spot on growth of *Eucalyptus nitens*. *Plant Disease* 71: 1025-1029.
- Milgate, A.W.; Yuan, Z.Q.; Vaillancourt, R.E.; Mohammed, C. 2001. *Mycosphaerella* species occurring on *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* plantations of Tasmania, Australia. *Forest Pathology* 31: 53-63.
- Milgate, A.W.; Potts, B.M.; Joyce, K.; Mohammed, C.; Vaillancourt, R.E. 2005. Genetic variation in *Eucalyptus globulus* for susceptibility to *Mycosphaerella nubilosa* and its association with tree growth. *Australasian Plant Pathology* 34: 11-18.
- MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). 2013. Recurso Forestal: bosques plantados registrados. Available at <http://www.mgap.gub.uy> [Verificado 10/07/2013].
- Mohammed, C.; Wardlaw, T.; Smith, A.; Pinkard, E.; Battaglia, M.; Glen, M.; Tommerup, I.; Potts, B.; Vaillancourt, R. 2003. *Mycosphaerella* leaf diseases of temperate eucalypts around the southern Pacific rim. *New Zealand Journal of Forestry Science* 33: 362-372.
- Park, R.F. 1988a. Epidemiology of *Mycosphaerella nubilosa* and *M. cryptica* on *Eucalyptus* spp. in South-Eastern Australia. *Transactions of the British Mycological Society* 91: 261-266.

- Park, R.F. 1988b. Effect of certain host, inoculum, and environmental factors on infection of *Eucalyptus* species by two *Mycosphaerella* species. *Transactions of the British Mycological Society* 90: 221-228.
- Park, R.F.; Keane, P.J.; Wingfield, M.J.; Crous, P.W. 2000. Fungal diseases of Eucalypt foliage. In 'Diseases and pathogens of Eucalypts'. (Eds PJ Keane, GA Kile, FD Podger, BN Brown) pp. 153-239. CSIRO publishing, Australia.
- Pinkard, E.A.; Mohammed, C.L. 2006. Photosynthesis of *Eucalyptus globulus* with *Mycosphaerella* leaf disease. *New Phytologist* 170: 119-127.
- Pinkard, E.A.; Baillie, C.C.; Patel, V.; Mohammed, C.L. 2006a. Effects of fertilizing with nitrogen and phosphorus on growth and crown condition of *Eucalyptus globulus* Labill. experiencing insect defoliation. *Forest Ecology and Management* 231: 131-137.
- Pinkard, E.A.; Baillie, C.C.; Patel, V.; Paterson, S.; Battaglia, M.; Smethurst, P.J.; Mohammed, C.L.; Wardlaw, T.; Stone, C. 2006b. Growth responses of *Eucalyptus globulus* Labill. to nitrogen application and severity, pattern and frequency of artificial defoliation. *Forest Ecology and Management* 229: 378-387.
- Pinkard, E.A.; Battaglia, M.; Mohammed, C. 2007. Defoliation and nitrogen effects on photosynthesis and growth of *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology* 27: 1053-1063.
- Pérez, G.; Hunter, G.; Slippers, B.; Pérez, C.A.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J. 2009a. *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa*, the causal agent of *Mycosphaerella* leaf disease (MLD), recently introduced into Uruguay. *European Journal of Plant Pathology* 125: 109-118.
- Pérez, G.; Slippers, B.; Wingfield, B.D.; Finkenauer, E.; Wingfield, M.J. 2009b. *Mycosphaerella* leaf disease (MLD) outbreak on *Eucalyptus globulus* in Brazil caused by *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa*. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 302-306.
- Pérez, G.; Slippers, B.; Wingfield, M.J.; Wingfield, B.D.; Carnegie, A.; Burgess, T. 2012. Cryptic species, native populations and biological invasions by a eucalypt forest pathogen. *Molecular Ecology* 21: 4452-4471.
- Reader, U.; Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters of Applied Microbiology* 1: 17-20.
- Reinoso, C. 1992. Variation in *Eucalyptus globulus* in susceptibility to *Mycosphaerella* leaf diseases. Master of Forest Science Thesis, University of Melbourne, Australia.

- SAS Institute. 1997. SAS/STAT software: changes and enhancements through Release 6.12. SAS Institute: Cary, NC.
- Simeto, S.; Balmelli, G.; Martínez, G.; Torres, D.; González, P.; Fros, D.; Bentancur, O.; Pérez, C.A. 2010. Relevamiento sanitario de *Eucalyptus* spp. en el Sureste y Litoral Oeste del país. *INIA Serie Actividades de Difusión* 629: 41-51. Tacuarembó, Uruguay.
- Stone, C. 2001. Reducing the impact of insect herbivory in eucalypt plantations through management of extrinsic influences on tree vigour. *Australian Ecology* 26: 482-488.
- Stone, C.; Matsuki, M.; Carnegie, A. 2003. Pest and disease assessment in young eucalypt plantations: field manual for using the Crown Damage Index. National Forest Inventory, Bureau of Rural Sciences, Canberra.
- Stram, D.O.; Lee, J.W. 1994. Variance components testing in the longitudinal mixed effects model. *Biometrics* 50: 1171-1177.
- Tibbits, W.N.; Boomsma, D.B.; Jarvis, S. 1997. Distribution, biology, genetics and improvement programs for *Eucalyptus globulus* and *E. nitens* around the world. In 'Proc. 24th Southern Forest Tree Improvement Conference'. (Eds. T White, D Huber, G Powell) Southern Tree Improvement Committee: Orlando, USA, pp. 81-95.
- Volker, P.W.; Dean, C.A.; Tibbits, W.N.; Ravenwood, I.C. 1990. Genetic parameters and gains expected from selection in *Eucalyptus globulus* in Tasmania. *Silvae Genetica* 39: 18-21.
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In 'PCR protocols: a guide to methods and applications' (Eds. MA Innis, DH Gelfand, JJ Snindky, TJ White) pp. 315-322. San Diego: Academic Press.

ARTÍCULO IV

Efecto de *Teratosphaeria nubilosa* sobre el crecimiento de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus maidenii*

Gustavo Balmelli¹, Sofía Simeto¹, Diego Torres¹, Alicia Castillo², Nora Altier³, Pablo Núñez¹, Federico Rodríguez¹, Wilfredo González¹, Guillermo Pérez⁴, Julio J. Diez⁵

¹ Programa Nacional de Investigación en Producción Forestal, INIA Tacuarembó.

² Sección Biotecnología, INIA Las Brujas.

³ Programa de Sustentabilidad Ambiental, Sección Bioinsumos, INIA Las Brujas.

⁴ Polo de Desarrollo Universitario Forestal, Centro Universitario de Tacuarembó (CUT), UdelaR.

⁵ Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. Instituto de Gestión Forestal Sostenible. Universidad de Valladolid. Palencia, España.

RESUMEN

Las Manchas de *Mycosphaerella* provocadas por *Teratosphaeria nubilosa* afectan severamente las plantaciones jóvenes de *E. globulus* y *E. maidenii* en Uruguay. En los últimos años *E. globulus* está siendo sustituida por especies más resistentes a esta enfermedad, como *E. maidenii*, *E. grandis* y *E. dunnii*. Sin embargo aún no se conoce la susceptibilidad relativa de *E. globulus* y *E. maidenii* frente a *T. nubilosa* y tampoco se han cuantificado las pérdidas provocadas por la enfermedad en dichas especies en las condiciones de Uruguay. El presente trabajo analiza el comportamiento de *E. globulus* y *E. maidenii* frente a *T. nubilosa* en base a datos obtenidos en una prueba de progenies infectada naturalmente por este patógeno. La severidad de los daños provocados por la enfermedad (manchas foliares y defoliación), así como la proporción de follaje adulto, fueron cuantificadas a los 14, 21 y 26 meses de edad. Los efectos de la defoliación y de la precocidad del cambio de follaje sobre el crecimiento y sobre la mortalidad fueron evaluados a los 26 meses de edad. *Eucalyptus globulus* presentó mayor susceptibilidad que *E. maidenii*, con valores de severidad de manchas y defoliación significativamente mayores que los de *E. maidenii*. Por el contrario, la proporción de follaje adulto en *E. globulus* fue significativamente mayor que en *E. maidenii*. Al año de iniciada la epidemia, el efecto perjudicial del daño foliar fue mayor en *E. globulus* que en *E.*

maidenii, registrándose en los árboles más defoliados una pérdida de crecimiento en DAP de 45% y 30%, respectivamente. En el caso de *E. globulus*, en los niveles de defoliación más altos también se observó una alta mortalidad. En esta especie, los árboles con mayor proporción de follaje adulto crecieron un 30% más y tuvieron menor mortalidad que los árboles que solamente tenían follaje juvenil. Desde el punto de vista productivo, tanto el daño foliar como las pérdidas de crecimiento registrados en *E. maidenii* sugieren que esta especie no es una alternativa efectiva para sustituir a *E. globulus* cuando ocurren infecciones severas de *T. nubilosa*.

Palabras clave: mancha foliar, defoliación, cambio de follaje, crecimiento, mortalidad.

INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de *Teratosphaeria nubilosa* en Uruguay en el año 2007 (Pérez *et al.* 2009), las plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus maidenii* están siendo severamente afectadas por la enfermedad causada por dicho hongo y conocida como Mancha Foliar por *Mycosphaerella* (o MLD por sus siglas en Inglés). Dicha enfermedad afecta principalmente el follaje juvenil, produciendo manchas foliares y defoliación (Carnegie *et al.* 1998; Hunter *et al.* 2009). La frecuente ocurrencia y gran severidad de los daños provocados por esta enfermedad son consecuencia de la alta susceptibilidad del follaje juvenil de *E. globulus* y *E. maidenii*, del gran volumen de inóculo producido por el patógeno y de que las condiciones ambientales predisponentes (varios días de lluvia y alta humedad relativa) son frecuentes en Uruguay (Balmelli *et al.* 2009a, 2009b, 2011a; 2013a, Simeto *et al.* 2010; Pérez *et al.* 2013). La magnitud del problema en *E. globulus*, que en ocasiones llega a provocar pérdidas de área foliar superiores al 80% (Balmelli *et al.* 2011a; Pérez *et al.* 2013; Alonso *et al.* 2013), ha provocado en los últimos años el reemplazo de esta especie por otras más resistentes, como *E. dunnii*, *E. grandis* y *E. maidenii*. De hecho, el área plantada anualmente con *E. globulus* ha sufrido una drástica reducción, pasando de 11600 hectáreas en 2006 a 706 hectáreas en 2011 (MGAP 2013).

La pérdida de área foliar provocada por enfermedades afecta el crecimiento de los árboles y en determinadas circunstancias provoca mortalidad, lo cual disminuye la productividad de la plantación. Sin embargo, y a pesar de la gravedad del problema, la magnitud de las pérdidas provocadas por *T. nubilosa* en *E. globulus* y en *E. maidenii* aún

no ha sido cuantificada en Uruguay. Por otro lado, si bien *E. maidenii* es utilizada por algunas empresas forestales para sustituir a *E. globulus*, hasta el momento tampoco se conoce la susceptibilidad relativa de ambas especies. Por tal motivo, el presente trabajo tiene como objetivos: a) evaluar el comportamiento de *E. globulus* y *E. maidenii* frente a *T. nubilosa*; b) cuantificar el efecto del daño provocado por la enfermedad sobre el crecimiento y sobre la mortalidad al año de comenzada la epidemia; y c) cuantificar el efecto del cambio de follaje sobre el nivel de daño, el crecimiento y la mortalidad al año de comenzada la epidemia.

MATERIALES Y MÉTODOS

La población evaluada corresponde a una prueba de progenies de *E. globulus* y *E. maidenii* instalada en Marzo de 2011 en Lavalleja (Ruta 8, km 161). El ensayo se instaló en un suelo 2.11a y su preparación consistió en la aplicación de herbicida pre-laboreo (Glifosato, 3 L/ha), laboreo en fajas (subsulado y excéntrica) y aplicación de herbicida pre y post emergente (Goal + Arnes: 1.5 + 1.5 L/ha). La densidad de plantación fue de 1428 plantas por hectárea (3.5 metros entre líneas y 2 metros entre plantas). Se fertilizó al momento de la plantación con 80 g/planta de 12/48/8. El material genético evaluado corresponde a 194 familias de polinización abierta de *E. globulus* y 86 de *E. maidenii* provenientes de las poblaciones de cría del INIA. El diseño experimental es de bloques completos al azar, con 3 repeticiones y parcelas de 8 plantas en línea.

En Febrero de 2012 (a los 11 meses de instalado el ensayo) se registraron varios días consecutivos de lluvia y/o alta humedad relativa, lo cual desencadenó una severa epidemia de *T. nubilosa* (Figura 1). Entre Marzo y Mayo se registraron nuevas infecciones, lo que provocó un aumento continuo de la defoliación en los meses siguientes. El crecimiento (altura), la severidad del daño foliar y la precocidad del cambio de follaje fueron evaluados en Mayo de 2012, a los 14 meses de edad (Figura 2). La susceptibilidad a la enfermedad fue cuantificada en la totalidad de la copa de cada árbol en base a la severidad de manchas foliares y a la defoliación (porcentaje de hojas caídas), mediante escalas visuales adaptadas de Lundquist y Purnell (1987). Para la severidad de manchas se utilizó una escala con intervalos de 5% (de 0 a 100%) y para la defoliación con intervalos de 10% (de 0 a 100%). Con ambos parámetros se estimó el daño foliar total mediante el Índice de Daño de Copa (IDC), adaptado de Stone *et al.* (2003), calculado cómo: $IDC = Defoliación + ((1 - Defoliación/100) \times Severidad de$

manchas/100). Para evaluar la precocidad del cambio de follaje se midió la proporción de follaje adulto, también con una escala visual a intervalos de 10% (Figura 3).



Figura 1. Manchas típicas de *T. nubilosa* en *E. globulus* (izquierda) y *E. maidenii* (derecha).



Figura 2. Vista del ensayo en el momento de la evaluación a los 14 meses (izquierda) y a los 21 meses (derecha).

En diciembre de 2012 (a los 21 meses de edad, Figura 2) se evaluó defoliación y proporción de follaje adulto, utilizando las mismas escalas que en la evaluación anterior. Finalmente, en Mayo de 2013 (a los 26 meses de edad) se evaluó el crecimiento en altura y en diámetro a la altura del pecho (DAP) y la proporción de follaje adulto. El número de árboles vivos en cada medición se utilizó para calcular la mortalidad ocurrida entre dos evaluaciones.



Figura 3. Daño foliar y cambio de follaje. a) Árbol con 60% de defoliación y sin follaje adulto; b) árbol con 40% de defoliación y 20% de follaje adulto y c) árbol con 10% de defoliación y 70% de follaje adulto.

El efecto del daño provocado por *T. nubilosa* se analizó en cada especie por separado. El análisis se realizó a nivel fenotípico, considerándose a ambas poblaciones como unidades genéticamente heterogéneas. La relación entre diferentes variables a nivel individual se estimó mediante el coeficiente de correlación de Pearson. El efecto del daño se evaluó, mediante análisis de varianza, para el crecimiento medio (incremento en altura y DAP) y para la mortalidad media entre los 14 y los 26 meses registrados en cada nivel de defoliación a los 14 meses. Para los contrastes de medias se utilizó el test de Tukey-Kramer. El mismo tipo de análisis se utilizó para cuantificar el efecto de la precocidad del cambio de follaje (porcentaje de follaje adulto a los 14 meses) sobre el crecimiento y sobre la mortalidad posterior. Para la evaluación de los efectos sobre la mortalidad se excluyeron del análisis 92 árboles de *E. globulus* y 39 de *E. maidenii* que se volcaron con posterioridad a la primera evaluación. También se excluyeron 87 árboles de *E. globulus* y 31 de *E. maidenii* que fueron seleccionados por su alta proporción de follaje adulto y cortados en agosto de 2012 para su clonación. La normalidad de los datos así como la homocedasticidad de la varianza residual se comprobó mediante análisis gráficos (gráficas de distribución normal y gráficas de valores predichos vs residuales), los cuales mostraron que no existen desviaciones en la normalidad ni falta de homogeneidad de varianza. Para los análisis estadísticos se utilizaron los procedimientos GLM y CORR del SAS (SAS Institute 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuesta de *E. globulus* y *E. maidenii* frente a epidemias de manchas foliares causadas por *T. nubilosa*

En la primera evaluación sanitaria, a los tres meses de iniciada la epidemia de *T. nubilosa*, prácticamente el 100% de los árboles de ambas especies presentaban manchas foliares y defoliación. Esta última característica representó un 81.6% del daño total (IDC) en *E. globulus* y un 83.6% en *E. maidenii*. El nivel de daño en *E. globulus* fue superior al de *E. maidenii*, encontrándose diferencias significativas para severidad de manchas ($P < 0.05$), para defoliación ($P < 0.01$) y para el daño total (IDC) ($P < 0.01$) (Tabla 1). Entre la primera y la segunda evaluación el nivel de daño provocado por la enfermedad continuó aumentando, principalmente por un incremento en la defoliación. Este hecho resaltó las diferencias en susceptibilidad entre ambas especies, registrándose a los 21 meses (a los 10 meses de iniciada la epidemia) una defoliación media del 52.5% en *E. globulus* y 28.8% en *E. maidenii* (Tabla 1).

Tabla 1. Comportamiento de *E. globulus* y *E. maidenii* a los 14, 21 y 26 meses de edad.

Característica	14 meses		21 meses		26 meses	
	<i>E. globulus</i>	<i>E. maidenii</i>	<i>E. globulus</i>	<i>E. maidenii</i>	<i>E. globulus</i>	<i>E. maidenii</i>
Severidad de manchas (%)	10.5	5.6 **	-	-	-	-
Defoliación (%)	31.5	22.8 ***	52.5	28.8 ***	-	-
IDC (%)	38.7	27.1 ***	-	-	-	-
% árboles con follaje adulto	34.1	2.8 ***	53.9	9.3 ***	82.8	54.3 ***
% Follaje Adulto	9.9	0.6 ***	17.3	2.3 ***	29.4	12.0 ***
Supervivencia (%)	82.9	87.1 ns	77.1	81.0 ns	74.2	79.7 **
Altura (cm)	287	275 ***	-	-	596	655 ***
DAP (cm)	-	-	-	-	5.5	7.0 ***

Nota: *** diferencias entre especies al 1%, ** diferencias al 5%, ns diferencias no significativas.

El cambio de follaje, de juvenil a adulto, comenzó significativamente más temprano en *E. globulus* que en *E. maidenii*. A los 14 meses el 34.1% de los árboles de *E. globulus* ya tenía hojas adultas, mientras que en *E. maidenii* solo tenían hojas adultas el 2.8% de los árboles (Tabla 1). La diferencia en el cambio de follaje entre ambas especies se

mantuvo hasta la última evaluación (26 meses), momento en que el 82.8% y 54.3% de los árboles de *E. globulus* y *E. maidenii* tenían, respectivamente, hojas adultas (Tabla 1). *E. maidenii* presentó a los 26 meses un promedio de 12% de follaje adulto, valor similar al que presentó *E. globulus* a los 14 meses (9.9%), indicando que esta última especie comienza el cambio de follaje aproximadamente un año antes (Tabla 1). El follaje juvenil es mucho más susceptible a *T. nubilosa* que el follaje adulto (Park *et al.* 2000), por lo que si bien *E. globulus* es más susceptible a *T. nubilosa* que *E. maidenii*, la mayor precocidad en el cambio de follaje le permitiría escapar a nuevas infecciones.

En la evaluación realizada a los 14 meses ambas especies presentaban similar supervivencia (Tabla 1). Sin embargo, entre los 14 y los 26 meses la mortalidad promedio de *E. globulus* fue mayor que la de *E. maidenii*, lo que determinó que a los 26 meses la supervivencia de *E. maidenii* pasara a ser significativamente mayor que la de *E. globulus*. Por otro lado, a los 14 meses el crecimiento de *E. globulus* era significativamente mayor que el de *E. maidenii*, pero entre los 14 y los 26 meses el crecimiento relativo se revirtió, pasando *E. maidenii* a tener mayor altura y mayor DAP promedio que *E. globulus* (Tabla 1). El menor crecimiento de *E. globulus* entre los 14 y los 26 meses podría deberse al efecto perjudicial del mayor nivel de daño registrados en esta especie. En un ensayo de especies y orígenes de *Eucalyptus* instalado en Lavalleja en 1992, y por lo tanto en ausencia de la enfermedad, el crecimiento de *E. globulus* fue superior al de *E. maidenii*, tanto al primer año como al tercer año (datos sin publicar). Estos resultados confirmarían la hipótesis de que el mayor nivel de daño provocado por *T. nubilosa* en *E. globulus* explicaría el menor crecimiento de esta especie observado en el presente ensayo con posterioridad al inicio de la epidemia.

Efecto del daño foliar provocado por *T. nubilosa* sobre el crecimiento y sobre la mortalidad al año de comenzada la epidemia

Al momento de la primera evaluación sanitaria no existían árboles sin daño, por lo tanto no se dispone de un verdadero control para cuantificar el efecto de la enfermedad sobre el crecimiento y sobre la supervivencia, tomándose como base de comparación al grupo de árboles que presentaban entre 0 y 10% de defoliación (clase 10%). La cantidad de árboles que presentaba cada nivel de defoliación se presenta en el Tabla 2.

Tabla 2. Número de árboles de *E. globulus* y de *E. maidenii* con cada nivel de defoliación en la evaluación realizada a los 14 meses de edad.

Defoliación (%)	<i>E. globulus</i> (N° de árboles)	<i>E. maidenii</i> (N° de árboles)
≤ 10	185	234
20	572	838
30	1709	571
40	1073	81
50	198	0
60	20	0

En ambas especies se encontró una relación inversa entre el nivel de daño a los 14 meses y el crecimiento posterior. El coeficiente de correlación individual entre la defoliación a los 14 meses y el incremento en altura entre los 14 y los 26 meses fue de -0.38 ($P < 0.01$) en *E. globulus* y de -0.30 ($P < 0.01$) en *E. maidenii*. El crecimiento en altura en *E. maidenii* solamente se vio significativamente afectado en los árboles con mayor nivel de daño foliar (40% de defoliación, Figura 4). En *E. globulus* los árboles con una defoliación igual o superior al 30% tuvieron crecimientos significativamente menores que los de la clase de defoliación $\leq 10\%$ (Figura 4). La diferencia de crecimiento en altura entre los árboles más dañados y los menos dañados, es decir la pérdida de crecimiento en los niveles de mayor defoliación, fue de 22% en *E. maidenii* y de 38% en *E. globulus*. También se observó una relación inversa entre la defoliación a los 14 meses y el DAP a los 26 meses, con un coeficiente de correlación fue de -0.38 ($P < 0.01$) en ambas especies. Sin embargo el efecto del daño sobre el DAP es significativo a niveles de defoliación más bajos (30% en *E. maidenii* y 20% en *E. globulus*) y las pérdidas de crecimiento en los niveles de mayor defoliación son mayores que las registradas para el crecimiento en altura (32% en *E. maidenii* y 44% en *E. globulus*) (Figura 4).

El efecto de la reducción del área foliar en *Eucalyptus* ha sido reportado por varios autores: Carnegie y Ades (2003) para manchas de MLD y Pinkard *et al.* (2006) para defoliación artificial, encontraron que el crecimiento de *E. globulus* se vio afectado a partir de un 10% de daño; Smith (2006) en *E. globulus* y Lundquist y Purnell (1987) en *E. nitens* concluyeron que el crecimiento se vio afectado cuando la defoliación producida por MLD fue superior al 20% y 25%, respectivamente. Sin embargo, Pinkard (2003) en *E. globulus* encontró pérdidas de crecimiento en sitios de buena productividad solamente cuando la defoliación superaba el 40%, mientras que Rapley *et al.* (2009) en *E. nitens*, encontraron efectos sobre el crecimiento cuando la defoliación superaba el 60%. El efecto del daño de enfermedades foliares sobre *E.*

globulus fue reportado previamente para Uruguay por Balmelli *et al.* (2011b, 2013b), quienes encontraron que el crecimiento fue afectado significativamente cuando la defoliación fue mayor al 40%, con pérdidas de 20% en DAP al séptimo año en los árboles con mayor defoliación. El ensayo analizado en dichos trabajos sufrió un único evento de defoliación durante el primer año, lo que contrasta con la situación actual, donde la defoliación provocada por *T. nubilosa* continuó aumentando en el segundo año (Tabla 1). Según Collett y Neumann (2002) y Wills *et al.* (2004) las defoliaciones repetidas tienen un mayor efecto perjudicial sobre el crecimiento que las defoliaciones aisladas, lo que explicaría las mayores pérdidas de crecimiento registradas en el presente estudio.

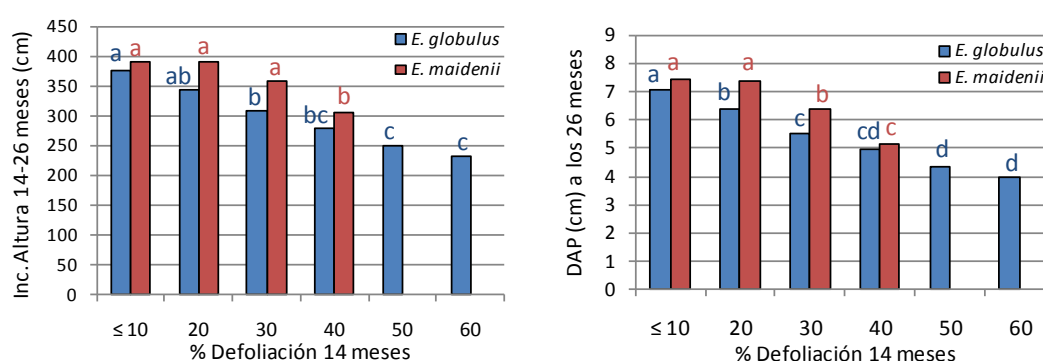


Figura 4. Incremento en altura entre los 14 y los 26 meses (izquierda) y DAP a los 26 meses (derecha) según el nivel de defoliación a los 14 meses. Dentro de cada especie, clases de defoliación con diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (al 5% por el test de Tukey-Kramer) en el crecimiento.

El daño provocado por *T. nubilosa* no afectó la supervivencia posterior en *E. maidenii* pero sí en *E. globulus*, donde los árboles más dañados (clases de defoliación 50 y 60%) presentaron mortalidades significativamente mayores que los árboles de las demás clases de daño (Figura 5). Si bien existen estudios en base a defoliación artificial en *E. globulus*, donde la defoliación, aún a niveles de 100%, no afectó la supervivencia a los 11 meses post daño (Collett y Neumann 2002), los resultados del presente trabajo sugieren que defoliaciones del 50% o superiores comprometen la supervivencia posterior. Similares resultados fueron reportados por Balmelli *et al.* (2011b, 2013b), donde la mortalidad en ensayos de *E. globulus* afectados por enfermedades foliares aumentó significativamente cuando los valores de defoliación fueron superiores al 60%. Sin embargo la muerte de árboles no puede atribuirse directamente al daño provocado por la enfermedad, sino que probablemente sea el resultado de una

interacción entre el debilitamiento de los árboles más dañados y el efecto de otros factores bióticos o abióticos, incluida la competencia generada por árboles vecinos (Carnegie *et al.* 1994).

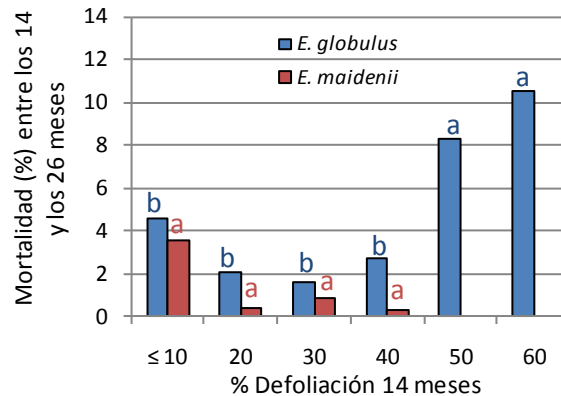


Figura 5. Mortalidad entre los 14 y los 26 meses según nivel de defoliación a los 14 meses. Dentro de cada especie, clases de defoliación con diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (al 5% por el test de Tukey-Kramer) en mortalidad.

Efecto de la precocidad del cambio de follaje en *E. globulus* sobre el nivel de daño provocado por *T. nubilosa* y sobre el crecimiento y la mortalidad posterior

A los 14 meses el 97% de los árboles de *E. maidenii* presentaban únicamente follaje juvenil (Tabla 3), por lo cual el efecto de la precocidad del cambio de follaje no fue analizado en esta especie.

Como se mencionó anteriormente, el follaje juvenil es mucho más susceptible a *T. nubilosa* que el follaje adulto, lo que explica la relación inversa observada en *E. globulus* entre el cambio de follaje y el nivel de daño a los 14 meses ($r = -0.37$, $P < 0.01$). En esta especie se registró una disminución significativa en el nivel de defoliación en aquellos árboles que tenían 30% o más de follaje adulto (Figura 6). Desde otro punto de vista, la defoliación de los árboles de *E. globulus* que presentaban 40% de follaje adulto fue similar a la defoliación de los árboles de *E. maidenii* con el 100% de follaje juvenil. El hecho de que *E. maidenii* presente menor nivel de daño que *E. globulus* sugiere que la mayor resistencia relativa no está dada por una mayor proporción de follaje adulto, sino por diferencias en características anatómicas y/o fisiológicas del follaje juvenil.

Tabla 3. Número de árboles de *E. globulus* y de *E. maidenii* con cada nivel de follaje adulto en la evaluación realizada a los 14 meses de edad.

Follaje Adulto (%)	<i>E. globulus</i> (N° de árboles)	<i>E. maidenii</i> (N° de árboles)
0	2543	1747
10	254	25
20	255	9
30	499	13
40	216	0
50	78	0
60	30	0
70	25	0

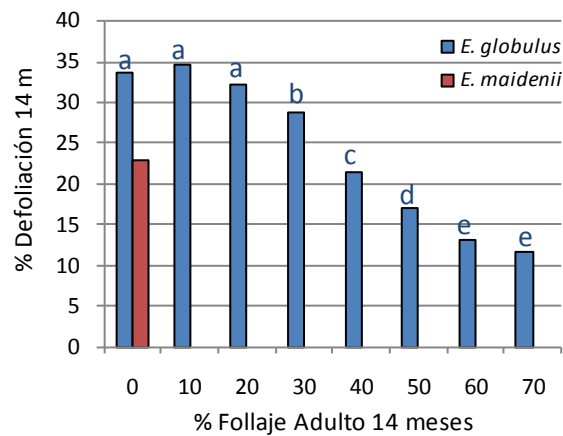


Figura 6. Defoliación según el porcentaje de follaje adulto a los 14 meses. Dentro de *E. globulus*, clases de follaje adulto con diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (al 5% por el test de Tukey-Kramer) en el porcentaje de defoliación. La defoliación en *E. maidenii* se presenta únicamente como referencia.

En *E. globulus* se encontró una relación directa entre el porcentaje de follaje adulto a los 14 meses y el crecimiento posterior: $r = 0.43$ ($P < 0.01$), con el incremento en altura entre los 14 y los 26 meses y $r = 0.49$ ($P < 0.01$) con el DAP a los 26 meses (Figura 7). Los árboles que tenían un 20% o más de follaje adulto, o los que tenían al menos un 10% de follaje adulto, tuvieron respectivamente un crecimiento en altura y DAP significativamente mayor que los que aún no habían comenzado a cambiar el follaje (0% follaje adulto). La diferencia de crecimiento entre los árboles con mayor proporción de follaje adulto respecto a los que tenían 100% de follaje juvenil fue de un 25% en altura y de un 30% en DAP. En otras palabras, el cambio precoz de follaje,

asociado a un menor nivel de daño (Figura 6), tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento posterior, siendo dicho efecto más marcado en el caso del DAP.

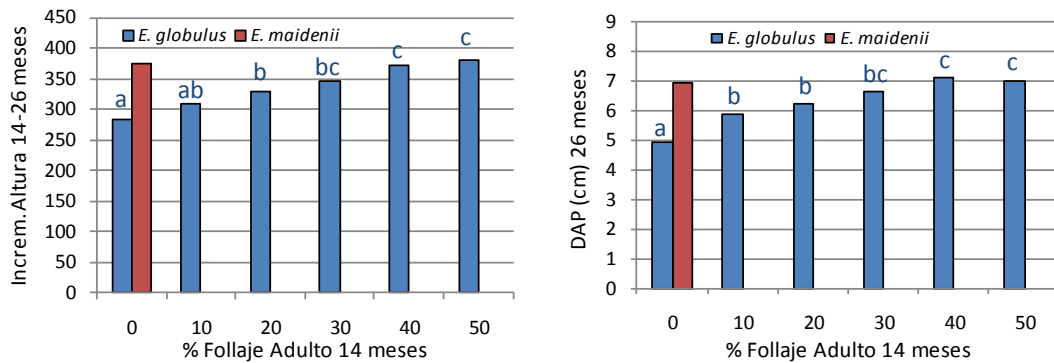


Figura 7. Incremento en altura entre los 14 y los 26 meses (izquierda) y DAP a los 26 meses (derecha) en *E. globulus* según porcentaje de follaje adulto a los 14 meses. Clases de follaje adulto con diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (al 5% por el test de Tukey-Kramer) en el crecimiento. El crecimiento para *E. maidenii* se presenta únicamente como referencia.

Los árboles que a los 14 meses ya habían comenzado a cambiar el follaje presentaron una mortalidad entre los 14 y los 26 meses significativamente menor que aquellos que solamente presentaban follaje juvenil (Figura 8). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad de los árboles que a los 14 meses ya habían comenzado a cambiar de follaje.

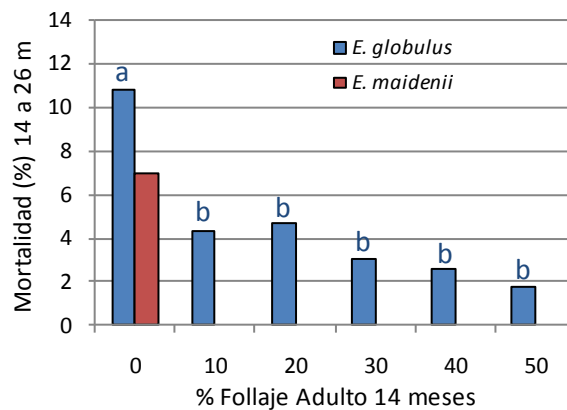


Figura 8. Mortalidad entre los 14 y los 26 meses según porcentaje de follaje adulto a los 14 meses en *E. globulus*. Clases de follaje adulto con diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (al 5% por el test de Tukey-Kramer) en la mortalidad. La mortalidad para *E. maidenii* se presenta únicamente como referencia.

Como se vio anteriormente (Figura 6), el cambio precoz de follaje en *E. globulus* está asociado a un menor nivel de daño de *T. nubilosa*, y probablemente debido a esto, favorece el crecimiento y reduce la mortalidad de los árboles afectados. Parece lógico por lo tanto promover el cambio temprano de follaje como medida de manejo de la enfermedad. Hay al menos dos alternativas para ello: acelerar el crecimiento inicial mediante una silvicultura intensiva y utilizar genotipos seleccionados por precocidad en el cambio de follaje. Sin embargo la relación entre el crecimiento inicial y el momento en que comienza el cambio de follaje en *E. globulus* es relativamente baja: Milgate *et al.* (2005) reportan una correlación fenotípica de 0.25 entre la altura a los 5 meses y la presencia de follaje adulto a los 2 años; y Balmelli *et al.* (2013b) reportan una correlación fenotípica de 0.35 entre la altura a los 8 meses y el porcentaje de follaje adulto a los 20 meses. Por el contrario, en varios trabajos se reporta un fuerte control genético del momento en que se produce el cambio de follaje en *E. globulus*, con heredabilidades que varían entre 0.41 y 0.74 (Balmelli *et al.* 2014a, 2014b; Hamilton *et al.* 2011; Jordan *et al.* 1999; López *et al.* 2002), lo que demuestra la posibilidad de seleccionar genotipos con cambio precoz de follaje.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que el nivel de daño foliar provocado por *T. nubilosa* fue mayor en *E. globulus* que en *E. maidenii*. Sin embargo, la susceptibilidad relativa de ambas especies depende del momento de la evaluación, o lo que es lo mismo, de la severidad de la infección. De todas forma, el daño registrado en *E. maidenii* sugiere que esta especie, desde el punto de vista de sustituir a *E. globulus*, es una alternativa riesgosa y poco efectiva cuando se dan condiciones ambientales para la ocurrencia de infecciones severas de *T. nubilosa*.

Los daños foliares provocados por *T. nubilosa* afectaron el crecimiento en ambas especies, aunque el efecto sobre el crecimiento fue mayor en *E. globulus* que en *E. maidenii*. En el caso de *E. globulus*, en los niveles de defoliación más altos también se registró una relativamente alta mortalidad. Si bien la muerte de árboles no puede atribuirse al efecto directo de la enfermedad, el debilitamiento que ésta genera en los árboles los predispone al efecto de otros factores bióticos o abióticos, lo que compromete su supervivencia.

La información generada en este trabajo demuestra que si bien el follaje juvenil de *E. globulus* es muy susceptible a *T. nubilosa*, el cambio a follaje adulto comienza antes que en *E. maidenii*. Dado que el follaje adulto es más resistente a *T. nubilosa*, los árboles de *E. globulus* con mayor proporción de follaje adulto crecieron más y tuvieron menor mortalidad que los árboles que solamente tenían follaje juvenil. Desde el punto de vista productivo es deseable que el cambio de follaje comience lo antes posible ya que el follaje adulto le permite al árbol recuperarse y escapar a nuevas infecciones. Por tal motivo, en INIA se está ejecutando un proyecto de selección y clonación de individuos que presentan esta característica.

Finalmente, cabe destacar que la información aquí presentada cuantifica el efecto del daño provocado por *T. nubilosa* al año de iniciada la epidemia, siendo necesario continuar la evaluación hasta la edad de cosecha.

AGRADECIMIENTOS

A la empresa Sierras Calmas por proveer el sitio, por la preparación del terreno y por el mantenimiento del ensayo. Al personal de apoyo del Programa Forestal del INIA, Pablo Núñez, Federico Rodríguez, Wilfredo González y Marcelo Alfonso, por su colaboración en la preparación de las plantas, la instalación del ensayo y la evaluación del mismo. El estudio fue parcialmente financiado por una beca otorgada al primer autor por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) de España, en el marco del Programa de Formación del Sistema de los INIA de Iberoamérica.

REFERENCIAS

- Alonso, R.; Soria, S.; Lupo, S.; Bettucci, L.; Perez, C. 2013. Alternativas de manejo de enfermedades foliares en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus*. En: V Jornada Técnica de Protección Forestal. *INIA Serie Técnica 209*. Montevideo. p. 39-44.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Martinez, G.; Torres, D.; Pérez, C.; Fros, D.; Bentancur, O. 2009a. Incidencia y severidad de enfermedades y plagas en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* en las regiones Sureste y Litoral Oeste de Uruguay. En:

- Jornada Técnica de Protección Forestal. Tacuarembó. *INIA Serie Actividades de Difusión* 567, 51-65.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Martínez, G.; Torres, D.; González, P.; Fros, D.; Bentancur, O.; Pérez, C. 2009b. Relevamiento sanitario de otoño en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus dunnii* en el Sureste y Litoral Oeste. En: Seminario Técnico de Sanidad Forestal. Tacuarembó: *INIA Serie Actividades de Difusión* 594, 51-72.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Martínez, G.; Torres, D.; Pérez, C.A.; Bentancur, O. 2011a. Incidence and severity of pests and diseases on young plantations of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. En: IUFRO Forest Protection Joint Meeting: pathogens, insects and their associations affecting forestry worldwide. 8-11 Noviembre. Colonia del Sacramento, Uruguay.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Altier, N.; Marroni, V.; Diez, J.J. 2011b. Efecto de la defoliación provocada por *Mycosphaerella* spp. en el crecimiento y en la sobrevivencia de *Eucalyptus globulus*. En: Día de campo forestal en zona Sureste. *INIA Serie Actividades de Difusión* 644, 5-11.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Torres-Dini, D.; Castillo, A.; Altier, N.; Perez, G.; Mac Gregor, J.; Peverelli, A.; Diez, J.J. 2013a. Mejoramiento genético en *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus maidenii* por resistencia a *Teratosphaeria nubilosa*. En: V Jornada Técnica de Protección Forestal. *INIA Serie Técnica* 209, 55-65.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Altier, N.; Marroni, V.; Diez, J.J. 2013b. Long term losses caused by foliar diseases on growth and survival of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *New Forests* 44(2): 249-263.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Marroni, V.; Altier, N.; Diez, J.J. 2014a. Genetic variation for resistance to *Mycosphaerella* leaf disease and *Eucalyptus* rust on *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 43(1): 97-107.
- Balmelli, G.; Simeto, S.; Torres, D.; Castillo, A.; Pérez, G.; Mac Gregor, J.; Peverelli, A.; Altier, A.; Diez, J. 2014b. Susceptibility to *Teratosphaeria nubilosa* and precocity of vegetative phase change in *Eucalyptus globulus* and *E. maidenii* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* (aceptado el 05/12/2013).
- Carnegie, A.J.; Ades, P.K. 2003. *Mycosphaerella* leaf disease reduces growth of plantation-grown *Eucalyptus globulus*. *Australian Forestry* 66: 113-119.
- Carnegie, A.J.; Keane, P.J.; Ades, P.K.; Smith, I.W. 1994. Variation in susceptibility of *Eucalyptus globulus* provenances to *Mycosphaerella* leaf disease. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 1751-1757.

- Carnegie, A.J.; Ades, P.K.; Keane, P.J.; Smith, I.W. 1998. Mycosphaerella disease of juvenile foliage in a eucalypts species and provenance trial in Victoria, Australia. *Australian Forestry* 61: 190-194.
- Collett, N.G.; Neumann, F.G. 2002. Effects of simulated chronic defoliation in summer on growth and survival of blue gum (*Eucalyptus globulus* Labill.) within young plantations in northern Victoria. *Australian Forestry* 65: 99-106.
- Hamilton, M.G.; Tilyard, P.A.; Williams, D.R.; Vaillancourt, R.E.; Wardlaw, T.J.; Potts, B.M. 2011. The genetic variation in the timing of heteroblastic transition in *Eucalyptus globulus* is stable across environments. *Australian Journal of Botany* 59: 170-175.
- Hunter, G.C.; Crous, P.W.; Carnegie, A.J.; Wingfield, M.J. 2009. *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of *Eucalyptus* spp. in native and introduced areas. *Molecular Plant Pathology* 10: 1-14.
- Jordan, G.J.; Potts, B.M.; Wiltshire, R. 1999. Strong, independent quantitative genetic control of vegetative phase change and first flowering in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* (Tasmanian Blue Gum). *Heredity* 83: 179-187.
- López, G.A.; Potts, B.M.; Dutkowski, G.W.; Apiolaza, L.A.; Gelid, P.E. 2002. Genetic variation and inter-trait correlations in *Eucalyptus globulus* base population trials in Argentina. *Forest Genetics* 9: 217-213.
- Lundquist, J.E.; Purnell, R.C. 1987. Effects of Mycosphaerella leaf spot on growth of *Eucalyptus nitens*. *Plant Disease* 71: 1025-1029.
- Milgate, A.W.; Potts, B.M.; Joyce, K.; Mohammed, C.; Vaillancourt, R.E. 2005. Genetic variation in *Eucalyptus globulus* for susceptibility to *Mycosphaerella nubilosa* and its association with tree growth. *Australasian Plant Pathology* 34: 11-18.
- MGAP. 2013. Recurso Forestal: bosques plantados registrados. <http://www.mgap.gub.uy>.
- Park, R.F.; Keane, P.J.; Wingfield, M.J.; Crous, P.W. 2000. Fungal diseases of Eucalypt foliage. In 'Diseases and pathogens of Eucalypts'. (Eds PJ Keane, GA Kile, FD Podger, BN Brown) p. 153-239. (CSIRO publishing, Australia).
- Pérez, G.; Hunter, G.; 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: 109-118.
- Pérez, C.A.; Martínez, G.; Simeto, S.; Torres-Dini, D.; Palladino, C.; Langone, F.; Bentancur, O.; Balmelli, G. 2013. Prospección sanitaria en plantaciones jóvenes

- de eucalipto: primavera 2008 - otoño 2012. En: V Jornada Técnica de Protección Forestal. *INIA Serie Técnica* 209: 23-28.
- Pinkard, E.A. 2003. Physiological and growth responses related to pattern and severity of pruning in young *Eucalyptus globulus*. *Forest Ecology and Management* 182: 231-245.
- Pinkard, E.A.; Baillie, C.C.; Patel, V.; Paterson, S.; Battaglia, M.; Smethurst, P.J.; Mohammed, C.L.; Wardlaw, T.; Stone, C. 2006. Growth responses of *Eucalyptus globulus* Labill. to nitrogen application and severity, pattern and frequency of artificial defoliation. *Forest Ecology and Management* 229: 378-387.
- Rapley, L.P.; Potts, B.M.; Battaglia, M.; Patel, V.S.; Allen, G.R. 2009. Long-term realised and projected growth impacts caused by autumn gum moth defoliation of 2-year-old *Eucalyptus nitens* plantation trees in Tasmania, Australia. *Forest Ecology and Management* 258: 1896-1903.
- SAS Institute. 1997. SAS/STAT software: changes and enhancements through Release 6.12. SAS Institute: Cary, NC.
- Simeto, S.; Balmelli, G.; Martínez, G.; Torres, D.; González, P.; Fros, D.; Bentancur, O.; Pérez, C.A. 2010. Relevamiento sanitario de *Eucalyptus* spp. en el Sureste y Litoral Oeste del país. En: Jornada Técnica de Protección Forestal. *INIA Serie Actividades de Difusión* 629: 41-51.
- Smith, A. 2006. The Development of Strategies for the Management and Research of Foliar Pathogens on Eucalypt Plantations: Using *Mycosphaerella* as a Case of Study. PhD Thesis, University of Tasmania.
- Stone, C.; Matsuki, M.; Carnegie, A. 2003. Pest and disease assessment in Young eucalypt plantations: field manual for using the Crown Damage Index. Canberra: Parsons, M. National Forest Inventory, Bureau of Rural Sciences.
- Wills, J.A.; Burbidge, T.E.; Abbott, I. 2004. Impact of repeated defoliation on jarrah (*Eucalyptus marginata*) saplings. *Australian Forestry* 67: 194-198.

