



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

**Identificación y caracterización de especies de Botryosphaeriaceae asociadas a muerte regresiva de manzanos**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**MELISSA SOFIA ROSSI SANCHEZ**

**TALCA - CHILE**

**2019**



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

**Identificación y caracterización de especies de Botryosphaeriaceae asociadas a muerte  
regresiva de manzanos**

**Por**

**MELISSA SOFIA ROSSI SANCHEZ**

**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**

En primer lugar, agradezco a mi familia Sandra, Luis y Daniela por el apoyo en todos estos años de estudio en la Universidad, por siempre alentarme y tener fe en mí para lograr terminar este proceso de buena forma.

Agradecer a todo el equipo del Laboratorio de Patología frutal por ayudarme en todas las tareas encomendadas y por la buena disposición a ayudarme y a resolver mis dudas cuando lo necesitaba.

Agradezco a mi profesor guía Gonzalo Díaz, por apoyarme en este trabajo, por su tiempo y estar dispuesto a orientarme en este trabajo de la mejor manera.

También agradecer a todas las personas que estuvieron conmigo en estos años de Universidad de alguna u otra forma, que hicieron que estos años fueran inolvidables para mí.

## RESUMEN

Chile se encuentra dentro de los principales países exportadores de manzanas (*Malus x domestica*) en el hemisferio sur, con una superficie de 32.370 hectáreas aproximadamente. La Región del Maule es donde se encuentra la mayor concentración de superficie plantada con 19.636 hectáreas. Sin embargo, la producción de este frutal se ve afectada por problemas de enfermedades de tipo fungoso. Previamente, en Chile solo se ha identificado a *Botryosphaeria dothidea* causando muerte regresiva en manzanos, estudio de la década de los 80. En este sentido, recientemente se reportó la presencia de *Diplodia seriata* causando muerte regresiva en la Región del Maule. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar especies de la familia Botryosphaeriaceae a través de una caracterización cultural, morfológica y molecular utilizando doce aislados obtenidos desde brazos con muerte regresiva de diferentes zonas de Chile. Además, se determinó la patogenicidad en ramillas cv. Cripps Pink, Fuji, Gala y Granny Smith y en frutos de manzana cv. Fuji, Pink Lady, Braeburn, Granny Smith, Premium Gala, Modi, Red Chief y Scarlett. Los resultados indican que a través de características culturales, morfológicas y moleculares se identificaron nueve aislados como *Diplodia seriata*, dos aislados a la especie *Neofusicoccum arbuti* y un solo aislado como *Lasiodiplodia theobromae*. Todos los aislados causaron lesiones necróticas en ramillas y pudrición en frutos. Finalmente, este trabajo identificó a *D. seriata*, *L. theobromae* y *N. arbuti* como especies de hongos causales de la muerte regresiva en manzanos en Chile.

## ABSTRAC

Chile is located within the main apple exporting countries (*Malus x domestica*) in the southern hemisphere, with an area of approximately 32,370 hectares. The Maule Region is where the highest concentration of planted area with 19,636 hectares. However, the production of this fruit is affected by fungal diseases. Previously, in Chile only *Botryosphaeria dothidea* has been identified causing dieback in apple trees, but the study was conducted during the 80s. In this sense, recently the presence of *Diplodia seriata* was reported causing apple dieback in the Region of Maule. Therefore, the objective of this work was to identify and characterize species belonging to the family Botryosphaeriaceae through a cultural, morphological and molecular characterization using twelve isolates obtained from arms dieback of different areas of apple production in Chile. In addition, pathogenicity was determined on twigs (2yrs-old) of cvs. Cripps Pink, Fuji, Gala and Granny Smith, and on apple fruits cv. Cripps Pink, Fuji, Braeburn, Granny Smith, Gala, Modi, Red Chief and Scarlett. The results indicate that through cultural, morphological and molecular characteristics nine isolates were identified as *Diplodia seriata*, two isolates as *Neofusicoccum arbuti* and one isolate as *Lasiodiplodia theobromae*. All isolates caused necrotic lesions in twigs and rot in fruits. Finally, this work identified to *D. seriata*, *L. theobromae* and *N. arbuti* as species of fungal belonging to Botryosphaeriaceae causing symptoms of dieback in apple trees in Chile.

## INDICE

	Página
<b>1.INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1.1 Hipótesis .....	4
1.2 Objetivo general .....	4
1.3 Objetivos específicos .....	4
<b>2.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
2.1 Generalidades del manzano .....	5
2.2 Generalidades de la producción de manzanas .....	5
2.2.1 Situación mundial .....	5
2.2.2 Situación en Chile y superficie .....	5
2.2.3 Situación del manzano en la Región del Maule .....	6
2.3 Principales enfermedades del manzano .....	6
2.4 Familia Botryosphaeriaceae .....	8
2.5 Cancros de la madera y muerte regresiva de brazos en manzano .....	8
2.6 Fuente de inóculo de Botryosphaeriaceae en Chile .....	9
<b>3.MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	11
3.1 Ubicación del ensayo .....	11
3.2 Obtención de aislados fungosos .....	11
3.3 Identificación morfológica .....	12
3.4 Identificación molecular y análisis filogenético .....	12
3.5 Inoculación de ramillas de manzano .....	13
3.6 Inoculación de manzanas .....	14
3.7 Diseño experimental y análisis estadístico .....	15
<b>4.RESULTADOS</b> .....	16
4.1 Identificación morfológica .....	16
4.2 Identificación molecular .....	19
4.3 Inoculación de ramillas con micelio .....	20

4.4 Inoculación de ramillas con conidias.....	22
4.5 Patogenicidad de frutos de manzana.....	23
<b>5.DISCUSIÓN</b> .....	26
<b>6.CONCLUSIÓN</b> .....	29
<b>7.CITAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	30

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 2.1.</b> Superficie nacional y distribución de plantaciones de manzanos variedades rojas y verdes (hectáreas).....	6
<b>Cuadro 2.2.</b> Superficie de variedades de manzanos en la Región del Maule en los años 2007 y 2013 .....	6
<b>Cuadro 3.1.</b> Aislados fungosos obtenidos desde brazos con muerte regresiva en manzanos cvs. Cripps Pink, Fuji y Gala en diferentes zonas de Chile.....	11
<b>Cuadro 4.1.</b> Dimensiones de conidias de aislados de <i>Diplodia seriata</i> , <i>Lasiodiplodia theobromae</i> y <i>Neofusicoccum arbuti</i> obtenidos desde brazos de manzano con muerte regresiva.....	17
<b>Cuadro 4.2.</b> Lesión necrótica en ramillas de manzano (dos años de edad) de cuatro cultivares inoculadas con micelio de aislados de <i>Diplodia seriata</i> , <i>Lasiodiplodia theobromae</i> y <i>Neofusicoccum arbuti</i> , después de 4 meses de incubación.....	21
<b>Cuadro 4.3.</b> Lesión necrótica en ramillas de manzano (dos años de edad) de cuatro cultivares inoculadas con conidias de los aislados de <i>Diplodia seriata</i> , <i>Lasiodiplodia theobromae</i> y <i>Neofusicoccum arbuti</i> , después de 4 meses de incubación.....	23
<b>Cuadro 4.4.</b> Lesión necrótica en frutos de manzano de ocho cultivares inoculadas con micelio de aislados de <i>Diplodia seriata</i> , <i>Lasiodiplodia theobromae</i> y <i>Neofusicoccum arbuti</i> , después de 7 días de incubación a 20°C.....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Triángulo de la enfermedad compuesto por hospedero susceptible, patógeno virulento y condiciones ambientales favorable para la infección.....7
- Figura 3.1.** Inoculación de ramillas cv. Fuji en la herida de poda con un trozo de crecimiento activo (5-mm) del aislado Bot-mz-1.....14
- Figura 3.2.** Inoculación de frutos de manzanas cultivar Cripps Pink con micelio de Botryosphaeriaceae obtenidos desde brazos de manzanos con muerte regresiva.....15
- Figura 4.1.** Crecimiento micelial de cultivos puros de aislados de *Diplodia seriata* (Bot-mz-1) (**A**), *Lasiodiplodia theobromae* (Bot-mz-7) (**B**) y *Neofusicoccum arbuti* (Bot-mz-11) (**C**) en medio de cultivo APD (2%) después de 5 días de incubación a 20°C.....17
- Figura 4.2.** Conidias de especies de Botryosphaeriaceae obtenidas desde cultivos en APD incubados por 14 días a 20°C. **A**, Conidias maduras de forma ovoide a elipsoides, de color café oscuro, de extremo obtuso, con una base truncada, aseptada, de paredes lisas y delgadas de *Diplodia seriata*. **B**, Conidias de forma subovoide a elipsoide de ápice ampliamente redondeada, con base truncada, de paredes finas, inicialmente hialina y aseptada, pero café oscura y septada en la madurez, con patrón de estriado en la superficie de *Lasiodiplodia theobromae*. **C**, Conidias fusiformes, hialinas, aseptadas de base truncada y ápice obtuso de *Neofusicoccum arbuti*. Barra = 10 µm.....18
- Figura 4.3.** Árbol filogenético de máxima parsimonia de secuencias concatenadas (ITS + BT + FE 1-alfa) de aislados de Botryosphaeriaceae obtenidos desde brazos con muerte regresiva en Chile. \*Aislados Chilenos obtenidos en el presente estudio.....19
- Figura 4.4.** Lesión necrótica en ramillas de manzano cv. Fuji inoculadas con micelio de *Diplodia seriata* (Bot-mz -1) después de 4 meses de incubación.....20
- Figura 4.5.** Largo de lesiones necróticas en ramillas (dos años) de manzano cvs. Cripps Pink, Fuji, Gala y Granny Smith inoculadas con micelio de aislados de *Diplodia seriata* (DS, 9 aislados), *Lasiodiplodia theobromae* (LT, 1 aislado) y *Neofusicoccum arbuti* (NA, 2 aislados) después de 4 meses desde la inoculación.....21

**Figura 4.6.** Largo de lesiones necróticas en ramillas de manzano cvs. Cripps Pink, Gala, Granny Smith y Fuji inoculadas con conidias de *Diplodia seriata* (DS, 9 aislados), *Lasiodiplodia theobromae* (LT, 1 aislado) y *Neofusicoccum arbuti* (NA; 2 aislados) después de 4 meses desde la inoculación.....22

**Figura 4.7.** Lesión en fruto cv. Fuji inoculado con micelio de la especie *Lasiodiplodia theobromae* (Bot-mz -7), después de 7 días de incubación a 20°C.....24

**Figura 4.8.** Largo de la lesión necrótica en frutos de manzano de cuatro cultivares inoculados con trozo de micelio de *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti*, después de 7 días de incubación a 20°C.....24

## 1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la fruticultura, las especies más cultivadas en el mundo pertenecen a las familias Vitaceae, Rutaceae, Oleaceae y Rosaceae. Dentro de la familia Rosaceae se encuentra la subfamilia *Pomoideae* en donde destaca la especie manzano (*Malus x domestica* Borkh.) (Agustí, 2004).

La manzana, es una de las especies de fruta dulce con mayor importancia en el mundo (Merlet et al, 2016). A nivel mundial la producción de manzanas para el año 2013 fue de 80.822.521 toneladas, siendo China su principal productor con casi la mitad de esta cifra, seguidos por Estado Unidos y Turquía (Toranzo, 2016). A nivel nacional, la superficie plantada de manzanas es de 32.370 hectáreas, siendo las variedades rojas las más utilizadas. La principal zona productora de manzana se localiza entre las regiones del General Bernardo O'Higgins y del Maule, siendo esta última la de mayor superficie con 19.636 ha, correspondiendo al 60% de la superficie nacional (ODEPA, 2019).

Según Quiroz (2017) las variedades más plantadas en la Región del General Bernardo O'Higgins y la Región del Maule son Royal Gala, Granny Smith, Fuji y Cripps Pink. Dadas las buenas condiciones edafoclimáticas de nuestro país, se logra obtener fruta de una alta calidad organoléptica en cuanto a color, aroma y sabor, con un 60% de estas exportadas a Estados Unidos de América, seguido de Europa, Lejano y Cercano Oriente (Alvarez et al., 2004).

Dentro del panorama fitosanitario del manzano, las enfermedades son de vital importancia, ya que, dependiendo de su severidad e incidencia en la temporada del cultivo, puede afectar gravemente la calidad, producción y condición de frutos, produciendo así factores limitantes para su comercialización y eventuales pérdidas económicas (Alvarez et al., 2004).

Para no obtener estas condiciones, es necesario que la fruta esté libre de enfermedades. Los principales hongos asociados a enfermedades en manzanos son *Venturia inaequalis* causando sarna del manzano, *Botrytis cinerea* causando pudrición calicinal, *Penicillium expansum* causando pudrición azul, *Neofabraea vagabunda* (= *N. alba*) asociada a ojo de buey, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia seriata* (= *Botryosphaeria obtusa*) asociados a canchales o muerte regresiva de brazos entre otras (Acuña, 2010).

Dentro de la familia Botryosphaeriaceae, existen una gran gama de hongos causantes de enfermedades en manzano, los cuales se encuentran en todas las áreas geográficas y climáticas del mundo, exceptuando las regiones polares, su gran asociación con enfermedades ha logrado

gran interés en estos patógenos logrando cada vez más estudios sobre sus especies y géneros (Phillips et al., 2013). Las especies de esta familia, se caracterizan por infectar una gran variedad de hospederos leñosos, ser endófitos o patógenos oportunistas asociados a condiciones de estrés. En manzanos estos patógenos causan cancro del tallo, muerte y podredumbre de la fruta en muchas áreas del mundo, provocando daños y pérdidas económicas considerables (Delgado-Cerrone et al., 2016).

Dentro de las pautas de manejo para enfrentar las enfermedades que afectan a la madera, está evitar las condiciones predisponentes, así como evitar heridas que faciliten el ingreso de estos patógenos. Toda esta preocupación se basa en que hasta hoy no se han encontrado fungicidas, ni controladores biológicos o productos naturales que sean capaces de penetrar la madera y detener el desarrollo de estos hongos estando en su interior (Alaniz et al., 2010).

Es de mucha importancia, determinar la identificación y caracterizar a estos patógenos, para que así se puedan realizar un manejo apropiado y poder controlar las enfermedades que causan en manzanos. En Chile solo se ha identificado a *Botryosphaeria dothidea* causando muerte regresiva de brazos, estudio realizado hace más de tres décadas (Latorre y Toledo, 1984). Recientemente, se identificó a *D. seriata* asociado a brazos con muerte regresiva en la Región del Maule (Herrera, 2018). Por lo tanto, es necesario realizar una investigación actual sobre la presencia de Botryosphaeriaceae asociadas a muerte regresiva en Chile.

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

### **1.1 Hipótesis**

La muerte regresiva de manzanos sería causada por diferentes especies fungosas de la familia Botryosphaeriaceae, las cuales presentan diferencias morfológicas, moleculares y de virulencia.

### **1.2 Objetivo general**

Caracterizar especies de Botryosphaeriaceae asociadas a la muerte regresiva de manzanos.

### **1.3 Objetivos específicos**

1-Identificar morfológicamente diferentes especies de Botryosphaeriaceae asociadas a la muerte regresiva de manzanos.

2-Identificar molecularmente diferentes especies de Botryosphaeriaceae asociadas a la muerte regresiva de manzanos.

3-Determinar la patogenicidad de diferentes especies de Botryosphaeriaceae asociadas a la muerte regresiva de manzanos.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Generalidades del manzano

El manzano (*Malus x domestica* Borkh.) pertenece a la familia Rosaceae y género *Malus*. Este árbol, en forma silvestre presenta una raíz pivotante profunda, una copa globosa, pudiendo llegar a crecer hasta 10 metros de altura (Merlet et al., 2016). La manzana, es un fruto carnosos (pomo) que según su forma puede ser achatada y/o redondeada (Cerezo, 2014). La parte comestible corresponde al desarrollo del perianto unido al ovario. Se pueden observar tres zonas externamente como el pedúnculo, la fosa calicinal y la parte globosa, esta última es la más desarrollada cubierta por células epidérmicas y por la cutícula serosa (Bondoux, 1994).

### 2.2 Generalidades de la producción de manzanas

#### 2.2.1 Situación mundial

La superficie mundial de manzanos (árboles) para el año 2009 alcanzó 4,92 millones de hectáreas. Siendo China el primer lugar con 2.017.000 hectáreas (41% de la superficie mundial), seguido por Rusia con 349.320 hectáreas, en tercer lugar, se encuentra India con 280.440 hectáreas, cuarto lugar Irán con 177.120 hectáreas y por último Polonia con 172.200 hectáreas. Los mayores exportadores de manzanas en el mundo, que concentran más del 50% de las exportaciones mundiales son nuevamente China liderando el grupo con un 14,2%, Chile con un 11,4%, Italia 10,9%, Estados Unidos 10% y Polonia 9,2% (Grau, 2015).

#### 2.2.2 Situación en Chile y superficie

El manzano es la segunda especie más plantada a nivel nacional con un 12,5%. El área plantada en nuestro país alcanzaría unas 32.370 hectáreas aproximadamente (ODEPA, 2019). Siendo las Regiones del Maule y O'Higgins las que reúnen un 87% de la superficie plantada nacional, seguidos por la Región de la Araucanía y Bio-Bío. Según las últimas tendencias se puede predecir que el cultivo se trasladó hacia la zona centro sur y sur de Chile, debido a condiciones climatológicas en el país, recursos hídricos y mano de obra disponible (Bravo, 2013).

**Cuadro 2.1.** Superficie nacional y distribución de plantaciones de manzanos variedades rojas y verdes (hectáreas).

Variedades de Manzana	Región (superficie, ha)							TOTAL
	Valparaíso	Metropolitana	O'Higgins	Maule	Bío-Bío	Araucanía	Los Ríos	
Roja	102	102	5.368	16.870	575	2.845	0,2	26.736
Verde	47	32	2.365	2.766	48	215	7,3	5.634
<b>TOTAL</b>	<b>149</b>	<b>134</b>	<b>7.734</b>	<b>19.636</b>	<b>623</b>	<b>3.060</b>	<b>7,5</b>	<b>32.370</b>

### 2.2.3 Situación del manzano en la Región del Maule

La Región del Maule se posee la mayor superficie plantada con manzanos a nivel nacional con un 60,3%, con una expansión de 1.880 hectáreas y un crecimiento de 9,1% porcentual del área plantada, entre los años 2007 y 2013 (Bravo, 2013).

Dentro de las variedades rojas y bicolors líderes se encuentran Royal Gala, Red Chief, Fuji, Scarlet, Red King Oregon Spur, Braeburn, Pink Lady y Galaxy. Dentro de las variedades verdes, Granny Smith lidera como la principal, debido a su antigüedad de plantación y buena demanda por parte de los consumidores en el mercado nacional e internacional (Amunátegui et al., 2002).

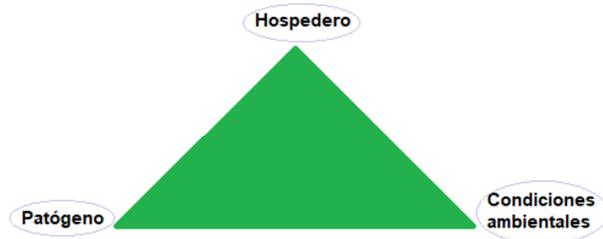
**Cuadro 2.2.** Superficie de variedades de manzanos en la Región del Maule en los años 2007 y 2013 (Bravo, 2013).

Variedad	Años (Superficie en Hectáreas)	
	2007	2013
Braeburn	750	396
Brookfield Gala	524	1.350
Fuji	2.135	1.602
Fuji Raku Raku	466	2.087
Gala Premiun	567	941
Galaxy	1.241	1.058
Granny Smith	3.114	3.510
Pink Lady	744	1.286
Red Chief	1.770	1.609
Red King Oregon Spur	703	419
Royal Gala	4.683	4.902
Scarlett	1.370	1.455
Otras	2.541	1.872
<b>TOTAL</b>	<b>20.608</b>	<b>22.488</b>

### 2.3 Principales enfermedades del manzano

Las enfermedades del manzano, como todas las enfermedades en vegetales, requieren para su inicio y desarrollo, tres componentes fundamentales, estos son: Hospedero susceptible,

Fitopatógeno virulento y Condición medioambiental favorable, conocido como el triángulo de la enfermedad (Díaz y Lolas, 2016) (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Triángulo de la enfermedad compuesto por hospedero susceptible, patógeno virulento y condiciones ambientales favorables para la infección.

Las enfermedades del manzano se dividen en cuatro, según el agente causal (abiótico y biótico, en primer lugar, las de origen abiótico como raíces tumorosas o “burrknots” causando pseudo agallas en el portainjerto debido a una alteración genético-fisiológico. En segundo lugar, están las enfermedades de origen bacteriano como las Agallas del cuello causado por *Agrobacterium tumefaciens*. En tercer lugar, están las enfermedades de origen fungoso (micosis) en Chile se destacan entre otras al Cancro áspero o granuloso causado por *Botryosphaeria dothidea*, Cancro europeo causado por *Neonectria ditissima* que afectan a los troncos, brazos y ramillas (Acuña, 2010). El Plateado causado por el basidiomicete *Chondrostereum purpureum*, que afecta a la madera. También destacan patologías que afectan a los frutos como la Pudrición calicinal y Corazón mohoso causado por *Botrytis cinerea* y especies de *Alternaria*, respectivamente (Latorre, 2004; Latorre, 2018). La Pudrición del cuello y raíces causado por *Phytophthora cactorum*. Enfermedades que afectan al follaje como Oídio y Sarna del manzano causado por *Podosphaera leucotricha* y *Venturia inaequalis*, respectivamente (Latorre, 2018). La sarna del manzano es considerada como la más importante de este frutal. En cuarto lugar, están las enfermedades de origen viral como Virus del Mosaico y Virus de la mancha de la hoja del manzano (Acuña, 2010; Alvarez et al., 2004; Latorre, 2004; Latorre, 2018).

Basado en Pinilla (2013), las estrategias de control asociadas a estas enfermedades, básicamente se basan en prácticas de manejo culturales y aplicaciones de agroquímicos, asociados a reducir el inóculo inicial mediante eliminación y destrucción de frutos enfermos y ramillas con canchros. Estas labores deben ser realizadas durante invierno, primavera y verano, además de realizar aplicaciones de fungicidas en precosecha, los cuales han presentados resultados variables, dependiendo de los patógenos presentes en los huertos causando

podridones o canchros en manzano. Mayoritariamente esos fungicidas son Folpet, Captan, Clorotalonilo, Benzimidazoles, Estrobilurinas, Inhibidores de Esteroles y productos cúpricos. Todas estas aplicaciones, para la exportación de fruta se debe considerar los registros, carencias y tolerancias de residuos para cada mercado en específico.

#### 2.4 Familia Botryosphaeriaceae

“La familia Botryosphaeriaceae pertenece al Reino *Fungi*, división *Ascomycota*, subfilum *Pezizomycotina*, clase *Dothideomycete*, subclase *Incertae sedis* y orden *Botryosphaeriales*” (Latorre, 2004). Botryosphaeriaceae es la única familia perteneciente al Orden de los *Botryosphaeriales* (Schoch et al., 2006).

El género *Botryosphaeria* se caracteriza por estar compuesto por un amplio número de especies con distribución cosmopolita, asociado frecuentemente a muerte y canchros de las plantas leñosas. La componen 18 géneros de anamorfos (estado asexual) que han sido asociados a *Botryosphaeria*, los cuales se han reducido bajo la sinonimia *Diplodia* (conidios mayoritariamente ovoides, pigmentados y paredes gruesas) o *Neofusicoccum* (conidias en su mayoría fusoides, hialinos y paredes delgadas) (Crous et al., 2006).

Muchas especies de la familia Botryosphaeriaceae, son hongos fitopatógenos oportunistas que pueden estar presentes en la madera viva como endófitos, así como en la madera muerta como saprofitos, pudiendo causar enfermedades cuando las plantas se encuentran en situaciones de estrés provocando pudrición de frutas, manchas en las hojas, gomosis, pudrición en el cuello, canchros en la madera, tizón de brotes y plántulas, muerte regresiva y muerte completa del árbol (Pelletteret et al., 2017; Alves et al., 2013).

#### 2.5 Canchros de la madera y muerte regresiva de brazos en manzano

El Cancro áspero o granuloso en Chile es causado por el hongo *Botryosphaeria dothidea*, cuyo estado asexual corresponde al género *Dothiorella*, causando infecciones en ramas principales, ramillas y tronco en manzanos (Alvarez et al., 2004; Latorre y Toledo, 1984). En Uruguay se han descrito a las especies *B. dothidea* y *D. seriata* como las principales especies de Botryosphaeriaceae asociado a canchros y muerte regresiva de manzanos (Delgado-Cerrone et al., 2016).

Las especies de Botryosphaeriaceae causan síntomas en ramas y ramillas de plantas jóvenes y adultas, donde la corteza se desprende y enrolla superficialmente provocando un cambio de

coloración marrón-anaranjado, bajo la corteza aparece un cancro que provoca anillado y muerte, seguido por una gran aparición de picnidios negros en la corteza afectada (Latorre y Toledo, 1984; Sutton et al., 2014; Pinilla, 2013). En los brazos afectados se observa una muerte regresiva de la estructura pudiendo afectar también al eje principal.

*Botryosphaeria dothidea* es un patógeno que penetra a través de heridas, por lo cual, es su principal entrada al hospedero y sus conidias dependen principalmente de viento y precipitaciones para su dispersión (Alvarez et al., 2004). En el huerto la principal vía de penetración e infección de estos hongos son a través de daños provocados en la poda, instrumentos de labranza, heladas, daños de sol y otros (Alvarez et al., 2004). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que estos hongos pueden penetrar directamente a través de lenticelas, estomas u otras aberturas en las plantas sanas (Brown y Hendrix, 1981).

A modo de control de esta especie, se recomienda medidas sanitarias de remoción de las partes infectadas como ramas y brazos de inmediato apenas se detectan los primeros síntomas, ya que este hongo tiene su ciclo en madera muerta, protegiendo las heridas de poda con pastas protectoras a base de fungicidas. Así mismo durante la poda, se debe eliminar las ramas, brotes o ramillas enfermas o muertas, para reducir las fuentes de inóculo y evitar el avance de los canchros a tejidos sanos del árbol (Alvarez et al., 2004).

Este hongo igualmente puede afectar a los frutos, produciendo pudrición blanca. En primavera se inicia la liberación de ascosporas y conidias dependiendo del estado sexual del hongo presente, las cuales van a infectar los frutos desde cuaja hasta cosecha. Estas esporas son diseminadas por lluvias y dispersadas por viento. La infección ocurre directamente en frutos mojados y con temperaturas altas (28-30°C). Los frutos pueden verse afectados tanto en el huerto como en postcosecha. Las lesiones comienzan como pequeñas manchas hendidas, rodeado por un halo rojizo-púrpura a negro, alcanzando la zona carpelar decolorando la epidermis, resaltando la coloración oscura de las lenticelas. La pulpa de la fruta se mantiene firme al tacto, no obstante, puede comprometer la totalidad del fruto (Pinilla, 2013; Sutton et al., 2014; Rista et al., 2011).

## 2.6 Fuente de inóculo de Botryosphaeriaceae en Chile

Recientemente se ha descrito a la especie *D. seriata* (= *Botryosphaeria obtusa*), asociada a la Pudrición negra de la manzana (=Black rot) durante precosecha y cosecha de frutos en la Región del Maule, causando considerables pérdidas en la variedad Fuji (Cáceres et al., 2016). Estos frutos cuando no son cosechados quedan en los árboles de manzano como también en el suelo

del huerto, de esta forma pueden ser potenciales fuentes de inóculo para infecciones en ramillas y brazos.

Otra fuente de inóculo corresponde a los residuos de poda de ramillas y brazos que se mantienen en el suelo del huerto, los cuales tienen picnidios (estructuras asexuales) y pueden liberar conidias cuando haya condiciones de alta humedad y temperaturas medias, así contribuyendo a la dispersión de Botryosphaeriaceae en el huerto.

En Chile, se han descrito varias especies de Botryosphaeriaceae asociadas a muerte regresiva de brazos. En el caso de las vides de vino se han descrito a las especies *D. mutila*, *D. seriata*, *N. parvum*, *N. australe* (Díaz et al., 2011; Besoain et al., 2013; Díaz et al., 2013). En vides de uva de mesa se han descrito a *D. mutila*, *D. seriata* y *Spencermartinsia viticola* (Morales et al., 2012). Según Espinoza et al. (2009), en arándanos se han descrito a las especies *N. arbuti*, *N. australe* y *N. parvum*. Recientemente se describió a *D. mutila* asociado a muerte regresiva de brazos en nogales (Díaz et al., 2018), y a las especies *D. mutila*, *D. pseudoseriata*, *D. seriata*, *Dothiorella iberica*, *Lasiodiplodia theobromae*, *N. australe*, *N. nonquaesitum* y *N. parvum* asociados a muerte regresiva de brazos en paltos (Valencia et al., 2019). En este sentido, estos frutales pueden ser fuentes de inóculo cuando están cercanos a plantaciones de manzanos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Ubicación del ensayo

Este 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, Avenida Lircay s/n, Talca, Chile.

#### 3.2 Obtención de aislados fúngicos

Se utilizaron doce cultivos puros de aislados fúngicos obtenidos desde muestras de brazos con síntomas de muerte regresiva provenientes de diferentes zonas de Chile (Cuadro 3.1). Los aislados fúngicos se obtuvieron desde la siembra de trozos de madera que se sembraron en placas Petri de 88 mm de diámetro con medio de cultivo agar papa dextrosa (APD, 2 %) modificado (APDM) con Igepal CO-630 (Sigma Aldrich, MO, E.E.U.U) (Díaz et al., 2011), manteniendo los cultivos sembrados a 20 °C por al menos 5 días. Para obtener cultivos puros, se realizó repiques desde puntas de hifas de los aislados fúngicos incubados en medios de cultivo APD (2%) de tres días de crecimiento a 20°C. Las placas de Petri de cultivos puros de los 12 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.

**Cuadro 3.1.** Aislados fúngicos obtenidos desde brazos con muerte regresiva en manzanos cvs. Cripps Pink, Fuji y Gala en diferentes zonas de Chile

<b>Aislado</b>	<b>Localidad</b>	<b>Cultivar</b>
Bot-mz-1	Rancagua	Fuji
Bot-mz-2	Rancagua	Cripps Pink
Bot-mz-3	Curicó	Gala
Bot-mz-4	Los Niches	Gala
Bot-mz-5	Los Niches	Gala
Bot-mz-6	Panguilemo	Fuji
Bot-mz-7	Rio Claro	Fuji
Bot-mz-8	San Clemente	Cripps Pink
Bot-mz-9	Longavi	Fuji

Bot-mz-10	Longavi	Cripps Pink
Bot-mz-11	Camarico	Fuji
Bot-mz-12	Temuco	Cripps Pink

### 3.3 Identificación morfológica

La identificación morfológica se realizó caracterizando el crecimiento de la colonia de 12 aislados representativos en medio de cultivo Agar-papa-Dextrosa (2%)-APD, donde se observaron, caracterizaron y midieron conidias y picnidios con el fin de identificar el agente causal, basado en el trabajo de Phillips et al. (2007) y Urbez-Torres et al. (2006; 2008). Los cultivos se examinaban semanalmente por la formación de picnidios y conidias. Las conidias se caracterizaron por forma (ovoide, fusiforme), color, presencia o ausencia de septas, que fueron obtenidas desde picnidios. El largo y el ancho de conidias (n=40) se midieron utilizando un microscopio óptico (Epson), con cámara incorporada utilizando el programa MOTIC IMAGE PLUS 2.0. Se realizaron mediciones de 40 conidias por aislado.

### 3.4 Identificación molecular y análisis filogenético

Para la identificación molecular se utilizaron los 12 aislados de Botryosphaeriaceae de 5 días de edad en medio de cultivo APD a 20°C. La extracción de ADN se realizó a partir del micelio del hongo, utilizando la metodología propuesta por Espinosa (2016), empleando el kit de extracción comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit – Promega). 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- $\alpha$  'FE' (Carbone y Kohn 1999). Las condiciones de temperatura empleados en el termociclador para los tres genes ITS, BT y FE fueron los descritos previamente por Espinosa (2016). El producto PCR se envió para su purificación y secuenciación a Macrogen (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). 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.

Para el análisis filogenético, las secuencias de consenso de los 12 aislados de Botryosphaeriaceae se sometieron a una prueba de máxima parsimonia utilizando el programa MEGA 5 '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 *D. seriata* (CBS 112555 exatype), *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 exatype) y *N. arbuti* (CBS 116131 exatype). La especie *Guignardia philoпрina* (CBS 447), se utilizó como una secuencia fuera de grupo para enraizar al árbol (outgroup).

### 3.5 Inoculación de ramillas de manzano

En la inoculación de ramillas se utilizaron los 12 aislados (Bot-mz-1, Bot-mz-2, Bot-mz-3, Bot-mz-4, Bot-mz-5, Bot-mz-6, Bot-mz-7, Bot-mz-8, Bot-mz-9, Bot-mz-10, Bot-mz-11 y Bot-mz-12). Para este ensayo se seleccionaron y podaron (desde su zona basal, en agosto) ramillas (n=384) de aproximadamente 45 cm de longitud por árbol de variedades Fuji, Gala, Granny Smith y Cripps Pink, libre de enfermedades y plagas. Este material se transportó al laboratorio para su implementación, después de 24 horas, las ramillas en receso se podaron en bisel en su zona distal y se colocaron en forma vertical al interior de cajas plásticas con perlita húmeda. Las ramillas fueron sumergidas en la zona basal (3 cm) en un enraizante (Anasac, Chile). Una vez ordenadas las ramillas de todas las variedades en cajas, estas se mantuvieron a una temperatura constante de 18-22°C con régimen de luz (12h/12h) con una humedad de 85%. Inmediatamente después, cada herida de poda se inoculó con i) un trozo de agar (5 mm diámetro) con crecimiento micelial activo (obtenido de un cultivo de 5 días) o ii) 40 µL de suspensión de conidias (106 conidias/mL) (Figura 3.1). Luego se procedió a proteger con parafilm cada herida. Una misma cantidad de ramillas se les colocó un trozo de agar estéril (5-mm de diámetro) o 40 µL agua estéril sobre la herida de poda como tratamiento testigo. Después de 4 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 cv. Fuji en la herida de poda con un trozo de crecimiento activo (5-mm) del aislado Bot-mz -1.

### 3.6 Inoculación de manzanas

En la inoculación de frutos se utilizaron los 12 aislados (Bot-mz-1, Bot-mz-2, Bot-mz-3, Bot-mz-4, Bot-mz-5, Bot-mz-6, Bot-mz-7, Bot-mz-8, Bot-mz-9, Bot-mz-10, Bot-mz-11 y Bot-mz-12). Para este ensayo se seleccionaron 8 variedades de manzanas (madurez comercial SS%, firmeza y color) cvs. Fuji (San Clemente), Cripps Pink (Longavi), Braeburn (Curicó), Granny Smith (San Fernando), Premium Gala (Chimbarongo), Modi (Curicó), Red Chief (Talca) y Scarlett (San Fernando). Se utilizaron 768 frutos libres de enfermedades, insectos y alteraciones fisiológicas. Los frutos fueron desinfectados superficialmente con una solución compuesta por 10 L de agua destilada, 1 mL de hipoclorito de sodio al 4,9 % y 5 mL de detergente líquido (quick) por 3 minutos y dejados sobre papel absorbente en una sala a 20°C por 30 min. 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 sellar la herida con parafilm. Se utilizaron una misma cantidad de frutos con heridas, pero se les colocó un trozo de agar estéril, los cuales fueron dejados como controles. Finalmente, los frutos inoculados fueron incubados por 7 días a 20°C. Una vez transcurrido los días establecidos se determinó el diámetro de la lesión (mm) utilizando un calibrador digital Vernier (serie 500 Absolute digimatic, Mitutoyo America Corporation). Se realizó un re-asilamiento de

cada variedad de manzana, para comprobar que el hongo sea la especie con que se inoculo la manzana, todo esto para confirmar los postulados de Koch.



**Figura 3.2.** Inoculación de frutos de manzanas cultivar Cripps Pink con micelio de Botryosphaeriaceae obtenidos desde brazos de manzanos con muerte regresiva.

### 3.7 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental utilizado para el estudio de inoculación (ensayo con micelio y ensayo con conidias) en ramillas correspondió a un diseño completamente al azar con una estructura factorial de 4 (cultivar) X 12 (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%) utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.2.

El diseño experimental utilizado para el estudio de inoculación con micelio en frutos correspondió a un diseño completamente al azar (DCA) con una estructura factorial de 8 (cultivar) X 12 (aislado). La unidad experimental correspondió a diez frutos y se utilizaron ocho repeticiones. Los promedios del diámetro de las lesiones en manzanas se comparan 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%). Utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.2.

## 4. RESULTADOS

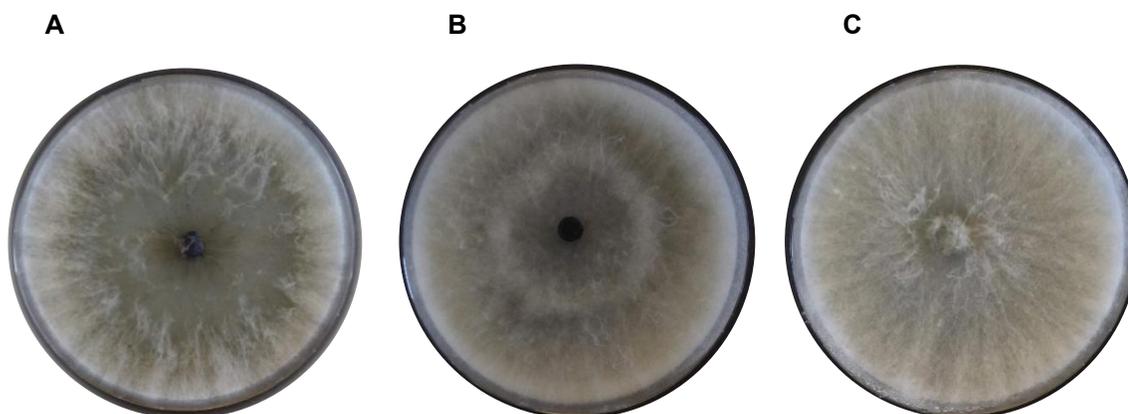
### 4.1 Identificación morfológica

Los aislados de Botryosphaeriaceae obtenidos desde brazos de manzanos con muerte regresiva fueron separados en tres grupos de acuerdo a características del cultivo y de las conidias en medio de cultivo APD (2%) incubados a 20°C (Figura 4.1):

Grupo 1, *Diplodia seriata*: Estos aislados (n=9) desarrollaron colonias en medio APD con moderado crecimiento aéreo de micelio, entre color gris claro a verde que se oscurecen a tonalidades grises a verdosas con la edad (5 días). Producen muchos picnidios individuales o agrupados, de café oscuro a negros y pequeños (0,4 a 1,2 mm de diámetro), después de al menos 10 días de incubación a 20°C con exposición a luz UVA (320 nm). Las conidias producidas por lo picnidios fueron de forma ovoide a elipsoides, amplia en el centro con un extremo obtuso (redondeado), con una base truncada, siendo hialina inicialmente y café oscuro en su madurez, aseptada, de paredes lisas y delgadas (Figura 4.2). Las dimensiones en promedio fueron de 24 µm de largo y 10,9 µm de ancho, L/A = 2,2 (Cuadro 4.1).

Grupo 2, *Lasiodiplodia theobromae*: El aislado (n=1) perteneciente a este grupo desarrollo en medio APD un crecimiento con abundante micelio aéreo de color blanco al inicio, pero tornándose de color verde-grisáceo hacia el centro con la edad. A partir de 14 días de incubación a 20°C con luz UVA (320 nm), los cultivos en APD formaron picnidios globosos agrupados de color negro, de 3 a 7 mm de diámetro. Las conidias producidas por lo picnidios fueron de forma subovoide a elipsoide de ápice ampliamente redondeada, con base truncada, amplia en el medio y angosta en los extremos, de paredes finas, inicialmente hialina y aseptada, pero café oscura y septada en la madurez, con depósitos de melanina con apariencia de estriado en la superficie (Figura 4.2). Las dimensiones en promedio fueron de 32,9 µm de largo y 15,6 µm de ancho, L/A = 2,1. (Cuadro 4.1).

Grupo 3, *Neofusicoccum arbuti*: Los aislados de este grupo (n=2) desarrollaron colonias blancas densas con moderado crecimiento micelial aéreo en el centro, que se torna a color verde-gris claro a gris oscuro con la edad (5 días). A partir de 14 días de incubación a 20°C con luz UVA (320 nm), los cultivos en APD formaron picnidios globosos negros individuales, de 0,5 a 2 mm de diámetro. Las conidias producidas en los picnidios fueron fusiforme, de base truncada, de ápice obtuso, hialina, aseptada, de paredes finas y lisas, de dimensiones en promedio de 21,9 µm de largo y 6,9 µm de ancho y L/A = 3,1 (Figura 4.2 y Cuadro 4.1).



**Figura 4.1.** Crecimiento micelial de cultivos puros de aislados de *Diplodia seriata* (Bot-mz-1) (A), *Lasiodiplodia theobromae* (Bot-mz-7) (B) y *Neofusicoccum arbuti* (Bot-mz-11) (C) en medio de cultivo APD (2%) después de 5 días de incubación a 20°C.

**Cuadro 4.1.** Dimensiones de conidias de aislados de *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti* obtenidos desde brazos de manzano con muerte regresiva.

Especie/Aislado	Dimensiones (µm)		
	Largo (L) <sup>1</sup>	Ancho (A)	L/A
<b><i>Diplodia seriata</i></b>			
<b>Bot-mz -1</b>	(22,0-) 25,0 ± 2,1 (-31,8)	(9,9-) 11,9 ± 1,1 (-13,7)	<b>2,1</b>
<b>Bot-mz -2</b>	(19,4-) 24,6 ± 3,2 (-33,7)	(8,9-) 10,8 ± 0,9 (-13,1)	<b>2,2</b>
<b>Bot-mz -3</b>	(19,9-) 24,4 ± 1,8 (-27,3)	(8,0-) 10,4 ± 0,9 (-12,1)	<b>2,3</b>
<b>Bot-mz -4</b>	(21,3-) 24,8 ± 1,7 (-28,2)	(8,6-) 11,0 ± 0,8 (-12,5)	<b>2,2</b>
<b>Bot-mz -5</b>	(20,5-) 24,9 ± 1,9 (-28,7)	(9,4-) 11,2 ± 1,0 (-14,3)	<b>2,2</b>
<b>Bot-mz -6</b>	(19,8-) 23,4 ± 2,0 (-31,7)	(8,8-) 10,8 ± 0,8 (-12,3)	<b>2,1</b>
<b>Bot-mz -8</b>	(19,9-) 23,3 ± 1,9 (-27,8)	(8,5-) 11,4 ± 0,9 (-13,0)	<b>2,0</b>
<b>Bot-mz -9</b>	(19,5-) 23,9 ± 1,7 (-27,9)	(8,2-) 9,9 ± 0,9 (-12,0)	<b>2,4</b>
<b>Bot-mz -10</b>	(17,2-) 21,4 ± 1,9 (-24,6)	(8,1-) 10,4 ± 0,9 (-12,3)	<b>2,0</b>
<b>Promedio</b>	24,0	10,9	<b>2,2</b>
<b>CBS 112555<sup>2</sup></b>	24.9	12.9	<b>1,9</b>
<b><i>Lasiodiplodia theobromae</i></b>			
<b>Bot-mz -7</b>	(29,7-) 32,9 ± 1,8 (-37,1)	(14,2-) 15,6 ± 0,7 (-17,1)	<b>2,1</b>

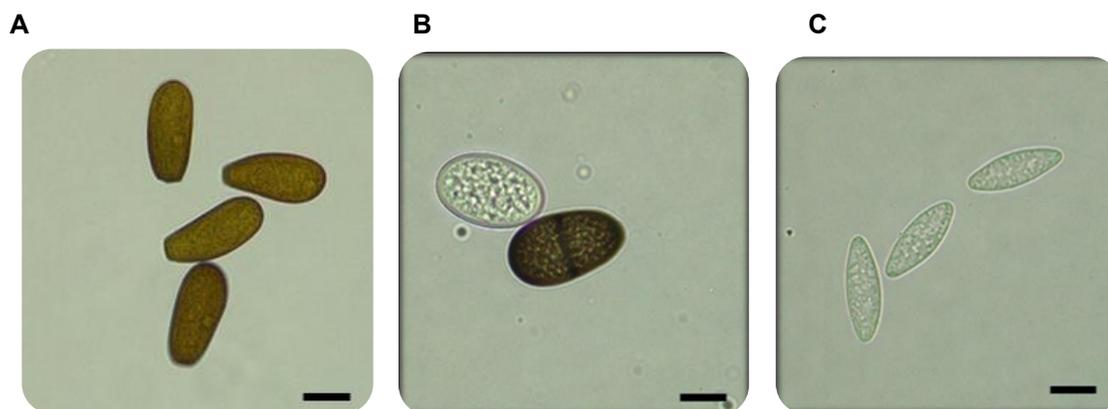
<b>Promedio</b>	32,9	15,6	<b>2,1</b>
<b>UCD923SN<sup>3</sup></b>	28,8	13,1	<b>2,2</b>
<b><i>Neofusicoccum arbuti</i></b>			
<b>Bot-mz -11</b>	(17,9-) 22,1 ± 2,3 (-27,4)	(5,6-) 6,7 ± 0,6 (-8,0)	<b>3,2</b>
<b>Bot-mz -12</b>	(17,8-) 21,7 ± 1,6 (-25,9)	(5,9-) 7,1 ± 0,6 (-8,8)	<b>3,0</b>
<b>Promedio</b>	21,9	6,9	<b>3,1</b>
<b>B03-07<sup>4</sup></b>	22,9	7,1	<b>3,3</b>

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

<sup>2</sup> Aislado CBS 112555 (extype) de *D. seriata*. Estudio de Phillips et al., 2007.

<sup>3</sup> Aislado UCD 923SN *L. theobromae*. Estudio de Ürbez-Torres et al., 2008.

<sup>4</sup> Aislados B03-07 *N. arbuti*. Estudio de Espinoza et al., 2009.

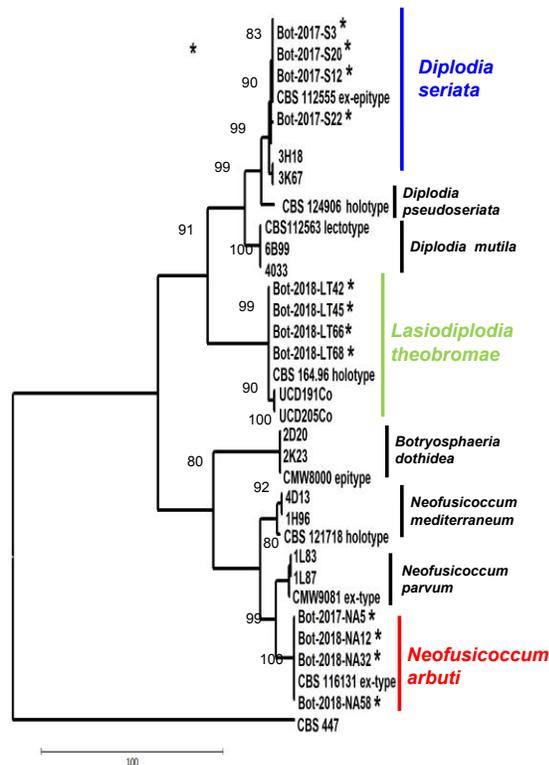


**Figura 4.2.** Conidias de especies de Botryosphaeriaceae obtenidas desde cultivos en APD incubados por 14 días a 20°C. **A**, Conidias maduras de forma ovoide a elipsoides, de color café oscuro, de extremo obtuso, con una base truncada, aseptada, de paredes lisas y delgadas de *Diplodia seriata*. **B**, Conidias de forma subovoide a elipsoide de ápice ampliamente redondeada, con base truncada, de paredes finas, inicialmente hialina y aseptada, pero café oscura y septada en la madurez, con patrón de estriado en la superficie de *Lasiodiplodia theobromae*. **C**, Conidias fusiformes, hialinas, aseptadas de base truncada y ápice obtuso de *Neofusicoccum arbuti*. Barra = 10 µm.

## 4.2 Identificación molecular

En los doce aislados de Botryosphaeriaceae se logró aislar ADN utilizando la metodología señalada. La amplificación fue exitosa en los 12 aislados utilizando los partidores ITS1 e ITS4; Bt2a y Bt2b, y FE1-728F y FE1-986R para los genes ITS, BT y FE1-alfa, respectivamente. Las secuencias de consenso de los ocho aislados de *D. seriata*, un aislado de *L. theobromae* y dos aislados de *N. arbuti* obtuvieron entre 99 a 100% de similitud en el análisis de Blast (GenBank) con los respectivos types de *D. seriata* (CBS 112555 ex-type), *L. theobromae* (CBS 164.94 holotype), y *N. arbuti* (CBS 116131 ex-type).

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 + FE1-alfa) pueden combinarse en el análisis de máxima parsimonia. El análisis mostró claramente una separación entre los clados de las tres especies identificadas. Los aislados de *D. seriata* se agruparon con el ex-type de *D. seriata* en un 90% de soporte. De forma muy similar los aislados de *L. theobromae* y *N. arbuti* se agruparon con sus respectivos ex-type, obteniendo 99 y 100 de soporte, respectivamente (Figura 4.3).



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

#### 4.3 Inoculación de ramillas con micelio

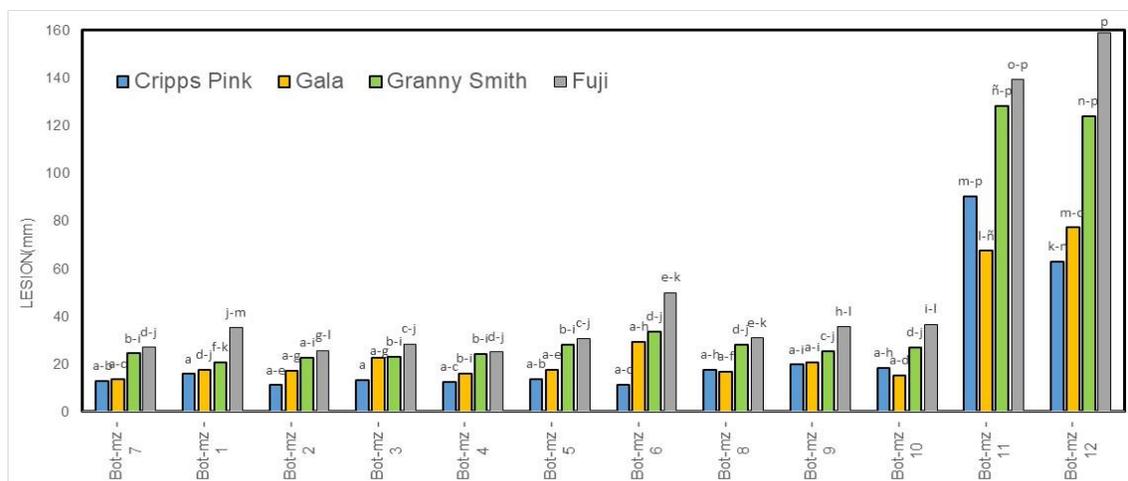
Las ramillas de manzano cv. Cripps Pink, Fuji, Royal Gala y Granny Smith inoculadas con micelio desarrollaron lesiones necróticas visibles. El promedio de esta lesión en ramillas de Cripps Pink fue de 24,9 mm, Fuji fue de 52,0 mm, Gala fue de 27,6 mm y Granny Smith fue de 42,4 mm (Figura 4.5). Las ramillas inoculadas como tratamiento testigo, no presentaron lesiones.

Estadísticamente, existieron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en la interacción del factor cultivar y factor aislado de *Botryosphaeria* (Bot-mz) (Cuadro 4.2), demuestra que la lesión va a depender del aislado y del cultivar (Cripps Pink, Fuji, Gala y Granny Smith).

Los aislados de *Neofusicoccum arbuti* (Bot-mz-11 y Bot-mz-12) fueron significativamente los más virulentos (Figura 4.5 y Cuadro 4.2). Los diferentes aislados fueron exitosamente re-aislados desde las lesiones de ramillas, sembradas en medio de cultivo APD. Esto confirmó la presencia e identificación de cada especie y aislado, cumpliéndose así los postulados de Koch.



**Figura 4.4.** Lesión necrótica en ramillas de manzano cv. Fuji inoculadas con micelio de *Diplodia seriata* (Bot-mz -1) después de 4 meses de incubación.



**Figura 4.5.** Largo de lesiones necróticas en ramillas (dos años) de manzano cvs. Cripps Pink, Fuji, Gala y Granny Smith inoculadas con micelio de aislados de *Diplodia seriata* (DS, 9 aislados), *Lasiodiplodia theobromae* (LT, 1 aislado) y *Neofusicoccum arbuti* (NA, 2 aislados) después de 4 meses desde la inoculación.

**Cuadro 4.2.** Lesión necrótica en ramillas de manzano (dos años de edad) de cuatro cultivares inoculadas con micelio de aislados de *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti*, después de 4 meses de incubación.

Especie/Aislado	Lesión necrótica (mm)				Promedio
	Cripps Pink	Fuji	Gala	Granny Smith	
<b><i>D. seriata</i></b>					
Bot-mz -1	11,4 a	49,9 j-m	29,2 d-j	33,6 f-k	31,0
Bot-mz -2	15,8 a-e	35,3 g-l	17,7 a-g	20,8 a-i	22,4
Bot-mz -3	11,1 a	25,7 c-j	17,3 a-g	22,6 b-i	19,2
Bot-mz -4	13,2 a-c	28,4 d-j	22,6 b-i	23,0 b-i	21,8
Bot-mz -5	12,4 a-b	25,2 c-j	16,0 a-e	24,2 b-i	19,5
Bot-mz -6	13,7 a-c	30,7 e-k	17,6 a-h	28,1 d-j	22,5
Bot-mz -8	17,6 a-h	31,0 e-k	16,9 a-f	28,0 d-j	23,4
Bot-mz -9	19,7 a-i	35,5 h-l	20,6 a-i	25,3 c-j	25,3
Bot-mz -10	18,3 a-h	36,6 i-l	15,2 a-d	27,0 d-j	24,3
<b><i>L. theobromae</i></b>					
Bot-mz -7	12,8 a-b	27,0 d-j	13,6 a-c	24,4 b-i	19,5
<b><i>N. arbuti</i></b>					
Bot-mz -11	90,3 m-p	139,4 o-p	67,4 l-ñ	128,2 ñ-p	106,3
Bot-mz -12	62,8 k-n	158,7 p	77,2 m-o	123,9 n-p	105,7
Promedio	24,9	52,0	27,6	42,4	

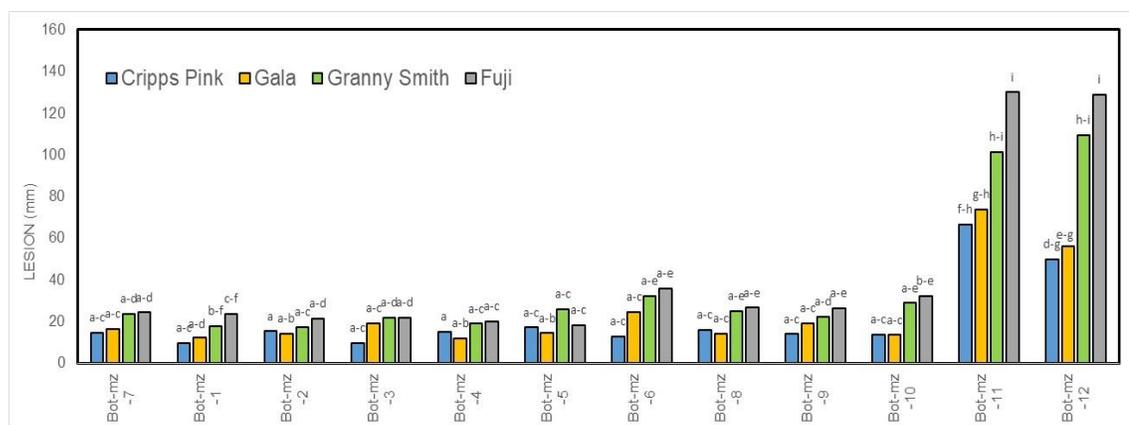
	gl	P
<b>Aislado (A)</b>	11	0,00001
<b>Cultivar (C)</b>	3	0,00001
<b>Interacción A x C</b>	33	0,0032

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

#### 4.4 Inoculación de ramillas con conidias

Las ramillas de manzano cv. Cripps Pink, Fuji, Gala y Granny Smith inoculadas con conidias lograron formar lesiones necróticas visibles. El promedio de esta lesión en cv. Cripps Pink fue de 21,1 mm, Fuji fue de 42,3 mm, Gala fue de 24,0 mm y Granny Smith fue de 37,0 mm (Figura 4.6). Las ramillas inoculas como tratamiento testigo, no presentaron lesiones.

La interacción entre el factor aislado y factor cultivar fue significativa (P=0,0013) (Cuadro 4.3 y Figura 4.6). Estos nos indica que el largo de la lesión depende del aislado y del cultivar. Los aislados significativamente más virulentos fueron los de *N. arbuti*, siendo similares los de *L. theobromae* y *D. seriata* (Figura 4.6). En general, todas los cultivares mostraron ser susceptibles, pero se observa una menor y mayor susceptibilidad (largo de lesión) en los cvs. Cripps. Pink y Fuji, respectivamente (Figura 4.6). Los diferentes aislados fueron exitosamente re-aislados desde las lesiones de ramillas, sembradas en medio de cultivo APD. Esto confirmó la presencia e identificación de cada especie y aislado, cumpliéndose así los postulados de Koch.



**Figura 4.6.** Largo de lesiones necróticas en ramillas de manzano cvs. Cripps Pink, Gala, Granny Smith y Fuji inoculadas con conidias de *Diplodia seriata* (DS, 9 aislados), *Lasiodiplodia theobromae* (LT, 1 aislado) y *Neofusicoccum arbuti* (NA; 2 aislados), después de 4 meses desde la inoculación.

**Cuadro 4.3.** Lesión necrótica en ramillas de manzano (dos años de edad) de cuatro cultivares inoculadas con conidias de los aislados de *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti*, después de 4 meses de incubación.

Especie/Aislado	Lesión necrótica (mm)				Promedio
	Cripps Pink	Fuji	Gala	Granny Smith	
<b><i>D. seriata</i></b>					
Bot-mz -1	12,7 a-c	35,8 c-f	24,4 a-d	32,2 b-f	26,3
Bot-mz -2	9,5 a	23,5 a-d	12,0 a-b	17,6 a-c	15,7
Bot-mz -3	15,2 a-c	21,2 a-d	13,9 a-c	17,3 a-c	16,9
Bot-mz -4	9,7 a	21,7 a-d	19,2 a-c	21,8 a-d	18,1
Bot-mz -5	15,1 a-c	19,8 a-c	11,9 a-b	18,8 a-c	16,4
Bot-mz -6	17,0 a-c	18,0 a-c	14,3 a-c	25,7 a-e	18,8
Bot-mz -8	15,8 a-c	26,5 a-e	14,1 a-c	24,8 a-e	20,3
Bot-mz -9	13,8 a-c	26,2 a-e	19,0 a-c	22,3 a-d	20,3
Bot-mz -10	13,7 a-c	32,2 b-e	13,4 a-c	28,7 a-e	22,0
<b><i>L. theobromae</i></b>					
Bot-mz -7	14,5 a-c	24,2 a-d	16,5 a-c	23,6 a-d	19,7
<b><i>N. arbuti</i></b>					
Bot-mz -11	66,5 f-h	129,9 i	73,6 g-h	101,3 h-i	92,8
Bot-mz -12	49,7 d-g	128,8 i	56,0 e-g	109,3 h-i	86,2
Promedio	21,1	42,3	24,0	37,0	
	gl	<i>P</i>			
<b>Aislado (A)</b>	11	0,0000			
<b>Cultivar (C)</b>	3	0,0000			
<b>Interacción A x C</b>	33	0,0013			

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

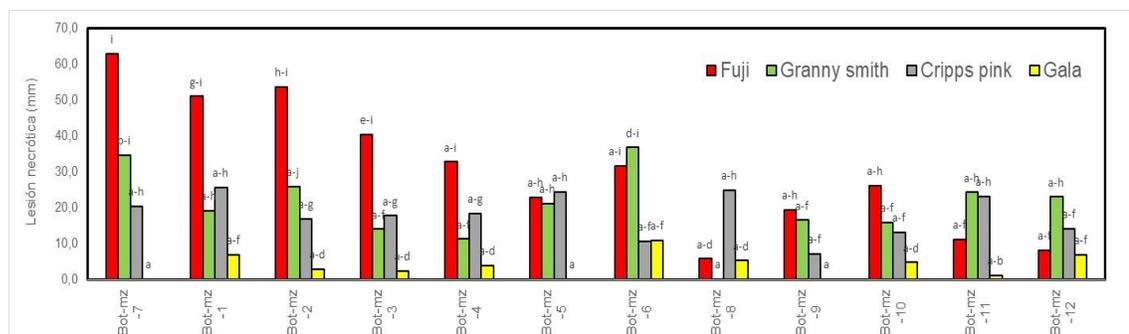
#### 4.5 Patogenicidad de frutos de manzana

Todos los frutos inoculados con aislados de la familia Botryosphaeriaceae desarrollaron lesiones de forma irregular de color pardo a pardo oscuro, que inicialmente fueron firmes, pero con el transcurso del tiempo se vuelven blandas, luego de 7 días a una temperatura de 20°C (Figura 4.7). Los frutos inoculados, como controles, no presentaron lesiones.



**Figura 4.7.** Lesión en fruto cv. Fuji inoculado con micelio de la especie *Lasiodiplodia theobromae* (Bot-mz -7), después de 7 días de incubación a 20°C.

De acuerdo a la estadística, la interacción entre el factor aislado y factor cultivar fue significativa ( $P=0,0001$ ) (Cuadro 4.4). Esto nos indica que el largo de la lesión depende del factor aislado y cultivar. El valor de lesión en fruto se obtuvo en la combinación de *Lasiodiplodia theobromae* y cv. Fuji (Figura 4.7, Figura 4.8 y Cuadro 4.4). En general, todas los ocho cultivares mostraron ser susceptibles, pero se observa un menor (promedio 3,7 mm diámetro) y mayor susceptibilidad (promedio 30,4 mm diámetro) en los cvs. Gala y Fuji, respectivamente (Cuadro 4.4). Los diferentes aislados fueron exitosamente re-aislados desde las lesiones de ramillas, sembradas en medio de cultivo APD. Esto confirmó la presencia e identificación de cada especie y aislado, cumpliéndose así los postulados de Koch.



**Figura 4.8.** Largo de la lesión necrótica en frutos de manzano de cuatro cultivares inoculados con trozo de micelio de *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti*, después de 7 días de incubación a 20°C.

**Cuadro 4.4.** Lesión necrótica en frutos de manzano de ocho cultivares inoculadas con micelio de aislados de *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti*, después de 7 días de incubación a 20°C.

		Lesión necrótica (mm)								
Especie/ Aislado	Braeburn	Fuji	Granny Smith	Cripps pink	Gala	Modi	Red Chief	Scarlett	Promedio	

<b><i>Diplodia seriata</i></b>									
Bot-mz -1	36,0 c-i	50,1 g-i	19,0 a-h	25,6 a-h	6,8 a-f	16,5 a-g	10,9 a-f	21,4 a-h	23,4
Bot-mz -2	26,7 a-h	53,5 h-i	25,7 a-h	16,8 a-g	2,8 a-d	10,1 a-f	6,5 a-f	32,5 a-i	21,8
Bot-mz -3	21,3 a-h	40,3 e-i	14,0 a-f	17,7 a-g	2,2 a-d	9,1 a-f	12,4 a-f	17,5 a-g	16,8
Bot-mz -4	17,6 a-g	32,7 a-i	11,2 a-f	18,4 a-g	3,9 a-d	8,7 a-f	4,0 a-d	2,8 a-d	12,4
Bot-mz -5	40,5 f-i	22,9 a-h	21,0 a-h	24,4 a-h	0,0 a	22,9 a-h	4,8 a-d	0,0 a	17,1
Bot-mz -6	21,2 a-h	31,5 a-i	36,7 d-i	10,6 a-f	10,8 a-f	9,3 a-f	1,1 a-b	3,3 a-d	15,6
Bot-mz -8	0,0 a	5,7 a-d	0,0 a	24,8 a-h	5,2 a-d	17,8 a-g	0,0 a	2,3 a-d	7,0
Bot-mz -9	9,7 a-f	19,4 a-h	16,5 a-f	7,0 a-f	0,0 a	7,9 a-f	15,8 a-f	5,8 a-e	10,3
Bot-mz -10	8,2 a-f	26,0 a-h	15,9 a-f	13,0 a-f	4,7 a-d	16,0 a-f	8,8 a-f	13,0 a-f	13,2
<b><i>Lasiodiplodia theobromae</i></b>									
Bot-mz -7	0,0 a	62,8 i	34,6 b-i	20,3 a-h	0,0 a	16,6 a-g	7,8 a-f	4,9 a-d	18,4
<b><i>Neofusicoccum arbuti</i></b>									
Bot-mz -11	33,9 a-i	11,1 a-f	24,2 a-h	23,1 a-h	1,0 a-b	7,8 a-f	1,8 a-c	14,9 a-f	14,7
Bot-mz -12	9,0 a-f	8,0 a-f	23,0 a-h	14,1 a-f	6,8 a-f	8,6 a-f	4,3 a-d	12,7 a-f	10,8
Promedio	18,7	30,4	20,1	18,0	3,7	12,6	6,5	10,9	
	gl	<i>P</i>							
<b>Aislado (A)</b>	11	0,00001							
<b>Cultivar (C)</b>	7	0,00001							
<b>Interacción</b>	77	0,0001							
<b>A x C</b>									

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

## 5. DISCUSIÓN

Basado en los resultados obtenidos en el presente estudio, se identificaron y caracterizaron por medio de estudios culturales, morfológicos, moleculares y de patogenicidad, a *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti* como especies de Botryosphaeriaceae causando muerte regresiva en manzanos en Chile. Este estudio confirma lo descrito recientemente por Herrera (2018) y Díaz et al. (2019), quienes describieron a *D. seriata* causando muerte regresiva de brazos. Previamente Latorre y Toledo (1984), identificaron a la especie *B. dothidea* causando muerte regresiva en manzanos en Chile, por lo tanto, esta investigación aporta datos de nuevas especies que están asociadas a esta enfermedad como agente causal, como *L. theobromae* y *N. arbuti*.

Varios han sido los estudios a lo largo del mundo que han descrito a especies de la familia Botryosphaeriaceae afectando a diferentes cultivos, por ejemplo, según el estudio de Martos (2008), identificó especies de esta familia Botryosphaeriaceae causando enfermedades de la madera en viñedos en Cataluña, España, siendo *D. seriata* la especie más abundante afectando a la vid, seguido por *N. parvum* y *B. dothidea*. De forma similar, Díaz et al. (2013), describieron a *D. seriata* como la especie de Botryosphaeriaceae (*D. mutila*, *Spencermartinsia viticola* y *N. parvum*) más frecuente asociado a enfermedades de la madera en vides en Chile. En Nueva Zelanda según el estudio de Tennakoon et al. (2017), que también describieron a especies de Botryosphaeriaceae que incluyen *N. australe*, *N. ribis* y *N. parvum*, pero afectando plantas de arándanos. Por otra parte, en California, los estudios de Úrbez-Torres et al. (2006), como el de McDonald y Eskalen (2011), describieron a especies de Botryosphaeriaceae asociadas a canchros y muerte regresiva en vides y paltos, respectivamente. Todos estos estudios, junto con el presente trabajo, demuestran el importante rol de las especies de Botryosphaeriaceae, como hongos fitopatógenos causando enfermedades de la madera y muerte regresiva de brazos en diversas especies frutales. Esta diversidad de hospedero que poseen las Botryosphaeriaceae, ha sido de interés, motivando un aumento del estudio de estas especies de hongos en diversas partes del mundo (Phillips et al., 2013).

Precisamente en manzano, varios trabajos han reportado a especies de Botryosphaeriaceae causando canchros y muerte regresiva de brazos (Abdollahzadeh, 2015; Delgado-Cerrone et al., 2016; Latorre y Toledo, 1984; Rooney-Latham y Soriano, 2016; Sessa et al., 2016; Úrbez-Torres et al., 2016). En Sudáfrica se describieron a *D. seriata* y especies de *Neofusicoccum*, pero la más frecuente fue *D. seriata* en manzanos. De igual manera, en el presente trabajo se describen a *D. seriata*, *L. theobromae* y *N. arbuti*, pero la más frecuente fue *D. seriata*. En Uruguay, se describieron a *B. dothidea* como la más frecuente, seguido por *D. seriata*, *N. parvum* y *N.*

*australe*, pero a *L. theobromae* en muy baja frecuencia, siendo similar al actual trabajo donde se encontró solo un aislados de esta especie (Delgado-Cerrone et al., 2016; Sessa et al., 2016). Por el contrario, en China, solo se determinó la presencia de *B. dothidea*, como la única especie de *Botryosphaeria* asociados a canchros de la madera en manzanos (Tang et al., 2012). En la Columbia Británica (Canadá) se describió a *D. seriata* y *D. mutila* como agentes causales de muerte regresiva de manzanos (Úrbez-Torres et al., 2016).

En el actual trabajo, las descripciones culturales y morfológicas de las conidias coinciden con los descrito previamente para las especies *D. seriata* (Phillips et al., 2007), *L. theobromae* (Úrbez-Torres et al., 2008) y *N. arbuti* (Espinoza et al., 2009). Sin embargo, para obtener una clara y potente identificación es necesario complementar la identificación morfológica con la identificación molecular, en especial con las especies de Botryosphaeriaceae (Crous et al., 2006; Phillips et al., 2007; Phillips et al., 2012; Phillips et al., 2013).

La identificación molecular basada en los genes ITS, BT y FE, ratifican los estudios de Phillips et al. (2012; 2013), los cuales logran separar a las especies de *Diplodia* como *D. seriata* y *D. mutila*, mediante un análisis filogenético, utilizando los genes ITS + Factor de elongación, de otras especies de la familia, al igual que el estudio realizado por Espinosa (2016), en el cual se identificó a través de los genes ITS, BT y FE a *D. seriata* a nivel nacional, afectando a frutos de manzanas en precosecha y que permite separar a través del análisis filogenético de forma individual de ITS, BT y FE. Este estudio ratifica que estos tres genes son los más útiles y robustos para identificar y diferenciar especies de Botryosphaeriaceae (Úrbez-Torres et al., 2006; Phillips et al., 2013).

En este estudio, los aislados de *N. arbuti* resultaron ser los más virulentos en cuanto a la lesión necrótica y síntomas de muerte regresiva sobre ramillas de manzano. Estos resultados coinciden con los trabajos de Delgado-Cerrone et al. (2016) y Sessa et al. (2016) quienes determinaron a las especies de *Neofusicoccum* como las más agresivas de las Botryosphaeriaceae en manzanos. Sin embargo, en el trabajo de Delgado-Cerrone et al. (2016), también describe como especie agresiva a *L. theobromae*, pero a diferencia del actual estudio, donde esta especie, fue una de las menos virulentas en ramillas. Por lo contrario, esta especie fue una de las más agresivas asociadas a pudriciones de frutos. Indicando, que esta especie podría ser una importante amenaza en frutos, ya que la pudrición de frutos de manzanas asociadas a Botryosphaeriaceae son cada vez más importante en Chile (Cáceres et al., 2016; Díaz et al., 2019), esto se puede comparar con el estudio realizado por Espinoza et al. (2009), el cual identifico por primera vez a especies del genero *Neofusicoccum* causando muerte regresiva en arándanos en Chile, dentro de las cuales estaba *N. arbuti*, *N. australe* y *N. parvum*.

Epidemiológicamente, en cuanto a hospederos, la familia Botryosphaeriaceae en Chile también ha sido descrita para otros frutales, como arándanos (Espinoza et al., 2009), kiwis y nogales (Díaz et al., 2018), vides (Díaz et al., 2013), limonero (Guajardo et al., 2018), paltos (Valencia et al., 2019). Por lo tanto, el actual trabajo contribuye al conocimiento de estas especies de Botryosphaeriaceae, que tienen como hospederos a manzanos. Es muy común encontrar plantaciones de nogales, kiwis y vides, que presentan una importante prevalencia de muerte regresiva de brazos, que están muy cercanos a plantaciones de manzano, en especial en la Región del Maule. Por lo tanto, estos frutales pueden ser posibles fuentes de inóculo para los manzanos si están en sus cercanías. En este sentido, los frutos infectados en el suelo del huerto o frutos no cosechados que se mantienen en el huerto también podrían constituir una importante fuente de inóculo, siendo que la pudrición de frutos de manzanos, con énfasis en *D. seriata* es muy frecuente en los últimos años en las plantaciones de manzanos en especial en la Región del Maule (Cáceres et al., 2016; Díaz et al., 2019).

Por estas razones, es necesario realizar estudios para determinar las especies asociadas a esta enfermedad, como también conocer la sensibilidad de los fungicidas para prevenir el impacto de las enfermedades de la madera, y evitar las pérdidas de fruta y económicas, recientemente varios estudios (Muñoz, 2017; Latorre et al., 2013; Torres et al., 2013) buscan conocer los efectos de fungicidas tanto in-vitro como en condiciones de campo sobre enfermedades de madera, para así buscar soluciones para un posible control.

Es fundamental la actualización de las investigaciones sobre la identificación de especies de Botryosphaeriaceae asociadas a esta enfermedad.

## 6. CONCLUSIÓN

Basado en los resultados del presente estudio, se concluye que:

- Los doce aislados fungosos obtenidos desde brazos con muerte regresiva correspondían a especies de la familia Botryosphaeriaceae, identificadas morfológicamente y molecularmente como *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti*, quienes mostraron diferencias morfológicas, moleculares y de virulencia.
- Los aislados de *Neofusicoccum arbuti* fueron los más virulentos en ramillas de manzano.

## 7. CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahzadeh, J. 2015. *Diplodia bulgarica*, as a new pathogen and potential threat to the apple industry in Iran. *Phytopathologia Mediterranea*. 54:128-132.
- Acuña, R. 2010. Compendio de bacterias y hongos de frutales y vides en Chile. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). 150 p.
- Agustí, M. 2004. Fruticultura. Primera Edición. Mundi-Prensa. Valencia, España. 494 p.
- Alaniz, S., Delgado, L., Leoni, C., y Mondino, P. 2010. Situación actual de los canchros del manzano: Distribución, Descripción de síntomas, Agentes causales, Pautas de manejo. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA Las Brujas). Canelones, Uruguay. Recuperado en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/1126/1/128221131113105534.pdf>. Consultado el 08 de octubre de 2018.
- Alvarez, M., Pinilla B. y Herrera G. 2004. Enfermedades del Manzano. Instituto de Investigaciones Agropecuaria, INIA Ministerio de Agricultura. Colección de libros INIA °10. 71 p.
- Alves, A., Barradas, C., Phillips, J., and Correia, A. 2013. Diversity of Botryosphaeriaceae species associated with conifers in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*. 135:791-804.
- Amunátegui, R., Farías, C., Martínez, H., y Sotomayor, O. 2002. Temporada Agrícola. ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). Recuperado en: <https://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servicios-informacion/tempo/temporada19.pdf>. Consultado el 07 de noviembre de 2018.
- Besoain, X., Torres, C., Díaz, G.A., and Latorre, B.A. 2013. First report of *Neofusicoccum australe* associated with *Botryosphaeria* canker of grapevine in Chile. *Plant Disease*. 97(1):143-143.
- Bondoux, P. 1994. Enfermedades de conservación de frutos de pepita, manzanas y peras. Primera edición. Edición Mundi-Prensa, España. 172 p.
- Bravo, J. 2013. Manzanas: una temporada de alto valor de exportaciones. ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). Recuperado en: <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2013/10/manzanas201310.pdf>. Consultado el 07 de noviembre de 2018.

Brown, E., and Hendrix, F. 1981. Pathogenicity and histopathology of *Botryosphaeria dothidea* on Apple stems. *Phytopathology* 71:375-379.

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.

Carbone, I., and Kohn, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553-556.

Cerezo, F. 2014. Producción de manzana. FTP-FAUTAPO. Recuperado en: <http://saludpublica.bvsp.org.bo/cc/bo40.1/documentos/704.pdf>. Consultado el 06 de noviembre de 2018.

Crous, P., Slippers, B., Wingfield, M., Rheeder, J., Marasas W., Philips, A., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., and Groenewald, J. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* 55:235-253.

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(3):637-655.

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., Latorre, B.A., Ferrada, E.E., and Lolas., M. 2019. Identification and characterization of *Diplodia mutila*, *D. 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., Latorre, B. A., Ferrada, E., Gutiérrez, M., Bravo, F., and Lolas, M. 2018. First report of *Diplodia mutila* causing branch dieback of English walnut cv. Chandler in the Maule Región, Chile. *Plant Disease* 102:1451-1452.

Díaz, G.A, Prehn, D., and Latorre, B.A. 2011. First report of *Cryptovalsa ampelina* and *Eutypella leprosa* associated with grapevine trunk diseases in Chile. Plant Disease 95:490.

Díaz, G.A, Prehn, D., Besoain, X., Chávez, E.R., and Latorre, B.A. 2011. *Neofusicoccum parvum* associated with grapevine trunk diseases in Chile. Plant Disease 95(8):1032-1032.

Díaz, G.A, y Lolas, M. 2016. Enfermedades de pre y postcosecha en manzanos. Boletín técnico volumen 16 no.5. Centro de Pomáceas. Universidad de Talca. Talca, Chile. Recuperado en: <http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/enfermedades-pre-y-pos-cosecha.pdf>. Consultado el 13 de noviembre de 2018.

Espinosa, C. 2016. Identificación molecular de *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila* y *Phacidium lacerum* asociados a pudriciones de pre-cosecha en manzanos 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.

Glass, N.L and Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology 61:1323-1330.

Grau, P. 2015. La importancia de la industria de la manzana chilena en el mercado internacional. Instituto de Investigaciones Agropecuaria, INIA-Quilamapu. Recuperado en: [http://www.inia.cl/wp-content/uploads/2015/01/Art-t%C3%A9cnico\\_Importancia-mercado-manzanas.pdf](http://www.inia.cl/wp-content/uploads/2015/01/Art-t%C3%A9cnico_Importancia-mercado-manzanas.pdf). Consultado el 06 de noviembre de 2018.

Guajardo, J., Riquelme, N., Tapia, L., Larach, A., Torres, C., Camps, R., and Besoain, X. 2018. First Report of *Lasioidiplodia theobromae* causing bot gummosis in *Citrus limon* in Chile. Plant Disease 102(4):818.

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. 35 p.

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.

Latorre, B.A. 2004. Enfermedades de las plantas cultivadas. Sexta Edición. Ediciones 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., Torres, R., Silva, T., and Elfar, K. 2013. Evaluation of the use of wound-protectant fungicides and biological control agents against stem canker (*Neofusicoccum parvum*) of blueberry. *Cien. Inv. Agr* 40(3): 537-545.

Martos, S. 2008. El decaimiento de la vid. Enfermedades de la madera relacionadas con hongos de la familia Botryosphaeriaceae. Memoria presentada para la obtención del grado de Doctor en Ciencia Biológicas. Departament De Biologia Animal. Universitat Autònoma de Barcelona. 225 p.

McDonald, V., and Eskalen, A. 2011. Botryosphaeriaceae Species Associated with Avocado Branch Cankers in California. *Plant Disease* 95:1465-1473.

Merlet, H., Navarro, A., y Rosales, C. 2016. Manual técnico productivo y económico manzana. Centro de Información de Recursos Humanos (CIREN). Recuperado en: <file:///C:/Users/sofia/Downloads/PC19116.pdf>. Consultado el 26 de septiembre de 2018.

Morales, A., Latorre, B.A, Piontelli, E., and Besoain, X. 2012. Botryosphaeriaceae species affecting table grape vineyards in Chile and cultivar susceptibility. *Ciencia e Investigación Agraria* 39(3): 445-458.

Muñoz, 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. 45 p

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2019. Estadísticas productivas. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. [En línea] Recuperado en: <https://www.odepa.gob.cl/estadisticas-del-sector/estadisticas-productivas>. Consultado el 26 de septiembre de 2018.

Pelleteret, P., Crovadore, J., Cochard, B., Pasche, S., Bovigny, P.Y., Chablais, R., and Lefort, F. 2017. Urban London plane tree dieback linked to fungi in the Botryosphaeriaceae. *Urban Forestry and Urban Greening* 22:74-83.

Phillips, A.J.L., 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* 76:51-167.

Phillips, A.J.L., Crous, P.W., and Alves, A. 2007. *Diplodia seriata*, The anamorph of '*Botryosphaeria obtusa*'. *Fungal Diversity* 25:141-155.

Phillips, A.J.L., Lopes, J., Abdollahzadeh, J., Boved, S., and Alves, A. 2012. Resolving the *Diplodia* complex on apple and other Rosaceae hosts. *Persoonia* 29: 29-38.

Pinilla, B. 2013. Principales enfermedades de las Pomáceas. Boletín técnico volumen 13 no.5. Centro de Pomáceas. Universidad de Talca. Talca, Chile. 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 el 08 de octubre de 2018.

Quiroz, I. 2017. Plantaciones de manzanos, perales y cerezos y su impacto en la oferta. Boletín técnico volumen 17 no.3. Centro de Pomáceas. Universidad de Talca. Talca, Chile. Recuperado en: [http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/Boletin\\_Tecnico\\_Mayo\\_2017.pdf](http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/Boletin_Tecnico_Mayo_2017.pdf). Consultado el 03 de octubre de 2018.

Rista, L., Maumary, R., Gariglio, N., y Favaro, C. 2011. *Botryosphaeria dothidea* (Moug) Afectando Plantaciones de Manzano y Duraznero en la Región Centro-Este de Santa Fe. *Fave. Sección ciencias agrarias*. 10(1-2):45-52. Recuperado en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1666-77192011000100004](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1666-77192011000100004). Consultado el 16 de noviembre de 2018.

Rooney-Latham, S., and Soriano, M.C. 2016. First Report of *Neofusicoccum nonquaesitum* causing branch dieback of apple in California. *Plant Disease* 100(5):1012-1012.

Schoch, C., Shoemaker, R., Seifert, K., Hambleton, S., Spatafora, J., and Crous, P. 2006. A multigene phylogeny of the *Dothideomycetes* using four nuclear loci. *Mycologia* 98:1041-1052.

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.

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.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.

Tang, W., Ding, Z., Zhou, Z.Q., Wang, Y.Z., and Guo, L.Y. 2012. Phylogenetic and pathogenic analyses show that the causal agent of apple ring rot in China is *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease* 96:486-496.

Tennakoon, K., Ridgway, H., Jaspers, M., and Jones, E. 2017. Botryosphaeriaceae species associated with blueberry dieback and sources of primary inoculum in propagation nurseries in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology* 150:363-374.

Toranzo, J. 2016. Producción mundial de manzanas y peras. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Recuperado en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_produccion-mundial-de-manzanas-y-peras\\_0.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_produccion-mundial-de-manzanas-y-peras_0.pdf). Consultado el 26 de septiembre de 2018.

Torres, C., Latorre, B.A., Undurraga, P., and Besoain, X. 2013. Evaluation of DMI fungicides against species of *Diplodia* and *Neofusicoccum* associated with *Botryosphaeria* canker of grapevine. *Cien. Inv. Agr* 40(1): 131-138.

Úrbez-Torres, J.R., Boule, J., and O’Gorman, D.T. 2016. First Report of *Diplodia seriata* and *Diplodia mutila* causing apple dieback in British Columbia. *Plant Disease* 100:1243.

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

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.M., Latorre, B.A., and Rosales, 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* 103:996-1005.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: *PCR, A Guide to Methods and Applications*. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA.