



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

Identificación de aislados de *Neofusicoccum arbuti* asociado a cancrrosis y muerte regresiva en manzanos

MEMORIA DE TÍTULO

CATALINA ROJAS RIQUELME

TALCA – Chile

2020

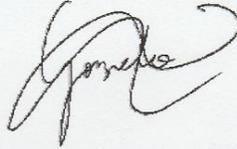
CONSTANCIA

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, 2020

Aprobación:

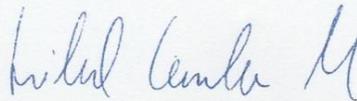


Profesor Guía: Ing. Agr. Mg. Cs. Dr. Gonzalo A. Díaz

Profesor Asistente

Escuela de Agronomía

Facultad de Ciencias Agrarias



Profesor informante: Ing. Alim. PhD. Anibal Concha M.

Profesor Asistente

Escuela de Agronomía

Facultad de Ciencias Agrarias

Fecha de presentación de Memoria de Título de 14 enero de 2020

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia ya que han sido muy importantes en este proceso, y siempre me han dado su apoyo durante estos años de estudio.

Agradezco a todos los funcionarios del Laboratorio de Patología Frutal por ayudarme a llevar a cabo este estudio.

Agradezco a mi profesor guía Gonzalo A. Díaz, por su tiempo, apoyo y dedicación durante este estudio.

Y a todas las personas que formaron parte de mi vida durante este proceso, y que hicieron muy ameno mi paso por la Universidad.

RESUMEN

Chile es uno de los principales países exportadores de manzanas (*Malus x domestica* Borkh.) de calidad en el hemisferio sur, con una superficie de 32.370 hectáreas plantadas. La Región del Maule, es la principal zona de producción, debido a que es la mayor de superficie plantada y productiva (60% del total nacional) con 19.636 hectáreas. Sin embargo, la producción se ve afectada por diversos problemas, destacándose por el impacto que generan las enfermedades causadas por hongos. Entre los problemas fungosos, la cancrrosis y muerte regresiva de manzano durante los últimos años es cada vez más recurrente en los huertos comerciales de manzanas. La única especie descrita causando muerte regresiva en manzanos en Chile es *Botryosphaeria dothidea*, estudio realizado en el año 1984. 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 especies de la familia Botryosphaeriaceae a través de una caracterización cultural, morfológica y molecular de aislados obtenidos desde brazos enfermos. Además, se determinó la patogenicidad en ramillas y frutos de los cvs. Cripps Pink y Fuji. Los resultados indican que a través de características culturales, morfológicas y moleculares se identificaron seis aislados como *Neofusicoccum arbuti*. Todos los aislados causaron lesiones necróticas en ramillas y pudrición en frutos, después de 60 y 7 días de incubación. Finalmente, este trabajo constituye la primera descripción y caracterización de aislados de *N. arbuti* causando muerte regresiva en manzanos obtenidos en la Región del Maule y de la Región de la Araucanía en Chile.

ABSTRACT

Chile is one of the main exporting countries of fresh apples (*Malus x domestica* Borkh.) in the southern hemisphere, with an area of 32,370 hectares planted. The Maule Region is the main production area, with 19,636 hectares (60% total area). However, the production of apples is affected by various problems, highlighting the impact generated by fungal diseases in the orchards as during storage. In recent years, the prevalence of apple trees with cankers and dieback has been observed recurrently in the Chilean apple orchards. The only specie described causing cankers and dieback in apple trees in Chile is *Botryosphaeria dothidea*, study carried out in 1984. Therefore, the objective of this work was to identify species of the Botryosphaeriaceae family through a cultural, morphological and molecular characterization of isolates obtained from diseased arms. In addition, the pathogenicity on twigs and fruits of the cvs. Cripps Pink and Fuji, was determined. The results indicate that the six isolates were identified as *Neofusicoccum arbuti* through cultural, morphological and molecular characteristics. All isolates caused necrotic lesions on twigs and rot in fruits, after 60 and 7 days of incubation. Finally, this work constitutes the first description and characterization of *N. arbuti* isolates causing cankers and dieback in apple trees obtained from the Maule Region and the Araucanía Region in Chile.

INDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis de trabajo.....	2
1.2. Objetivo general.....	2
1.3. Objetivos específicos	2
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Características del manzano	3
2.2. Situación en Chile.....	3
2.3. Enfermedades del manzano causadas por hongos.....	5
2.4. Familia Botryosphaeriaceae	6
III. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1. Lugar de estudio	9
3.2. Aislados del hongo <i>Neofusicoccum arbuti</i>	9
3.3. Inoculación de frutos de manzano.....	11
3.4. Inoculación de ramillas de manzano	12
3.5. Identificación morfológica y molecular de la especie.....	10
3.6. Diseño experimental y análisis estadístico.....	13
IV. RESULTADOS	14
V. CONCLUSIÓN	25
VI. BIBLIOGRAFÍA	26

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 3.1. Aislados fungosos de Botryosphaeriaceae obtenidos desde brazos de manzanos cvs. Cripps Pink y Fuji con síntomas de muerte regresiva en diferentes zonas de Chile.....8

Cuadro 4.1. Dimensiones de conidias (μm) de seis aislados de *Neofusicoccum arbuti* obtenidos desde brazos de manzano con muerte regresiva.....14

Cuadro 4.2. Lesiones en ramillas (mm) inoculadas con trozo de micelio de aislados de *Neofusicoccum arbuti*, incubados por 60 días a 20°C.....17

Cuadro 4.3. Lesiones en frutos inoculados (mm) con trozo de micelio de aislados de *Neofusicoccum arbuti*, incubados por 7 días a 20°C.....20

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 3.1. Inoculación de frutos de manzanas cv. Cripps Pink, mediante micelio de aislados de <i>Neofusicoccum</i> sp.	11
Figura 3.2. Inoculación de ramillas de manzano cv. Cripps Pink, mediante micelio de aislados de <i>Neofusicoccum</i> sp.	12
Figura 4.1. Crecimiento de la colonia de <i>Neofusicoccum arbuti</i> (Bot-2018-NA58) después de 5 días de incubación a 20°C en medio de cultivo APD (2%).....	13
Figura 4.2. Conidias fusiforme, unicelulares de base truncada y ápice obtuso de <i>Neofusicoccum arbuti</i> (Bot-2018-NA12) obtenida desde picnidios formados después de 14 días de incubación a 20°C en medio APD (2%) con luz UV.....	14
Figura 4.3. Árbol filogenético de máxima parsimonia de secuencias concatenadas de los genes ITS + BT + FE 1-alfa de seis de aislados de <i>Neofusicoccum arbuti</i> obtenidos desde brazos con muerte regresiva en Chile. *Aislados Chilenos obtenidos en el presente estudio.....	16
Figura 4.4. Lesión en ramillas causada por <i>Neofusicoccum arbuti</i> en cvs. Fuji (A) y Cripps Pink (B), después de 60 días de incubación a 20°C.....	17

Figura 4.5. Largo de la lesión necrótica en ramillas cvs. Cripps Pink y Fuji inoculados con trozo de micelio de seis aislados de *Neofusicoccum arbuti*, después de 7 días de incubación a 20°C.
.....19

Figura 4.6. Lesión externa e interna desarrollada en frutos inoculados con micelio de *Neofusicoccum arbuti* (Bot-2108-NA58) en cvs. Cripps Pink (A) y Fuji (B), después de 7 días de incubación a 20°C.....20

Figura 4.7. Lesión necrótica en frutos cvs. Cripps Pink y Fuji inoculados con trozo de micelio de seis aislados de *Neofusicoccum arbuti*, después de 7 días de incubación a 20°C.....21

I. INTRODUCCIÓN

En Chile, la fruticultura se centra principalmente en la producción de vid de mesa, con 15,3% de participación; nogales, con 12,4 %; paltos, con 9,5%; manzanos rojos con 9,2%; cerezos, con 8% y olivos, con 6,9%. Las regiones con mayor superficie frutícola de Chile son: en primer lugar la Región de O'Higgins con un 24,5% de superficie, seguida por la Región del Maule (21%), y Región Metropolitana (16,6%). La superficie de manzanos (*Malus x domestica* Borkh.) a nivel nacional es de aproximadamente 32.370 ha, concentrándose en la Región del Maule con un superficie cercana a las 19.636 hectáreas, equivalente a un 60% de la superficie nacional (Odepa, 2019).

Mundialmente Chile participa con un 1,5 % de la producción mundial de manzanos, con una superficie del 0,7 %, ocupa el lugar undécimo. El país que lidera la producción de manzanas es China, principal productor con un 44,4% de la producción mundial total, seguida por Estados Unidos (6,3%) y Turquía (3,9%) (Bravo, 2011).

La calidad y productividad en el cultivo de manzanos se ve afectado en nuestro país, debido a enfermedades causado por hongos, entre las cuales se destacan por su importancia (Acuña, 2010); la sarna del manzano causado por *Venturia inaequalis*, cancro europeo del manzano asociado a *Neonectria ditissima*, y cancrrosis y muerte regresiva de la madera, asociada a *Botryosphaeria dothidea* (Latorre, 2004).

Últimamente a nivel mundial el manzano se ve afectada por la muerte regresiva de brazos y ramillas 'cancrosis', que es producida por especies de la familia Botryosphaeriaceae, dentro de esta familia se han identificado especies que pertenecen a los géneros *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Neofusicoccum* y *Lasiodiplodia* (Delgado-Cerrone et al., 2016).

Botryosphaeria y *Neofusicoccum* son patógenos endófitos, oportunistas, que inducen cancrros en tronco y ramas, muerte regresiva 'dieback', pudrición de frutos, pudrición del cuello y dumping-off en plántulas (Mohalit et al., 2006; Slippers y Wingfield, 2007). Recientemente se han identificado a especies del género *Diplodia* como *D. seriata* y *D. mutila* en manzanos causando muerte regresiva en British Columbia, Canadá (Úrbez-Torres et al., 2016). En Uruguay se han descrito a las especies *N. parvum* y *N. luteum* pertenecientes al género *Neofusicoccum*, asociados a muerte regresiva en manzanos (Delgado-Cerrone et al., 2016).

En Chile se han descrito a varias especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae afectando a diferentes especies frutales como *D. seriata* en vides (Díaz et.al., 2011), *D. mutila*

en nogales (Díaz et al., 2018) y especies como *N. arbuti*, *N. australe*, y *N. parvum* afectando a plantas de arándano (Espinoza et al., 2009), entre otros.

Debido a un aumento de la presencia de plantas de manzano con muerte regresiva en la Región del Maule y a que solo se ha descrito como causante de muerte regresiva a *Botryosphaeria dothidea*, por estudio realizado en el año 1984 (Latorre y Toledo, 1984), y a la reciente descripción de *D. seriata* causando muerte regresiva en manzanos en la Región del Maule (Herrera, 2018), se hace necesario expandir los estudios de los agentes causales asociados a canchros y muerte regresiva en manzanos a nivel nacional. Por lo tanto a continuación se plantea la hipótesis y objetivos del presente estudio:

1.1. Hipótesis de trabajo

Entre las especies de la familia Botryosphaeriaceae asociadas a la muerte regresiva en manzanos se encuentran representantes del género *Neofusicoccum*.

1.2. Objetivo general

Identificar aislados de *Neofusicoccum arbuti* obtenidos desde manzanos con muerte regresiva

1.3. Objetivos específicos

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

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

Determinar la patogenicidad de aislados de *Neofusicoccum* causando lesiones en ramillas y en frutos.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características del manzano

El cultivo del manzano tiene sus orígenes en Asia central. Su ancestro es *Malus sieversii*, especie que proviene de Tien Shan (montañas celestiales), que se localiza en China, ex USSR y Asia central (Janick, 2011).

El manzano *Malus x domestica* Borkh. pertenece a la Familia: Rosácea, Subfamilia: Pomoidea, esta es una de las especies, de mayor difusión a escala mundial. Por su facilidad de adaptación a diferentes climas y suelos, su potente valor alimenticio y terapéutico, calidad y diversidad de productos que se obtienen en la industria transformadora (Merlet et al., 2016).

En plantas de semillas, poseen una raíz que es pivotante y profunda en el suelo, pero en estacas, acodo o estaquillas tienen varias raíces principales alrededor del tronco, este puede alcanzar hasta 10 metros de altura, posee una copa globosa, y tiene un tronco recto, que puede llegar a los 2,5 m de altura. La corteza de las partes de más edad del árbol es escamosa y de color grisáceo (Cerezo, 2014). Las hojas son ovaladas, cortamente acuminadas, aserradas, con dientes obtusos, blandas, con el haz verde claro, de doble longitud que el pecíolo, con 4-8 nervios alternados y bien desarrollados. Posee flores que son grandes, casi sentadas o cortamente pedunculadas, Son hermafroditas, de color rosa pálido, a veces, blancas y en número de 3-6 unidas en corimbo. El fruto es un pomo; según su forma puede ser achatada y/o redondeada. Esto dependerá de la variedad a la cual pertenece el fruto (Cerezo, 2014).

2.2. Situación en Chile

Los principales productores de manzana son China, con 44,4% de ella, seguida por Estados Unidos (6,3%), Turquía (3,9%), Polonia (3,7%), Irán (3,4%) e Italia (3,2%). Chile, a pesar de tener sólo 0,7% de la superficie mundial, participa con 1,5% de la producción mundial, ocupando el lugar 11 entre los principales productores. Sólo alrededor de 10,8% de la producción mundial de manzanas se transa en los mercados internacionales, ya que los mayores productores, en particular China, India e Irán, concentran su producción para abastecer la demanda interna de sus países. Por lo tanto la importancia de Chile, radica en ser el principal exportador de manzanas del Hemisferio Sur en contra-estación (Grau, 2013).

La superficie de manzanos en Chile es de aproximadamente 32.370 ha, concentrándose en la Región del Maule con un superficie cercana a las 19.636 ha (Odepa, 2019).

Dentro de las principales variedades rojas producidas en la región se encuentran: Galas, Fujis, Cripps Pink, las cuales poseen una superficie en hectáreas de 9.215, 3.523, 1.966 respectivamente, y dentro de las variedades verdes la principal es Granny Smith con una superficie de 3.301 hectáreas (Quiroz, 2017).

2.3. Características de principales variedades rojas

Dentro de las principales variedades producidas a nivel mundial se encuentra Royal Gala, la cual fue obtenida, por el cruzamiento entre Kidd's Orange Red y Golden Delicious en Nueva Zelanda en el año 1939. Esta variedad tiene características como ser medianamente a muy vigorosa, ser poco sensible a la alternancia, y es muy productivo y de rápida entrada en producción, siempre que se mantenga el equilibrio del árbol entre vegetación y fructificación (Benítez, 2001).

Su fruto es de forma tronco-cónica, con el cáliz cerrado y el pedúnculo largo; de tamaño medio, con 170 a 180 gramos de peso y 65 a 75 mm de calibre. El color de fondo que en un inicio es verde claro, se vuelve casi blanco cuando se acerca el momento óptimo de cosecha y luego se va tornando más amarillo a medida que avanza la madurez (Benítez, 2001).

Otro importante cultivar es Fuji la que fue obtenida en 1939 por la National Fruit Research Station de Morioka, Japón, mediante un cruzamiento entre Ralls Janet y Red Delicious, su fruto es redondo, de mediano a grande, de 200 a 250 gramos de peso, con mayoría de calibres ubicados entre 75 y 85 mm, con una epidermis de color rojo brillante de aparición tardía, sobre el 25 al 50% de la superficie del fondo verde claro (Benítez, 2001).

El hábito de crecimiento de esta especie es con ramas vigorosas y un eje con escasa dominancia apical, por lo cual necesita estructura en cualquier portainjerto para una adecuada producción (Galdames y Mesa, 2013).

También con una gran superficie de producción se encuentra el cultivar Cripps Pink, el cual es producto de un cruzamiento entre Lady Williams y Golden Delicious, obtenida por John L. Cripp's en 1979, en la Horticultural Research Station of Stoneville, Australia, su fruto es cilíndrico-cónico, de mediano a grande tiene un peso de 185 a 200 gramos, de calibre 80 a 85 mm, y posee un color rojo luminoso (Benítez, 2001). Este es un árbol productivo, estable, de

vigor medio, de fácil formación y conducción, presenta buena ramificación en el eje, con buenos ángulos de salida, y logra adaptarse a una gran variedad de portainjertos (Galdames y Mesa, 2013).

2.4. Enfermedades del manzano causadas por hongos

Las principales enfermedades en manzano son : la sarna del manzano causado por *Venturia inaequalis*, cancro europeo del manzano asociado a *Neonectria ditissima*, y cancrrosis y muerte regresiva de la madera, asociada a *Botryosphaeria dothidea*, entre otras enfermedades (Acuña, 2010; Latorre, 2004; Latorre y Toledo, 1984).

La sarna del manzano causada por el hongo *Venturia inaequalis*. Esta especie de *Venturia* produce síntomas que afectan tanto a hojas como frutos. Estos son lesiones de color verde y que tienen una apariencia aterciopelada tanto en hojas y frutos, durante la temporada estas adquieren un color marrón a negro (Latorre, 2004). Es sin lugar a duda una de las principales enfermedades que afectan a los manzanos a nivel mundial, y Chile no es la excepción. Es una enfermedad que necesita de la aplicación de fungicidas en los huertos productivos, por estar expuestos a las precipitaciones (agua libre) y temperaturas medias, que son propicias y que se producen en Chile. Ambos factores son esenciales en la epidemiología asociada a la sarna del manzano (Latorre, 2004; Sutton et al., 2014). Recientemente, se describió problemas de resistencia en aislados de *Venturia* a fungicidas como trifloxiestrobil en la Región del Maule. La época crítica de protección es desde puntas verdes a frutos cuajado, para posterior seguir con la protección preventiva o curativa según condiciones climáticas (agua libre) hasta la cosecha (Latorre, 2018).

El cancro europeo del manzano, es otra enfermedad que es muy recurrente en Chile. Esta enfermedad esta asociado a la especie fungosa *Neonectria ditissima*. El cancro europeo del manzano genera necrosis de ramillas del año, cancrros (lesiones elípticas), en donde estas lesiones se pueden extender en toda la estructura de la rama o el tronco, causando un anillamiento completo de la estructura, y como consecuencia provocar la muerte del tronco, brazos y ramillas (Pinilla, 2013). El tejido que se encuentra afectado, comienza a tener una consistencia papirácea, a medida que se forman los cancrros. En zonas altamente lluviosas puede existir una alta incidencia de la enfermedad, ya que el hongo necesita agua libre para reproducirse (Sutton et al., 2014). De otra forma, los huertos localizados de Chillán al sur de Chile, tienden a presentar mayores niveles de cancro europeo.

La canchrosis y muerte regresiva de la madera en manzanos es otra enfermedad que fue descrita en el año 1984 a nivel nacional (Latorre y Toledo, 1984) y esta asociada a *B. dothidea*, presenta síntomas que afectan principalmente a ramas y ramillas de plantas jóvenes y adultas, las ramillas afectadas por esta enfermedad, adquieren una tonalidad marron-anarajada, y también abundantes picnidios que en su interior poseen conidias (Sutton et al., 2014). Las condiciones necesarias para que este hongo pueda ingresar a su hospedero, son heridas, y las conidias necesitan precipitaciones, y viento para poder dispersarse (Álvarez et al., 2004).

2.5. Familia Botryosphaeriaceae

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

Esta familia está compuesta por 17 géneros que se pueden reconocer filogenéticamente (Phillips et al., 2013), y son considerados como hongos fitopatógenos oportunistas, que generalmente se desarrollan en tallos leñosos muertos y en madera, en donde estos actúan como patógenos latentes, y producen daño en las plantas cuando se encuentran estresadas (Alves et al., 2013).

Las especies de esta familia se distribuyen cosmopolita y con gran cantidad de hospederos, es por esto que se han presentado múltiples hospederos como leñosos que incluyen vides, olivos, eucaliptos, robles, pinos, entre otros. Las especies fungosas de Botryosphaeriaceae se han descrito causando pudrición de frutas, manchas en las hojas, pudrición de semillas y en el cuello, canchros, tizón de brotes y plántulas, gomosis, muerte regresiva y completa del árbol afectado (Alves et al., 2013; Delgado-Cerrone et al., 2016; Díaz et al., 2019a; Díaz et al., 2019b; Montealegre et al., 2016).

2.6. Cancros de la madera y muerte regresiva de brazos en manzano por Botryosphaeriaceae

Dentro de la familia Botryosphaeriaceae, hay varios géneros que han sido descritos por estar asociados a plantas de manzanos con muerte regresiva de brazos y ramillas (Delgado-Cerrone et al., 2016; Úrbez-Torres et al., 2016). Es más, en un trabajo realizado en Uruguay, se describieron varias especies que pertenecen a los géneros *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Neofusicoccum* y *Lasiodiplodia* (Delgado-Cerrone et al., 2016). En Canadá, se describió a *Diplodia mutila* y *D. seriata* causantes de muerte regresiva en manzanos (Úrbez-Torres et al., 2016).

En Chile solo ha sido identificada la especie *B. dothidea* produciendo la enfermedad sobre las ramillas, ramas principales y tronco de los manzanos (Latorre y Toledo, 1984). Sin embargo, solo recientemente, se ha aislado e identificado a la especie *Diplodia seriata* asociados a manzanos con canchros y muerte regresiva en la Región del Maule (Herrera, 2018; Díaz et al., 2019b).

Los síntomas que produce esta especie son canchros alargados, con aspecto papiliforme, anaranjado, áspero y hendido en ramillas, ramas y tronco, con muerte parcial de ramas y ramillas. Los tejidos enfermos desarrollan abundantes picnidios, que exudan “cirrus” blanquecinos en presencia de agua libre, para que las conidias se diseminen por el salpicado de las precipitaciones y viento (Latorre, 2004). Es más, *D. seriata* y *D. mutila*, han sido descritas causando pudriciones de manzanos durante precosecha en Chile (Díaz et al., 2019a). Estas Botryosphaeriaceae logran infectar los frutos con heridas (labores culturales; insectos plagas) produciendo lesiones de color pardo oscuro, que se ablandan unos 15 días a temperatura ambiente, presentando en su superficie una gran cantidad de picnidios. Es por esto que los frutos momificados en el árbol como los frutos enfermos dejados en el suelo de los huertos, junto con los restos de poda y ramillas enfermas son considerados fuentes de inóculo debido a la gran cantidad de picnidios que poseen estas estructuras del manzano (Díaz y Lolas, 2016).

2.6 Características del género *Neofusicoccum*

Otra especie perteneciente a esta familia, es *Neofusicoccum*, al igual que otros miembros de Botryosphaeriaceae, es un patógeno considerado débil por necesitar de alguna herida o que la planta esté estresada para poder desarrollar la infección (Sutton et al., 2014). Cuando se estresa un árbol infectado, *N. arbuti* causa el desarrollo de canchros en el tallo principal estos pueden aparecer abiertos o parcialmente callosos (McGregor, 2016).

En Chile el género de *Neofusicoccum* ha sido identificado en diversos cultivos causando síntomas de muerte regresiva en la madera de brazos o troncos de especies frutales como arándanos donde se identificaron las especies *N. arbuti*, *N. australe*, *N. nonquaesitum* y *N. parvum* (Espinoza et al., 2009; Pérez et al., 2014), en paltos a las especies *N. australe*, *N. nonquaesitum* y *N. parvum*, y en vides se describieron a *N. australe* y *N. parvum* (Besoain et al. 2013; Díaz et al. 2011). En araucarias, la especie *N. nonquaesitum* fue identificada como causante de la enfermedad de muerte regresiva (Pérez et al. 2018).

Las especies pertenecientes al género *Neofusicoccum* que se han encontrado en arándanos, se encuentran asociadas a plantas con canchros que desarrollan síntomas que se caracterizan por la presencia de lesiones necróticas de color marrón rojizo que se extienden, desde la base de las cañas hasta la corona en las plantas afectadas (Espinoza et al., 2009). Durante la primavera y el verano, los síntomas a menudo se observan sólo en un lado de la plantas, asociado a la muerte de ramillas y de cañas. Las cañas que se encuentran afectadas por *Neofusicoccum* presentan lesiones internas con decoloración vascular (Espinoza et al., 2009).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Patología Frutal, adjunto a la Facultad de Ciencias Agrarias, ubicado en el Campus Talca de la Universidad de Talca, Talca, Chile.

3.2. Aislados del hongo *Neofusicoccum* sp.

Se utilizaron seis cultivos puros de aislados fungosos de la especie *Neofusicoccum* sp. (Cuadro 3.1). Previamente, los aislados se obtuvieron desde muestras de brazos con síntomas de muerte regresiva en huertos de manzanos. El aislamiento de las especies fungosas se realizó desde la siembra de trozos de madera (5 mm) en placas de Petri (88 mm) con medio de cultivo agar papa dextrosa (ADP, 2%) modificado (APDM) con antibióticos e Igepal (Díaz y Latorre, 2014)

Cuadro 3.1. Aislados fungosos de Botryosphaeriaceae obtenidos desde brazos de manzanos cvs. Cripps Pink y Fuji con síntomas de muerte regresiva.

Aislado	Cultivar	Procedencia
Bot-2017-NA5	Cripp Pink	Los Niches
Bot-2018-NA12	Cripp Pink	Curicó
Bot-2018-NA32	Cripp Pink	Los Niches
Bot-2108-NA58	Fuji	Rio Claro
Bot-2018-NA64	Fuji	Camarico
Bot-2018-NA82	Cripps Pink	Temuco

Estos seis cultivos del hongo fueron replicados en nuevas placas de Petri con medio de cultivo APD (2%), y multiplicados cada 7 días para obtener y disponer de cultivos activos en forma permanente a temperatura ambiente (20°C).

3.3. Identificación morfológica

En la identificación morfológica, se observó el crecimiento de los seis aislados, que se encontraban en medio de cultivo APD, los cuales se caracterizaron y midieron conidias, para poder determinar el agente causal, basado en estudios previos de Phillips et al. (2013) y Úrbez-Torres et al. (2006). Con este propósito, los cultivos fueron examinados semanalmente por la formación de picnidios y conidias en los cultivos expuestos a luz U.V por 15 días a 20°C. Las conidias, fueron obtenidas desde picnidios, caracterizando forma (ovoide, fusiforme), color, presencia o ausencia de septas en morfología (Phillips et al., 2013; Úrbez-Torres et al., (2006). Una vez obtenidas las conidias, se procedió a medir el largo y ancho de 40 conidias por cada uno de los aislados utilizando un microscopio óptico (Leica, DM500, Wetzlar, Alemania), con cámara incorporada Moticam 5, utilizando el programa Motic Image Plus 2.0 (Moticam 5 MP, Xiamen, China).

3.4 Identificación molecular

Para la identificación molecular se realizó la obtención de ADN fungoso a partir de cultivos puros, obteniendo un trozo de micelio de cada aislado utilizando la metodología propuesta por Espinosa (2016). Brevemente, se realizó una extracción en frío, con nitrógeno líquido y molienda física del tejido fungoso (pistilo y mortero), utilizando un kit de extracción comercial de ADN (Wizard® Genomic DNA Purification Kit – Promega).

Posterior a esto se utilizó un termociclador para realizar la amplificación del ADN del gen de la región 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 Espinosa (2016), mediante la técnica de reacción cadena polimerasa (PCR), utilizando el termociclador Veriti™ 96-Well (Applied Biosystem; Thermo Fisher Scientific, Singapur). Para verificar el éxito de la extracción de ADN, se realizó una electroforesis mediante un gel de agarosa (2%) en buffer TAE al 1%. Luego de que las bandas de las muestras amplificadas con los genes fueron observadas en el trasluminizador, los tubos eppendorf con los productos PCR de cada aislado y cada gen, fueron enviados para su purificación y secuenciación a Macrogen (www.macrogen.com, Seúl, República de Corea del Sur).

Luego de obtener la secuenciación se utilizó el programa Bioedit (v. 7.1.3.0; Tom Hall, Isis Pharmaceutical Inc. E.E.U.U), el cual permitió editar las secuencias, eliminando las colas de los nucleótidos fuera de los partidores, obteniendo una secuencia de consenso. Estas secuencias de consenso se compararon con secuencias depositadas en el GenBank mediante el alineamiento básico de secuencias (Blastn) del NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine). La identificación de la especie se realizó cuando se obtuvo >97% de similitud con las especies depositadas en la base de datos del GenBank.

Para el análisis filogenético, las secuencias de consenso desde los 6 aislados fueron sometidas a una prueba de máxima parsimonia con 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 la prueba de máxima parsimonia (MP) para todos los análisis, con 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 tipos 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).

3.4. Inoculación de frutos de manzano

Frutos (n=60) de los cultivares Cripps Pink y Fuji, se obtuvieron desde huertos comerciales de localizados en San Clemente (Compañía Casas Patronales) y Longaví (Compañía Verfrut), respectivamente, Región del Maule, Chile. Para realizar este procedimiento, los frutos de los cvs. Cripps Pink y Fuji fueron superficialmente desinfectados con etanol al 75% y lavados con agua destilada estéril. A continuación los frutos se colocaron en mesones con papel absorbente a una temperatura de 20°C por 2 horas. Luego del secado, a cada fruto de manzana se le realizó en la zona ecuatorial una herida superficial de 5-mm de diámetro con un sacabocado de acero inoxidable estéril. Sobre la herida se colocó un trozo de agar de 5-mm diámetro con crecimiento micelial de *Neofusicoccum* de 5 días. Una vez inoculado, la zona de las heridas de los frutos, fueron selladas con parafilm y estos fueron colocados en una caja de exportación de manzanas a temperatura ambiente (20°C) por 7 días. Después del tiempo de incubación, se procedió a medir diámetro del daño producido por el hongo, con el calibrador digital Vernier (serie 500 Absolute digimatic, Mitutoyo America Corporation, E.E.U.U). También se procedió a

realizar el re-aislamiento del hongo, tomando trozos desde la zona de avance del daño (pudrición) en el fruto y colocandolos en placas de Petri con medio de cultivo agar-papa-dextrosa (APD, 2%), para comprobar que el hongo recuperado sea la misma especie con que se inoculó el fruto.



Figura 3.1. Inoculación de frutos de manzanas cultivar Cripps Pink mediante micelio de aislados de *Neofusicoccum* sp.

3.5. Inoculación de ramillas de manzano

En este procedimiento se seleccionaron ramillas lignificadas de dos años cv.Cripps Pink y Fuji, libre de enfermedades y plagas, que provenían de un huerto comercial ubicado en la ciudad de Curicó. Las ramillas seleccionadas tenían una longitud de 40 cm, y en su extremo distal se realizó un corte en bisel con tijera de podar. Las ramillas se colocaron en forma vertical sobre cajas plásticas con sustrato perlita, y se enterraron unos 10 cm en profundidad. Inmediatamente después de colocadas las ramillas, estas se inocularon en la zona distal con un trozo de agar de 5- mm de diámetro de crecimiento micelial de cada aislado de *Neofusicoccum*, que fueron obtenidos después de 5 días de crecimiento a 20°C (Figura 3.1). Post-inoculación, las ramillas fueron mantenidas en un ambiente de 80% HR a una temperatura de incubación de 20 - 22 ° C por 2 meses. Después de transcurridos el tiempo de incubación, a cada ramilla se le determinó el largo de la lesión (mm) utilizando un calibrador digital Vernier (serie 500 Absolute digimatic, Mitutoyo America Corporation, E.E.U.U). El re-aislamiento se realizó sembrando trozos de lesiones obtenidos desde las ramillas inoculadas en placas de Petri con medio de cultivo APD incubados por 5 días a 20°C.



Figura 3.2. Inoculación de ramillas de manzano cv. Cripps Pink, mediante micelio de aislados de *Neofusicoccum* sp.

3.6. Diseño experimental y análisis estadístico

En el ensayo de frutos inoculados, se utilizó un diseño completamente al azar. La unidad experimental correspondió a 60 frutos (30 frutos de la variedad Cripps pink, y 30 Fuji), se emplearon cinco repeticiones de cada variedad por 12 tratamientos. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de los promedios con un nivel de significancia de $p < 0,05$, y seguido de una prueba de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$) usando el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.2.

En el ensayo de ramillas inoculadas se utilizó un diseño completamente al azar. La unidad experimental correspondió a 84 ramillas, (42 ramillas de la variedad Cripps Pink, y 42 Fuji) se emplearon siete repeticiones de cada variedad por 12 tratamientos. En caso de existir diferencias entre los promedios se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de los promedios con un nivel de significancia de $p < 0,05$, y seguido de una prueba de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$) usando el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.2.

IV. RESULTADOS

4.1 Identificación morfológica

Los seis aislados obtenidos en el presente trabajo, desarrollaron en medio de cultivo APD (2%), colonias inicialmente 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) (**Figura 4.1**). A partir de 14 días de incubación a 20°C con luz UVA (320 nm), los seis aislados en los medios de cultivos en 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 21,4 µm de largo y 6,7 µm de ancho, con una relación de L/A = 3,2 (**Cuadro 4.1** y **Figura 4.2**).



Figura 4.1. Crecimiento de la colonia de *Neofusicoccum arbuti* (Bot-2018-NA58), después de 5 días de incubación a 20°C en medio de cultivo APD (2%).

Cuadro 4.1. Dimensiones de conidias (µm) de seis aislados de *Neofusicoccum arbuti* obtenidos desde brazos de manzano con muerte regresiva.

Especie/Aislado	Dimensiones (µm)		
	Largo (L)	Ancho (A)	L/A
<i>Neofusicoccum arbuti</i>			
Bot-2017-NA5	(15,3-) 19,6 ± 2,3 (-25,0)	(3,4-) 4,9 ± 0,7 (-6,2)	3,9
Bot-2018-NA12	(20,3-) 24,4 ± 2,1 (-28,7)	(6,4-) 8,8 ± 0,9 (-10,3)	2,7
Bot-2018-NA32	(18,7-) 22,5 ± 1,6 (-25,9)	(5,3-) 6,2 ± 0,5 (-7,4)	3,6

Bot-2108-NA58	(16,4-) 19,3 ± 1,3 (-21,9)	(6,1-) 7,1 ± 0,5 (-8,0)	2,7
Bot-2018-NA64	(17,7-) 20,4 ± 1,6 (-24,2)	(5,6-) 6,4 ± 0,4 (-7,2)	3,2
Bot-2018-NA82	(19,1-) 22,3 ± 1,7 (-25,4)	(5,9-) 6,9 ± 0,4 (-7,7)	3,2
Promedio	21,4	6,7	3,2
B03-07²	22,9	7,1	3,3

¹ Dimensiones= (dato mínimo-), promedio ± desviación estándar (-dato máximo).

² Aislado B03-07 de *N. arbuti* asociado a la muerte regresiva de ramillas en arándanos (Espinoza et al., 2009).



Figura 4.2. Conidias fusiforme, unicelulares de base truncada y ápice obtuso de *Neofusicoccum arbuti* (Bot-2018-NA12) obtenida desde picnidios formados después de 14 días de incubación en APD (2%) con luz UV.

4.2 Identificación molecular

Referentes a la identificación molecular, en los seis aislados pertenecientes a la familia de Botryosphaeriaceae, se logró obtener ADN utilizando la metodología utilizada. 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 FE1-alfa, respectivamente. A partir de las secuencias recibidas desde Macrogen (Corea del Sur), las secuencias de complementaron y editaron para obtener las secuencias de consenso de los seis aislados de *N. arbuti*. Estas secuencias de

concenso obtuvieron entre 99 a 100% de similitud en el análisis de Blast (GenBank) con el aislado extype de *N. arbuti* (CBS 116131).

Las secuencias de Botryosphaeriaceae no fueron significativas según la prueba de partición de homogeneidad, por lo tanto, las secuencias de los tres genes que incluyen ITS + BT + FE1-alfa pueden combinarse en el análisis de máxima parsimonia. El análisis mostró que los seis aislados de *Neofusicoccum* se agruparon en el mismo clado que la especie extype de *N. arbuti* CBS 116131, obteniendo un 100 de soporte en este clado (Figura 4.3).

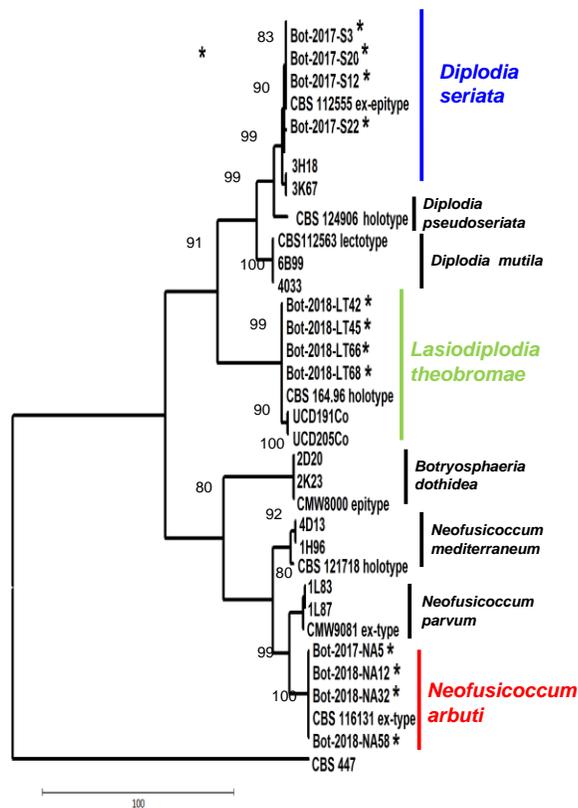


Figura 4.3. Árbol filogenético de máxima parsimonia de secuencias concatenadas de los genes ITS + BT + FE 1-alfa de los seis de aislados de *Neofusicoccum arbuti* obtenidos desde brazos con muerte regresiva en Chile. *Aislados Chilenos obtenidos en el presente estudio.

4.3 Inoculación de ramillas con micelio

Después haber transcurrido 60 días de incubación a 20 °C, desde las ramillas inoculadas con los seis aislados de *N. arbuti* se observaron lesiones necróticas en todas las ramillas inoculadas (Figura 4.4). Estadísticamente, las lesiones asociadas en las ramillas no dependen de la interacción entre factor aislado y el factor cultivar, al no existir interacción, ambos factores se deben analizar por separado (Cuadro 4.2). El promedio de las lesiones necróticas fue significativamente mayor en las ramillas inoculadas del cultivar Fuji (lesión promedio 115,7 mm), en comparación con el promedio del largo de la lesión en ramillas del cultivar Cripps Pink (lesión promedio 72,1 mm) (Figura 4.5 A). En el caso de los aislados, se detectó diferencias significativas entre ellos (Cuadro 4.2 y Figura 4.5 B).

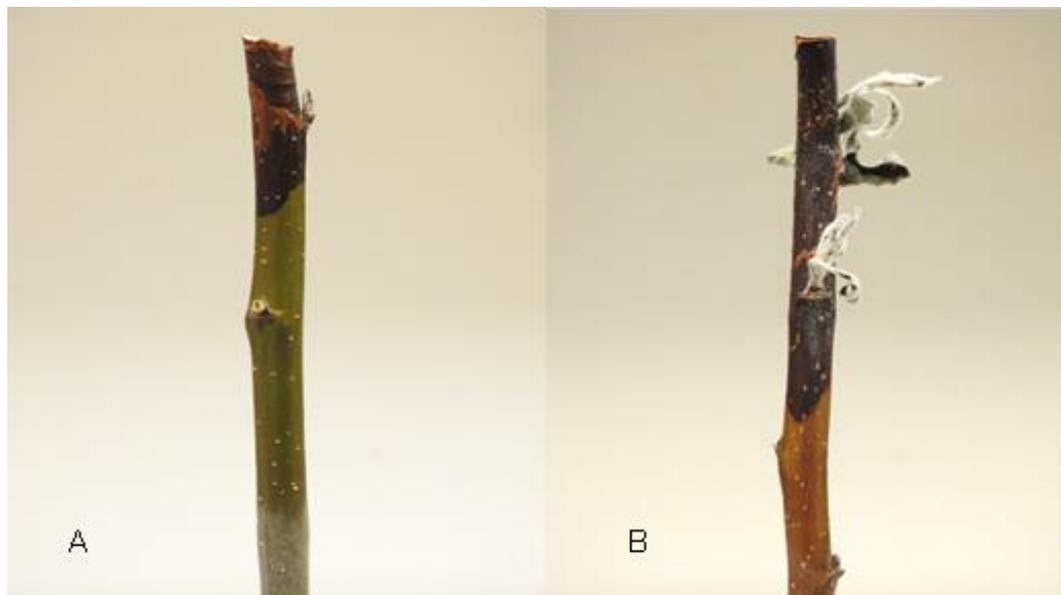


Figura 4.4. Lesión necrótica en ramillas inoculada con micelio de *Neofusicoccum arbuti* (aislado Bot-2018-NA12) en cvs. Cripps Pink (A) y Fuji (B), después de 60 días de incubación a 20°C.

Cuadro 4.2. Lesiones en ramillas (mm) inoculadas con trozo de micelio de seis aislados de *Neofusicoccum arbuti*, después de 60 días de incubación a 20°C.

Lesión necrótica (mm)			
Aislado	Cripps Pink	Fuji	Promedio
Bot-2017-NA5	88,7	139,9	114,3 a
Bot-2018-NA12	70,5	113,3	91,9 ab
Bot-2018-NA32	74,7	111,9	93,3 ab
Bot-2108-NA58	67,8	109,7	88,8 b
Bot-2018-NA64	66,6	114,8	90,7 ab
Bot-2018-NA82	64,4	104,7	84,6 b
Promedio	72,1 B	115,7 A	
ANDEVA	gl	<i>P</i>	
Aislado (A)	5	0,0173	
Cultivar (C)	1	< 0,001	
A x C	5	0,9681	

*Promedios seguidos con letras minúsculas distintas en columna o letras mayúsculas en fila indican diferencia significativa según prueba de rango múltiple de Tukey ($P \leq 0,05$).

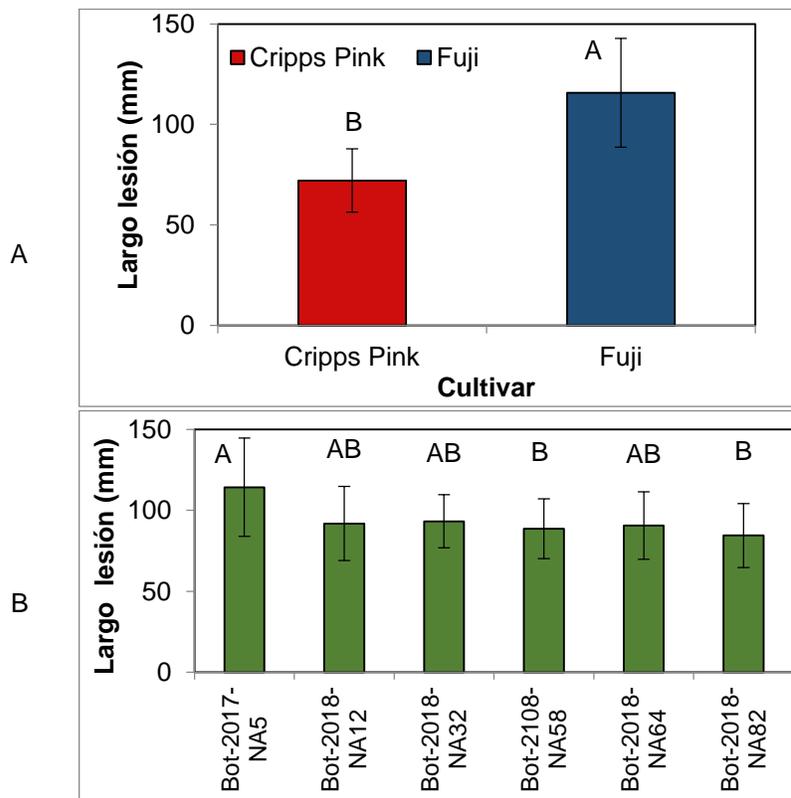


Figura 4.5. Largo de la lesión necrótica (mm) en ramillas cvs. Cripps Pink y Fuji inoculados con trozo de micelio de seis aislados de *Neofusicoccum arbuti*, después de 7 días de incubación a 20°C. **A**, Promedio de lesión de los seis aislados de *N. arbuti* en cvs. Cripps Pink y Fuji. **B**, Promedio de lesión de los dos cvs. Cripps Pink y Fuji para cada aislado de *N. arbuti*. Promedios seguidos con letras minúsculas distintas indican diferencia significativa según prueba de rango múltiple de Tukey ($P \leq 0,05$). La Interacción entre el factor cultivar y aislados no fue significativa.

4.4 Inoculación de frutos con micelio

Después de haber transcurrido 7 días de almacenaje a 22 °C, desde todos los frutos inoculados con micelio de los seis aislados de *N. arbuti*, desarrollaron lesiones necróticas, que se caracterizaron por producir pudriciones blandas de los frutos que abarcaban la pulpa de los frutos (Figura 4.6). Estadísticamente, la interacción entre ambos factores no fue significativa (Cuadro 4.3). El promedio de las lesiones fue significativamente mayor en frutos inoculados del cultivar Fuji que presentó un promedio de 37,5 mm, en comparación con el promedio de la lesión de cultivar Cripps Pink con un promedio de 24,8 mm (Cuadro 4.3, Figura 4.7 A). Para los

aislados no existieron diferencias significativas, en relación al tamaño de la lesión (Cuadro 4.3; Figura 4.7 B)



Figura 4.6. Lesión externa e interna desarrollada en frutos inoculados con micelio de *Neofusicoccum arbuti* (Bot-2108-NA58) en cv. Cripps Pink (A) y Fuji (B) después de 7 días de incubación a 20°C.

Cuadro 4.3. Lesiones en frutos inoculados con trozo de micelio de seis aislados de *Neofusicoccum arbuti*, después de 7 días de incubación a 20°C.

Lesión necrótica (mm)			
Aislado	Cripps Pink	Fuji	Promedio
Bot-2017-NA5	22,5	40,2	31,4 a
Bot-2018-NA12	25,6	36,8	31,2 a
Bot-2018-NA32	22,0	37,7	29,9 a
Bot-2108-NA58	22,6	36,5	29,6 a
Bot-2018-NA64	28,5	37,4	33,0 a
Bot-2018-NA82	27,7	36,6	32,2 a
Promedio	24,8 B	37,5 A	31,2 a

ANDEVA

	gl	P
Aislado (A)	5	0,862
Cultivar (C)	1	< 0,001
A x C	5	0,6068

*Promedios seguidos con letras minúsculas distintas en columna o letras mayúsculas en fila indican diferencia significativa según prueba de rango múltiple de Tukey ($P \leq 0,05$).

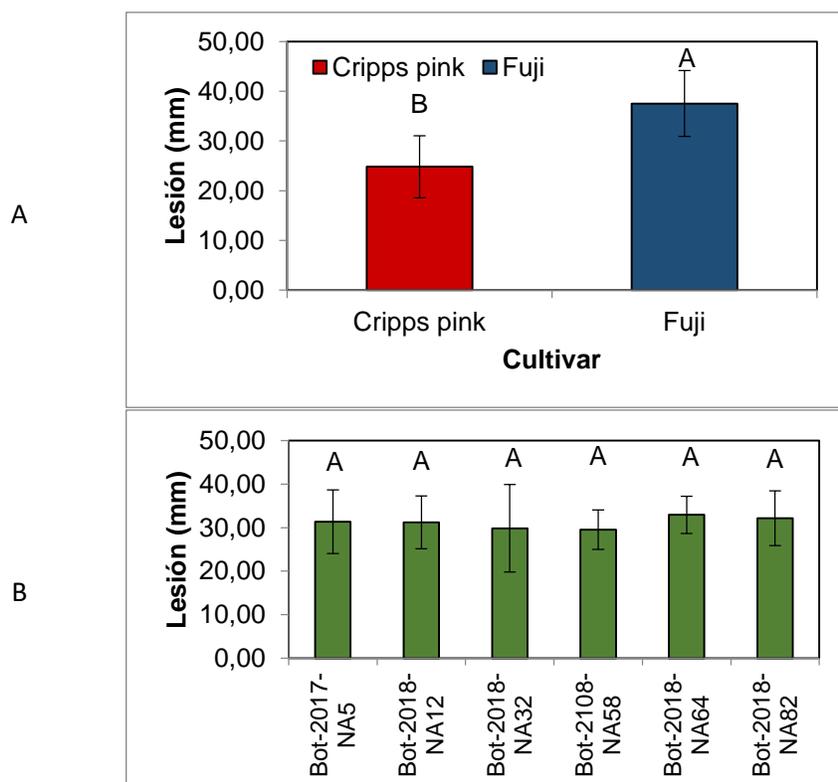


Figura 4.7. Lesión necrótica en frutos cvs. Cripps Pink y Fuji inoculados con trozo de micelio de seis aislados de *Neofusicoccum arbuti*, después de 7 días de incubación a 20°C. **A**, Promedio de lesión de los seis aislados de *N. arbuti* en cvs. Cripps Pink y Fuji. **B**, Promedio de lesión de los dos cvs. Cripps Pink y Fuji para cada aislado de *N. arbuti*. Promedios seguidos con letras minúsculas distintas indican diferencia significativa según prueba de rango múltiple de Tukey ($P \leq 0,05$). La Interacción entre el factor cultivar y aislados no fue significativa.

V. DISCUSIÓN

Este estudio representa el primer trabajo que describe a la especie fungosa perteneciente a la familia Botryosphaeriaceae *N. arbuti*, como causante de canchrosis y muerte regresiva de manzanos en Chile. Los resultados de esta investigación complementan los estudios previos sobre la etiología de la canchrosis y muerte regresiva, en donde inicialmente se describió a la especie *Botryosphaeria dothidea* (Latorre y Toledo, 1984), y recientemente a la especie *D. seriata* (Herrera, 2018; Díaz et al., 2019). Por lo tanto, esta es la primera descripción de aislados de *N. arbuti* causando muerte regresiva de manzanos en Chile.

La identificación basados en las características culturales y de morfología de los aislados de *N. arbuti*, permiten obtener una clara descripción del agente causal como miembro del género *Neofusicoccum* dentro de la familia Botryosphaeriaceae, pero no son suficiente para identificar a nivel de especie dentro del género (Alves et al., 2013; Phillips et al., 2013), en relación a especies cercanas como *N. parvum* y *N. ribis* (Pavlic et al., 2009). Las características de las conidias de *N. arbuti* obtenidas en el presente trabajo coinciden con las descripciones previas indicadas en los trabajos de Phillips et al. (2013) y Espinoza et al. (2009), en donde se apreciaron conidias hialinas, de forma fusiformes, base truncada, ápice obtuso, y una la relación de 3,2 entre largo/ancho. Este parámetro de relación es muy usado como indicador en la descripción morfológica de especies de Botryosphaeriaceae en diversos trabajos micológicos (Slippers y Wingfield, 2007; Slippers et al., 2007; Alves et al., 2013; Phillips et al., 2013).

Con respecto a la identificación molecular realizada en los seis aislados chilenos obtenidos desde brazos con canchrosis y muerte regresiva, todos alcanzaron una alta similitud, desde 99 a 100%, con depositos en el Genbank de especimenes reconocidos de *N. arbuti* (types) para cada uno de los genes ITS, BT y FE 1-alfa. El análisis filogenético confirma en forma robusta la identificación de *N. arbuti*, al obtener un árbol en donde los seis aislados de *Neofusicoccum* se agruparon en el mismo clado de exctype de *N. arbuti*, y claramente separados de otros clados de especies Botryosphaeriaceae cercanas como *N. parvum* y mas distantes que las especies del género *Diplodia*. Por lo tanto este trabajo demuestra que estos tres genes utilizados son altamente informativos para especies de Botryosphaeriaceae (Crous et al., 2006; Slippers et al., 2007; Phillips et al., 2013; Dissanayake et al., 2016). Sin embargo, en el trabajo de Dissanayake et al., (2016), se demuestra que el gen LSU es otro que también permite obtener una separación de Botryosphaeriaceae y debería incluirse en los análisis de estas especies. Esto también fue recientemente ratificado con especies de *Diplodia* en Chile, incluyendo el gen LSU, el cual separaba claramente especies como *D. seriata* y *D. mutila* asociados con pudriciones de manzanas en precosecha en Chile (Díaz et al., 2019a).

Estudios previos realizados en Brasil, China, Canadá, E.E.U.U, Irán, Sudáfrica y Uruguay, entre otros han descrito múltiples especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae causando cancrrosis y muerte regresiva del manzano, incluyendo a *B. dothidea*, *Diplodia bulgarica*, *D. seriata*, *D. mutila*, *Lasiodiplodia theobromae* y *L. brasiliense* (Cloete et al., 2011; Tang et al., 2012; Abdollahzadeh, 2015; Úrbez-Torres et al., 2016; Martins et al., 2018). En relación a las especies del género *Neofusicoccum*, en Sudáfrica se identificó la especie *N. australe* (Slippers et al., 2007), posteriormente se describió a *N. vitifusiforme* asociados a muerte regresiva, pero en perales (Cloete et al., 2011). En el caso de California (E.E.U.U), la especie *N. nonquaesitum* fue descrita causando muerte regresiva en manzano cv. Honeycrisp (Rooney-Latham y Soriano, 2016). En Uruguay se identificó a las especies *N. australe*, *N. luteum* y *N. parvum* asociados a cancros y muerte de árboles de manzanos (Delgado-Cerrone et al., 2016). Por lo tanto, este estudio es el primer trabajo que describe a la especie *N. arbuti* en manzanos asociados con cancros y muerte regresiva a nivel mundial.

El presente trabajo aporta en la claridad de la etiología de la cancrrosis y muerte regresiva de manzanos en Chile. La previa descripción de *B. dothidea* por Latorre y Toledo (1984), y a la reciente caracterización de *D. seriata* asociados a manzanos (Herrera, 2018; Díaz et al., 2019b), junto con la descripción de *N. arbuti* en este trabajo, indican que las especies asociadas de Botryosphaeriaceae en Chile corresponden a *D. seriata*, *B. dothidea* y *N. arbuti*. Sin embargo, *B. dothidea* no se ha encontrado nuevamente en las prospecciones realizadas actualmente por nuestro equipo.

En este estudio también se logró comprobar la patogenicidad de *N. arbuti* tanto en frutos como en ramillas, donde se generaron cancros en ramas jóvenes y los frutos desarrollaron pudriciones blandas de color marrón oscuro, lo que indica que el aislado, puede infectar indiscriminadamente ambos órganos, al igual que en investigaciones previas realizadas por Delgado-Cerrone et al. (2016) en ambos casos los frutos y ramillas que se vieron más afectados fueron los pertenecientes al cultivar Fuji, presentando un mayor daño en comparación con el cultivar Cripps Pink, coincidiendo con el actual trabajo. Esta misma capacidad, fue recientemente descrita en el palto con las especies de *Neofusicoccum*, capaces de causar lesiones en ramillas y frutos de paltos (Valencia et al., 2019.)

A nivel nacional, especies de Botryosphaeriaceae han sido descritas causando cancrrosis y muerte regresiva en varios frutales y especie leñosas en los últimos 10 años, incluyendo arándanos (Espinoza et al., 2009), kiwis y nogales (Díaz et al., 2018), vides (Díaz et al., 2011; Díaz et al., 2013), limonero (Guajardo et al., 2018), paltos (Valencia et al., 2019) y Araucaria

(Pérez et al., 2018). Por lo tanto, el actual estudio amplía el conocimiento de estas especies de Botryosphaeriaceae, que tienen como hospederos a manzanos. A nivel regional (Maule), es recurrente encontrar plantaciones comerciales de nogales, kiwis y vides, que presentan una alta prevalencia de muerte regresiva, muy cercanos a plantaciones comerciales de manzano. Es por esta razón, que estas especies pueden ser potenciales fuentes de inóculo para los manzanos, si están en sus cercanías y como también en viceversa. En este sentido, los frutos infectados por *D. seriata* que caen y se mantienen en el suelo del huerto o frutos no cosechados que se mantienen en el huerto constituyen potenciales fuente de inóculo, siendo que la pudrición de frutos de manzanos, durante precosecha es muy frecuente en los últimos años en la Región del Maule (Cáceres et al., 2016; Díaz et al., 2019).

Finalmente es importante profundizar estudios para conocer aspectos epidemiológicos de la canchrosis y muerte regresiva de manzanos, asociados a la detección de fuentes de inóculo, y a determinar la susceptibilidad de las heridas de poda a la infección por especies de Botryosphaeriaceae en manzanos entre otros para implementar medidas que mitiguen la enfermedad a nivel nacional.

V. CONCLUSIÓN

En base a las condiciones del presente estudio se concluye que:

- Se identificó a la especie *Neofusicoccum arbuti* causando canchros y muerte regresiva de manzanos.
- Todos los aislados de *N. arbuti* fueron patogénicos en ramillas y frutos de manzano cvs. Cripps Pink y Fuji.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Alves, A., Barradas, C., Phillips, A. J., and Correia, A. 2013. Diversity of Botryosphaeriaceae species associated with conifers in Portugal. *European Journal of Plant Pathology* 135: 791-804.
- Álvarez, M., Pinilla, B., y Herrera, G. 2004. Enfermedades del manzano. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Chile: La Platina. 71p.
- Benítez, C. 2001. Cosecha y Poscosecha de Peras y Manzanas en los Valles Irrigados de la Patagonia. INTA EEA Alto Valle. General Roca, Río Negro. Argentina. 126 p.
- 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: 143-143.
- Bravo, J. 2011. Mercados Agropecuarios. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Recuperado en: <http://www.odepa.cl/odepaweb/servicios-informacion/Mercados/oct-11.pdf>. Consultado el 4 de octubre de 2018.
- 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 4 de octubre de 2018.

CIREN, 2016. Catastro frutícola Region del maule. Recuperado en: <http://bibliotecadigital.ciren.cl/bitstream/handle/123456789/26218/PCsn-CFRVII-2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Consultado el 4 de octubre de 2018

Cloete, M., Fouri, P., 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: 176–190.

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

Delgado, L.; Mondino, P.; Alaniz, y S. 2012. Caracterización de especies de Botryosphaeriaceae asociadas al cultivo de manzano en Uruguay. 35º Congreso Paulista de Fitopatología, 14 a 16 de febrero, Jaguariúna, San Pablo, Brasil.

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* 146:637-655.

Díaz, G.A., Latorre, B.A., Ferrada, E.E., and Lolas, M. 2019a. 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., 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., and Latorre, B. A. 2019b. *Diplodia seriata* associated with Botryosphaeria canker and dieback in apple trees in Chile. *Plant Disease* 103:1025-1025.

Díaz, G. A., Latorre, B. A., Ferrada, E., Gutierrez, M., Bravo, F., and Lolas, M. 2018. First Report of *Diplodia mutila* Causing Branch Dieback of English Walnut cv. Chandler in the Maule Region, Chile. *Plant Disease* 102:1451-1452.

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* 95:1032-1032.

Dissanayake, A., Phillips, A.J.L, Li, X. , and Hyde, K. 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., Briceño, E., Chávez, E., 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: http://www.copefrut.com/wp-content/themes/copefrut/img/revistas/2013_N1.pdf. Consultado el: 17 de noviembre del 2018.

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. 2013. La importancia de la industria de la manzana chilena en el mercado internacional. INIA. Disponible en: http://www.inia.cl/wp-content/uploads/2015/01/Art-t%C3%A9cnico_Importancia-mercado-manzanas.pdf . Consultado el 17 de noviembre de 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(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. 33p

Janick, E. 2011. *Edible: Apple : A Global History*. London, GB: Reaktion Books. 132 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.

Martins, M.V.V., Lima, J.S., Hawerth, F.J., Ootani, M. A., Araujo, F.S.A., Cardoso, J.E., Serrano, L.A.L, and Viana, F.M.P. First report of *Lasiodiplodia brasiliense* causing disease in apple trees in Brazil. *Plant Disease* 102:127-127.

Montealegre, J. R. ; Ramírez, M. ; Riquelme, D. ; Armengol, J. ; León, M., and Pérez, L. M. 2016. First Report of *Neofusicoccum australe* in Chile Causing Avocado Stem-end Rot. *Plant Disease*. 100(12): 2532-2532

Merlet, H., Navarro, A., y Rosales, C. 2016. *Manual técnico productivo y económico manzana*. CIREN. Disponible en <http://bibliotecadigital.ciren.cl/handle/123456789/26085>. Consultado el 17 de noviembre de 2018.

McGregor, R ., Sakalidis, M. , and Hamelin, R. 2016. *Neofusicoccum arbuti*: a hidden threat to *Arbutus menziesii* characterized by widespread latent infections and a broad host range. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 38:70-81.

Mohali, S., B. N. Slippers and M. J. Wingfield. 2006. Two new *Fusicoccum* species from *Acacia* and *Eucalyptus* in Venezuela based on morphology and DNA sequence data. *Mycological Research*. 110:405-413.

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.

Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T., and Wingfield, J. 2009. Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the Botryosphaeriaceae: A case study on the *Neofusicoccum parvum*/N. *ribis* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51, 259–268

Pérez, S., Meriño-Gergichevich, C., and Guerrero J. 2014. Detection of *Neofusicoccum nonquaesitum* causing dieback and dieback in highbush blueberry from southern Chile. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 14:581–588.

Pérez, S., Guerrero, J., and Galdames, R. 2018. First Report of *Neofusicoccum nonquaesitum* in Chile Causing Branch Dieback and Decline in *Araucaria araucana*. *Plant Disease* 102:1460-1460.

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.

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. Consultado el 16 de noviembre de 2018

Quiroz, I. 2017. Plantación de manzanos, perales y cerezos y su impacto en la oferta. Centro de pomáceas. Boletín técnico n°17.1-18. Disponible en : http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/Boletin_Tecnico_Mayo_2017.pdf. Consultado el : 17 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* 100:1012-1012.

Slippers, B and Wingfield, M. J. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology* 21: 90-106.

Slippers, B., Smit, W.A., Crous, P.W., Coutin, T.A., Wingfield, B.D., and Wingfield, M. J. 2007. Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *European Journal of Plant Pathology*. 56: 128-139.

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.

Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Agnello, A. M., and Walgenbach, J. F. 2014. Compendium of apple and pear diseases and pest. Second edition. APS Press. The American Phytopathological Society. Minnesota, USA. 218 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.

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

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.