



**UNIVERSIDAD DE TALCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**Caracterización de aislados de *Lasiodiplodia theobromae* asociado a muerte regresiva  
en manzanos**

**Memoria de título**

**María Sylvia Ravello Jáuregui**

**Talca, Chile**

**2019**



**UNIVERSIDAD DE TALCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**Caracterización de aislados de *Lasiodiplodia theobromae* asociado a muerte regresiva  
en manzanos**

**Por**

**María Sylvia Ravello Jáuregui**

**MEMORIA DE TITULO**

**Presentada a la Universidad de Talca como parte de los requisitos para optar al título  
de**

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**TALCA, 2019**

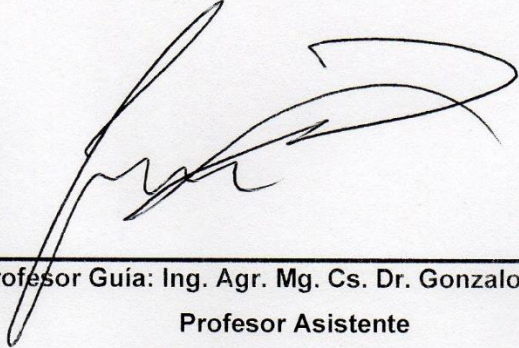
## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

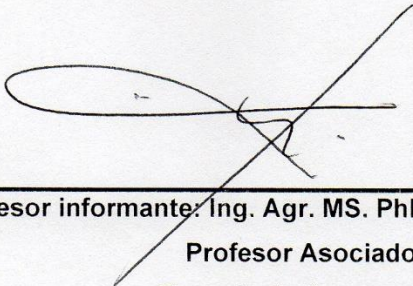
Aprobación:



---

Profesor Guía: Ing. Agr. Mg. Cs. Dr. Gonzalo A. Díaz

Profesor Asistente  
Escuela de Agronomía  
Facultad de Ciencias Agrarias



---

Profesor informante: Ing. Agr. MS. PhD. Mauricio Lolas C.

Profesor Asociado  
Escuela de Agronomía  
Facultad de Ciencias Agrarias

Fecha de presentación de Memoria de Título de 27 septiembre de 2019

**El presente estudio fue apoyado y financiado por el Proyecto Fondecyt Regular  
1180677 (Conicyt, Chile).**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres, Federico y Gladys por todos los años de esfuerzo, han sido mi apoyo en todo momento, agradezco cada palabra de aliento que me dieron, la confianza depositada en mí y todo el cariño que me entregan día a día.

Doy gracias a mis familiares y amigos que me ayudaron, apoyaron y motivaron de una u otra manera en esta etapa.

También agradezco a mi Profesor guía Gonzalo Díaz y a Mauricio Gutiérrez por su buena voluntad, orientarme, entregarme sus conocimientos y apoyo en todo momento durante este proceso.

## RESUMEN

Chile es el principal exportador de manzana fresca del hemisferio sur, cuenta con 32.370 ha. Sin embargo, la producción se ve limitada por la presencia de enfermedades. En los últimos años en Chile se ha observado un incremento de plantas de manzanos con muerte regresiva, lo que está asociado a la familia de las Botryosphaeriaceae. Esta familia presenta una amplia gama de géneros de hongos, entre los que se destacan *Lasiodiplodia*, caracterizada por ser un género que produce problemas de muerte regresiva importantes en vides. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue la caracterización morfológica, molecular y patogénica de seis aislados de *Lasiodiplodia* sp. obtenidos desde manzano con muerte regresiva de los cvs. Fuji y Cripps Pink, pertenecientes a la Región de O'Higgins y del Maule. Para este propósito se realizó una identificación morfológica e identificación molecular, utilizando los genes de la región internal transcribed spacer (ITS), gen parcial de la beta tubulina (BT) y del gen del factor de elongación 1-  $\alpha$  (FE). Para patogenicidad se utilizaron ramillas y frutos de manzano de cvs. Cripps Pink y Fuji que fueron inoculados con los seis aislados de *Lasiodiplodia* sp. En base a los resultados morfológicos y estudios moleculares se identificó a la especie *Lasiodiplodia theobromae*. Todos los aislados mostraron ser patogénicos en ramillas y frutos, siendo todos los aislados similares en virulencia. Además, el cv. Fuji fue más susceptible que el cv. Cripps Pink. Este trabajo constituye la primera descripción de *L. theobromae* en manzanos con muerte regresiva en Chile.

## ABSTRACT

Chile is the main exporter of fresh apple from the southern hemisphere, with 32,370 ha. However, the production is limited by the presence of fungal diseases. In recent years the presence of apple trees with arm dieback associated with the Botryosphaeriaceae family has been increased. This family has a wide range of fungal genera, among which *Lasiodiplodia* stands out, characterized by cause important problem of arm dieback in grapevines. Therefore, the goal of this work was characterized by morphological, molecular and pathogenic studies of six isolates of *Lasiodiplodia* sp. obtained from apple tree with dieback on cvs Cripps Pink and Fuji, obtained from apple trees diseased in the Region of O'Higgins and the Maule. For this purpose a morphological and molecular identification was performed using the genes of the internal transcribed spacer region (ITS), partial beta tubulin gene (BT) and the elongation factor 1-  $\alpha$  gene (EF). For pathogenicity studies, lignified twigs and apple fruits of cvs. Cripps Pink and Fuji were inoculated with the six isolates of *Lasiodiplodia* sp. Based on the morphological and molecular studies, the isolates were identified as *Lasiodiplodia theobromae*. All isolates were pathogenics on twigs and fruits. The six isolates of *L. theobromae* were similar in virulence, and the cv. Fuji was most susceptible than cv. Cripps Pink. This work constitutes the first description of *L. theobromae* in apple trees with dieback in Chile.



## INDICE

	Páginas
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Hipótesis .....	3
1.2. Objetivo general .....	3
1.3. Objetivos específicos .....	3
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
2.1. Características del manzano .....	4
2.1.1. Características de las variedades Cripps Pink y Fuji .....	4
2.2. Producción de manzano en Chile .....	5
2.3. Principales enfermedades del manzano .....	5
2.4. Familia de las Botryosphaeriaceae .....	6
2.4.1. Enfermedades por Botryosphaeriaceae en manzano .....	7
2.5. Características de la especie <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	8
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	9
3.1. Ubicación del estudio .....	9
3.2. Aislados de <i>Lasiodiplodia</i> sp. ....	9
3.3. Identificación morfológica de <i>Lasiodiplodia</i> sp .....	10
3.4. Identificación molecular .....	10
3.5. Inoculación de ramillas de manzanos .....	11
3.6. Inoculación de frutos de manzano .....	12
3.7. Diseño experimental y análisis estadístico .....	13
<b>4. RESULTADOS</b> .....	14
4.1. Identificación morfológica del hongo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	14
4.2. Identificación molecular de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	16
4.3. Patogenicidad de ramillas de manzano .....	18
4.4. Patogenicidad de fruto de manzano .....	19
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	22

6.	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	25
7.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	26

## INDICE DE CUADROS

Páginas

<b>Cuadro 3.1.</b> Aislados fungosos de <i>Lasiodiplodia</i> sp. obtenidos desde manzanos con muerte regresiva ubicados en la Región de O'Higgins y Región del Maule, Chile.....	9
<b>Cuadro 4.1.</b> Dimensiones de conidias de seis aislados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> obtenidos desde brazos de manzano con muerte regresiva.....	15
<b>Cuadro 4.2.</b> Largo de lesión (mm) en ramillas (de 2 años de edad) de manzano cv. Cripps Pink y Fuji inoculados con trozo de micelio de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , después de 3 meses de incubación a 20°C.....	19
<b>Cuadro 4.3.</b> Diámetro de la lesión (mm) en frutos de manzano ( <i>Malus x domestica</i> ) cv Cripps Pink y Fuji inoculados con trozo de micelio de aislados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> después de 7 días de incubación a 20°C.....	21

## INDICE DE FIGURA

	Páginas
<b>Figura 3.1.</b> Inoculación de ramillas de manzano cv Fuji mediante disco de agar con micelio de <i>Lasiodiplodia</i> sp. (Bot-2018-LT45).....	12
<b>Figura 4.1.</b> Colonia blanca-gris de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (aislado Bot-2017-LT12) en medio de cultivo APD, después de 7 días de incubación a 20°C.....	14
<b>Figura 4.2.</b> Conidias de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Bot-2018-LT45). Conidias de forma subovoide a elipsoide de apice ampliamente redondeada, con base truncada, que inicialmente son hialinas y aseptadas con paredes gruesas ( <b>A</b> ), pero en su madurez, las conidias cambian a color café oscuro y ser septadas, con un patrón de estriado en la superficie, ( <b>B</b> ).....	15
<b>Figura 4.3.</b> Árbol filogenético de máxima parsimonia de secuencias concatenadas de los genes ITS + BT + FE 1-alfa de aislados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> obtenidos desde brazos con muerte regresiva en Chile. *Aislados Chilenos obtenidos en el presente estudio .....	18
<b>Figura 4.4.</b> Lesión necrótica y cancro en ramilla de dos años del cv. Cripps Pink inoculado con micelio del aislado Bot-2017-LT12 de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , después de 3 meses de incubación a 22°C.....	18
<b>Figura 4.5.</b> Lesiones en frutos cv. Cripps Pink inoculados con micelio de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Bot-2018-LT42), después de 7 días de incubación a 20°C.....	20
<b>Figura 4.6.</b> Lesiones en frutos cv. Fuji inoculados con micelio de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Bot-2018-LT42), después de 7 días de incubación a 20°C.....	20

## 1. INTRODUCCIÓN

Chile es el principal exportador frutícola del hemisferio sur, posee condiciones climáticas y geográficas privilegiadas, que le permite: por un lado, tener un amplio abanico de productos, y por abastecer fruta fresca de contra estación a los principales mercados del mundo como Estados Unidos, Europa y Asia entre otros (Grau, 2013; ODEPA, 2010).

A nivel nacional, la superficie agrícola ha ido aumentando, alcanzando una superficie de 342.654 hectáreas, donde la mayor superficie frutícola se concentra en la zona centro-sur, desde la Región de Valparaíso hasta la Región del Maule (ODEPA, 2019) destacando como los principales frutales la uva de mesa, manzanos, kiwis y arándanos (Grau, 2013).

El manzano (*Malus x domestica* Borkh.) es un árbol perteneciente a la familia de las rosáceas, el cual es cultivado por su fruto. Chile posee una superficie plantada de aproximadamente 32.370 hectáreas (ODEPA, 2019). Cabe destacar que es un producto atractivo para el mercado nacional y sobre todo internacional, por lo que los agricultores tienen el constante desafío de ir mejorando sus productos ante la mayor exigencia de los consumidores, es por ello que están tratando de buscar e integrar nuevas variedades, con la finalidad de obtener fruta que sea más interesante, es decir, con mejores características organolépticas, que posea una vida útil más prolongada (para llegar a los diferentes mercados sin problemas) y que estos sean resistentes a plagas y enfermedades (Quiroz, 2017).

A pesar de los avances de la agricultura, uno de los principales desafíos que se presentan, tanto en Chile como en el extranjero, es el manejo de plagas y enfermedades que afectan a los cultivos, en especial en el manzano, ya que existe todavía una gran cantidad de especies que aún no han sido caracterizadas, impidiendo que estos se puedan controlar e identificar con normalidad, limitando la producción del cultivo y generando grandes pérdidas.

Sin lugar a dudas, las enfermedades pueden ser un factor de importancia en la producción, debido a las pérdidas que pueden causar a nivel de huerto y/o durante su post cosecha. Entre los agentes causales asociados a enfermedades a nivel nacional, las especies fungosas son las que tienen mayor importancia causando problemas en los frutales (Latorre, 2004; Latorre, 2018). De las enfermedades que se han reportado sobre manzanos, en Chile las más importantes son la venturia o sarna del manzano cuyo agente causal es el hongo *Venturia inaequalis* (Díaz y Lolás, 2016), el cancro europeo del manzano causado por el hongo *Neonectria ditissima* (= *N. galligena*), el cancro áspero cuyo agente causal es *Botryosphaeria dothidea* (Latorre, 2004; Acuña 2010).

Por otra parte, en post cosecha, las pudriciones más comunes que se pueden encontrar son Moho Azul causado por *Penicillium expansum*, Pudrición Calicinal provocado por *Botrytis cinerea* y Ojo de Buey, causado por *Neofabraea vagabunda* (= *N. alba*) (Pinilla, 2013).

Como se mencionó anteriormente, cuando se producen las condiciones adecuadas tanto en pre como en postcosecha (ya sea por las condiciones climáticas o por malos manejos que se producen en los huertos o durante la postcosecha), el manzano es muy susceptible al ataque de patógenos. Dentro estos que se pueden presentar, se encuentran especies fungosas pertenecientes a la familia de las Botryosphaeriaceae que se caracterizan por causar canchales en la madera, muerte regresiva de los brazos y pudrición de los frutos en diferentes hospederos como vid (Díaz et al., 2013; Úrbez-Torres et al., 2006), arándanos (Espinoza et al., 2009), paltos (McDonald y Eskalen, 2011; Valencia et al., 2019) entre otros.

En los últimos años, en Chile se ha observado un incremento de plantas de manzanos con muerte regresiva, siendo el único estudio disponible, el de los autores Latorre y Toledo (1984), describiendo a la especie *Botryosphaeria dothidea*. Por lo tanto, se hace necesario determinar cuáles son los agentes causales asociados a la enfermedad en manzanos en la actualidad. El estudio reciente de Herrera (2018) y Díaz et al. (2019), describe a *D. seriata* causando muerte regresiva en brazos de manzano en la Región del Maule. Sin embargo, el aumento de la prevalencia de esta enfermedad en el manzano, hace necesario describir a todas las especies fungosas asociadas a la muerte regresiva, para poder realizar estudios epidemiológicos.

Debido a que la agricultura sigue avanzando, es muy importante poder investigar e identificar los distintos patógenos que se pueden presentar en los huertos agrícolas, para poder tomar las medidas adecuadas y realizar los controles de forma oportuna. Un claro ejemplo de esto es la especie *Lasiodiplodia theobromae* perteneciente a la familia de las Botryosphaeriaceae, que ha sido descrita recientemente asociada a muerte regresiva en paltos, pero se desconoce su presencia en manzanos con muerte regresiva en Chile.

A continuación, se plantea la hipótesis y objetivos del presente estudio:

1.1. Hipótesis

La muerte regresiva en manzanos es causada por varias especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae, destacándose a la especie *Lasiodiplodia theobromae*, que presenta aislados con una virulencia diferencial en manzano.

1.2. Objetivo general

Caracterizar aislados de *Lasiodiplodia theobromae* obtenidos desde manzanos con muerte regresiva.

1.3. Objetivos específicos

Identificar morfológicamente aislados de *Lasiodiplodia theobromae* obtenidos desde manzanos con muerte regresiva.

Identificar molecularmente aislados de *Lasiodiplodia theobromae* obtenidos desde manzanos con muerte regresiva.

Determinar la patogenicidad de aislados de *Lasiodiplodia theobromae* causando lesiones en ramillas y fruta de manzano.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Características del manzano

*Malus x domestica* Borkh conocido comúnmente como manzano, es uno de los árboles más antiguos cultivados por el hombre, originario de China, que pertenece a la familia de las rosáceas. (Álvarez et al., 2004).

El manzano es una especie leñosa de hoja caduca que es cultivado en varios lugares del mundo, debido a su facilidad de adaptación a distintos suelos y climas, siendo el único requisito es que se deben cumplir las horas de frío que requiere cada variedad, que varían desde las 800 a 1700 horas frío (Ciren, 2017). El manzano puede tener un ciclo vegetativo que abarca desde los 180 a 220 días según las variedades (Ciren, 2017). Esta especie arbórea puede alcanzar hasta los 10 m de alturas, dependiendo del patrón y el sistema conducción que se le dé al árbol y un ancho en la base de 1 a 4,5 m, con una copa globosa (Cardenas y Fisher, 2013).

Este árbol es cultivado por su apreciado fruto, debido a los aportes nutricionales y terapéuticas que este le entrega a nuestro organismo, por ser un producto de buena calidad, y por los distintos productos industriales que se pueden realizar en base a este producto (Ciren, 2017).

El fruto es un pomo carnoso que tiene la particularidad de tener un ovario ínfero con un endocarpio lignificado, posee un pedúnculo corto, puede tener forma oblonga, cónico u oblicuo. Además, este se puede presentar en distintas tonalidades, las que se pueden clasificar en: Verde, amarillas y rojas (Ryugo, 1993; Cárdenas y Fischer, 2013; Ciren, 2017). Las principales variedades de manzana roja que se encuentran en Chile son Royal Gala, Fuji, y Cripps Pink y para manzana verde se encuentra la variedad Granny Smith (Quiroz, 2017).

#### 2.1.1. Características de las variedades Cripps Pink y Fuji

La variedad Cripps Pink proviene del cruzamiento entre Lady Williams y Golden Delicious que se obtuvo en Australia, en el año 1979 (Calvo et al., 2008). Las características que presenta esta variedad es de vigor medio, fácil formación y conducción, presenta buena ramificación en eje, con buenos ángulos de salida. Por otro lado, el fruto es de tamaño medio a grande con una forma cónica-oblonga, posee un color rosado a rojo brillante sobre fondo verde, que vira a amarillo en madurez (Galdames y Mesa, 2013; Moggia y Pereira, 2013).



La variedad Fuji es la segunda variedad más plantada en Chile según el catastro realizado por Odepa-Ciren en el 2011, en primer lugar, se encuentra la variedad Royal. La variedad Fuji proviene del cruzamiento entre las variedades americanas Red Delicious y Virginia Ralls Genet, obtenida en Japón en el año 1939. Las características que tiene esta variedad es que posee un hábito de crecimiento que presenta ramas vigorosas, eje con escasa dominancia apical, se adapta a una gran variedad de portainjertos. La fruta es de tamaño grande, redondo, de color de superficie rojo oscuro y de fondo verde amarillento, presenta un alto contenido de azúcar (Galdámes y Mesa, 2013).

## 2.2. Producción de manzano en Chile

En Chile, según ODEPA (2019) se encuentran 32.370 ha de manzanos, que se distribuyen principalmente desde la Región de Valparaíso hasta la Región de Los Lagos. Sin embargo, la Región del Maule es la principal zona productora de manzano con 19.636 ha, siendo la manzana roja la predominante con 16.870 ha, mientras que la manzana verde posee una superficie de 2.766 ha.

Chile es considerado como el principal exportador de manzana del hemisferio sur y el cuarto a nivel mundial, con un volumen de 740 toneladas aproximadamente (Bustamante, 2019) la fruta es exportada principalmente hacia Latinoamérica, Estados Unidos, Europa, lejano y cercano oriente. El resto de la producción de fruta queda para el mercado nacional, como fruta fresca o para la elaboración de jugos o procesados, según la calidad en la que se encuentre este producto. (Álvarez et al., 2004).

## 2.3. Principales enfermedades del manzano

Las enfermedades afectan directamente la calidad de la fruta y de la planta, siendo un factor perjudicial cuando estas se presentan, ya que puede generar pérdidas económicas importantes si es que estas no se previenen o controlan a tiempo. Para que esto ocurra debe existir la presencia de tres factores básicos, las que conforman el triángulo de las enfermedades que consisten en: i) la presencia de un hospedero susceptible, ii) presencia de un agente virulento y iii) las condiciones ambientales favorables para que la infección ocurra (Latorre, 2014). Para evitar que la enfermedad suceda se debe tener cuidado en todo momento, desde el huerto hasta que el fruto llegue a su destino.

El manzano es muy susceptible al ataque de diferentes patógenos tanto en precosecha como en poscosecha. Una de las enfermedades más importante del manzano tanto en Chile como en varios lugares del mundo es la Sarna del Manzano, provocada por el hongo ascomicete *Venturia inaequalis*, colonizando e infectando follaje, brotes, flores y frutos, lo que puede generar pérdidas hasta un 80% si no se controla a tiempo (Álvarez et al., 2004; Latorre, 2018; Lolás, 2003; Sutton et al., 2014). Entre las enfermedades que causan pudriciones en frutos se destaca por su constante frecuencia Pudrición Calicinal, causada por *Botrytis cinerea* (Acuña, 2010; Latorre, 2004; Latorre 2018), y Ojo de Buey causado por *Neofabraea vagabunda* (= *N. alba*) que causa importantes pérdidas en variedades tardías como Cripps Pink y Fuji durante almacenaje (Pinilla, 2013; Soto-Alvear et al., 2013).

Una de las enfermedades que causa daño en la madera de la planta es el Cancro Áspero o granuloso provocado por el hongo *Botryphaeria dothidea*, que genera daño en brazos y ramillas en plantas jóvenes y adultas. También se encuentra el Cancro Europeo causado por *Neonectria ditissima* (= *N. galligena*), que genera canchros elípticos en troncos, brazos y ramillas, que finalmente causan un estrangulamiento de la zona afectada (Acuña, 2010; Álvarez et al., 2004).

#### 2.4. Familia de las Botryosphaeriaceae

“La familia Botryosphaeriaceae pertenece al Reino Fungi, de la división Ascomycota, subfilum Pezizomycotina, clase Dothideomycete, subclase Incertae sedis y orden Botryosphaeriales” (Latorre, 2004).

La familia Botryosphaeriaceae presenta una amplia gama de hongos, los que presentan morfología y genética distinta, donde se han descrito más de 17 géneros pertenecientes a esta familia, entre las que se incluyen géneros como *Botryosphaeria*, *Dothiorella*, *Neofusicoccum*, *Lasiodiplodia* y *Diplodia* entre otras (Phillips et al., 2013). Las especies de Botryosphaeriaceae son organismos fungosos que pueden ser patógenos, endófitos o saprófitos (Slippers y Wingfield, 2007; Picos-Muñoz et al., 2015).

Las especies de esta familia se encuentran distribuidas en varios lugares del mundo, salvo en regiones polares donde el frío es extremo. Estos hongos poseen un amplio rango de hospederos tanto en gimnosperma como angiosperma, afectando principalmente plantas leñosas como por ejemplo vides, paltos, arándanos y manzanos (Espinoza et al., 2009; Phillips et al., 2013; Slippers y Wingfield, 2007; Úrbez-Torres et al., 2006; Valencia et al., 2019).

Estos patógenos infectan y colonizan rápidamente cuando la planta se encuentra en situaciones de estrés (hídrico, salino, temperatura entre otros), cuando se generan daños físicos (por granizos, podas, etc.) o cuando las variedades se encuentran en sitios inadecuados. Es más, estudios han demostrado que en condiciones de estrés hídrico y de temperatura, aumenta la severidad de la muerte de brazos en vides asociados al hongo *Eutypa lata* (Sosnowsky et al., 2011).

Los síntomas que se presentan en los diferentes hospederos leñosos son debilitamiento general de los árboles, muerte regresiva de brazos y ramillas, cancro y en algunos casos puede generar muerte de árboles (Slippers y Wingfield, 2007; Úrbez-Torres et al., 2006).

#### 2.4.1. Enfermedades por Botryosphaeriaceae en manzano

La especie *Botryosphaeria dothidea* asociada al Cancro Áspero, afecta brazos y ramillas de plantas jóvenes y adultas, generando que la corteza que es afectada, se produzcan abundantes picnidios, junto con desprendimiento y enrollamiento de la corteza adquiriendo una tonalidad anaranjada (Pinilla, 2013). Cabe destacar que la *B. dothidea* es la única especie de Botryosphaeriaceae descrita causando cancrrosis y muerte regresiva en manzanos en Chile (Latorre y Toledo, 1984). Recientemente, *D. seriata* ha sido encontrado e identificado como un importante patógeno asociado a la muerte regresiva en manzanos en la Región del Maule (Herrera, 2018; Díaz et al., 2019).

En Chile como en otras partes del mundo, la especie *D. seriata* causa pudrición de frutos en manzanas denominada Pudrición Negra (=Black rot), presentando lesiones irregulares de color pardo a pardo oscuro con una consistencia firme inicialmente, pero con el tiempo, los síntomas son más severos y el fruto va perdiendo su estructura y contenido (pudrición blanda), volviéndose un fruto blando y acuoso en el huerto (Cáceres et al., 2016). Recientemente se determinó la presencia de *D. mutila* causando pudrición negra, siendo junto con *D. seriata*, dos especies que se ven favorecidos con temperaturas medias (20-28 °C) y presencia de agua libre, en especial cercano a la fecha de cosecha de frutos en variedad Fuji (Díaz et al., 2019). Esto indica que estas especies de Botryosphaeriaceae asociadas en frutos, podrían ser una importante fuente de inóculo (frutos en árboles o en el suelo de los huertos) para infecciones de ramillas y brazos de manzano con muerte regresiva.

## 2.5. Características de la especie *Lasiodiplodia theobromae*

La especie *Lasiodiplodia theobromae* es un hongo ascomicete, perteneciente a la familia de las Botryosphaeriaceae, orden Botryosphaerales (Phillips et al., 2013; Picos-Muñoz et al., 2015). Este hongo se encuentra distribuido en varios lugares del mundo, es capaz de infectar un gran número de plantas en su mayoría plantas leñosas como paltos, mangos, manzano y cacao, indicando que esta especie es una de las más virulentas entre las Botryosphaeriaceae (Delgado-Cerrone et al., 2016; Rosado et al., 2016; Úrbez-Torres et al., 2008; Valencia et al., 2019). Las plantas afectadas por esta especie desarrollan síntomas que incluyen: muerte regresiva o muerte apical regresiva, canchales, gomosis, tizón de la hoja, pudrición de raíz y pudrición de frutos (Segura-Contreras et al., 2015; Picos-Muñoz et al., 2015).

El patógeno *L. theobromae* se ve favorecido cuando se presentan condiciones de alta humedad ambiental y temperatura, siendo catalogada una especie de Botryosphaeriaceae de climas subtropicales (Úrbez-Torres et al., 2008), infectando rápidamente cuando la planta se encuentra en estado de estrés hídrico o con déficit de nutrición. Esta especie ingresa a la planta cuando se producen heridas por podas, caídas de hojas, daños por insectos, entre otros y sobreviven en tejidos muertos que se encuentran en el suelo o en el mismo árbol, sobretodo en frutos que fueron afectados. Las conidias que se forman (picnidios) sobre los tejidos afectados, son diseminadas por viento y salpicado de las precipitaciones (Picos-Muñoz et al., 2015).

En Chile, la especie *L. theobromae* ha sido descrita recientemente asociado a muerte regresiva en limoneros de la zona de Pica, Región de Tarapacá (Guajardo et al., 2018) y en paltos asociados a muerte de brazos y a pudrición de paltos en la Región de Valparaíso (Valencia et al., 2019).

*Lasiodiplodia theobromae* solo ha sido descrita en manzanos causando muerte regresiva en Uruguay (Delgado-Cerrones et al., 2016). Sin embargo, su frecuencia es baja, siendo más importante la especie *D. seriata* (Delgado-Cerrone et al., 2016; Sessa et al., 2016). En Chile, no hay antecedentes disponibles sobre la descripción de esta especie causando muerte regresiva en manzanos, siendo las únicas especies descritas en manzanos hasta el momento *B. dothidea* y *D. seriata* (Latorre y Toledo, 1984; Díaz et al., 2019; Herrera, 2018).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación del estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología Frutal, adjunto a la Facultad de Ciencias Agrarias, ubicado en el campus Talca de la Universidad de Talca, Chile.

#### 3.2. Aislados de *Lasiodiplodia* sp.

Para el presente estudio, se utilizaron seis cultivos puros de aislados fungosos de la especie *Lasiodiplodia* sp., que se obtuvieron desde muestras de brazos con síntomas de muerte regresiva en huertos de manzano de distintas localidades de las regiones de O'Higgins y del Maule (Cuadro 3.1). En forma breve, los aislados fungosos se obtuvieron desde la siembra de trozos de madera (3-5 mm de diámetro) en placas de Petri (88 mm de diámetro) con medio de cultivo agar papa dextrosa (ADP, 2%) modificado (APDM) con antibióticos e Igepal (Díaz y Latorre, 2014). Para obtener cultivos puros, se tomaron puntas de hifas de cada aislado fungoso incubado en medios de cultivo APD (2%) de tres días de crecimiento a 20°C. Las placas de Petri de los seis aislados se mantuvieron en condiciones de 20-22°C por 5 días con régimen de 12h/12h luz/oscuridad, hasta observar crecimiento micelial del agente causal. Los cultivos puros se multiplicaron periódicamente cada 7 días para disponer de cultivos activos para los diferentes estudios a realizar.

**Cuadro 3.1.** Aislados fungosos de *Lasiodiplodia* sp. obtenidos desde manzanos con muerte regresiva ubicados en la Región de O'Higgins y Región del Maule, Chile

Aislados	Cultivar	Procedencia
Bot-2017-LT12	Fuji	Camarico
Bot-2018-LT42	Cripps Pink	Rancagua
Bot-2018-LT45	Fuji	Los Niches
Bot-2018-LT66	Fuji	Panguilemo
Bot-2018-LT68	Cripps Pink	Rio Claro
Bot-2018-LT102	Cripps Pink	Rancagua

### 3.3. Identificación morfológica de *Lasiodiplodia* sp

La identificación morfológica se realizó observando el crecimiento de la colonia de los seis aislados en medio de cultivo APD, en donde se caracterizaron y midieron picnidios y conidias con el objetivo de identificar el agente causal, basado en el trabajo de Phillips et al. (2013) y Úrbez-Torres et al. (2008). Los cultivos se examinaron semanalmente por la formación de picnidios y conidias. Las conidias que fueron obtenidas desde picnidios, se caracterizaron por forma (ovoide, fusiforme), color, presencia o ausencia de septas. El largo y el ancho de conidias se midieron utilizando un microscopio óptico (Epson), con cámara incorporada utilizando el programa MOTIC IMAGE PLUS 2.0. Se realizaron mediciones (largo y ancho) de 40 conidias por cada aislado de *Lasiodiplodia* sp.

### 3.4. Identificación molecular

Para la identificación molecular se utilizaron cultivos puros de seis aislados de *Lasiodiplodia* sp. (Bot-2017-LT12; Bot-2018-LT42; Bot-2018-LT45; Bot-2018-LT66; Bot-2018-LT68; Bot-2018-LT102) de 5 días de edad en medio ADP (2%) incubados a 20°C. Para la identificación molecular se realizaron los siguientes pasos:

i) Obtención de ADN: La extracción de ADN se realizó a partir de micelio (5 mg aprox.), utilizando la metodología propuesta por Espinoza (2016), empleando el kit de extracción comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit – Promega). Para confirmar la extracción de ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (1 g de agarosa por 100 mL de buffer TAE al 1X). Una vez solidificado el gel, a cada pocillo del gel de agarosa, se le agregó 6 µL de mezcla de la muestra de ADN (3 µL) y buffer de carga (3 µL). También se colocó en uno de los pocillos un indicador de referencia de peso molecular 100-1000 pb (Invitrogen, Ladder 100 pb, E.E.U.U.). Luego, se cargó eléctricamente con 120 mV (fuente de poder, 75.1214 Class II, Continental Lab Products, Inc.) a la cámara del gel de agarosa desde un polo negativo a un polo positivo, por aproximadamente 60 minutos. Finalmente se visualizó el gel de agarosa en un transiluminador de UV (ECX-26.M Viber Lourmat, Francia).

ii) Amplificación y secuenciación del ADN: Para este propósito el ADN fungoso se amplificó utilizando los genes; internal transcribed spacer 'ITS' (White et al., 1990), gen parcial de la beta tubulina 'BT' (Glass y Donaldson, 1995) y gen del factor de elongación 1-α 'FE' (Carbone y Kohn 1999). Las condiciones de temperatura empleados en el termociclador para los genes ITS, BT y

FE fueron los descritos previamente por Espinoza (2016). El producto PCR se envió para su purificación y secuenciación a Macrogen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com), Corea del Sur). Las secuencias de los aislados de Botryosphaeriaceae, se limpiaron eliminando las colas de nucleótidos fuera de los partidores y editando las secuencias con el programa Bioedit (v. 7.1.3.0; Tom Hall, Isis Pharmaceutical Inc. E.E.U.U).

iii) Análisis de Blast: Una vez obtenidas las secuencias de consenso de cada uno de los aislados, se procedió a realizar una comparación de las secuencias con secuencias de calidad depositadas en el GenBank mediante el alineamiento básico de secuencias (Blastn) del NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine). Se consideró la identidad a nivel de especie cuando se obtuvo un >97% de similitud con las especies depositadas de referencias en la base de datos del GenBank.

iv) Árbol filogenético: Para el análisis filogenético, las secuencias de consenso de los seis aislados de *Lasiodiplodia* sp. se sometieron a una prueba de máxima parsimonia utilizando el programa MEGA 7 'Molecular Evolutionary Genetics Analysis software' (Tamura et al., 2011). Brechas en secuencias fueron consideradas como un quinto carácter de robustez. Se utilizó opción de búsqueda heurística y 1000 repeticiones de secuencias como soporte de calidad. Se incorporaron en el análisis filogenético secuencias obtenidas desde el GenBank (genes ITS, BT y FE) de especímenes types de las especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae como *D. seriata* (CBS 112555 extype), *D. pseudoseriata* (CBS 124906 holotype), *D. mutila* (CBS 112563 lectotype), *L. theobromae* (CBS 164.94 holotype), *B. dothidea* (CMW8000 epitype), *N. mediterraneum* (CBS 121718 holotype), *N. parvum* (CMW9081 extype) y *N. arbuti* (CBS 116131 extype). La especie *Guignardia philoprina* (CBS 447), se utilizó como una secuencia de fuera de grupo para enraizar al árbol (outgroup).

### 3.5. Inoculación de ramillas de manzanos

Para este estudio se utilizaron los seis aislados de *Lasiodiplodia* sp. (Bot-2017-LT12; Bot-2018-LT42; Bot-2018-LT45; Bot-2018-LT66; Bot-2018-LT68 y Bot-2018-LT102). Para este ensayo se seleccionaron y podaron (desde su zona basal, en agosto) ramillas lignificadas de dos años (n=280 ramillas) de aproximadamente 45 cm de longitud por árbol de variedades Fuji y Cripps Pink, libre de enfermedades y plagas, desde un huerto comercial de Curicó. Este material se transportó al laboratorio para su implementación. Las ramillas fueron sumergidas en la zona basal (3 cm) en un enraizante por 10 s (Anasac, Chile). Inmediatamente después, las ramillas en receso se colocaron en forma vertical al interior de cajas plásticas con perlita húmeda (5 cm en

profundidad). Una vez ordenadas las ramillas de ambas variedades, las ramillas en receso se podaron en bisel en su zona distal. Después de 24 horas, cada herida de poda se inoculó con un trozo de agar (5 mm diámetro) con crecimiento micelial activo (obtenido de un cultivo de 5 días) (Figura 3.1). Luego, se procedió a proteger con parafilm cada herida. A una misma cantidad de ramillas se les colocó un trozo de agar estéril (5-mm de diámetro) que fueron dejados como tratamiento testigo. Las ramillas inoculadas se mantuvieron a una temperatura constante de 18-22°C con régimen de luz (12h/12h) con una humedad entre un 80 a 85%. Después de 3 meses de incubación, se procedió observar síntomas externos e internos y a medir la lesión necrótica (mm) desde la zona de inoculación (herida de poda) hacia la base (mm) de las ramillas utilizando un calibrador digital Vernier (serie 500 Absolute digimatic, Mitutoyo America Corporation). Se realizó un re-aislamiento de cada ramilla en medio APD para confirmar los postulados de Koch.



**Figura 3.1.** Inoculación de ramillas de manzano cv Fuji mediante disco de agar con micelio de *Lasiodiplodia* sp. (Bot-2018-LT45).

### 3.6. Inoculación de frutos de manzano

Para este estudio se utilizaron los seis aislados de *Lasiodiplodia* sp. (Bot-2017-LT12; Bot-2018-LT42; Bot-2018-LT45; Bot-2018-LT66; Bot-2018-LT68 y Bot-2018-LT102). Se seleccionaron frutos de manzano de variedades (madurez comercial SS%, firmeza y color) Fuji (San Clemente) y Cripps Pink (Longavi). Se utilizaron 1120 frutos libres de enfermedades, plagas y alteraciones fisiológicas. Los frutos se desinfectaron superficialmente con una solución de detergente y cloro (10 L de agua



destilada, 1 mL de hipoclorito de sodio al 4,9 % y 5 mL de detergente liquido) por 3 minutos y dejados sobre papel absorbente en una sala a 20°C por 2 h. Una vez secos los frutos, se procedió a realizar una herida en la zona ecuatorial utilizando un sacabocado de acero inoxidable estéril (5 mm de diámetro) que fue desinfectado con etanol al 90%. Sobre cada herida se colocó un trozo de agar (5 mm diámetro) con crecimiento micelial activo. Una vez realizada la inoculación se procedió a proteger la herida con parafilm. Se utilizó una misma cantidad de frutos con heridas, pero se les colocó un trozo de agar estéril que fueron dejados como control. Finalmente, los frutos inoculados fueron incubados por 7 días a 20°C. Una vez transcurridos los días incubación se determinó el diámetro de la lesión (mm) utilizando un calibrador digital Vernier (serie 500 Absolute digimatic, Mitutoyo America Corporation). Se realizó un re-aislamiento de cada variedad de manzana en medio de APD (incubado por 5 días a 20°C), para comprobar que el hongo sea la especie con que se inoculó inicialmente la manzana, todo esto para confirmar los postulados de Koch.

### 3.7. Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental utilizado para el estudio de inoculación de ramillas fue un diseño completamente al azar con una estructura factorial de 2 (cultivar) X 6 (aislado). La unidad experimental correspondió a cinco ramillas y se utilizaron cuatro repeticiones. Los promedios del largo de las lesiones en ramillas se compararon a través de un análisis de varianza (ANDEVA) ( $P < 0,05$ ), y en caso de existir diferencias significativas, los promedios se sometieron a una prueba de rango múltiple de Tukey (5%). Se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.2.

El diseño experimental utilizado para el estudio de inoculación de frutos fue un diseño completamente al azar, con una estructura factorial de 2 (cultivar) X 6 (aislado). La unidad experimental correspondió a diez frutos y se utilizaron ocho repeticiones. Los promedios del diámetro de las lesiones en manzanas se compararon a través de un análisis de varianza (ANDEVA) ( $P < 0,05$ ), y en caso de existir diferencias significativas, los promedios se sometieron a una prueba de rango múltiple de Tukey (5%). Se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.2.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Identificación morfológica del hongo *Lasiodiplodia theobromae*

Los seis aislados desarrollaron en medio APD, un crecimiento muy rápido (desde dos a cinco días) con abundante micelio aéreo inicialmente de color blanco-grisáceo, pero tornándose de color verde-grisáceo hacia el centro de la colonia con la edad. A partir de 14 días de incubación a 20°C con luz UVA (320 nm), los cultivos de los seis aislados formaron picnidios, globosos y agrupados de color negro, de 3 a 5 mm de diámetro. Las conidias producidas por los picnidios (cirrus de color rosado) fueron de forma subovoide a elipsoide de ápice ampliamente redondeada, con una base truncada, amplia en el medio y angosta hacia los extremos, de paredes gruesas, inicialmente hialina y aseptada, pero en su madurez son de color café oscuro y septadas, con depósitos de melanina con apariencia de estriado en la superficie (Figura 4.2). Las dimensiones en promedio fueron de 29,9  $\mu\text{m}$  largo y 18,6  $\mu\text{m}$  de ancho (Cuadro 4.1).



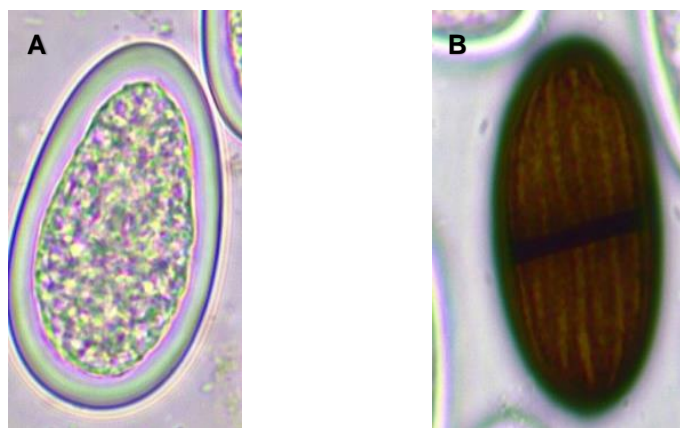
**Figura 4.1.** Colonia blanca-gris de *Lasiodiplodia theobromae* (aislado Bot-2017-LT12) en medio de cultivo APD, después de 7 días de incubación a 20°C.

**Cuadro 4.1.** Dimensiones de conidias de seis aislados de *Lasiodiplodia theobromae* obtenidos desde brazos de manzano con muerte regresiva.

Aislados	Dimensiones ( $\mu\text{m}$ )		
	Largo (L) <sup>1</sup>	Ancho (A) <sup>1</sup>	L/A
	(min-) Pro $\pm$ Dess (-Max)		
Bot-2017-LT12	(27,8-) 30,6 $\pm$ 1,5 (-35,4)	(6,1-) 14,8 $\pm$ 1,9 (-17)	2,1
Bot-2018-LT42	(26,5-) 30,4 $\pm$ 1,5 (-33,7)	(13-) 17,7,6 $\pm$ 4 (-31,4)	1,7
Bot-2018-LT45	(17,1-) 27,9 $\pm$ 4 (-37,4)	(11,9-) 23,5 $\pm$ 7,5 (-36,1)	1,2
Bot-2018-LT66	(26,5-) 30,9 $\pm$ 2,2 (-36,0)	(14,6-) 24,1 $\pm$ 7,8 (-36,0)	1,3
Bot-2018-LT68	(26,0-) 31,8 $\pm$ 2,6 (-36,6)	(13,7-) 16,5 $\pm$ 2,1 (-27,8)	1,9
Bot-2018-LT102	(22,1-) 27,6 $\pm$ 2,6 (-31,8)	(11,0-) 14,7 $\pm$ 1,3 (-17,7)	1,9
Promedio	29,9	18,6	1,7
Referencia <sup>2</sup>	(28,5-) 26,7 (-19,9)	(17,8-) 14,6 (-11,5)	1,8

<sup>1</sup> Dimensiones= (dato mínimo-), promedio  $\pm$  desviación estándar (-dato máximo).

<sup>2</sup> Urbez-Torres et al., 2008.

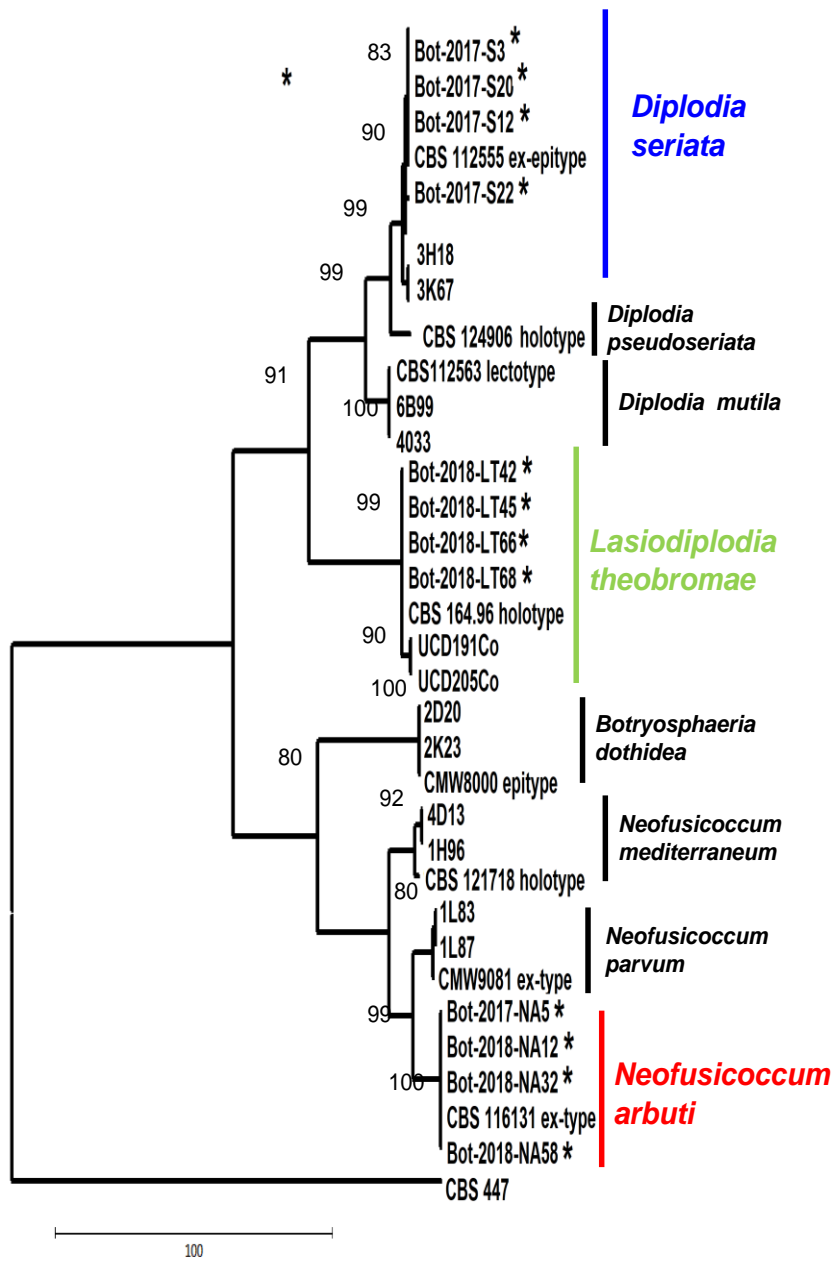


**Figura 4.2.** Conidias de *Lasiodiplodia theobromae* (Bot-2018-LT45). Conidias de forma subovoide a elipsoide de ápice ampliamente redondeada, con base truncada, que inicialmente son hialinas y aseptadas con paredes gruesas (A), pero en su madurez, las conidias cambian a color café oscuro y ser septadas, con un patrón de estriado en la superficie, (B).

#### 4.2. Identificación molecular de *Lasiodiplodia theobromae*

En los seis aislados de Botryosphaeriaceae se logró aislar ADN utilizando la metodología señalada. La amplificación fue exitosa en los seis aislados utilizando los partidores ITS1 e ITS4; Bt2a y Bt2b, y FE1-728F y FE1-986R para los genes ITS, BT y FE 1-alfa, respectivamente. Las secuencias de consenso de los seis aislados obtuvieron entre 99 a 100% de similitud en el análisis de Blast (GenBank) con el espécimen type de *L. theobromae* (CBS 164.94 holotype).

Las secuencias de Botryosphaeriaceae no fueron significativas según una prueba de partición de homogeneidad, por lo tanto, las secuencias de los tres genes (ITS + BT + FE 1-alfa) pueden combinarse en el análisis de máxima parsimonia. El análisis mostró claramente una separación entre los clados de las especies de Botryosphaeriaceae analizadas. Los seis aislados de *L. theobromae* se agruparon con el type de *L. theobromae* (CBS 164.96 holotype) con un soporte sólido de 90% (Figura 4.3). Todas las especies fueron separadas en diferentes clados con un alto nivel de soporte.



**Figura 4.3.** Árbol filogenético de máxima parsimonia de secuencias concatenadas de los genes ITS + BT + FE 1-alfa de aislados de *Lasiodiplodia theobromae* obtenidos desde brazos con muerte regresiva en Chile. \*Aislados Chilenos obtenidos en el presente estudio.

#### 4.3. Patogenicidad de ramillas de manzano

Las ramillas de manzano cvs. Cripps Pink y Fuji provenientes de San Clemente y Curicó inoculadas con los seis aislados de *L. theobromae* que se mantuvieron en condiciones de 80% HR a una temperatura de incubación de 20-22 C por 3 meses, desarrollaron lesiones necróticas, con canchales y muerte regresiva (Figura 4.4). Los síntomas incluyen una necrosis en la parte externa e interna de la ramilla, en donde la corteza toma una coloración anaranjada con formación de picnidios (Figura 4.4). En cuanto a los tratamientos testigos, estos no presentaron lesiones ocasionadas por el hongo *L. theobromae*.



**Figura 4.4.** Lesión necrótica y cancro en ramilla de dos años del cv. Cripps Pink inoculado con micelio del aislado Bot-2017-LT12 de *Lasiodiplodia theobromae*, después de 3 meses de incubación a 22°C.

Al realizar el análisis estadístico, la interacción entre el factor cultivar y factor aislados resultó ser no significativo (Cuadro 4.2). Por lo tanto, las lesiones provocadas en las ramillas no dependen de la interacción entre los factores. Al mirar los factores por separados, el factor aislado no mostró ser significativo, pero en cuanto al factor cultivar, este mostró ser significativo, indicando una mayor susceptibilidad el cultivar Fuji (Cuadro 4.2).

**Cuadro 4.2.** Largo de lesión (mm) en ramillas (de 2 años de edad) de manzano cv. Cripps Pink y Fuji inoculados con trozo de micelio de *Lasiodiplodia theobromae*, después de 3 meses de incubación a 20°C.

Aislados	Largo de lesión (mm)*		Promedio (mm)
	Cripps Pink	Fuji	
Bot-2017-LT12	12,4	17,7	15,0
Bot-2018-LT42	10,8	17,3	14,1
Bot-2018-LT45	13,2	17,7	15,5
Bot-2018-LT66	10,9	18,1	14,5
Bot-2018-LT68	14,6	14,8	14,7
Bot-2018-LT102	15,7	16,9	16,3
Promedio	12,9 a	17,1 b	
ANDEVA	dg	P	
Cultivar (C)	1	0,0001	
Aislado (A)	5	0,8473	
C x I	5	0,2852	

\*Promedios seguidos por la misma letra minúscula en fila no difirieron significativamente según la prueba de rango múltiple de Tukey ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4. Patogenicidad de fruto de manzano

Al realizar la patogenicidad de frutos, todos los frutos inoculados con seis aislados de *L. theobromae* desarrollaron síntomas que presentan lesiones de forma irregular de color pardo a pardo oscuro, luego de 7 días a una temperatura de 20°C, que inicialmente fueron firmes, pero con el transcurso del tiempo se volvieron blandas (Figura 4.5. y 4.6.).

De acuerdo con el análisis estadístico, la lesión en los frutos no depende de la interacción entre factor cultivar y factor aislados (Cuadro 4.3). Por otro lado, en los aislados no se encontraron diferencias significativas entre ellas, mientras que en el factor cultivar si hay diferencias significativas entre el cultivar Cripps Pink y Fuji, mostrando una significativa susceptibilidad el cv. Fuji (Cuadro 4.3). En cuanto a las frutas control estas no presentaron lesiones ocasionadas por el hongo *L. theobromae*.



**Figura 4.5.** Lesiones en frutos cv. Cripps Pink inoculados con micelio de *Lasiodiplodia theobromae* (Bot-2018-LT42), después de 7 días de incubación a 20°C.



**Figura 4.6.** Lesiones en frutos cv. Fuji inoculados con micelio de *Lasiodiplodia theobromae* (Bot-2018-LT42), después de 7 días de incubación a 20°C.



**Cuadro 1.3.** Diámetro de la lesión (mm) en frutos de manzano (*Malus x doméstica*) cv Cripps Pink y Fuji inoculados con trozo de micelio de aislados de *Lasiodiplodia theobromae* después de 7 días de incubación a 20°C.

Aislados	Diámetro de la lesión (mm)*		Promedio (mm)
	Cripps Pink	Fuji	
Bot-2017-LT12	59,5	56,6	58,1
Bot-2018-LT42	56,5	60,2	58,3
Bot-2018-LT45	52,7	60,4	56,5
Bot-2018-LT66	47,1	57,3	52,2
Bot-2018-LT68	49,9	55,3	52,6
Bot-2018-LT102	55,9	56,5	56,2
Promedio (mm)	45,9 a	49,5 b	
ANDEVA	dg	P	
Cultivar (C)	1	0,0155	
Aislado (A)	5	0,1457	
C x I	5	0,2554	

\*Promedios seguidos por la misma letra minúscula en fila no difirieron significativamente según la prueba de rango múltiple de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## 5. DISCUSIÓN

Este trabajo constituye el primer estudio realizado en Chile, en donde se identifican por medio de una caracterización cultural, morfológica, molecular y patogénica a aislados de *Lasiodiplodia theobromae* obtenidos desde muerte regresiva de brazos en manzanos entre las regiones de O'Higgins y del Maule. Previamente, los antecedentes nacionales sobre la etiología fueron desarrollados por Latorre y Toledo (1984), en donde se caracterizó e identificó a la especie *Botryosphaeria dothidea* causando canchros y muerte regresiva en manzanos cv. Red King Oregon. Solo recientemente (Herrera, 2018; Díaz et al., 2019), se reportó e identificó a *Diplodia seriata* como agente etiológico. En virtud de los antecedentes, el presente trabajo contribuye al conocimiento de agentes causales asociados a muerte regresiva en manzanos, que incluyen *B. dothidea*, *D. seriata* y *L. theobromae* en Chile.

En Chile, la ocurrencia de esta patología asociadas a especies de Botryosphaeriaceae en manzanos, ha incrementado con los años. La presencia de árboles de manzano con canchros y muerte regresiva era de baja importancia en los años 80s (Latorre y Toledo, 1984). Sin embargo, esta situación ha cambiado, en donde la frecuencia de plantas enfermas con muerte regresiva se ha incrementado entre un 8 a 35% de prevalencia en huertos comerciales, localizados entre las Regiones de O'Higgins y del Maule (Díaz et al., 2019). Este incremento de plantas enfermas en los últimos años, se puede deber a que en las últimas décadas se ha incrementado la superficie y densidad de los huertos comerciales con un cambio de variedades rojas como Gala, Fuji y, Cripps Pink, que en los años 80 no existían o eran incipientes. Esto pudo traer como consecuencia una producción de plantas temprana que son estresadas, junto con la no protección de las heridas de poda, pudiendo ser más susceptibles y favoreciendo el ingreso de Botryosphaeriaceae. Un ejemplo de esto ha ocurrido de manera muy similar en vides, arándanos y kiwis, cuyas mismas razones y otras han llevado a tener una prevalencia importante de enfermedades de la madera y muerte de brazos en Chile (Díaz et al., 2013; Espinoza et al., 2009; Navarrete, 2017).

El presente estudio coincide con previos trabajos internacionales que han descrito a *L. theobromae* como uno de los agentes causales de muerte regresiva en frutales (Úrbez-Torres et al., 2008; Abreo et al., 2013; Sessa et al., 2016; Chen et al., 2013; Delgado-Cerrone et al., 2016; Ismael et al., 2012) como en otras plantas (Yildiz et al., 2014; Rosado et al., 2016;). Precisamente en manzanos solo ha sido descrita *L. theobromae* en el cv. Cripps Pink desde plantas con canchros y muerte regresiva de manzanos en la zona norte de Uruguay, en una muy baja frecuencia (Sessa et al., 2016; Delgado-Cerrone et al., 2016). Recientemente en el noreste de Brasil, se describió a *L. brasiliense* especie muy cercana a *L. theobromae* causando canchros y muerte regresiva en manzanos cv. Eva (Martins et al., 2018). Aunque sea de baja frecuencia, los aislados de *L.*

*theobromae*, son una amenaza potencial en manzanos en Chile. Varios estudios han obtenido que la especie más frecuentemente aisladas desde brazos con muerte regresiva en manzanos incluyen *D. seriata*, *B. dothidea* y *Neofusicoccum* spp. (Cloete et al., 2011; Delgado-Cerrone et al., 2016; Sessa et al., 2016; Díaz et al., 2019; Sutton et al., 2014).

En Chile, previamente varias especies de Botryosphaeriaceae han sido descritas causando canchros y muerte de ramillas y brazos en especies frutales como arándanos (Espinoza et al., 2009), vides (Díaz et al., 2013), nogales (Díaz et al., 2018), kiwis (Navarrete, 2017), paltos (Valencia et al., 2019) y limones (Guajardo et al., 2018). Por lo tanto, el actual trabajo describe a otro miembro de la familia Botryosphaeriaceae causando daños a especies frutales como el manzano, y coincide con trabajos nacionales previos que describieron a *L. theobromae* causando muerte de brazos en paltos cv. Hass (Valencia et al., 2019) y limones (Guajardo et al., 2018). En este sentido, es muy común tener huertos cercanos entre vides, manzanos, kiwis y arándanos, pudiendo ser potenciales fuentes de inóculo, en especial cuando están presentes los síntomas de muerte regresiva, en especial en esta zona central de Chile. Esto ha sido demostrado en Sudáfrica por Cloete et al. (2011) quienes demostraron que aislados de manzanos son capaces de causar daños en brotes de perales y vides como en otros hospederos. De forma similar Sessa et al. (2016), quienes obtuvieron lesiones en brotes de perales y durazneros, al inocularnos con aislados de Botryosphaeriaceae de manzanos en Uruguay.

De acuerdo con la identificación molecular robusta obtenida en los aislados de *L. theobromae* del presente estudio, concuerdan con lo descrito por Phillips et al., (2013) y Úrbez-Torres et al., (2008), donde en los aislados chilenos se agruparon en el mismo clado con la especie holotype CBS 164.96 de *L. theobromae*, con el análisis filogenético concatenado de los genes ITS, BT y FE 1-alfa. Además, en este análisis filogenético empleando los tres genes permitió separar claramente otras especies de Botryosphaeriaceae con un alto nivel de soporte, confirmando que son necesarios al menos estos tres genes para tener una identificación robusta en especies de Botryosphaeriaceae (Dissanayake et al., 2016; Slippers et al., 2007; Phillips et al., 2013).

La identificación morfológica de los aislados de *L. theobromae* obtenidos en el presente trabajo coinciden con la descrita previamente en los trabajos de Phillips et al. (2013) y Úrbez-Torres et al. (2008), donde en ambos estudios se observó la principal característica del género *Lasiodiplodia*, que la distingue de otras especies pertenecientes a la familia de las Botryosphaeriaceae, que es una conidia elipsoide a ovoide con presencia de una septa y de estrías longitudinales en conidias maduras generadas por depósitos de melanina en la superficie. En cuanto a la proporción largo/ancho de las conidias en este estudio dio un promedio de 1,7 siendo muy similar a los descrito por Urbez-Torres et al., (2008) y Phillips et al., (2013), donde

obtuvieron una relación 1,8. Sin embargo, las características culturales y morfológicas no son suficientes para identificar o diferenciar especies cercanas. Por lo tanto, siempre es necesario realizar una identificación morfológica junto con una caracterización molecular para obtener una identificación de especies de Botryosphaeriaceae.

Este trabajo demostró también la capacidad de los aislados de *L. theobromae*, obtenidos desde brazos con canchros y muerte regresiva, de causar considerables daños en frutos de manzanas cvs. Cripps Pink y Fuji, cuando fueron inoculados, siendo los frutos cv. Fuji los más susceptibles. De igual manera, las inoculaciones en ramillas, mostró que el cv. Fuji fue el más susceptibles en el largo de lesión en la madera. Por lo tanto, este trabajo concuerda con los trabajos de Latorre y Toledo (1984) y Delgado-Cerrone et al. (2016), quienes también indicaron que aislados de *B. dothidea* y especies de *Botryosphaeria*, obtenidos desde madera son capaces de causar daños en frutos. De otra manera, las plantas enfermas como los residuos de poda (ramillas) con Botryosphaeriaceae pueden ser potenciales fuentes de inóculo para infecciones de frutos. En Chile las pudriciones de frutos de manzanas asociadas a especies de Botryosphaeriaceae se han incrementado en los últimos años (Cáceres et al., 2016; Díaz et al., 2019).

Finalmente es importante señalar que la presente descripción de *Lasiodiplodia theobromae* contribuye a un mejor conocimiento de los agentes causales asociados a canchros y muerte regresiva de manzanos en Chile. Un mejor conocimiento de los agentes causales permite elaborar estudios epidemiológicos y de control asociados a la muerte regresiva de brazos en manzanos en Chile.

## 6. CONCLUSIÓN

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que:

Las características culturales, morfológicas, moleculares y patogénicas de los aislados fungosos correspondieron a la especie *Lasiodiplodia theobromae*.

Los aislados de *L. theobromae* presentaron una virulencia similar entre ellos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Abreo, E., Martínez, S., Betucchi, L., and Lupo, S. 2016. Characterization of Botryosphaeriaceae species associated with grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 42:241-249.

Acuña, R. 2010. Compendio de bacterias y hongos de frutales y vides de Chile. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Santiago, Chile. 150p.

Alaniz, S.; Delgado.; Leoni, C. y Mondino, P. S/F Situación actual de los canchros del manzano: distribución, descripción de síntomas, agentes causales, pautas de manejo INIA Las brujas Uruguay Recuperado en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/1126/1/128221131113105534.pdf>. Consultado el: 15 de octubre de 2018.

Álvarez, M., Pinilla, B. y Herrera, G. 2004. Enfermedades del manzano. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Chile: La Platina. 71p.

Bravo, F. 2018. Descripción de *Diplodia mutila* asociada a la muerte regresiva de brazos en nogales (*Juglans regia*) cv. Chandler. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca. Talca, Chile. 29p.

Bravo, J. 2010. Mercado agropecuario, Oficina de estudios y políticas agrarias, Ministerio de Agricultura Recuperado en: <https://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servicios-informacion/Mercados/abr-10.pdf>. Consultado el: 15 de octubre de 2018.

Bustamante, N 2019. Iqonsulting: las tendencias en la exportación de las nuevas variedades de manzanas de Chile. Recuperado en: <https://fedefruta.cl/iqonsulting-las-tendencias-en-la-exportacion-de-las-nuevas-variedades-de-manzanas-de-chile/>. Consultado: 1 de septiembre de 2019.

Cáceres, M., Lolas, M., Gutiérrez, M., Ferrada, E.E., and Díaz, G.A. 2016. Severe Outbreak of Black Rot in Apple Fruit cv. Fuji Caused by *Diplodia seriata* During Pre-Harvest in Maule Región, Chile. *Plant Disease* 100: 2333-2333.

Calvo, G., Candan, A.P., Gomila; T. y Villarreal; P. 2003. Crips Pink's Investigación regional sobre el comportamiento de la variedad en cosecha y poscosecha Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle Centro Regional Patagonia Norte. Recuperado en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_cripps-pink-cosecha-y-poscosecha.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_cripps-pink-cosecha-y-poscosecha.pdf). Consultado el: 18 de noviembre de 2018

Cárdenas, J. y Fischer, G. 2013. Clasificación botánica y morfología de manzano, peral, duraznero y ciruelo. Los frutales caducifolios en Colombia: Situación actual, sistemas de cultivo y plan de desarrollo. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas. 24-25.

Cloethe, M., Fourie, P. H., Damm, U., Crous, P. W., and Mostert, L. 2011. Fungi associated with die-back symptoms of apple and pear trees, a possible inoculum source of grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia mediterranea* 50 (Supplement): S176-S190.

Chen, S.F, Morganm D., Beede, R.H. and Michailides, T.J. 2013. First report of *Lasiodiplodia theobromae* associated with stem canker of almond in California. *Plant Disease* 97(7):994-994.

Delgado-Cerrone, L., Mondino-Hintz, P., and Alaniz-Ferro, S. 2016. Botryosphaeriaceae species associated with stem canker, die-back and fruit rot on apple in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology* 146: 637.

Díaz, G.A., Auger, J., Besoain, X., Bordeu, E., and Latorre, B.A. 2013. Prevalence and pathogenicity of fungi associated with grapevine trunk diseases in Chilean vineyards. *Ciencia e Investigación Agraria* 40(2):327-339.

Díaz, G.A., Mostert, L., Halleen, F., Lolas, M., Gutierrez, M., Ferrada, E.E., and Latorre, B.A. 2019. *Diplodia seriata* associated with Botryosphaeria canker and dieback in apple trees in Chile. *Plant Disease* 103: 1026.

Díaz, G.A., Latorre, B.A., Ferrada, E.E., and Lolas, M. 2019. Identification and characterization of *Diplodia mutila*, *Diplodia seriata*, *Phacidiopycnis washingtonensis* and *Phacidium lacerum* obtained from apple (*Malus x domestica*) fruit rot in Maule Region, Chile. *European Journal of Plant Pathology* 153:1259-1273.

Díaz, G. A. y Lolás, M. 2016. Enfermedades de pre y post cosecha en manzanos. Centro de Pomáceas. Universidad de Talca. Chile. Recuperado en: <http://pomaceas.otalca.cl/wpcontent/uploads/2016/06/enfermedades-pre-y-poscosecha.pdf>. Consultado el: 15 de octubre de 2018.

Dissayanake, A. J., Phillips, J. J. L., Li, X.H., and Hyde, K. D. 2016. Botryosphaeriaceae: Current status of genera and species. *Mycosphere* 7:1001-1073.

Espinosa, C. 2016. Identificación molecular de *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila* y *Phacidium lacerum* asociados a pudriciones de pre-cosecha en manzanas cvs. Cripps Pink y Fuji. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca. Talca, Chile. 35p.

Espinoza, J.G., Briceño, E.X., Chávez, E.R., Úrbez-Torres, J.R., and Latorre, B.A. 2009. *Neofusicoccum* spp. Associated with stem canker and dieback of blueberry in Chile. *Plant Disease*. 93:1187-1194.

Galdames, R. y Mesa, F. 2013. Nuevas variedades de manzanos en Chile. *Revista frutícola Copefrut S.A. Especial Manzano*. Recuperado en: [file:///C:/Users/HP/Downloads/Revista-Fruticola-2013-Abril%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/HP/Downloads/Revista-Fruticola-2013-Abril%20(2).pdf). Consultado el: 13 de noviembre del 2018.

Guajardo, J., Riquelme, N., Tapia, L., Larach, A., Torres, C., Camps, R., and Besoain, X. 2018. First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing Bot Gummosis in *Citrus limon* in Chile. *Plant Disease* 102: 818-819.

Grau, P. 2013. La importancia de la industria de la manzana chilena en el mercado internacional. INIA. Recuperado en: [http://www.inia.cl/wp-content/uploads/2015/01/Artt%C3%A9nico\\_Importancia-mercado-manzanas.pdf](http://www.inia.cl/wp-content/uploads/2015/01/Artt%C3%A9nico_Importancia-mercado-manzanas.pdf). Consultado el: 15 de octubre de 2018.

Herrera, F. 2018. Caracterización molecular y patogenicidad de aislados de *Diplodia seriata* asociados a muerte regresiva de brazos de manzanos. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca. Talca, Chile. 33p

Quiroz, I 2017 Boletín Técnico Pomáceas, Centro de pomáceas Talca Universidad de Talca, Chile. Recuperado en: <http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/07/Isabel-Quiroz.-PomaExpo-2017.pdf>. Consultado el: 15 de octubre de 2018.



Ismail, A.M., Cirvilleri, G., Polizzi, G., Crous, P.W., Groebewald, J., and Lombard, L. 2012. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. Australasian Plant pathology 41:649-660.

Latorre, B.A. 2004. Enfermedades de las plantas cultivadas. Sexta edición. Ediciones Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 638 p.

Latorre, B.A. 2018. Compendio de las enfermedades de las plantas. Primera edición. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 733 p.

Latorre, B. A., Díaz, G. A., and Reed, M. 2012. Effect water activity on in vitro mycelial growth of *Neofusicoccum* spp. infecting blueberry. Ciencia e Investigación Agraria 221-228.

Latorre, B. A., and Toledo, M.V. 1984. Occurrence and relative susceptibility of apple cultivars to *Botryosphaeria* canker in Chile. Plant Disease 68: 36-39.

Martins, M. V. V., Lima, J. S., Hawerth, F. J., Ootani, M. A., Araujo, F. S. A., Cardoso, J. S., Serrano, L. A. L., and Viana, F. M. P. 2018. First report of *Lasiodiplodia brasiliense* causing disease in apple trees. Plant Disease 102:1027.

Moggia: C y Pereira; M, 2003 Manzanas Pink lady. Boletín Técnico Pomáceas, Centro de pomáceas Talca Universidad de Talca, Chile [http://pomaceas.utalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/Boletin\\_N03\\_4.pdf](http://pomaceas.utalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/Boletin_N03_4.pdf). Consultado el: 12 de noviembre de 2018.

Montealegre, J., Venegas, P., y Herrera, R. 2004. Etiología de la pudrición negra de la manzana. XIV Congreso anual de la Sociedad Chilena de Fitopatología. 30 de noviembre al 3 de diciembre, Talca, Chile.

Navarrete, A. 2017. Protección de heridas de poda mediante fungicidas contra *Diaporthe australafricana* y *Neofusicoccum parvum* en kiwis cv. Hayward. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca. Talca, Chile. 35p.

Oficina de estudios y políticas agrarias, Ministerio de Agricultura. 2016. Julio Catastro frutícola principales resultados Región del Maule Recuperado en: <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2016/08/Catastro-Fruticola-VII-Maule-2016.pdf> Consultado el: 12 de noviembre de 2018.

Oficina de estudios y políticas agrarias, Ministerio de Agricultura. 2011. Mercado agropecuario. Recuperado en: <https://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servicios-informacion/Mercados/oct-11.pdf> Consultado el: 8 de octubre de 2018.

Oficina de estudios y políticas agrarias, Ministerio de Agricultura. 2019. Estadísticas productivas, Catastro frutícola superficie frutícolas por región. Recuperado en: <https://www.odepa.gob.cl/estadisticas-del-sector/estadisticas-productivas>. Consultado el: 30 de Agosto de 2019.

Phillips, A. J., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., and Crous, P. W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76(1): 51-16.

Picos-Muñoz; P, García-Estrada; R, León-Félix; J., Sañudo-Barajas, A, y Allende-Molar; R. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(1): 54-74.

Pinilla, B. 2013. Principales enfermedades de las pomáceas, Centro de pomáceas. Universidad de Talca. Recuperado en: [http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/Boletin\\_N13\\_5.pdf](http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/Boletin_N13_5.pdf). Consultado: 17 de Octubre de 2018.

Pitt, W., Sosnowski, M., Huang, R., Qiu, Y., Steel, C., and Savocchia, S. 2012. Evaluation of fungicides for the management of Botryosphaeria canker of grapevines. *Plant Disease* 96:1303-1308.

Rosado, A.W.C., Machado, A.R., Freire, F.C.O., Pereira, O.L. 2016. Phylogeny, identification, and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end rot of coconut in Brazil. *Plant Disease* 100:561-568.

Segura, S., Rodriguez, M., y Chico, J. 2015 Actividad anti fúngica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en condiciones de laboratorio Laboratorio de Fitopatología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú. Recuperad in: [file:///C:/Users/HP/Downloads/1075-2921-1-PB%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/HP/Downloads/1075-2921-1-PB%20(1).pdf).

Sessa, L. 2016 Enfermedades de cultivos frutales del Uruguay: hongos endófitos, patógenos latentes y fitopatógenos. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay 146p.

Sessa, L., Abreo, E., Bettucci, L. and Lupo, S. 2016. Botryosphaeriaceae species associated with wood diseases of stone and pome fruits trees: symptoms and virulence across different hosts in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology* 146:519–530.

Slippers, B. and Wingfield, M.J. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 90-106.

Sosnowsky, M. R., Luque, J., Loschiavo, A. P., Martos, S., García-Figueres, F., Wicks, T. J., and Scott, E. S. 2011. Studies on the effect of water and temperature stress on grapevine inoculated with *Eutypa lata*. *Phytopathologia Maediterranea* 50 (supplement): S127-S138.

Sutton, T., Aldwinckle H., Agnello A., and Walgenbach, J. 2014. Compendium of Apple and pear diseases and pests. Second edition. American Phytopathological Society (APS). Minnesota, USA. 224 p.

Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G., Guerrero, J., Guevara, J., and Gubler, W. D. 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease* 92 (4): 519– 529.

Úrbez-Torres J.R. and Gluber W.D 2009. Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease* 93 (6): 584-592.

Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G.M., Voegel, T.M., and Gubler, W.D. 2006. Identification and Distribution of *Botryosphaeria* spp. Associated with Grapevine Cankers in California. *Plant Disease*. 90:1490-1503.

Valencia, A.L., Gil, P., Latorre, B.A., and Rosales, I.M. 2019. Characterization and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species obtained from avocado trees with branch canker and dieback and from avocado fruit with stem end rot in Chile. *Plant Disease* 103(5):996-1005.

Yildiz, A., Benlioglu, K. and Benlioglu, H.S. 2014 First report of strawberry dieback caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Plant Disease* 98 (11):1579-1580.