

# VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA ROYA DEL EUCALIPTO

Sofía Simeto<sup>1</sup>, Diego Torres-Dini<sup>1</sup>,  
Gustavo Balmelli<sup>1</sup>, Gonzalo Martínez<sup>1</sup>,  
Carlos Pérez<sup>2</sup>, Nora Altier<sup>1</sup>,  
Lina Bettucci<sup>3</sup>

## INTRODUCCIÓN

El sector forestal uruguayo ha tenido en los últimos 20 años un crecimiento exponencial, que lo ha ubicado entre los tres sectores agroindustriales exportadores más importantes del país, junto con la ganadería y la agricultura (Pou, 2011). Este incremento en el área forestada ha propiciado la aparición de nuevos patógenos y plagas, tendencia que ha sido observada también a nivel mundial, en países con plantaciones comerciales con especies exóticas como *Eucalyptus* y *Pinus*. En esos países, el número de plagas y enfermedades no registradas previamente constituyeron una importante y creciente amenaza para el sector (Wingfield, 2003). Muchos de los patógenos presentes en especies forestales exóticas han sido presumiblemente introducidos de forma accidental, pero también existen casos en que patógenos de especies nativas han «saltado» hacia los nuevos hospederos. Un claro ejemplo de este tipo de salto de hospedero es el de *Puccinia psidii* Winter, el agente causal de la enfermedad conocida como «roya del eucalipto». En Uruguay fue encontrada por primera vez sobre *Psidium guajava* L. en 1981 (Koch de Brotos *et al.*, 1981). Posteriormente, en el año 2003 se la registró sobre *Eucalyptus globulus* Labill. causando daños severos en una plantación de un año (Telechea *et al.*, 2003). A partir de ese momento se la ha observado a campo sobre diferentes huéspedes y con diversos

grados de incidencia y severidad (Balmelli *et al.*, 2004, 2009; Pérez *et al.*, 2010). Se la considera originaria de América del Sur y América Central y es capaz de infectar un amplio rango de hospederos dentro de la familia Myrtaceae, estando presente en 24 especies de *Eucalyptus* todas ellas de importancia comercial para la forestación (Simpson *et al.*, 2006). En Uruguay, se han reportado infecciones de *P. psidii* en: *Myrrhinium atropurpureum* var. *octandrum* Benth. (palo de fierro), *Myrcianthes pungens* (O.Berg) D.Legrand (guaviyú), *Psidium guajava* (guayabo brasileiro), *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden (Pérez *et al.*, 2010; Koch de Brotos *et al.*, 1981; Telechea *et al.*, 2003).

En *Eucalyptus*, *P. psidii* infecta tejidos jóvenes y afecta desde plantas de vivero hasta plantas de dos años en el campo, así como rebrotes de tocones. En materiales altamente susceptibles la enfermedad causa deformaciones, hipertrofia y necrosis de las porciones afectadas pudiendo, en caso de ataques severos, matar los ápices con la consiguiente pérdida de dominancia apical y el desarrollo de un hábito arbustivo (Figura 1). Las lesiones sobre los órganos afectados (láminas y pecíolos de hojas juveniles y yemas y brotes jóvenes) comienzan como muy pequeñas puntuaciones que, transcurridos un par de días se transforman en pústulas conteniendo uredosporas de color amarillo intenso. A partir de ese momento las pústulas aumentan de tamaño y se producen infec-

<sup>1</sup>Programa Nacional de Producción Forestal. INIA. Ruta 5, km 386, Tacuarembó, Uruguay. Correo electrónico: ssimeto@tb.inia.org.uy

<sup>2</sup>Departamento de Protección Vegetal, EEMAC, Facultad de Agronomía, UdelaR. EEMAC. Ruta 3, km 363, Paysandú, Uruguay.

<sup>3</sup>Laboratorio de Micología. Facultad de Ciencias – Facultad de Ingeniería. UdelaR, Julio Herrera y Reissig 565, Montevideo.



**Figura 1.** Infecciones de *Puccinia psidii* sobre (a) *Eucalyptus globulus*, (b y c) *Eucalyptus grandis*; (d) tallo de *E. grandis* afectado por *P. psidii*; (e) follaje de *E. grandis* de 14 meses afectado por *P. psidii*; (f y g) hábito arbustivo e impacto sobre el crecimiento en árboles de *E. grandis* de 6 meses de edad, afectados por *P. psidii*.

ciones secundarias dentro de una misma planta, principalmente debido al rocío o a la lluvia.

Desde el punto de vista productivo la enfermedad puede tener efectos directos debidos a la reducción del crecimiento o a la muerte de la planta (en casos de mayor severidad) y efectos indirectos debidos al estrés provocado en la planta, que la hace más susceptible a factores abióticos y bióticos (Balmelli *et al.*, 2004). Debido a su gran capacidad de dispersión y a su amplio rango de hospederos esta enfermedad es considerada de gran importancia ya que bajo condiciones favorables y en materiales susceptibles su severidad e incidencia pueden ser muy altas y ocasionar importantes pérdidas económicas. En Brasil esta enfermedad constituye un problema de gravedad y una limitante en el cultivo de *Eucalyptus* en algunas regiones en las que la temperatura y precipitaciones son adecuadas para el desarrollo de la misma. La pérdida de volumen de madera debida a *P. psidii* se estima entre un 20% y un 40% (Takahashi, 2002; Masson, 2009).

A nivel nacional, hacia fines de 2001 y principios de 2002 se registraron ataques severos de *P. psidii* sobre plantas de *E. globulus* de un año de edad (Telechea *et al.*, 2003). Balmelli *et al.* (2004; 2009) también reportaron infección de plantas de *E. globulus* de 6 a 12 meses de edad. A fines de 2009 y principios de 2010 el ataque de *P. psidii* sobre clones de *E. grandis* en la zona centro del país llevó a un importante retraso en el crecimiento en plantas de un año. Las dos epidemias de roya que causaron gran preocupación en nuestro país (2001-2002 y 2009-2010), coincidieron con veranos y otoños lluviosos. Recientemente (fines de noviembre 2012) se observó una importante infección de roya sobre plantaciones de *E. grandis* de un año en el departamento de Cerro Largo, también asociada a las abundantes lluvias de octubre.

El mejoramiento genético a través de la selección y cruzamiento de genotipos resistentes es considerado como la estrategia más apropiada en el manejo de enfermedades forestales. Dicha selección se realiza principalmente a través de ensayos de campo o mediante la inoculación artificial del

patógeno en condiciones controladas. En el caso de la roya, es posible realizar la inoculación artificial, asegurando de esta forma la presencia del patógeno y las condiciones controladas que favorezcan el desarrollo de la enfermedad. A su vez, es posible realizar una selección temprana sobre plantines jóvenes para evaluar la expresión de resistencia/susceptibilidad de diferentes materiales. Un aspecto importante a tener en cuenta es que la resistencia seleccionada de esta forma debe contemplar la variabilidad de la población del patógeno presente en la naturaleza. El quiebre en una resistencia seleccionada sin haber tenido en cuenta este aspecto, puede tener consecuencias devastadoras en el cultivo de *Eucalyptus*, donde la sustitución por un genotipo más resistente es dificultosa y onerosa (Simpson y Podger, 2000). Existen numerosos trabajos en otros países donde a través de inoculaciones artificiales con *P. psidii* se puso en evidencia la existencia de variabilidad en la virulencia sobre diferentes hospederos (MacLachlan 1938, Rayachhetry *et al.*, 2001; Ferreira, 1983; Coelho *et al.*, 2001; Xavier, 2002; Aparecido *et al.*, 2003). Al igual que para otros patógenos, es esperable que la población de *P. psidii* posea variabilidad genética. En Uruguay, Pérez *et al.* (2010) encontraron cierto grado de variabilidad entre cepas aisladas de *Eucalyptus* y algunas mirtáceas nativas, a través de inoculaciones artificiales y del análisis genético de la región ITS de los aislamientos. Si bien se trata de resultados preliminares, éstos estarían indicando la existencia de variabilidad en la población de *P. psidii* presente en nuestro país. Por lo tanto, la correcta caracterización de la población de *P. psidii* en Uruguay resulta imprescindible para el manejo de la enfermedad a través de la identificación y uso de genotipos de *Eucalyptus* resistentes a la misma. Actualmente, se encuentra en ejecución la tesis de maestría PEDECIBA «Estudio de la variabilidad de *Puccinia psidii* en *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus grandis* en Uruguay» enmarcada a su vez en el proyecto INIA FO06 «Biología y epidemiología de las plagas y enfermedades prioritarias para el sector forestal». Su principal objetivo es analizar la variabilidad de *P. psidii* en *E. globulus* y *E. grandis* con el propósito de manejar la inci-

dencia de la enfermedad en el Uruguay. En el presente trabajo se analiza la variabilidad genética de *P. psidii*, mediante diversas técnicas moleculares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta y extracción de ADN

Se realizó una colecta de hojas de *E. globulus* y *E. grandis* infectadas por *P. psidii* en plantaciones jóvenes ubicadas en diferentes departamentos (Lavalleja, Rocha, Florida y Tacuarembó). Las pústulas presentes en las hojas fueron recortadas y transferidas a tubos Eppendorff de 2 ml en presencia de tres esferas de borosilicato de 3 mm de diámetro y 25 mg de tierra de diatomeas. La ruptura de las mismas se realizó por agitación en Tyssue Lyser II, a máxima potencia durante 3 min. Posteriormente se aplicó un protocolo de purificación estándar basado en el buffer CTAB (Graça, 2011).

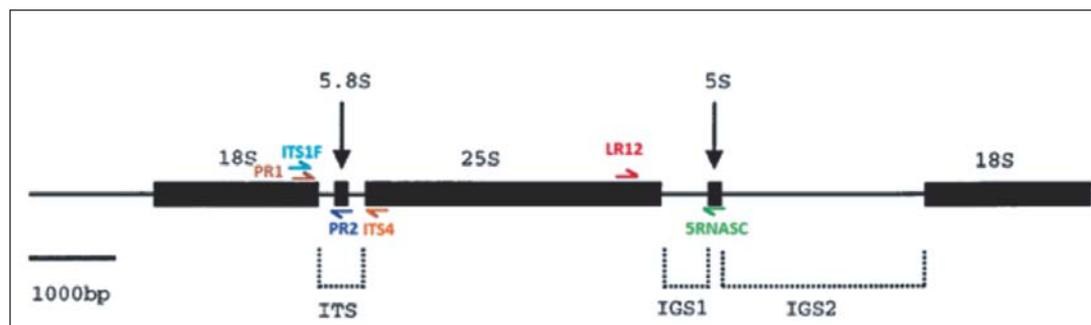
### Análisis del ADNr (ITS, IGS1)

Para la identificación de especie y análisis de la variabilidad genética intraespecífica se analizaron dos secuencias del gen que codifica para el ARNr. La región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) fue amplificada con las combinaciones de cebadores ITS1F - ITSrust1 y PR1 - PR2 de acuerdo con lo propuesto por Kroop *et al.* (1995) y Langrell *et al.* (2008). Adicionalmente se analizó la

región IGS1 (*Intergenic Spacer*) del ADN ribosomal. Para caracterizar esta región se utilizaron los cebadores LR12 y 5SRNASC (James *et al.*, 2001). La ubicación de cada uno de los cebadores descritos se muestra en la representación esquemática de la Figura 2. Los productos de PCR (*Polymerase chain reaction*) fueron corridos en geles de agarosa 1% y posteriormente secuenciados. La confirmación de la especie se realizó mediante el software Blast empleando el algoritmo BlastN. Posteriormente, se realizó el alineamiento de las secuencias usando el software ClustalW y finalmente se construyeron árboles de distancias Neighbour-Joining mediante el software MEGA (Tamura *et al.*, 2011). En el Cuadro 1 se resumen las secuencias utilizadas para los análisis de la variabilidad de las regiones ITS e IGS1.

### Análisis de SSRs (Simple Sequence Repeats, microsatélites)

Para la SSR-PCR se utilizaron los cebadores reportados PpSSR012, PpSSR022, PpSSR087, PpSSR102, PpSSR136, PpSSR161, PpSSR195, PpSSR208 para la amplificación de microsatélites de esta especie (Zhong *et al.*, 2008). Todos los productos de PCR fueron enviados a un servicio externo de genotipificación mediante secuenciador automático (Macrogen Inc.).



**Figura 2.** Representación esquemática de los genes del ADN ribosomal y del posicionamiento de los cebadores empleados en este trabajo.

**Cuadro 1.** Lista de cepas utilizadas en el análisis. Cepas obtenidas en este trabajo (UYTB) y en otros trabajos nacionales e internacionales (NCBI GenBank)

ID #	Roya	Hospedero	Referencia
AB232547	<i>Puccinia hemerocallidi</i>	<i>Hemerocallis</i> spp.	Chatasiri <i>et al.</i> , 2006
EF210141.1	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Psidium guajava</i>	Langrell <i>et al.</i> , 2008
EF490601	<i>Puccinia cygnorum</i>	<i>Kunzea ericifolia</i>	Langrell <i>et al.</i> , 2008
EF599767.1	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Metrosideros polymorpha</i>	Zhong, 2008
EF599768.1	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Metrosideros polymorpha</i>	Zhong, 2008
EU436721.1	<i>Phakospora pachyrhizi</i>	<i>Glycine max</i>	Barnes <i>et al.</i> , 2009
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	<i>Triticum</i> spp.	<i>Puccinia graminis</i> sequencing project
UY1371	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	Pérez <i>et al.</i> , 2010
UY1372	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	Pérez <i>et al.</i> , 2010
UY1374	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Pérez <i>et al.</i> , 2010
UY1375	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Pérez <i>et al.</i> , 2010
UY1731	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	Pérez <i>et al.</i> , 2010
UY1732	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Syzygium jambos</i>	Pérez <i>et al.</i> , 2010
UY217	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	Pérez <i>et al.</i> , 2010
UY220	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Myrrhinium atropurpureum</i> var. <i>octandrum</i>	Pérez <i>et al.</i> , 2010
UY221	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Myrcianthes pungens</i>	Pérez <i>et al.</i> , 2010
UY894	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Pérez <i>et al.</i> , 2010
UY895	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Pérez <i>et al.</i> , 2010
UYTB 20	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	Este estudio
UYTB 26	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Este estudio
UYTB 29	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Este estudio
UYTB 31	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Este estudio
UYTB 33	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Este estudio
UYTB 36	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Este estudio
UYTB 39	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Psidium guajava</i>	Este estudio
UYTB 41	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Este estudio
UYTB 42	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Este estudio
UYTB 45	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Este estudio
UYTB 49	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Este estudio
UYTB 52	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Este estudio
UYTB 71	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Este estudio
UYTB 75	<i>Puccinia psidii</i>	<i>Psidium guajava</i>	Este estudio

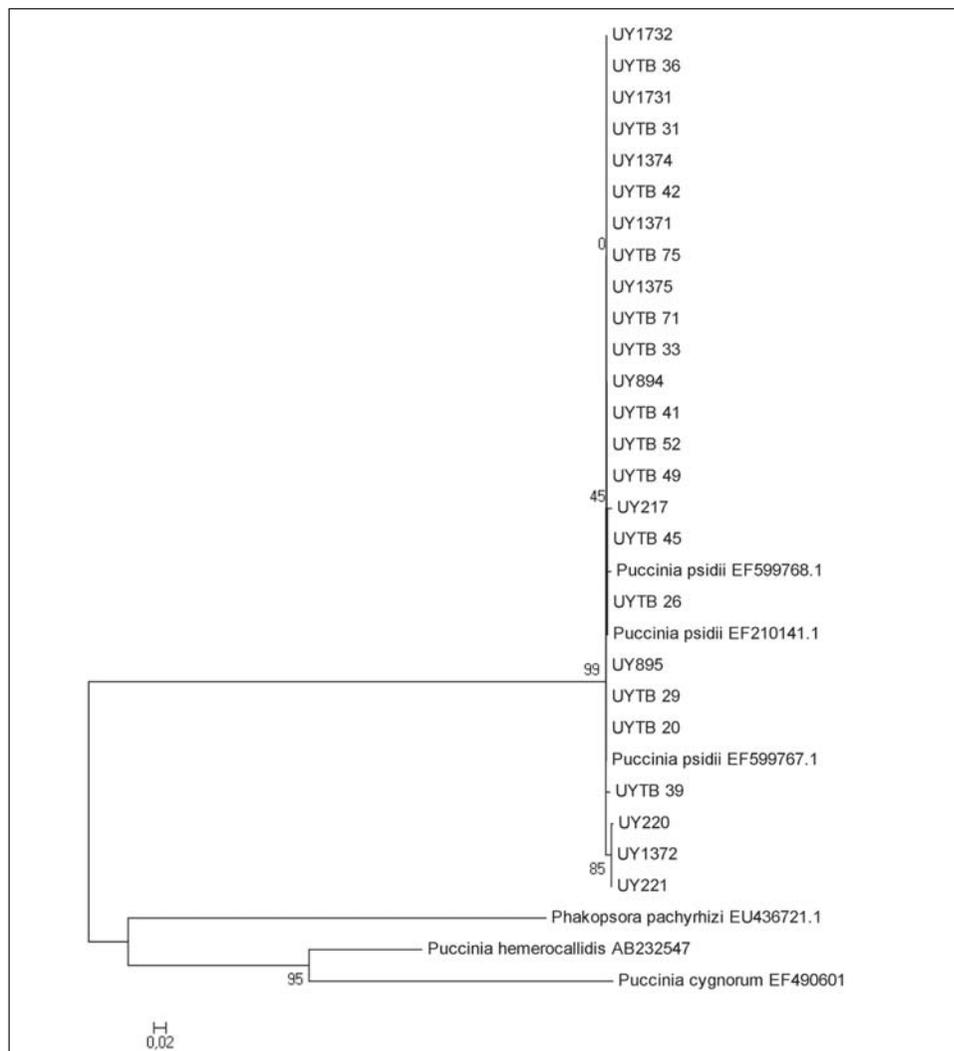
## RESULTADOS

### Análisis del ADNr

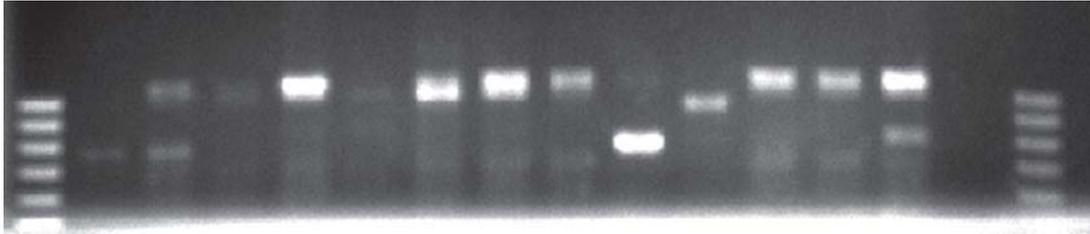
Los análisis de Blast de las secuencias generadas de la región ITS permitieron en todos los casos confirmar la identificación de la especie como *P. psidii*, con e-value = 0, una cobertura de secuencia (querycover) de 100% y un reconocimiento de identidad de 100% para cada una de la muestras analizadas. Estos resultados indican que no existe variabilidad genética para este locus, como puede observarse además en el árbol

de distancias Neighbour-Joining construido a partir de estas secuencias (Figura 3). Si bien se confirma el valor taxonómico de la secuencia ITS como herramienta de diagnóstico a nivel especie para *P. psidii*, resulta evidente su limitado potencial para estudios de variabilidad genética dentro de la especie.

El análisis de la región IGS1 exhibió polimorfismo a distintos niveles. En electroforesis de agarosa se detectó polimorfismo de peso molecular (Figura 4). Adicionalmente se observó que muchas muestras tienen un patrón de amplificación di-alélico de tipo codominante, similar al esperado para geno-



**Figura 3.** Árbol de distancias Neighbour-Joining en base a la región ITS de *Puccinia psidii* sobre *Eucalyptus* spp. y *Psidium guajava* y secuencias de otras royas. Los nodos muestran valores de Bootstrap analizado en base a 1000 réplicas.



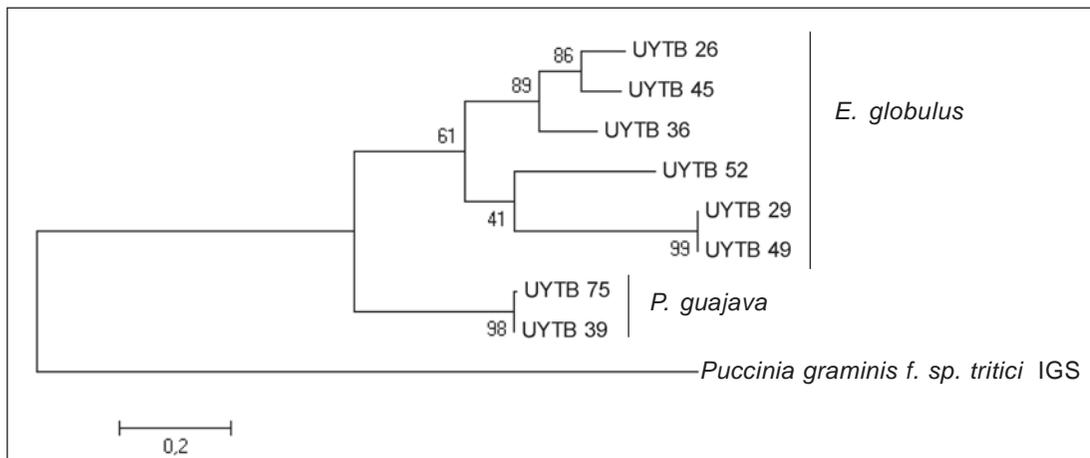
**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación realizada con los cebadores LR12 – 5RNASC. Se observa variabilidad genética en el tamaño del amplicon así como también un patrón de amplificación de tipo codominante.

tipos diploides o dicarióticos (James *et al.*, 2001). Los resultados de BlastN de las secuencias correspondientes a estas bandas evidenciaron su variabilidad genética a nivel nucleotídico. Sin embargo, no fue posible confirmar la homología con *P. psidii* ya que las secuencias IGS1 generadas en este reporte son las primeras reportadas para esta especie. A su vez, presentaron homologías con regiones IGS1 de otras especies fúngicas con e-valores diferentes de cero y coberturas de secuencia inferiores al 64%. Como era de esperar de la comparación con otras especies fúngicas, el porcentaje de identidad en ningún caso llegó al 100%. El potencial de la región IGS1 para estudios de variabilidad genética intraespecífica en *P. psidii* se puede observar en el árbol de distancias de la Figura 5, en la que las secuencias de

*P. psidii* quedaron separadas en dos grandes grupos: uno formado por secuencias de roya provenientes de *E. globulus* y otro por secuencias provenientes de una mirtácea nativa.

**Análisis de SSRs**

Los resultados obtenidos para los SSRs mostraron estar dentro de los rangos alélicos descritos por Zhong *et al.* (2008). De las ocho muestras analizadas sólo una mostró diferencias genotípicas con respecto a las demás, comportándose como monomórfica para el locus PpSSR102 mostrando un alelo de 287pb. Para el resto de los loci analizados no se detectó ningún tipo de variación (Cuadro 2).



**Figura 5.** Árbol de distancias Neighbour-Joining basado en las secuencias IGS1 de *Puccinia psidii* sobre *Eucalyptus globulus* y *Psidium guajava* y de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* como grupo externo. Los nodos muestran valores de Bootstrap analizado en base a 1000 réplicas. Otros árboles Bootstrap (con 1000 réplicas) construidos utilizando UPGMA y Maximum Parsimony mostraron igual topología.

**Cuadro 2.** Alelos (tamaño representado por pares de base, pb) obtenidos a partir de *Puccinia psidii*, utilizando microsatélites (SSR) específicos para esta especie (Zhong *et al.*, 2008). El rango de tamaños (pb) de los SSR en el trabajo original se presenta entre paréntesis.

Alelos	Marcadores SSR										
	PpSSR012 (235-258)	PpSSR022 (151 – 166)	PpSSR087 (143 – 154)	PpSSR102 (255 – 295)	PpSSR136 (132 – 144)	PpSSR161 (276 – 287)	PpSSR195 (134 – 145)	PpSSR208 (85 – 96)			
	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
UYTB_26	233	154	135	287	132	277	115	130	83	102	102
UYTB_29	233	154	135	241	132	277	115	130	83	102	102
UYTB_36	233	154	135	241	132	277	115	130	83	102	102
UYTB_31	233	154	135	241	132	277	115	130	83	102	102
UYTB_39	233	154	135	241	132	277	115	130	83	102	102
UYTB_41	233	154	135	241	132	277	115	130	83	102	102
UYTB_42	233	154	135	241	132	277	115	130	83	102	102
UYTB_45	233	154	n/d	n/d	132	277	115	130	83	102	102

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El análisis de las regiones ITS demostró ser de gran utilidad para el posicionamiento a nivel de especie y confirmación de la identidad de las muestras. Sin embargo, el potencial de esta técnica para explorar la variabilidad genética intraespecífica en *P. psidii* es bajo ya que en ninguna de las muestras analizadas en este trabajo se detectó polimorfismo. Asimismo, el análisis de microsatélites mostró muy baja variabilidad para los alelos analizados. El tener mayor grado de variabilidad genética con IGS1 que con SSR es un resultado inesperado. Los resultados del análisis de la región IGS1 muestran indicios de especialización de la roya entre *Eucalyptus* y *Psidium guajava*. Si bien se trata de resultados preliminares, la existencia de diferentes genotipos asociados a distintos hospederos coincide con lo observado por Graça *et al.* (2011a, b), quienes encontraron genotipos asociados a hospederos para poblaciones de roya en Hawaii y varios países de Sudamérica. En el caso de *Eucalyptus* un único genotipo estaría asociado a este hospedero. Estos autores postulan a su vez que la reproducción de *P. psidii* en las poblaciones observadas es clonal. En este contexto, en nuestro país también sería esperable encontrar un genotipo clonal de *P. psidii* asociado a especies de *Eucalyptus*, el cual correspondería al genotipo que efectuó el «salto» a este hospedero, y una mayor variabilidad entre *P. psidii* de mirtáceas nativas. De confirmarse esta hipótesis, este último aspecto resulta decisivo para los programas de mejoramiento genético ya que las mirtáceas nativas actuarían como un reservorio de diferentes cepas *P. psidii* con el potencial de efectuar nuevos «saltos» hacia el *Eucalyptus*. El análisis de un mayor número de cepas tanto de *Eucalyptus* como de mirtáceas nativas permitirá contar con resultados más robustos para probar esta hipótesis. A su vez, los resultados deberían ser contrastados con ensayos de patogenicidad para poder comprender el significado biológico en relación a su virulencia. Una vez caracterizados los diferentes genotipos del patógeno presentes en el país

y evaluada su patogenicidad, se podría incorporar a los programas de mejoramiento genético de *Eucalyptus* la evaluación de germoplasma para resistencia a la roya a través de la inoculación artificial del patógeno.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las empresas Sierras Calmas y UPM – Forestal Oriental, por su apoyo logístico.

## BIBLIOGRAFÍA

- APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B.; FURTADO, E.L.** 2003. Groups of physiological variability in *Puccinia psidii* populations. *Summa Phytopathologica* 29: 234-238.
- BALMELLI, G.; MARRONI, V.; ALTIER, N.; GARCÍA, R.** 2004. Potencial del mejoramiento genético para el manejo de enfermedades en *Eucalyptus globulus*. Montevideo: INIA. (Serie Técnica; 143). 43 p.
- BALMELLI, G.; SIMETO, S.; MARTÍNEZ, G.; TORRES, D.; PÉREZ, C.; FROS, D.; BENTANCUR, O.** 2009. Relevamiento sanitario de otoño en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus dunnii* en el sureste y litoral oeste. Seminario Técnico de Sanidad Forestal. Tacuarembó: INIA. (Serie Actividades de Difusión; 594). p.51-72.
- BARNES, C.W.; SZABO, L.J.; BOWERSOX, V.C.** 2009. Identifying and quantifying *Phakopsora pachyrhizi* spores in rain. *Phytopathology* 99: 328-338.
- CHATASIRI, S.; KITADE, O.; ONO, Y.** 2006. Phylogenetic relationships among *Puccinia hemerocallidis*, *P. funkiae*, and *P. patriniae* (Uredinales) inferred from ITS sequence. *Mycoscience* 47: 123-129.
- COELHO, L.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.** 2001. Physiologic variability of *Puccinia psidii* – the rust of *Eucalyptus*. *Summa Phytopathologica* 27: 295-300.
- FERREIRA, F.A.** 1983. Ferrugem do eucalipto. *Revista Árvore* 7: 91-109.
- GRAÇA, R.N.** 2011. Genetic diversity of *Puccinia psidii* populations. PhD tesis, Universidade Federal de Viçosa, Brasil.
- GRAÇA, R.N.; ROSS-DAVIS, A.L.; KLOPFENSTEIN, N.B.; KIM, M.; PEEVER, T.L.; CANNON, P.G.; UCHIDA, J.Y.; ALFENAS, A.C.** 2011a. Microsatellite profile of *Puccinia psidii* in Hawaii and South America. *Phytopathology* 101:S127.
- GRAÇA, R.N.; ROSS-DAVIS, A.L.; KLOPFENSTEIN, N.B.; KIM, M.; PEEVER, T.L.; CANNON, P.G.; AUN, C.P.; MIZUBUTI, E.S.; ALFENAS, A.C.** 2011b. Multilocus genotypes indicate selection by host in *Puccinia psidii* populations from Brazil. *Phytopathology* 101:S127.
- JAMES, T.Y.; MONCALVO, J.M.; LI, S.; VILGALYS, R.** 2001. Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. *Genetics* 157: 149-161.
- KOCH DE BRODOS L.; BOASSO, O.; RICCIO DE MACHADO, C.; GANDOLFO ANTÚNEZ, C.** 1981. Enfermedades de las plantas, hongos superiores y saprófitas en Uruguay. Montevideo, Uruguay: Departamento de Comunicaciones, Dirección de Sanidad Vegetal, Ministerio de Agricultura y Pesca.
- KROOP, B.R.; ALBEE, S.; FLINT, K.M.; ZAMBINO, P.; SZABO, L.J.; THOMSON, S.V.** 1995. Early detection of systematic rust infections of Dyers Woad (*Isatis tinctoria* L.) using polymerase chain reaction. *Weed Science* 43: 467-472.
- LANGRELL, S.R.H.; GLEN, M.; ALFENAS, A.C.** 2008. Molecular diagnosis of *Puccinia psidii* (guava rust) – a quarantine threat to Australian eucalypt and Myrtaceae biodiversity. *Plant Pathology* 57: 687-701.
- MACLACHLAN, J.D.** 1938. A rust of the pimento tree in Jamaica. *Phytopathology* 28: 157-170.
- MASSON, M.V.** 2009. Ferrugem do eucalipto: planejamento evasivo, estimativa de dano e análise da viabilidade do controle químico. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 167p.
- PÉREZ, C.; ALTIER, N.; SIMETO, S.; WINGFIELD, M.J.; BLANCHETTE, R.A.** 2010. *Puccinia psidii* infecting cultivated *Eucalyptus* and native myrtaceae in Uruguay. *Mycological Progress* 10: 273-282.

- POU, R.** 2011. Agenda Forestal 2011 - Uruguay.
- RAYACHHETRY, M.B.; VAN, T.K.; CENTER, T.D.; ELLIOTT, M.L.** 2001. Host range of *Puccinia psidii*, a potential biological control agent of *Melaleuca quinquenervia* in Florida. *Biological Control* 22: 38-45.
- SIMPSON, J.A.; PODGER, F.D.** 2000. Management of eucalypt diseases: options and constraints. En: *Diseases and Pathogens of Eucalypts*. CSIRO, pp.427-444.
- SIMPSON, J.A.; THOMAS, K.; GRGURINOVIC, C.A.** 2006. Uredinales species pathogenic on species of Myrtaceae. *Australasian Plant Pathology* 35: 549-562.
- TAKAHASHI, S.S.** 2002. Ferrugem do eucalipto: Índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionados à intensidade da doença no campo. Botucatu, Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrômicas, Botucatu. 101p.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S.** 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- TELECHEA, N.; ROLFO, M.; COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, M.J.** 2003. *Puccinia psidii* on *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *Plant Pathology* 52: 427.
- WINGFIELD, M.J.** 2003. Increasing threat of diseases to exotic plantation forests in the Southern Hemisphere: lessons from *Cryphonectria* canker. *Australasian Plant Pathology* 32: 41-53.
- XAVIER, A.A.** 2002. Histopatologia da interação *Puccinia psidii* e virulencia de isolados do patógeno em espécies de Myrtaceae. PhD tesis, Universidade Federal de Visoça, Brasil.
- ZHONG, S.; YANG, B.; ALFENAS, A.C.** 2008. Development of microsatellite markers for the guava rust fungus, *Puccinia psidii*. *Molecular Ecology Resources*, 8: 348-350.