



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

**CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *CYTOSPORA* SPP. ASOCIADOS A
ENFERMEDADES DE LA MADERA DE ÁRBOLES FRUTALES**

MEMORIA DE TÍTULO

TERESA JACQUELINE FARIAS ALIAGA

TALCA-CHILE

2023

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, 2023

Aprobación:



Profesor Guía Ing. Agr. MS. PhD. Mauricio Lolas C.
Profesor Titular
Escuela de Agronomía
Facultad de Ciencias Agrarias



Profesor informante Ing. Agr. Mg. Cs. Dr. Gonzalo Díaz U.
Profesor Asociado
Escuela de Agronomía
Facultad de Ciencias Agrarias

Fecha de presentación de la Defensa de Memoria: 03 de Abril de 2023

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi pequeña familia que desde el primer momento fueron participe de todos estos años de estudio y dedicación, entregando el aliento necesario para seguir día a día y alcanzar este gran logro.

Agradezco a todos quienes integraron mi vida universitaria, en especial a mi compañera Angela por tantos años de comprensión, dedicación y logros vividos.

Finalmente, agradezco a mi profesor guía Mauricio Lolas por la oportunidad y al equipo del laboratorio de Patología Frutal de la Universidad de Talca, en especial a Paulina González por su apoyo y paciencia incondicional para poder llevar a cabo esta investigación, quien fue de gran ayuda durante todo este proceso.

RESUMEN

La fruticultura en Chile cumple un rol importante dentro de la economía nacional, exportando un total de 2.567.717 toneladas de fruta donde se destacan las cerezas y manzanas, así como otras especies como las peras y avellanas europeas. La Región del Maule concentra 76.374 ha para la producción de estas especies. Sin embargo, la presencia de enfermedades que afectan la madera de estos huertos frutales es cada vez más recurrente, presentando muerte de ramas y ramitas, muerte regresiva, canchros y exudación de gomas. El objetivo del presente estudio fue comparar las tasas de crecimiento y caracterizar morfológica y molecularmente aislados de *Cytospora* spp. provenientes de árboles frutales afectados con enfermedades de la madera. Para llevar a cabo este objetivo se realizaron estudios en diferentes temperaturas de crecimiento: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35°C; en diferentes medios de cultivo: agar papa dextrosa (APD), extracto de malta, agar maíz y agar agua; observación de las colonias y medición de las conidias; y una identificación molecular por medio del uso de genes internal transcribed spacer (ITS), beta tubulina (Bt) y factor de elongación (EF). Los aislados identificados correspondieron a *Cytospora eucalypticola* proveniente de avellano; *Cytospora leucostoma* y *Cytospora sorbicola*, provenientes de cerezo y manzano, y *Cytospora* spp. proveniente de peral. Las temperaturas óptimas se encontraron entre 20 y 30°C, desarrollándose adecuadamente en todos los medios de cultivo, resultando el medio de cultivo agar papa dextrosa el más apropiado. Este trabajo demuestra que la correcta identificación de las especies de *Cytospora* spp. causando canchros en cerezo, manzano, peral y avellano es necesaria para implementar los mejores métodos de control preventivo en estas especies frutales.

ABSTRACT

Fruit growing in Chile plays an important role in the national economy, exporting a total of 2,567,717 tons of fruit where cherries and apples stand out, as well as species such as pears and European hazelnuts. The Maule Region concentrates 76,374 ha for the production of these species. However, the presence of diseases that affect the wood of these fruit orchards is increasingly recurrent, presenting the death of branches and twigs, regressive death, cankers, and exudation of gums. The objective of the present study was to compare growth rates and characterize morphologically and molecularly isolated *Cytospora* spp. from fruit trees affected with wood diseases. To carry out this objective, studies were carried out at different growth temperatures: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, and 35°C; in different culture media: potato dextrose agar (APD), malt extract, corn agar, and water agar; colony observation and conidia measurement; and molecular identification through the use of an internal transcribed spacer (ITS), beta tubulin (Bt) and elongation factor (EF) genes. The isolates identified corresponded to *Cytospora eucalypticola* from hazelnut; *Cytospora leucostoma* and *Cytospora sorbicola*, from cherry and apple trees, and *Cytospora* spp. from pear trees. The optimum temperatures were between 20 and 30°C, developing properly in all culture media, resulting in the culture medium dextrose potato agar being the most appropriate. This work demonstrates the correct identification of *Cytospora* spp. species causing cankers in cherry, apple, pear, and hazelnuts is necessary to implement the best methods of preventive control in these fruit species.

ÍNDICE

	Página
Capítulo 1. Introducción	11
1.1 Hipótesis	12
1.2 Objetivo general	13
1.3 Objetivos específicos	13
Capítulo 2. Revisión bibliográfica	14
2.1 Importancia de la fruticultura en Chile	14
2.2 Enfermedades de los frutales	14
2.2.1 Principales enfermedades en cerezo	15
2.2.2 Principales enfermedades en pomáceas	15
2.2.3 Principales enfermedades en avellano	15
2.3 Enfermedades de la madera	16
2.4 Aspectos epidemiológicos de <i>Cytospora</i> spp.	16
2.5 Identificación morfológica de <i>Cytospora</i> spp.	17
2.6 Identificación molecular de <i>Cytospora</i> spp.	18
Capítulo 3. Materiales y métodos	20
3.1 Origen de los aislados	20
3.2 Reactivación de los aislados de <i>Cytospora</i> spp.	20
3.3 Identificación morfológica de los aislados de <i>Cytospora</i> spp.	21
3.3.1 Crecimiento a diferentes temperaturas	21
3.3.2 Crecimiento en diferentes medios de cultivo	21
3.4 Identificación molecular de los aislados de <i>Cytospora</i> spp.	22
3.4.1 Extracción de ADN y amplificación de la reacción en cadena de polimerasa (PCR)	22
3.4.2 Secuenciación y edición	23
3.4.3 Análisis de BLAST	23
Capítulo 4. Resultados y Discusión	24
4.1 Identificación morfológica de los aislados	24
4.2 Crecimiento de los aislados a distintas temperaturas	31
4.2.1 Aislados de Cerezo	31

4.2.2	Aislado M1	33
4.2.3	Aislado P1	35
4.2.4	Aislado A1	36
4.2.5	Tasa de crecimiento de micelio en distintas temperaturas	37
4.2.5.1	Aislados de Cerezo	37
4.2.5.2	Aislado M1	38
4.2.5.3	Aislado P1	39
4.2.5.4	Aislado A1	40
4.3	Crecimiento en diferentes medios de cultivo	41
4.4	Identificación molecular	42
4.4.1	Análisis de BLAST	43
Capítulo 5. Conclusión		46
Capítulo 6. Referencias		47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1 Procedencia de los aislados de <i>Cytospora</i> spp. utilizados en el estudio.....	16
Cuadro 3.2 Abreviación de los distintos medios a elaborar en el estudio.....	18
Cuadro 4.1 Caracterización de las colonias de cada aislado en condiciones de incubación a 20°C en oscuridad durante 15 días en medio APD. Tamaño de las conidias obtenidas de exudación de <i>cirrus</i> desde los aislados C1, C2, C3 y C4 tras 25 días y de A1 tras 43 días.....	21
Cuadro 4.2 Resultados del análisis de BLAST de las secuencias enviadas desde MACROGEN (Corea) de los aislados en estudio utilizando los genes ITS1, ITS4, Bt2a, Bt2b, EF1-728F y EF1-926R.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1 Aislados de Grupo I: (A) Exudación de *cirrus* desde picnidios en aislado C4. (B) Exudación de *cirrus* desde picnidio en aislado C1. Ambos casos tras 25 días de incubación a 20°C en medio de cultivo APD.....23

Figura 4.2 Aislados de Grupo II: (A) Exudación de *cirrus* desde picnidio en aislado A1, (B) exudación de *cirrus* desde picnidio del aislado M1. Ambos casos en acícula de pino tras 43 días de incubación a 20°C en medio de cultivo APD.....23

Figura 4.3 (A, B, C) Aislados P1, M1 y A1 tras 7 días de crecimiento en medio de cultivo PDA con acículas de pino. (D, E, F) Aislados P1, M1 y A1 tras 7 días de crecimiento en medio de cultivo APD con mondadientes de madera.....24

Figura 4.4 Aislados M1, P1 y A1 en mondadientes de madera y acículas de pino tras 43 días de incubación a 20°C en medio de cultivo APD en oscuridad.....25

Figura 4.5 Aislados M1 (A), P1 (B) y A1 (C) con mondadientes de madera y acículas de pino tras 43 días de crecimiento en luz oscura, temperatura ambiente y medio de cultivo APD.....26

Figura 4.6 Conidias del aislado C1 (A) y C4 (B) provenientes de huerto de cerezo captadas con el programa Motic Images Plus 2.0 (MOTIC, CHINA).....27

Figura 4.7 Diámetro de crecimiento del micelio de los aislados C1 (A) y C5 (B) en distintas temperaturas de crecimiento durante 14 días de incubación.....28

Figura 4.8 Diámetro de crecimiento del micelio de aislado M1 en distintas temperaturas de crecimiento durante 14 días de incubación.....30

Figura 4.9 Diámetro de crecimiento del micelio de aislado P1 en distintas temperaturas de crecimiento durante 14 días de incubación.....31

Figura 4.10 Diámetro de crecimiento del micelio de aislado A1 en distintas temperaturas de crecimiento durante 14 días de incubación.....32

Figura 4.11 Tasa de crecimiento de micelio de los aislados C1 (A) y C5 (B) cada 48 horas en las distintas temperaturas en estudio durante 14 días. Se realizó una regresión de datos no lineal para el conjunto de datos correspondiente para cada patógeno.....34

Figura 4.12 Tasa de crecimiento de micelio del aislado M1 cada 48 horas en las distintas temperaturas en estudio durante 13 días.....35

Figura 4.13 Tasa de crecimiento de micelio del aislado P1 cada 48 horas en las distintas temperaturas en estudio durante 14 días.....36

Figura 4.14 Tasa de crecimiento de micelio del aislado A1 cada 48 horas en las distintas temperaturas de crecimiento durante 14 días.....37

Figura 4.15 Crecimiento de micelio de cada colonia en los medios de cultivo extracto de malta (EM), agar maíz (AM), agar agua (AA) y agar papa dextrosa (APD) durante 14 días de incubación.....38

1. INTRODUCCIÓN

La producción y exportación de fruta es un rubro muy importante a nivel nacional, siendo la Región del Maule una de las más preponderantes en la producción de fruta. La superficie de especies frutales posee un área aproximada de 352.970 ha, de las cuales 76.374 ha (22%) corresponden a las plantadas en la Región del Maule (ODEPA, 2022^a). En este sentido, los cultivos frutales como manzanos, cerezos, perales y avellanos tienen una producción considerable a nivel nacional, alcanzando plantaciones de 30.967, 48.960, 6.241 y 24.455 ha, respectivamente (ODEPA, 2022^a).

En reiteradas oportunidades la producción de fruta presenta problemas asociados a desórdenes fisiológicos y a la presencia de plagas y enfermedades que limitan el éxito de su producción y exportación. Dentro de las enfermedades, las micosis son una de las más importantes en nuestra realidad de producción frutícola (Latorre, 2018), varias de ellas provocando daños a la madera.

En los últimos años se ha detectado un aumento de plantas frutales afectadas por enfermedades a la madera o ‘trunk diseases’ en los huertos nacionales, donde se incluye especies frutales como kiwis (Díaz et al., 2021), manzanos (Díaz et al., 2022), vides (Díaz et al., 2013) y nogales (Díaz et al., 2018; Jiménez-Luna et al., 2022), entre otros. El incremento de las enfermedades de la madera tiene relación con los sistemas productivos actuales que utilizan mayor cantidad de plantas por hectárea (Shindoi et al., 2020), exceso de fertilización (Alejo et al., 2016), exceso de poda (Valenzuela, 2020), entre otros. Principalmente las enfermedades de la madera son causadas por diferentes especies de hongos como *Chondrostereum purpureum* asociado al Plateado de frutales (Latorre, 2018), Botryosphaeriaceae y Diaporthaceae asociados a la muerte regresiva de ramillas y brazos (Espinoza et al., 2009; Díaz et al., 2021; Díaz et al., 2022), y especies de *Cytospora* asociados a canchros y muerte regresiva (Latorre, 2018).

A nivel internacional las especies de *Cytospora* se han descrito causando muerte regresiva en olivo (Úrbez-Torres et al., 2020), nogal (Zhao et al., 2018), avellano (Lamichhane et al., 2014), almendros (Holland et al., 2021), entre otros. Las enfermedades a la madera que son causadas por *Cytospora* spp. han reaparecido en los últimos años probablemente producto de las condiciones

climáticas (Lamichhane et al., 2014) y de manejo agronómico favorables para su crecimiento (Holland et al., 2021; Wang and Wang, 2020). Sin embargo, en Chile, el conocimiento y caracterización de especies de *Cytospora* es muy limitado, describiendo a la fecha su presencia en canchales de tronco, ramas y ramillas de huertos de cerezo ubicados en la Región de O'Higgins con abundante exudación de goma y presencia de fructificaciones picnidiales sobre las lesiones (Ramella, 2000). También, desde canchosis de los ejes principales de árboles de manzano en huertos comerciales de la Región del Maule pudo detectarse e identificarse gracias a sus características morfológicas, especies de *Cytospora* (Méndez, 2011). Epidemiológicamente, la infección ocurriría por el ingreso de esporas del hongo principalmente por las heridas de poda, y en menor grado por heridas de cosecha, heridas naturales como caída de hojas o por acciones climáticas (Perdomo et al., 2018).

La Citosporiosis o Cancro por *Cytospora* es causado por las especies *Cytospora leucostoma* y *Cytospora cincta* en ciruelos, durazneros y nectarinos (Latorre, 2004). Además, se observa presencia de picnidios negros incrustados en la madera muerta y exudación de finos hilos (*cirrus*) de color amarillo anaranjado durante otoño e invierno.

En base a la limitada información que existe actualmente en relación con el hongo *Cytospora* spp. y la importancia que rápidamente va tomando esta enfermedad en los huertos frutales nacionales, se hace necesario establecer un estudio de caracterización de aislados del hongo obtenidos desde diferentes hospederos.

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

1.1 Hipótesis

Los aislados de *Cytospora* spp. obtenidos de manzano, cerezo, peral y avellano, tendrían tasas de crecimiento y características morfológicas distintas.

Los aislados de *Cytospora* spp. obtenidos de manzano, cerezo, peral y avellano corresponderían a especies distintas del hongo fitopatógeno.

1.2 Objetivo general

Caracterizar aislados de *Cytospora* spp. provenientes de árboles frutales afectados con enfermedades de la madera.

1.3 Objetivos específicos

Comparar las tasas de crecimiento del micelio de distintos aislados de *Cytospora* spp. obtenidos de manzano, cerezo, peral y avellano a distintas temperaturas de incubación.

Comparar las tasas de crecimiento del micelio de distintos aislados de *Cytospora* spp. obtenidos de manzano, cerezo, peral y avellano en distintos medios de cultivo.

Identificar morfológica y molecularmente los distintos aislados de *Cytospora* spp. obtenidos de manzano, cerezo, peral y avellano.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importancia de la fruticultura en Chile

La fruticultura en Chile ha tenido un aumento en los últimos años centrándose en la producción y exportación de fruta de calidad, favoreciendo la economía interna del país. La Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (2017) señala que la contribución de la fruticultura al Producto Interno Bruto (PIB) ha ido en aumento, participando en un 11,93% del PIB silvo-agroindustrial y un 0,94% al PIB nacional. Chile cuenta con un área de 352.970 ha de huertos frutales a nivel nacional (ODEPA, 2022a). Para la temporada 2020-2021 Chile exportó 2.567.717 toneladas de fruta fresca equivalente a US\$ 9.047.916.484 (ODEPA, 2022b), un 1,2% más que la temporada anterior (ASOEX, 2021). Los principales mercados de destino de las exportaciones de fruta fresca durante el año 2021 según la Base de Datos Comercio Exterior de ODEPA fueron: Estados Unidos, China y Holanda con 820.387.309 ton, 502.911.174 ton y 189.514.222 ton, respectivamente, equivalente a US\$ 1.306.869.559, US\$ 1.851.215.974 y US\$ 386.618.323 respectivamente (ODEPA, 2022b).

La Región del Maule cuenta con una superficie de 76.374 ha destinadas a la fruticultura, existiendo una notoria producción de huertos de cerezo, manzano, peral y avellano con un área de 17.655, 19.637, 1.859 y 11.225 ha, respectivamente (ODEPA, 2022a). Esta misma región exporta 79.554.635 ton de cereza, 327.982.020 ton de manzana, 23.730.746 ton de pera y 16.353.908 ton de avellana europea con destino principalmente hacia China, India, Holanda e Italia, respectivamente (ODEPA, 2022b).

2.2 Enfermedades de los frutales

La producción de fruta puede verse afectada por problemas sanitarios como la presencia de insectos-plaga (Díaz, 2022), desordenes fisiológicos (Mejías, 2019) y enfermedades (Latorre, 2004), las cuales ponen límites en el rendimiento y exportación de la fruta aumentando los costos de producción. Dentro de las enfermedades, las micosis son unas de las más relevantes, varias de ellas causando daños a la madera.

2.2.1 Principales enfermedades en cerezo

Los huertos de cerezo (*Prunus avium*), presentan enfermedades de importancia como el Cáncer Bacterial (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) que causa la muerte de árboles en casos severos (Latorre, 2004). La Pudrición del Cuello es causada por *Phytophthora* spp. y es considerada una de las enfermedades de la madera más relevantes de los huertos de cerezo en Chile ya que es una especie muy susceptible pudiendo ocasionar la pérdida total de plantas nuevas o parcial en plantas adultas (Loewe, 2001).

2.2.2 Principales enfermedades en pomáceas

El manzano (*Malus domestica*) se ve afectado principalmente por Venturia o Sarna del manzano (*Venturia inaequalis*) que es una de las enfermedades micóticas más importantes a nivel mundial provocando pérdidas económicas relevantes (González-Domínguez et al., 2017); su aparición es favorecida por las lluvias en las épocas de crecimiento (Latorre, 2004). Por otro lado, la Cancrosis y Muerte regresiva de brazos, ramas y ramillas, causada por especies de Botryosphaeriaceae, han aumentado progresivamente en ocurrencia y en severidad en los huertos comerciales durante los últimos 15 años (Díaz et al., 2022).

El peral (*Pyrus communis*) presenta complicaciones similares a los huertos de manzano, donde destaca la Sarna del peral causado por *Venturia pirina* (González-Domínguez et al., 2017) y la presencia de Oídio (*Podosphaera leucotricha*) en hojas y brotes como polvillo de color blanquecino (Vajna y Kiss, 2008). También la Pudrición del cuello, corona y raíces causado por especies de *Phytophthora* que produce canchros en el tejido leñoso con exudación de goma es una enfermedad relevante en esta especie frutal (Sutton et al., 2014).

2.2.3 Principales enfermedades en avellano

El avellano (*Corylus avellana*) presenta enfermedades de origen bacteriano como Tizón y Cancro bacteriano causado por *Xanthomonas arboricola* (Lamichhane, 2014). Además, en los últimos años se ha incrementado la presencia de enfermedades de la madera, reportándose a

Diplodia coryli (Guerrero y Pérez, 2013a) y *Diaporthe australafricana* (Guerrero y Pérez, 2013b) causando canchros y muerte regresiva en huertos comerciales.

2.3 Enfermedades de la madera

Durante los últimos años se ha registrado un aumento en las enfermedades a la madera causadas por hongos en los huertos frutales de manzano (Díaz, 2020), cerezo (Grinbergs et al., 2021), peral (Sutton et al., 2014) y avellano (Guerrero y Pérez, 2013a; Guerrero y Pérez, 2013b) en Chile.

Estudios recientes describen la presencia del hongo *Cytospora* spp. causando canchros en la madera en árboles frutales de cerezo (Ramella, 2000), manzano (Méndez, 2011), ciruelo, duraznero y nectarino (Latorre, 2004). Por el momento, en Chile se ha mencionado las especies *C. leucostoma* y *C. cincta*, ambas causando canchros abiertos de tamaño variable en ramas, brazos y tronco provocando además canchros rojizos en ramillas nuevas (Ramella, 2000; Latorre, 2004).

A nivel internacional hay descripción de diversas especies de *Cytospora* en distintos hospederos como: duraznero (Royse y Ries, 1978), nogal (Zhao et al., 2018), olivo (Úrbez-Torres et al., 2020), avellano (Lamichhane et al., 2014), almendro (Holland et al., 2021), entre otros. El hongo *C. cincta* afecta la madera de durazneros provocando canchros rugosos en ramas, brazos y tronco a menudo con exudación de goma color ámbar (Latorre, 2004); *C. nivea* está presente en nogal presentando canchros con exudación amarilla y marrón rojiza (Zhao et al., 2018); *C. oleícola* y *C. olivarum* spp. nov en plantaciones de olivo causando necrosis vascular, canchros en las ramas y muerte regresiva de ellas (Úrbez-Torres et al., 2020); *C. sorbicola* en almendro asociado a cancro de tronco y ramas (Holland et al., 2021) y *C. corylicola* en avellano provocando daños severos en la madera (Lamichhane et al., 2014). Estas especies se identificaron en Inglaterra, China, California e Italia, a diferentes condiciones de temperatura según las zonas geográficas.

2.4 Aspectos epidemiológicos de *Cytospora* spp.

Las especies de *Cytospora* spp. producen canchros en sus hospederos que pueden variar el tamaño según su ubicación, pudiendo localizarse en brazos, ramas, ramillas y tronco de la planta (Ramella,

2000; Latorre, 2004), además de presentar exudación de gomas de diversas coloraciones que van desde amarillo a rojizo oscuro (Latorre, 2004; Zhao et al., 2018).

En la madera muerta se pueden apreciar picnidios de coloración oscura (Ramella, 2000) y exudación de *cirrus* (finos hilos) (Latorre, 2004). Su diseminación se ve influenciado posiblemente por el salpicado y escurrimiento producido por las lluvias o la presencia de algunos insectos que actúan como transporte (Latorre, 2004; Pinto et al., 2004). El ingreso a la planta es mediante heridas previamente establecidas causadas por heridas de poda (Úrbez-Torres et al., 2020), y en menor grado por heridas de cosecha (Holland et al., 2020), heridas naturales como caída de hojas o por acciones climáticas (Perdomo et al., 2018).

La temperatura mínima, óptima y máxima para el crecimiento *in vitro* particularmente de la especie *C. leucostoma* es de 3 a 6°, 30 a 33° y 39°C, respectivamente (Pinto et al., 2004). Para el caso de *C. cincta* las temperaturas son 0 a 3°, 21 a 24° y 30 a 36°C, respectivamente (Pinto et al., 2004).

2.5 Identificación morfológica de *Cytospora* spp.

El hongo *Cytospora* spp. corresponde al grupo taxonómico Ascomycota (Padilla et al., 2018). Presenta el ascostroma rodeado por un conceptáculo de color negro en donde se encuentran los ascos que contienen 8 ascosporas hialinas y alantoides (Santos da Silva et al., 2020) producidas mediante reproducción sexual (Pinto et al., 2004). Las estructuras encargadas de la reproducción asexual son los conidióforos que producen conidias hialinas y alantoides (Cai y Ma, 2019); las cuales son proyectadas desde del estroma en forma de zarcillo de color ámbar (*cirrus*) que consiste en una masa de conidias cubierta por una matriz hidrofóbica (Méndez, 2011; Pinto et al., 2004).

Los picnidios son estructuras que se forman durante el primer año previo a la infección ya que el ascostroma no madura hasta tres o cuatro años más tarde (Pinto et al., 2004).

2.6 Identificación molecular de *Cytospora* spp.

La identificación a nivel de especie es de difícil desarrollo al revisar exclusivamente las características morfológicas debido a la superposición de las estructuras macro y microscópicas (Úrbez-Torres et al., 2020). Para la identificación de *Cytospora* spp. se utilizan análisis filogenéticos basados en la extracción de ADN genómico desde el micelio del hongo (Jiang et al., 2020; Holland et al., 2020), puesto que son especies muy complejas de diferenciar. Actualmente hay 110 especies de *Cytospora* reconocidas, mientras que sólo 45 secuencias de ADN se encuentran disponibles en el banco de secuencias genéticas GenBank (Úrbez-Torres et al., 2020).

Los procedimientos para poder aislar el hongo adecuadamente comienzan con la recolección de estructuras del hongo desde madera de árboles infectados los cuales presentan muerte de ramas o ramillas (Santos da Silva et al., 2020), canchales, secreciones gomosas (Holland et al., 2020), entre otras características. Una vez obtenidas las muestras son llevadas a laboratorio para su cultivo *in vitro*.

La siembra de las estructuras recolectadas de *Cytospora* spp. se lleva a cabo principalmente en agar papa dextrosa (APD) (Holland et al., 2020; Santos da Silva et al., 2020) a temperaturas entre 20 y 25°C (Méndez, 2011; Holland et al., 2020). Una vez establecidos los aislados se realizan réplicas con la finalidad de eliminar cualquier contaminación de la estructura obtenida en terreno (Méndez, 2011). Finalmente, a partir de repiques libres de contaminación se obtienen estructuras reproductivas para ser objeto de estudio (Holland et al., 2020).

La extracción de ADN desde micelio de los aislados se realiza por métodos como el bromuro de cetiltrimetilamonio (Cai y Ma, 2019) o mediante el uso de equipos como Dneasy Plant Kit (Úrbez-Torres et al., 2020) o FastDNA Spin Kit (Holland et al., 2020).

Luego se transcriben las secuencias de ADN ribosómico nuclear obtenidas (Holland et al., 2020), utilizando marcadores moleculares o cebadores tales como factor de elongación 1- α (Stewart et al., 2022), actina (ACT) y β -TUBULINA (Úrbez-Torres et al., 2020).

La amplificación mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Úrbez-Torres, 2020) es la técnica más empleada y requiere del uso de fragmentos de ADN denominados cebadores. Úrbez-Torres et al. (2020) emplearon el conjunto de cebadores EF1-688F/1251R, BT1a/1b y ACT-512F/783R para la amplificación de los genes TEF1, TUB2 y ACT1, respectivamente. Por otra parte, Cai y Ma (2019) utilizaron los cebadores ITS1, ITS4, NL1, NL4, ACT512F, ACT783R, RPB-5F y RPB-7Cr para llevar a cabo la técnica PCR. Además, Santos da Silva et al. (2020) recomienda el uso de los cebadores ITS1/ITS4 para la obtención de secuencias ITS para identificación molecular del hongo.

Para llevar a cabo estudios filogenéticos de esta especie fungosa, Úrbez-Torres et al. (2020) recomiendan utilizar los genes TEF1, ACT1 y la región ITS, ya que discriminan de una forma más precisa las especies dentro del género *Cytospora*. Por otro lado, Fan et al. (2020) emplearon una filogenia de seis locus utilizando los genes ITS, LSU, ACT1, RPB2, TEF1- α , y TUB2. Además, Zhao et al. (2018) recomienda el uso de las secuencias de genes ITS y β -Tubulina. Por último, Venter et al. (2017) utilizaron las regiones ITS y TEF1 para la identificación de esta especie.

Finalmente, una vez obtenidas las secuencias de los fragmentos, éstas son comparadas con aquellas existentes en el GenBank (Venter et al., 2017) usando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; National Center for Biotechnology Information, EEUU). Cai y Ma mencionan al Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) para la comparación de las secuencias génicas obtenidas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Origen de los aislados

Los aislados utilizados para su caracterización morfológica y molecular pertenecen a la Colección de Hongos Fitopatógenos del Laboratorio de Fitopatología Frutal de la Universidad de Talca. Estos aislados de *Cytospora* spp. provienen de huertos de manzano, cerezo, peral y avellano ubicados en la Región del Maule (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1 Procedencia de los aislados de *Cytospora* spp. utilizados en el estudio.

Especie Frutal	Identificación del Aislado	Procedencia
Cerezo	C1	Curicó
	C2	San Clemente
	C3	San Clemente
	C4	Río Blanco, Longaví
Manzano	M1	Huapi, Licantén
Peral	P1	Teno
Avellano	A1	Camarico, Río Claro

3.2 Reactivación de los aislados de *Cytospora* spp.

El procedimiento comenzó con la extracción de un trozo de micelio del hongo desde la placa Petri que contenía el aislado, y se sembró sobre una nueva placa con medio de cultivo agar papa dextrosa (en adelante APD) con la ayuda de material esterilizado previamente al interior de la cámara de flujo (JSR, JSCB-1200SB), ubicada en el Laboratorio de Fitopatología Frutal. Se realizaron tres resiembras para cada aislado. Posteriormente se dejó a temperatura ambiente (22-25°C) con un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se evaluó un adecuado crecimiento realizando resiembras hasta la obtención de aislados puros del hongo en estudio.

3.3 Identificación morfológica de los aislados de *Cytospora* spp.

La identificación se llevó a cabo mediante la observación y caracterización del crecimiento, coloración y formación de estructuras reproductivas de las colonias de cada aislado en estudio utilizando medio de cultivo APD. Posteriormente se realizó la extracción de conidias desde las colonias de aislados para su medición de largo y ancho con la ayuda de microscopio (Moticam 30MP BA310) y el programa Motic Images Plus 2.0 (China).

3.3.1 Crecimiento a diferentes temperaturas

A modo de identificar el rango de temperatura óptima de crecimiento de *Cytospora* spp., se realizaron mediciones *in vitro* en placas Petri con medio de cultivo APD. Para ello, previamente se preparó el medio de cultivo utilizando agar-agar, dextrosa, puré de papas comercial y agua destilada. Una vez preparado el medio de cultivo, se distribuyó en placas Petri utilizando la cámara de flujo para mantener estéril.

Finalmente, se extrajeron tres trozos de micelio de cada aislado puro obtenido para resembrar en las placas Petri ya preparadas con medio APD y se ubicaron en incubadoras (Velp Scientifica, FOC 215E; BINDER, KB115-230V) a distintas temperaturas: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35°C en condiciones de oscuridad. Se registró su crecimiento cada 48 horas midiendo largo por ancho en relación con el nombre de cada placa.

3.3.2 Crecimiento en diferentes medios de cultivo

Cada medio de cultivo aporta diferentes nutrientes y otros componentes que buscan favorecer el crecimiento y desarrollo del aislado. Se estudió el crecimiento de los aislados del hongo en cuatro medios diferentes: extracto de malta, agar-agua, agar-maíz y APD. En el Cuadro 3.3 se detalla la abreviación que se utilizó para cada medio de cultivo durante el estudio.

Cuadro 3.2 Abreviación de los distintos medios de cultivo a evaluar en el estudio.

Medio	Abreviación
Extracto de Malta	EM
Agar Maíz	AM
Agar Agua	AA
Agar Papa Dextrosa	APD

La elaboración de cada medio se llevó a cabo según las instrucciones de cada fabricante. Se extrajeron tres trozos de micelio de cada aislado puro obtenido y se sembró en los distintos medios. Posteriormente se ubicaron en incubadora a una misma temperatura de 20°C bajo condiciones de oscuridad. Se registró su crecimiento cada 48 horas midiendo largo por ancho en relación con el nombre de cada placa.

3.4 Identificación molecular de los aislados de *Cytospora* spp.

El proceso se llevó a cabo mediante la extracción de ADN genómico desde el micelio y estructuras reproductivas desarrolladas desde las placas Petri que contenían un crecimiento óptimo del hongo en estudio.

3.4.1 Extracción de ADN y amplificación de la reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La extracción de ADN se realizó empleando el kit de extracción DNeasy PowerSoil Pro Kit siguiendo las instrucciones establecidas por el fabricante. Posteriormente se realizó la amplificación de los fragmentos de ADN utilizando los genes β -tubulina, factor de elongación e ITS con la ayuda de los partidores Bt2a y Bt2b, EF1-728F y EF1-926R, e ITS1 e ITS4, respectivamente. La reacción en cadena de polimerasa (en adelante PCR) se llevó a cabo con la utilización de un termociclador (Verity 96-Well Thermal Cycler).

3.4.2 Secuenciación y edición

La secuenciación obtenida desde la reacción PCR se envió para su purificación y edición a MACROGEN (www.macrogen.com, COREA).

3.4.3 Análisis de BLAST

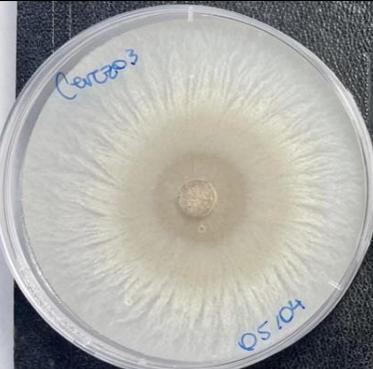
Se realizó el análisis de BLAST con la finalidad de encontrar regiones de similitud local entre las secuencias obtenidas ya que compara las secuencias de nucleótidos o proteínas con las secuencias de bases de datos y calcula la importancia estadística de las similitudes.

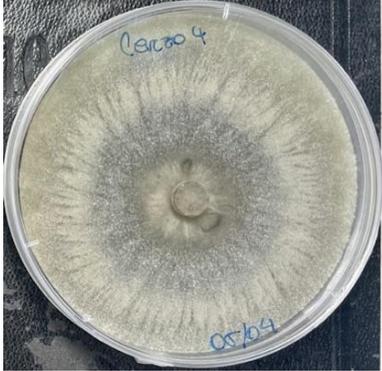
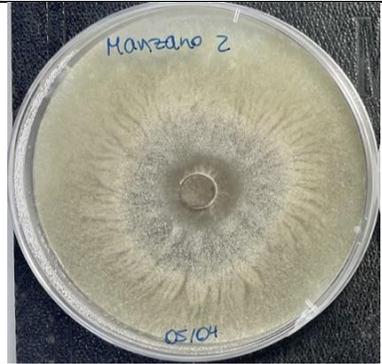
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación morfológica de los aislados

El desarrollo de estructuras en las colonias fungosas se dividió en dos grupos: Grupo I: con los aislados C1, C2, C3 y C4, los cuales presentaron estructuras reproductivas luego de 25 días a 20 y 25°C en medio de cultivo APD (Úrbez-Torres et al., 2020; Madar et al., 2007) con la presencia de *cirrus* de color anaranjado brillante, cremoso y consistente (Figura 4.1) del cual se pudo extraer abundantes conidias de forma alantoide (coma) con bordes bien definidos (Úrbez-Torres et al., 2020; Cai y Ma, 2019) (Figura 4.6); y Grupo II: con los aislados M1 y A1 los cuales presentaron dichas estructuras tras 43 días de crecimiento en luz oscura, temperatura ambiente que varió entre los 20 y 25°C y medio de cultivo APD (Madar et al., 2007) con leve exudación de *cirrus* en M1 y abundante en A1 (Figura 4.2). ; El aislado P1 que no presentó producción de estructuras reproductivas en las mismas condiciones anteriores, se le agregó al lugar de crecimiento mondadientes de madera y acículas de pino e incubadas en oscuridad a 20°C (Figura 4.4) o en luz oscura a temperatura ambiente (Figura 4.5); en ambos casos en medio de cultivo APD. Para este caso del aislado P1, únicamente desarrolló gotas de un exudado de color naranja sin presentar esporas relacionadas con este hongo fitopatógeno. La inoculación de los aislados se siguiere hacerla directamente en madera para provocar exudación de *cirrus* en menos tiempo (Úrbez-Torres et al., 2020), sin embargo, en este estudio se usó el medio de cultivo APD para lo mismo, lográndose que los aislados provenientes de cerezo (C1-C4) y avellano (A1) produjeran conidias *in vitro*.

Cuadro 4.1 Caracterización de las colonias de cada aislado en condiciones de incubación a 20°C en oscuridad durante 15 días en medio APD. Tamaño de las conidias obtenidas de exudación de *cirrus* desde los aislados C1, C2, C3 y C4 tras 25 días y de A1 tras 43 días.

Aislado	Característica de la colonia	Tamaño conidias (µm)	Colonia
C1	Presenta micelio rastrero de coloración amarillenta sobre el medio de cultivo y una delgada capa algodonosa aérea de color blanco con el paso de los días.	$3,61 \pm 0,30 \times$ $0,98 \pm 0,19$	
C2	Micelio rastrero de coloración verdosa con dos areolas de color beige ubicadas hacia el centro de la placa.	$3,78 \pm 0,55 \times$ $1,10 \pm 0,22$	
C3	Cobertura de toda la placa con micelio rastrero de coloración blanquecina, presenta una areola definida de color blanco en el centro de la placa.	$3,85 \pm 0,58 \times$ $1,25 \pm 0,29$	

C4	Coloración verdosa de micelio rastrero con dos areolas de color beige ubicadas hacia el centro de la placa.	$3.85 \pm 0.54 \times$ 1.11 ± 0.16	
M1	Micelio rastrero de color verdoso cubre por completo la placa presentando una areola de color verde brillante y otra de color verde opaco hacia el centro de la placa.	Ausente	
P1	Cobertura de micelio rastrero de color blanquecino y más blanco hacia el centro de la placa. Presenta una leve cobertura algodonosa aérea central de color blanco.	Ausente	
A1	Crecimiento de micelio rastrero blanquecino hacia el borde de la colonia y hacia el centro presenta coloración verdosa con leve cobertura algodonosa del mismo color.	$3,04 \pm 0,49 \times$ $1,08 \pm 0,19$	

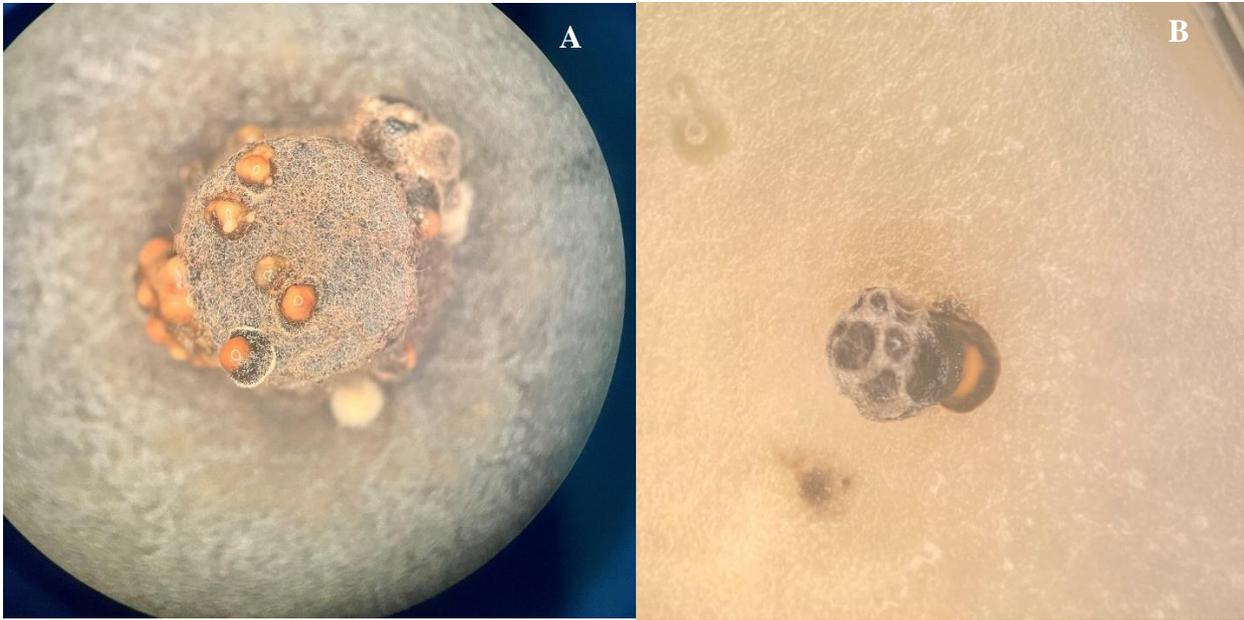


Figura 4.1 Aislados de Grupo I: (A) Exudación de *cirrus* desde picnidios en aislado C4. (B) Exudación de *cirrus* desde picnidio en aislado C1. Ambos casos tras 25 días de incubación a 20°C en medio de cultivo APD.

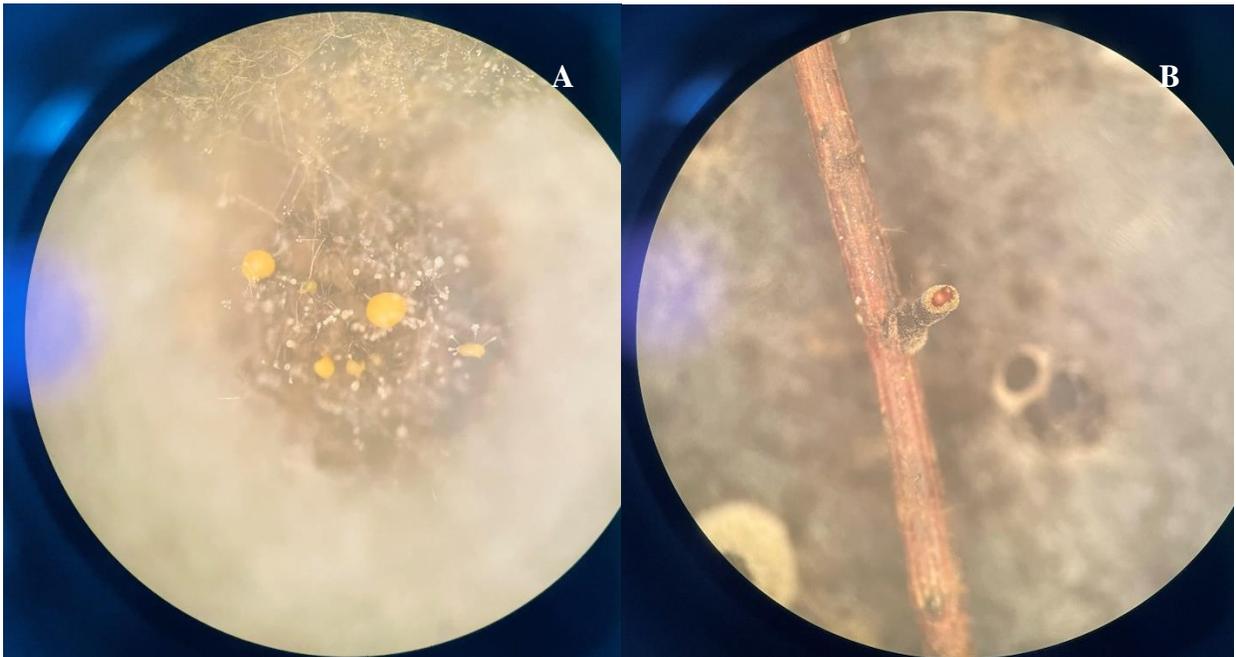


Figura 4.2 Aislados de Grupo II: (A) Exudación de *cirrus* desde picnidio en aislado A1, (B) exudación de *cirrus* desde picnidio del aislado M1. Ambos casos en acícula de pino tras 43 días de incubación a 20°C en medio de cultivo APD.



Figura 4.3 Aislados P1 (A), M1 (B) y A1 (C) tras 7 días de crecimiento en medio de cultivo PDA con acículas de pino. Aislados P1 (D), M1 (E) y A1 (F) tras 7 días de crecimiento en medio de cultivo APD con mondadientes de madera.

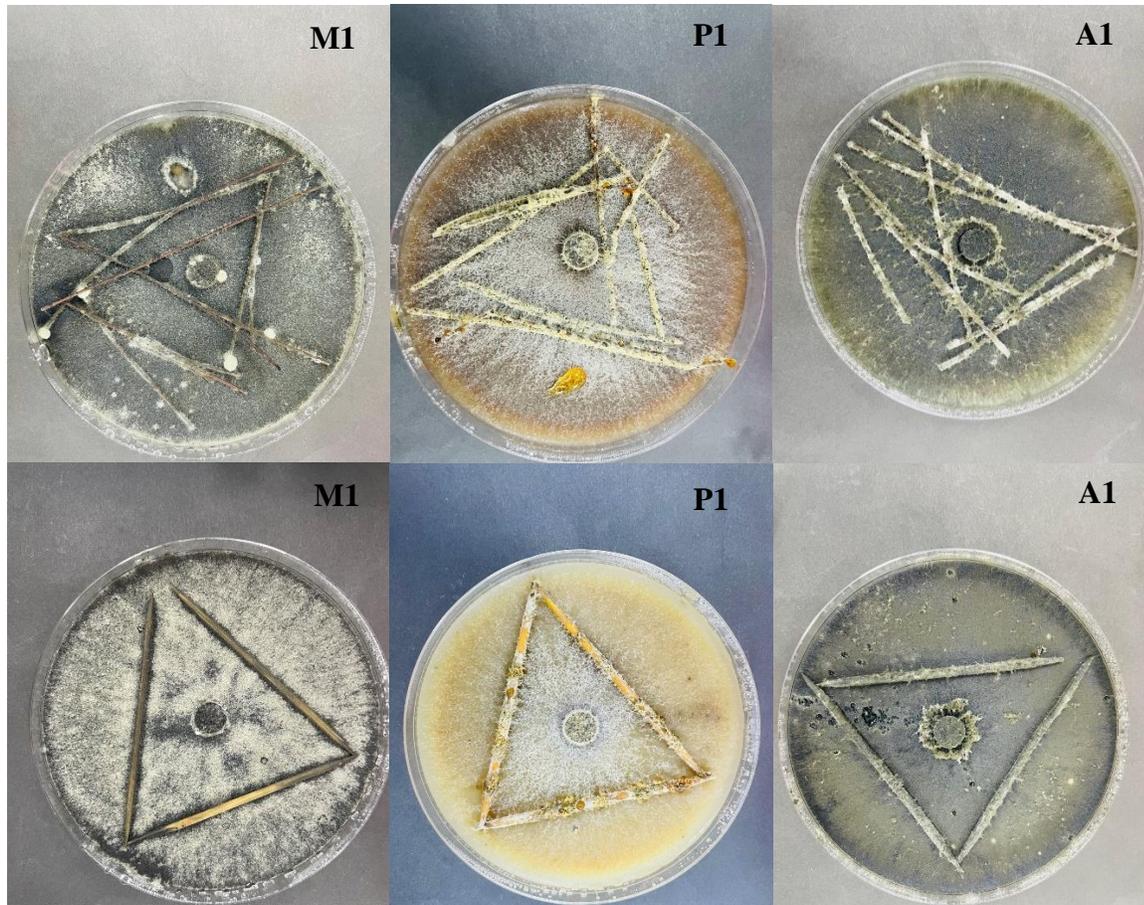


Figura 4.4 Aislados M1, P1 y A1 en mondadientes de madera y acículas de pino tras 43 días de incubación a 20°C en medio de cultivo APD en oscuridad.

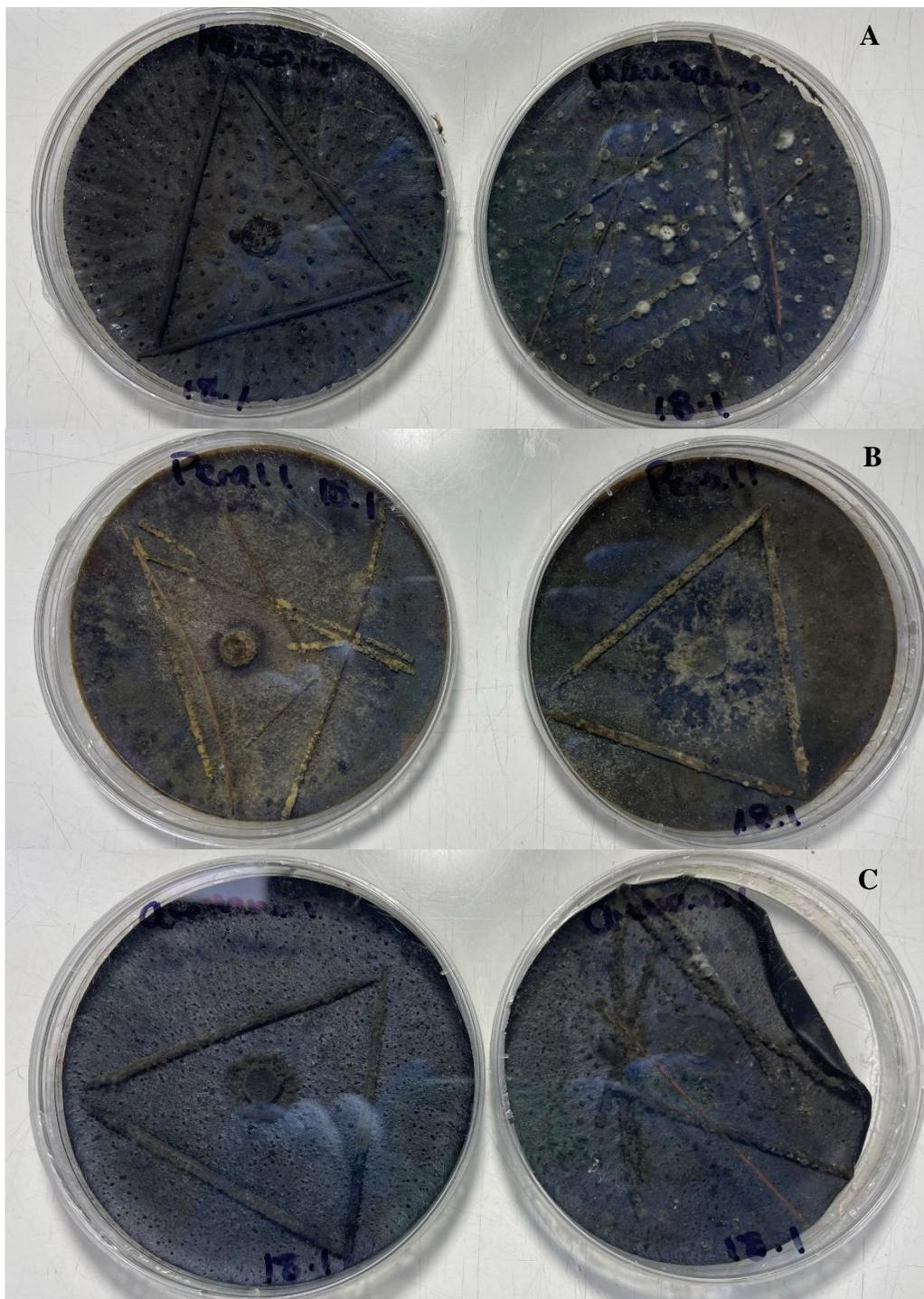


Figura 4.5 Aislados M1 (A), P1 (B) y A1 (C) con mondadientes de madera y acículas de pino tras 43 días de crecimiento en luz oscura, temperatura ambiente y medio de cultivo APD.

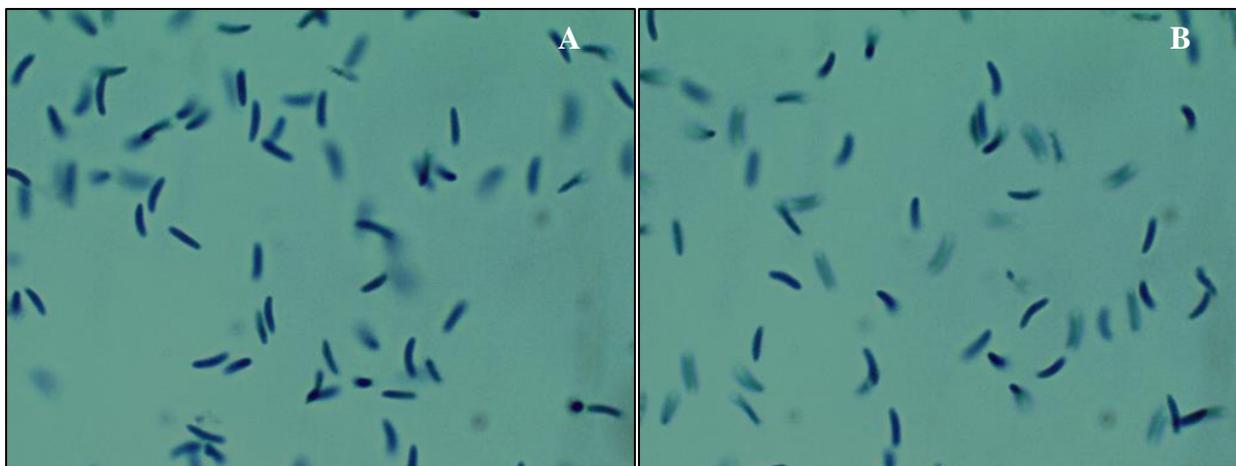


Figura 4.6 Conidias del aislado C1 (A) y C4 (B) provenientes de huerto de cerezo captadas con el programa Motic Images Plus 2.0 (MOTIC, CHINA).

4.2 Crecimiento de los aislados a distintas temperaturas

Las observaciones se realizaron tras un registro de 14 días de incubación de las colonias en medio de cultivo APD en oscuridad.

4.2.1 Aislados de Cerezo

El aislado C1 presentó características estadísticas diferentes a los aislados C2, C3 y C4, los cuales no tuvieron diferencias significativas por lo que se agruparon estadísticamente para formar el aislado C5. Dichas características de crecimiento estuvieron sujetas a evaluación por medio del análisis ANOVA Simple con la Prueba de Múltiples Rangos correspondiente, que arroja diferencia en las medias del aislado C1 comparado con las medias de los aislados C2, C3 y C4 que no presentan diferencias significativas entre ellos.

La actividad de C1 se mantuvo entre las temperaturas 5 y 35°C mientras que para C5 varió entre 5 y 30°C. C1 presentó un crecimiento óptimo entre las temperaturas 25 y 30°C alcanzando crecimiento completo a los 6 días (Luo et al., 2022, Úrbez-Torres et al., 2020; Lin et al., 2023), en las temperaturas restantes no terminó su crecimiento tras los 14 días de estudio y a 0°C no presentó actividad. Por su parte el aislado C5 presenta un rango óptimo de temperaturas entre 20 y 30°C

alcanzado a los 6 días (Lin et al., 2023; Luo et al., 2022) y de igual forma un crecimiento un poco más lento a los 10 y 15°C tras 8 y 10 días respectivamente, su crecimiento a 5°C fue bajo y nulo a los 0 y 35°C (Figura 4.7).

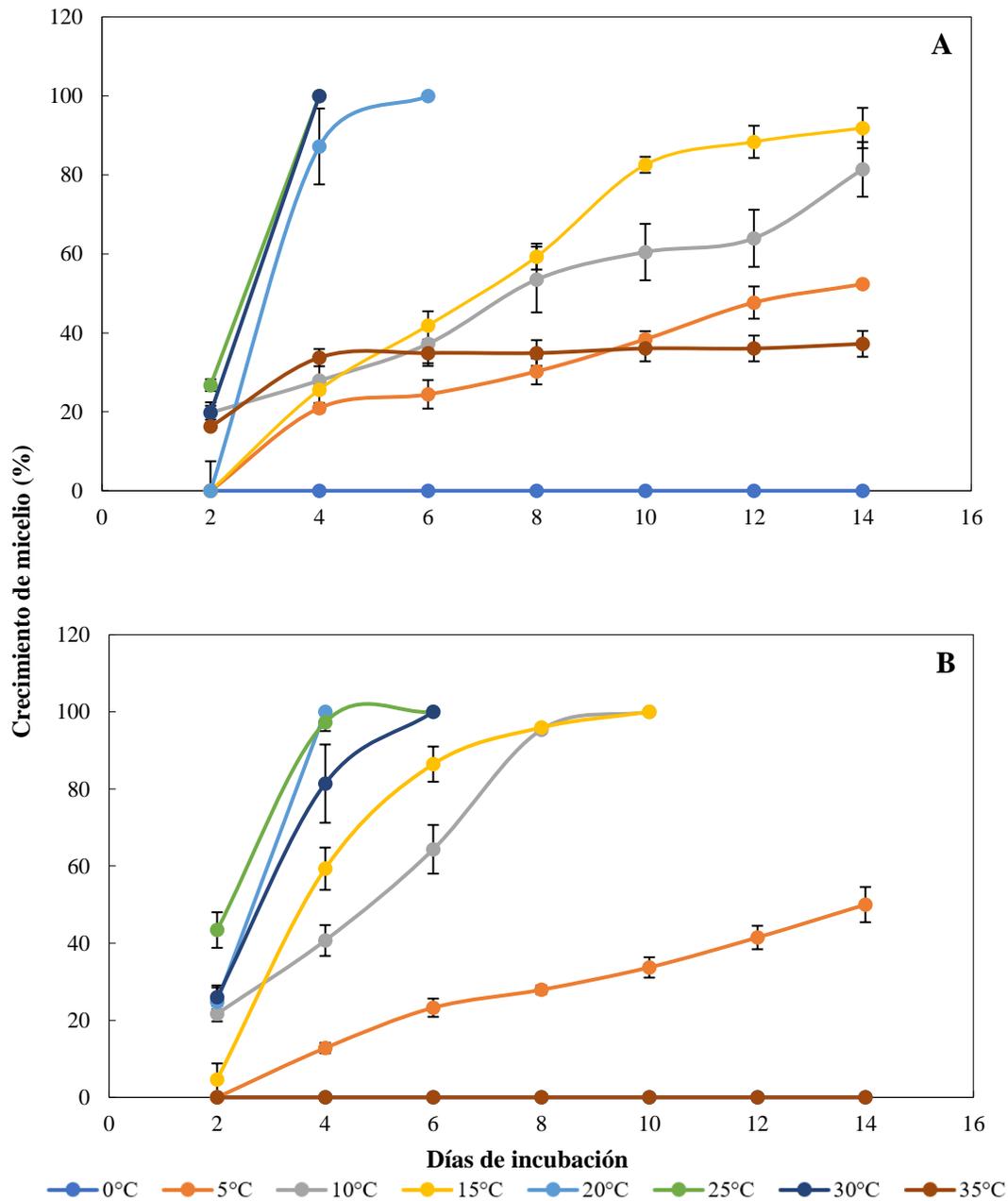


Figura 4.7 Diámetro de crecimiento del micelio de los aislados C1 (A) y C5 (B) en distintas temperaturas de crecimiento durante 14 días de incubación.

Las temperaturas de desarrollo para C1 se presentan durante el inicio de la temporada de cosecha en los meses de noviembre y diciembre con temperaturas que oscilan principalmente entre 25 y 30°C (METEOCHILE, 2023), pudiendo afectar la calidad del fruto a cosecha de variedades tempranas de cerezo tales como Bing (Donoso et al., 2007), el cual tiene bajos requerimientos de frío (Ramella, 2000) por lo que sus huertos pueden ubicarse en zonas un poco más cálidas favoreciendo su presencia. Es una especie susceptible a las bajas temperaturas puesto que su crecimiento baja notoriamente luego de los 15°C por lo que durante los meses de invierno su desarrollo en el huerto se ve afectado presentando una tasa de crecimiento prácticamente nula; además el patógeno no es capaz de invadir el tejido floemático sano del árbol por lo que requiere de heridas como método de entrada (Miller et al., 2019), esto favorece la inoculación del huerto tras realizar trabajos de poda (Úrbez-Torres et al. 2020) lo cual puede causar cortes infecciosos o lesiones de la corteza causadas por el frío (Miller et al., 2019) durante la época de invierno.

El amplio rango óptimo de temperaturas para C5 permite que se encuentre activo durante los meses de primavera, verano y parte del otoño afectando diversas variedades de cerezo que se encuentran en época de cosecha la cual deja una cicatriz en el árbol que puede actuar como vía de ingreso del patógeno a la madera del árbol (Holland et al., 2020), mediante cicatriz de caída de hojas o acciones climáticas (Perdomo et al., 2018) permitiendo su crecimiento rápidamente al encontrarse en condiciones óptimas de temperatura. Se ve limitado por temperaturas inferiores a los 5°C y al igual que C1, en el huerto se dan actividades que pueden favorecer la inoculación del patógeno en la madera.

4.2.2 Aislado M1

El aislado M1 se desarrolló entre 5 y 30 °C alcanzando un crecimiento óptimo entre 20 y 30°C a los 8 días de incubación (Lin et al., 2023) y un crecimiento más lento en las temperaturas 10 y 15°C a los 10 y 12 días respectivamente; a 5°C no logró llegar a término mientras que a 0 y 35°C no presentó crecimiento (Figura 4.8).

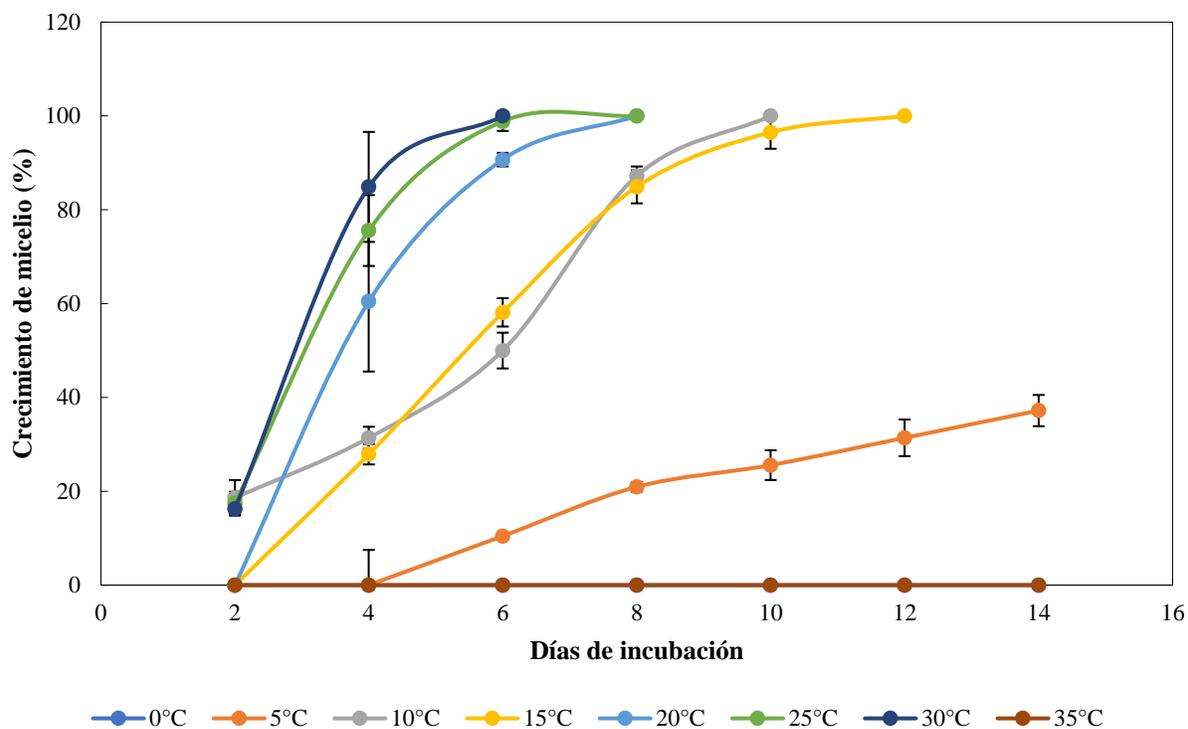


Figura 4.8 Diámetro de crecimiento del micelio de aislado M1 en distintas temperaturas de crecimiento durante 14 días de incubación.

La presencia del aislado M1 en los huertos de manzano se ve favorecida debido al amplio rango de temperaturas de crecimiento que se presentan desde primavera hasta otoño, siendo durante esta época la mayor expansión de los canchros comparado con el verano que presenta temperaturas mayores a 30°C (Brown-Rytlewski y McManus, 2007). Una vez desarrollado el canchro la corteza procede a agrietarse y descascararse mientras que las hojas distales al canchro mueren (Brown-Rytlewski y McManus, 2007). Durante los meses de invierno cuando el patógeno se encuentra en receso de crecimiento se abren las posibilidades de ingreso del hongo a la madera principalmente mediante heridas infecciosas causadas por labores de poda (Úrbez-Torres et al., 2020), además puede ingresar en menor grado por la herida de cicatriz tras la caída de hojas (Perdomo et al., 2018) y/o salpicaduras de agua libre (Latorre et al., 2004; Pinto et al., 2004). Una vez el hongo se establece en el hospedero es posible apreciar canchros en la madera del manzano lo cual provoca bajas en el rendimiento del cultivo de la manzana (Sha et al, 2022).

4.2.3 Aislado P1

Es un aislado de crecimiento más lento comparado con los anteriores, su rango de crecimiento va desde los 5 a 25°C alcanzando su crecimiento óptimo a los 8-10 días de incubación entre 10 y 20°C, no logró desarrollarse a 5 y 25 °C mientras que no presentó crecimiento entre los 0, 30 y 35°C (Figura 4.9).

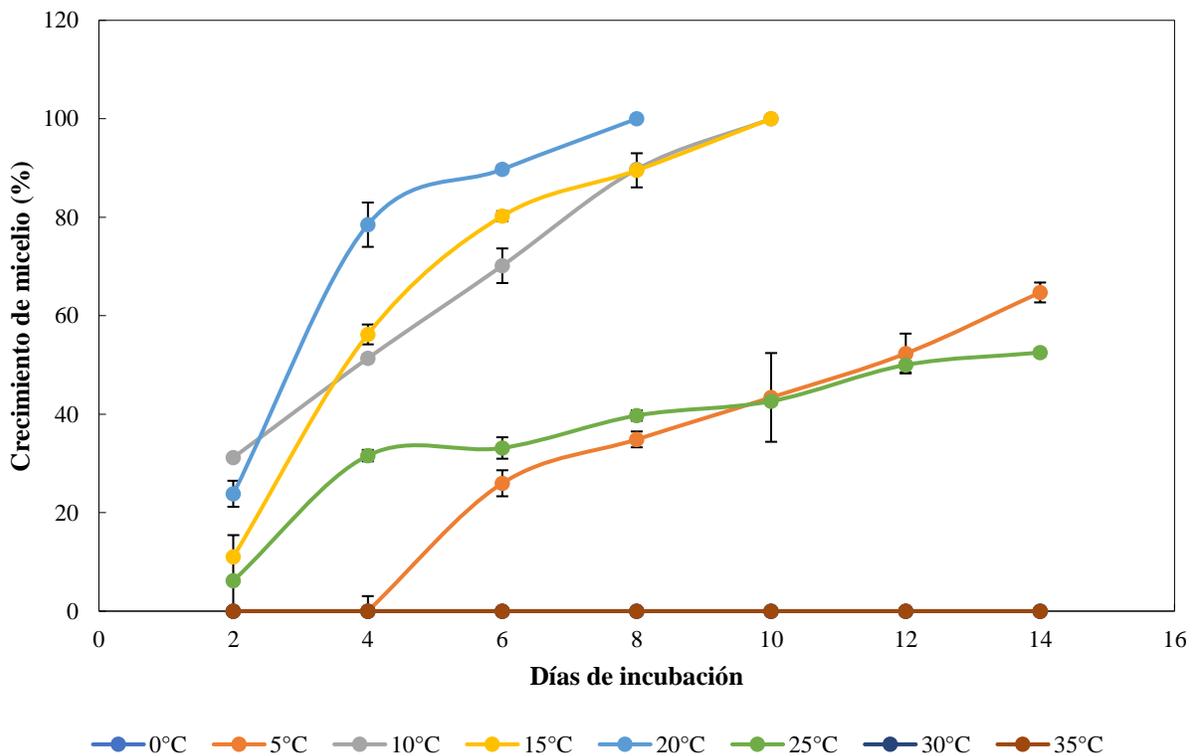


Figura 4.9 Diámetro de crecimiento del micelio de aislado P1 en distintas temperaturas de crecimiento durante 14 días de incubación.

Las temperaturas ideales de desarrollo para el aislado P1 se dan en las épocas de primavera y otoño las cuales son favorables para el aumento de los canchros en la madera (Brown-Rytlewski y McManus, 2007). Por otra parte, este patógeno presenta crecimiento sin mayores inconvenientes en aquellos huertos que presentan temperaturas de 5 a 10°C durante invierno permitiendo la inoculación del hongo en la madera mediante heridas antes mencionadas (Latorre et al., 2004; Pinto et al., 2004; Úrbez-Torres et al., 2020; Perdomo et al., 2018) y a la vez su crecimiento lento pero constante dentro del hospedero generando canchros con el paso de los días (Liu et al., 2020). En

casos severos los canchros pueden provocar la muerte regresiva de ramas y ramitas (Liu et al., 2020; Zhao et al., 2018) en los huertos de peral, afectando así la producción.

4.2.4 Aislado A1

El aislado A1 logró crecer en temperaturas entre 5 y 35°C alcanzando un crecimiento óptimo entre 4 y 6 días a 30 y 35°C, respectivamente; de igual forma completa su crecimiento a 10, 15, 20 y 25°C entre los 10 y 12 días. Presentó dificultades para desarrollarse a 5°C ya que no completó su crecimiento en el tiempo de estudio mientras que a 0°C no presentó crecimiento alguno (Figura 4.10).

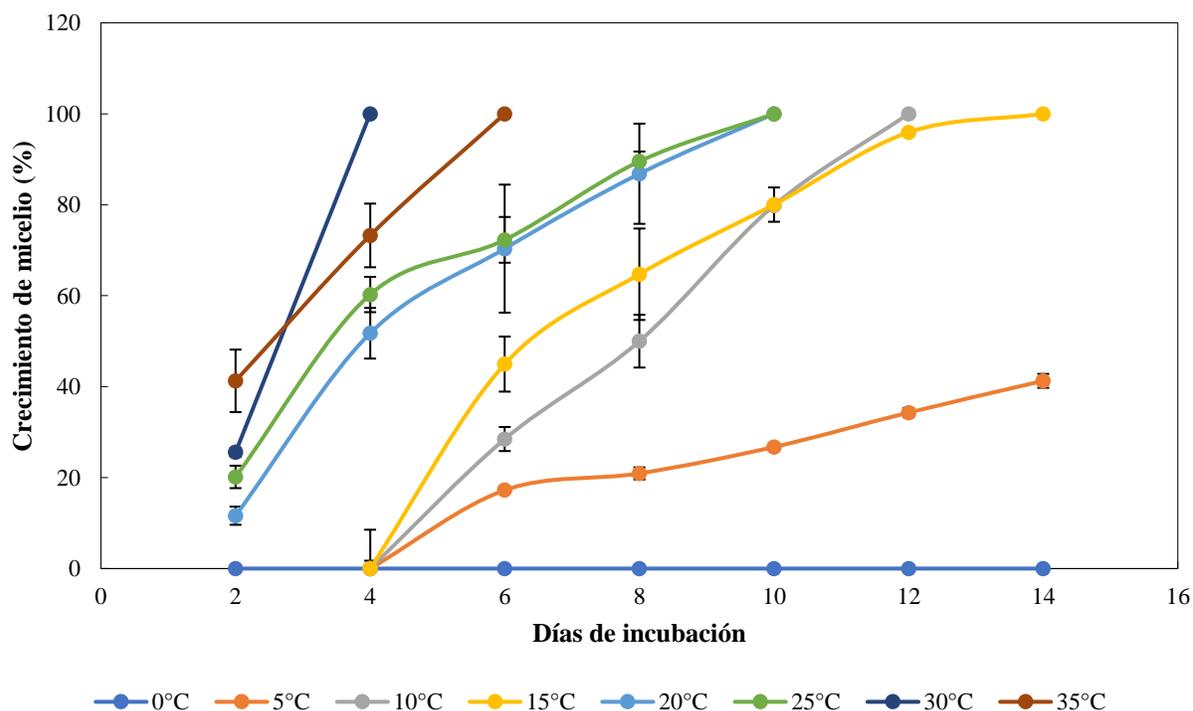


Figura 4.10 Diámetro de crecimiento del micelio de aislado A1 en distintas temperaturas de crecimiento durante 14 días de incubación.

Las temperaturas de crecimiento para A1 difieren completamente del resto de los patógenos ya que se desarrolla rápidamente durante la época de primavera y verano dificultando su crecimiento sólo en la época de invierno. De lo anterior se puede deducir que el patógeno se encuentra activo

durante el mes de febrero que es cuando inicia la caída de fruto para su posterior cosecha (Holland et al., 2020), lo cual deja al descubierto bastantes heridas por el deceso de la fruta y su posterior recolección permitiendo el ingreso del patógeno a la madera, además la poda se realiza durante el invierno (Úrbez-Torres et al., 2020) y la salpicadura y escurrimiento de agua libre (Latorre et al., 2004; Pinto et al., 2004) que favorecen su diseminación lo cual aumenta las posibilidades de ingreso. Por lo tanto, este aislado tiene un amplio rango de inoculación debido a las labores que se llevan a cabo en los huertos de avellano.

4.2.5 Tasa de crecimiento del micelio en distintas temperaturas

Se realizó una estimación del promedio de crecimiento de micelio (mm) de las colonias para las distintas temperaturas de incubación con el fin de establecer aquella que le permitió un desarrollo en menor tiempo. El registro de mediciones se realizó cada dos días durante 14 días, por lo que la tasa de crecimiento del micelio es cada 48 horas, en medio de cultivo APD.

4.2.5.1 Aislados de Cerezo

Los diámetros de las colonias a 25 y 30°C alcanzaron la máxima tasa de crecimiento para C1 con 43 mm/48 hr en ambos casos comparado con otras temperaturas; a 20°C alcanzó mayor tasa de crecimiento que a 15 y 10°C, mientras que a 5°C alcanzó una tasa de crecimiento de 6 mm/48 hr. Para C5 se observó una tasa máxima de crecimiento igual a 43 mm/48 hr a 20°C en relación con las temperaturas restantes; a 25°C se presentó de igual forma una alta tasa de crecimiento comparado con 10, 15 y 30°C que tienen una tasa más baja, mientras que a 5°C la tasa fue de solo 6 mm/48 hr. Para ambos casos no se observó crecimiento a 0°C y para C5 a 35°C (Figura 4.11).

Las temperaturas de primavera principalmente permiten que ambos patógenos se encuentren presentes de manera activa en el huerto provocando un desarrollo óptimo de canchales en la madera (Brown-Rytlewski y McManus, 2007), los cuales pueden ubicarse en ramas, ramillas y tronco del árbol (Ramella, 2000; Latorre, 2004) provocando defoliación en zonas cercanas al cancro en casos severos (Brown-Rytlewski y McManus, 2007).

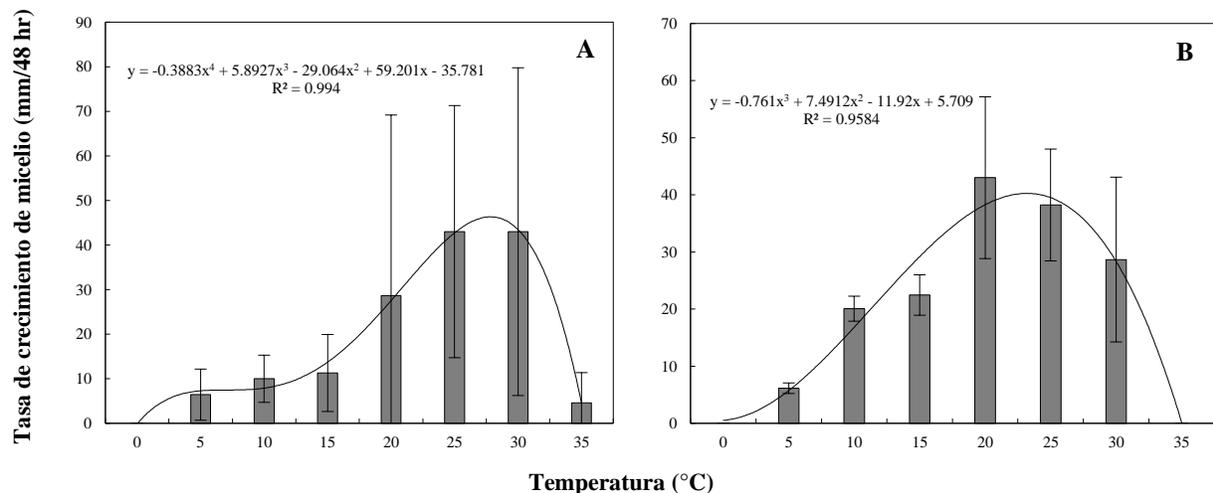


Figura 4.11 Tasa de crecimiento de micelio de los aislados C1 (A) y C5 (B) cada 48 horas en las distintas temperaturas en estudio durante 14 días. Se realizó una regresión de datos no lineal para el conjunto de datos correspondiente para cada patógeno.

4.2.5.2 Aislado M1

El peak en la tasa de crecimiento se registró a los 30°C con 29 mm/48 hr, a 25 y 25°C fue mayor comparado con las temperaturas restantes, mientras que a 5°C estuvo la tasa mínima de crecimiento igual a 6 mm/48 hr. A 0 y 35°C no se registró ningún crecimiento (Figura 4.12). Los daños son más severos durante la época de verano ya que la tasa de crecimiento más alta ocurre en aquellos meses que presentan temperaturas iguales a 30°C en donde se pueden desarrollar canchales que agrietan y descascaran la corteza del árbol (Brown-Rytlewski y McManus, 2007) provocando debilitamiento y pérdida productiva.

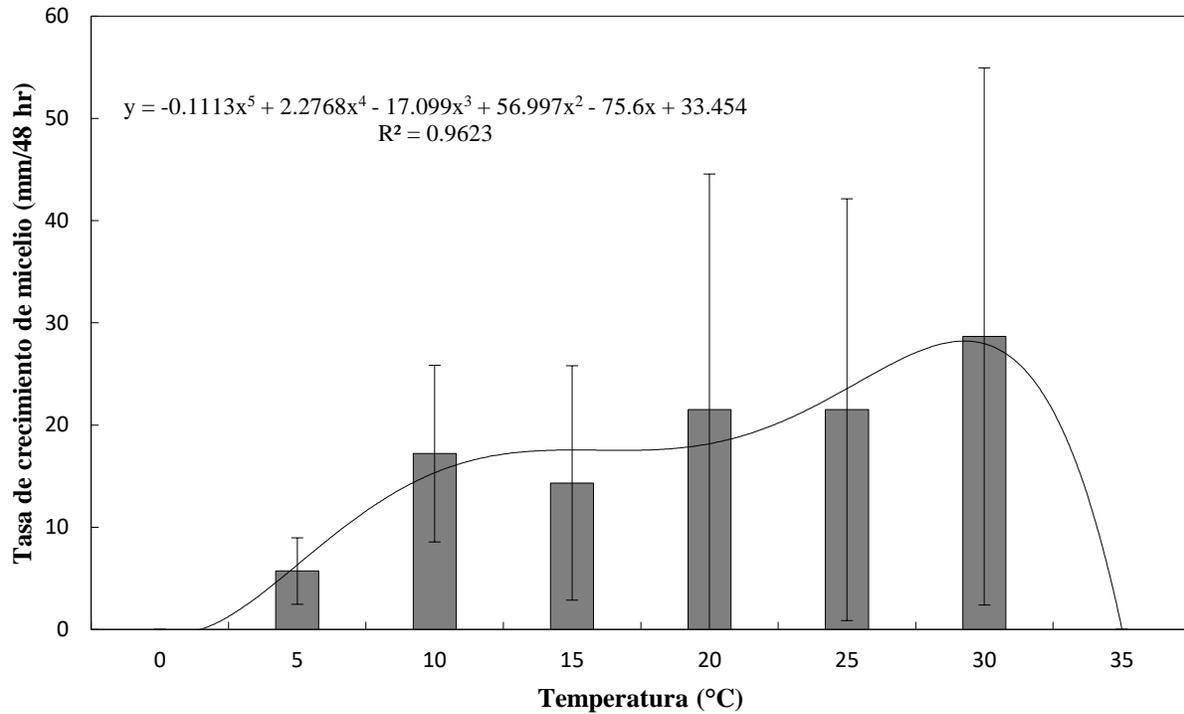


Figura 4.12 Tasa de crecimiento de micelio del aislado M1 cada 48 horas en las distintas temperaturas en estudio durante 13 días.

4.2.5.3 Aislado P1

La máxima tasa de crecimiento de la colonia se registra a 20°C con un peak de 22 mm/48 hr, a 10 y 15°C se presentó un crecimiento notorio comparado con las demás temperaturas. Por último, a 0, 30 y 35°C no se registró crecimiento (Figura 4.13). La época de verano vuelve la actividad del patógeno prácticamente nula debido a las altas temperaturas, pero una vez ingresado al tejido floemático (Miller et al., 2019) durante el invierno para desarrollar la infección durante la primavera en sus condiciones óptimas.

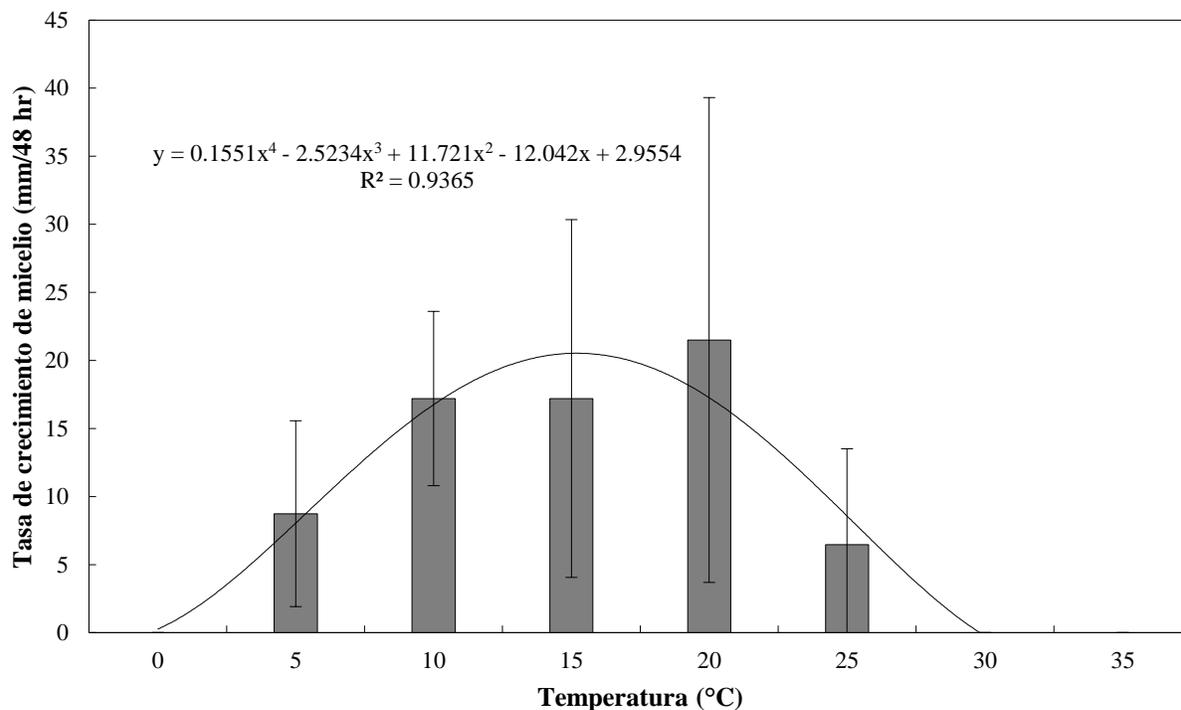


Figura 4.13 Tasa de crecimiento de micelio del aislado P1 cada 48 horas en las distintas temperaturas en estudio durante 14 días.

4.2.5.4 Aislado A1

La colonia A1 registró un desarrollo óptimo notorio a los 30°C igual a 43 mm/48 hr estando por sobre las demás temperaturas en estudio, de igual forma a los 35°C presento un buen crecimiento, al contrario de las temperaturas inferiores a los 25°C y no registrándose desarrollo a los 0°C (Figura 4.14). Esta especie al presentar crecimiento óptimo en temperaturas levemente superiores a 30°C puede estar activa durante el verano permitiendo el desarrollo de los canchales alcanzando parte de la caída de frutos que es un punto de inóculo (Holland et al., 2020) lo cual implica disminuciones severas de producción para huertos que se encuentren infectados durante la temporada.

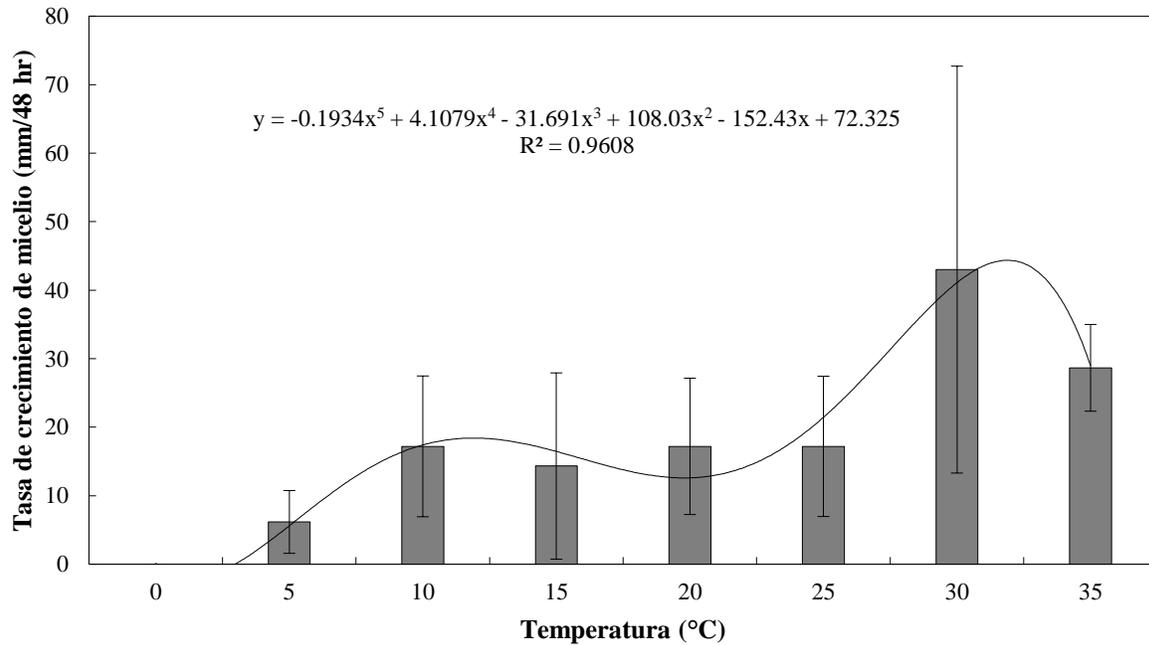


Figura 4.14 Tasa de crecimiento de micelio del aislado A1 cada 48 horas en las distintas temperaturas de crecimiento durante 14 días.

4.3 Crecimiento en diferentes medios de cultivo

La descripción de crecimiento ocurre tras 7 días de incubación a 20°C en oscuridad. Los aislados C1, C3, C4, M1 Y P1 presentaron crecimiento en todos los medios de cultivo estudiados mientras que C2 y A1 no crecieron en el medio de cultivo agar agua. Todos los aislados se desarrollaron adecuadamente en el medio APD, mientras que en extracto de malta el crecimiento fue bueno para el caso de C1, C4 y P1 y moderado en C2, C3, M1 y A1. El medio agar maíz presentó crecimiento óptimo solo en el caso de C1 mientras que para el resto de los aislados obtuvo un crecimiento moderado a bajo. Por último, los aislados C1, C3, C4, M1 y P1 presentaron bajo crecimiento en el medio agar agua mientras que los aislados C2 y A1 no desarrollaron crecimiento (Figura 4.15).

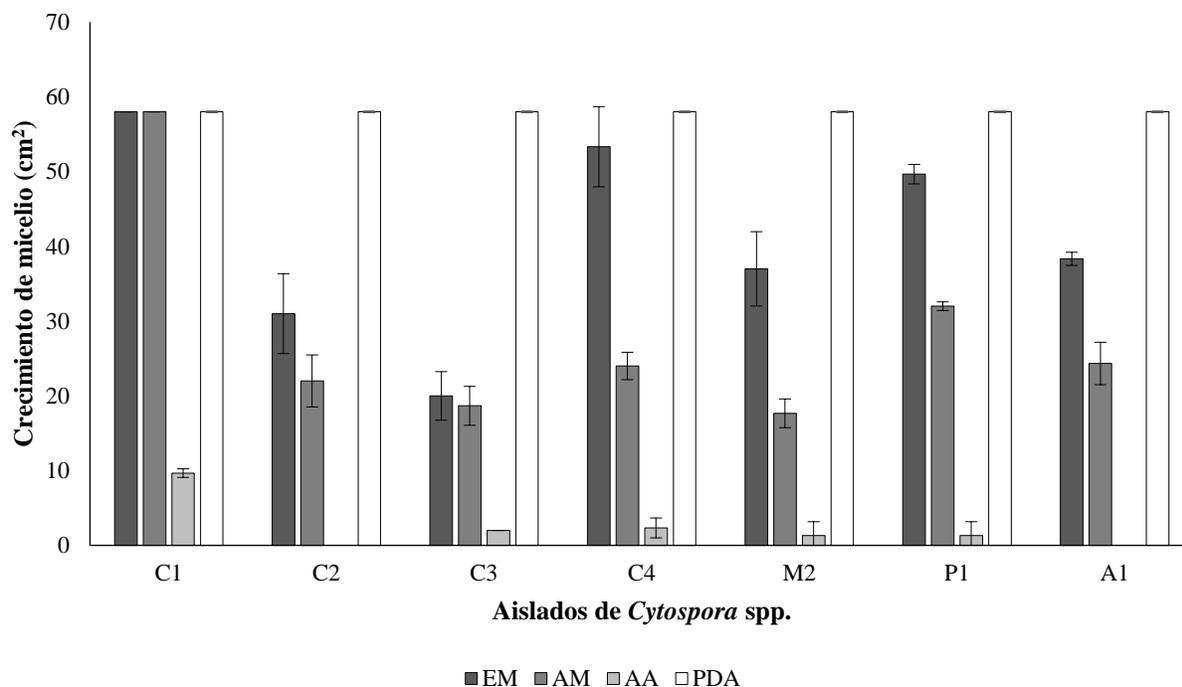


Figura 4.15 Crecimiento de micelio de cada colonia en los medios de cultivo extracto de malta (EM), agar maíz (AM), agar agua (AA) y agar papa dextrosa (APD) durante 14 días de incubación.

Los patógenos de *Cytospora* spp. tienen un crecimiento adecuado en medio de cultivo PDA el cual es un medio sólido con nutrientes de alto beneficio para este patógeno en particular (Ceiro et al., 2014), por lo que es utilizado por diversos autores tales como Urbez-Torres et al. (2020), Miller et al. (2019), Méndez (2011), Zhao et al. (2018), entre otros, como principal medio para el aislamiento de *Cytospora* spp., y en el caso de Miller et al. (2019), el aislado luego es transferido a agar Leonian.

4.4 Identificación molecular

Se logró aislar ADN de los 7 aislados de *Cytospora* spp. utilizando la metodología de extracción antes mencionada. La amplificación fue exitosa en todos los casos utilizando los partidores ITS1 y ITS4, Bt2a y Bt2b, y EF1-728F y EF1-926R para los genes ITS, BT y Factor de Elongación, respectivamente.

4.4.1 Análisis de BLAST

El aislado A1 tuvo un acertado porcentaje de identificación para *Cytospora eucalypticola* (en adelante *C. eucalypticola*) con los genes utilizados en el estudio mientras que para C2 la especie identificada corresponde a *Cytospora leucostoma* (en adelante *C. leucostoma*) y en el caso de C3, C4 y M1 el análisis fue más incierto dando como resultado *C. leucostoma* y *Cytospora sorbicola* (en adelante *C. sorbicola*) en todos los casos. Por último, se sugiere realizar edición de las secuencias de genes obtenidas para los patógenos C1 y P1 ya que su análisis corresponde a *Cytospora* spp. sin una identificación clara de la especie (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2 Resultados del análisis de BLAST de las secuencias enviadas desde MACROGEN (Corea) de los aislados en estudio utilizando los genes ITS1, ITS4, Bt2a, Bt2b, EF1-728F y EF1-926R.

Aislado	GEN	Especie
C1	ITS1	No se encontró similitud significativa
	ITS4	No se encontró similitud significativa
	Bt2a	<i>Cytospora chrysosperma</i>
	Bt2b	<i>Cytospora</i> spp.
	EF1-728F	<i>Cytospora</i> spp.
	EF1-926R	No se encontró similitud significativa
C2	ITS1	<i>Cytospora leucostoma</i>
	ITS4	<i>Cytospora leucostoma</i>
	Bt2a	<i>Cytospora leucostoma</i>
	Bt2b	No se encontró similitud significativa
	EF1-728F	No se encontró similitud significativa
	EF1-926R	No se encontró similitud significativa
C3	ITS1	<i>Cytospora sorbicola</i>
	ITS4	<i>Cytospora sorbicola</i>
	Bt2a	<i>Cytospora leucostoma</i>
	Bt2b	<i>Cytospora leucostoma</i>
	EF1-728F	<i>Cytospora</i> spp.
	EF1-926R	No se encontró similitud significativa
C4	ITS1	<i>Cytospora leucostoma</i>
	ITS4	<i>Cytospora sorbicola</i>
	Bt2a	No se encontró similitud significativa
	Bt2b	<i>Cytospora leucostoma</i>

	EF1-728F	<i>Cytospora sorbicola</i>
	EF1-926R	<i>Cytospora sorbicola</i>
M1	ITS1	<i>Cytospora</i> spp.
	ITS4	<i>Cytospora leucostoma</i>
	Bt2a	<i>Cytospora leucostoma</i>
	Bt2b	<i>Cytospora leucostoma</i>
	EF1-728F	<i>Cytospora sorbicola</i>
	EF1-926R	<i>Cytospora sorbicola</i>
P1	ITS1	<i>Cytospora californica</i>
	ITS4	No se encontró similitud significativa
	Bt2a	No se encontró similitud significativa
	Bt2b	<i>Cytospora parasitica</i>
	EF1-728F	<i>Cytospora</i> spp.
	EF1-926R	No se encontró similitud significativa
A1	ITS1	<i>Cytospora eucalypticola</i>
	ITS4	<i>Cytospora eucalypticola</i>
	Bt2a	<i>Cytospora eucalypticola</i>
	Bt2b	<i>Cytospora eucalypticola</i>
	EF1-728F	No se encontró similitud significativa
	EF1-926R	No se encontró similitud significativa

Los genes ITS, BT y Factor de Elongación son buenos identificadores para *C. eucalypticola*, principalmente el uso de los partidores ITS1, ITS4, Bt2a, Bt2b, EF1-728F y EF1-926R; dicho patógeno se encuentra presente en cultivos forestales particularmente de *Eucalyptus* spp. como lo describen los autores Wilkes et al. (1989) y Alonso et al. (2005); por lo que se deduce que *C. eucalypticola* logró adaptarse para infectar huertos de avellano los cuales están rodeados de estas plantaciones forestales; por otra parte, el avellano se ve afectado por *Cytospora corylicola*, la cual es la principal especie causante de cancro a la madera (Lamichhane et al., 2014). Las especies *C. leucostoma* y *C. sorbicola* no presentan una clara identificación con el uso de los genes antes mencionados ya que los partidores correspondientes no distinguen con claridad la especie estudiada; es por esto por lo que sería una buena opción utilizar otros cebadores recomendados por otros autores tales como ACT-512F y ACT-783R o NL1 y NL4 mencionado por Úrbez-Torres et al. (2020) y Cai y Ma (2019), respectivamente. En el caso de los patógenos P1 y C1, los partidores utilizados no lograron identificar una especie de *Cytospora* en particular para cada uno, para esto se recomienda realizar estudios enfocados en el uso de cebadores diferentes tales como RPB-5F y

RPB-7cR (Cai y Ma,2019) sumado a los mencionados anteriormente para lograr conocer el aislado de *Cytospora* spp. con mayor certeza. Además, la edición de las secuencias obtenidas favorecería el estudio para lograr una adecuada identificación.

5. CONCLUSIONES

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

- Las temperaturas óptimas de crecimiento para los aislados de *Cytospora* spp. estudiados son 20 a 30°C para cerezo y manzano, 10 a 20°C para peral y 30 a 35°C en avellano.
- El medio de cultivo Agar Papa Dextrosa es el más indicado para un óptimo crecimiento de los aislados de *Cytospora* spp.
- Las principales especies identificadas pueden ser *Cytospora eucalypticola* para A1, *Cytospora leucostoma* y *Cytospora sorbicola* para C2, C3, C4 y M1 y *Cytospora* spp. en el caso de los aislados C1 y P1.

6. REFERENCIAS

Alejo, G., Aburto, C., Sánchez, A. y Navarrete, A. 2016. Eficiencia productiva en la nutrición de los frutales. *Educatatecnología* 12: 73-81.

Alonso, R., Lupo, S. and Bettucci, L. 2005. Pathogenicity evaluation of *Cytospora eucalypticola* isolated from *Eucalyptus* spp: cankers in Uruguay. *Fitopatologia Brasileira* 30: 3.

Alvarez, L.A., Vicent, A., De la Roca, E., Bascón, J., Abad-Campos, P., Armengol, J. and García-Jiménez, J. 2008. Branch cankers on citrus trees in Spain caused by *Phytophthora citrophthora*. *Plant Pathology* 57: 84-91.

Apey, A. 2019. La fruticultura en Chile: tendencias productivas y su expresión territorial. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). [En línea] Recuperado en: <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2019/05/Art%C3%Adculo-Fruticultura_mayo-1.pdf>. Consultado el 29 de mayo de 2022.

ASOEX, 2021. Temporada 2020-2021: Exportaciones de frutas chilenas terminan con leve alza de 1,2%. Mientras China se consolida como segundo país de destino. [En línea] Recuperado en: <<https://www.asoex.cl/component/content/article/25-noticias/1029>>. Consultado el 29 de mayo de 2022.

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

Brown-Rytlewski, D. E. and McManus, P. S. 2007. Outbreak of Leucostoma Canker Caused by *Leucostoma cincta* on McIntosh Apple Trees in Wisconsin. *Plant Disease* 84: 923-923.

Cai, GF. and Ma, R. 2019. Primer informe de *Cytospora ulmi* que causa cancro en *Elaeagnus angustifolia* en China. *Plant Disease* 103: 1773.

Ceiro, W. G., Arévalo, J., Puertas, A. L., y Hidalgo-Díaz, L. 2014. Efecto de las concentraciones de NaCl sobre el crecimiento micelial de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams en medio PDA y suelo. *Revista de Protección Vegetal* 29: 122-127.

Díaz, G., Valdés, A., Halleen, F., Ferrada, E., Lolas, M. and Latorre, B. 2022. Characterization and pathogenicity of *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* species causing Botryosphaeria canker and dieback in apple trees in Central Chile. *Plant Disease* 106: 925-937.

Díaz, G. 2020. Cancrosis y muerte regresiva en manzanos: etiología y aspectos epidemiológicos en Chile. Pomáceas. [En línea] Recuperado en: <<https://pomaceas.utralca.cl/wp-content/uploads/2021/11/111.-Enfermedades-del-manzano.-G.-D%C3%Adaz-y-M.-Lolas.-Julio-2020.pdf>>. Consultado el 24 de mayo de 2022.

Díaz, G., Zoffoli, J., Ferrada, E. and Lolas, M. 2021. Identification and pathogenicity of *Diplodia*, *Neofusicoccum*, *Cadophora* and *Diaporthe* species associated with Cordon Dieback in kiwi cultivar Hayward in Central Chile. *Plant Disease* 105:1308-1319.

Díaz, GA., Auger, J., Besoain, X., Bordeu, E. and Latorre, BA. 2013. Prevalencia y patogenicidad de hongos asociados a enfermedades del tronco de la vid en viñedos chilenos. *Ciencia e Investigación Agraria* 40: 327-339.

Díaz, K. 2022. Importancia de los ácaros en los cítricos (*Citrus* spp). Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Babahoyo, Ecuador, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad técnica de Babahoyo. 19 p.

Donoso, J., Bastías, R., Lemus, G. y Silva, L. (2007) Comportamiento fenológico del cerezo (*Prunus avium* L.) en tres localidades de la VI región, temporadas 2005-2006 y 2006-2007. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. [En línea] Recuperado en: <<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/4166/NR34355.pdf?sequence=1&isAllowed>>. Consultado el 19 de febrero de 2023.

Grinbergs, D., Chilian, J. and France, A. 2021. First Report of *Eutypa lata* Causing Cankers and Dieback in Sweet Cherry in Chile. *Plant Disease* 105: 3307-3307.

Fan, X.L., Bezerra, J.D.P., Tian, C.M. and Crous, P.W. 2020. *Cytospora* (Diaporthales) in China. *Persoonia – Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 45: 01-45.

González-Domínguez, E., Armengol, J. and Rossi, V. 2017. Biology and Epidemiology of *Venturia* Species Affecting Fruit Crops: A Review. *Frontiers in Plants Science* 8: 1946.

Guerrero, JA. and Pérez, SM. 2013a. First Report of Shoot Blight and Canker Caused by *Diplodia coryli* in Hazelnut Trees in Chile. *Plant Disease* 97: 144-144.

Guerrero, J. and Pérez, S. 2013b. First Report of *Diaporthe australafricana*-Caused Stem Canker and Dieback in European Hazelnut (*Corylus avellana* L.) in Chile. *Plant Disease* 97: 1657-1657.

Holland, L., Travadon, R., Lawrence, D., Nouri, M. and Trouillas, F. 2021. Evaluation of Pruning Wound Protection Products for the Management of Almond Canker Diseases in California. *Plant Disease* 105: 3368-3375.

Holland, L., Trouillas, F., Nouri, M., Lawrence, D., Crespo, M., Doll, D., Duncan, R., Holtz, B., Culumber, C., Yaghmour, M., Niederholzer, F., Lightle, D., Jarvis-Shean, K., Gordon, P. and Fichtner, E. 2020. Fungal Pathogens Associated with Canker Diseases of Almond in California. *Plant Disease* 105: 346-360.

Jiang, N., Yang, Q., Fan, XL. and Tian, CM. 2020. Identification of six *Cytospora* species on Chinese chestnut in China. *MycoKeys* 62: 1-25.

Jimenez Luna, I., Besoain, X., Saá, S., Peach-Fine, E., Cádiz, F., Riquelme, N., Larach, A., et al. 2022. Identity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from *Juglans regia* in Chile. *Phytopathologia Mediterranea* 61: 79-94.

Lamichhane, J. 2014. *Xanthomonas arboricola* Diseases of Stone Fruit, Almond, and Walnut Trees: Progress Toward Understanding and Management. *Plant Disease* 98: 1600-1610.

Lamichhane, J., Fabi, A. and Varvaro, L. 2014. Summer Heat and Low Soil Organic Matter Influence Severity of Hazelnut *Cytospora* Canker. *Phytopathology* 104: 387-395.

Latorre, B.A. 2004. Enfermedades de las plantas cultivadas. Primera 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.

Lin, L., Pan, M., Bezerra, J., Tian, C. and Fan, X. 2023. Pathogenicity of *Cytospora* Species from *Populus* in China. *Plant Disease* 107: 83-96.

Liu, X., Li, X., Bozorov, T., Ma, R., Ma, J., Zhang, Y., Yang, H., Li, L. and Zhang, D. 2020. Characterization and pathogenicity of six *Cytospora* strains causing stem canker of wild apple in the Tianshan Forest, China. *Forest Pathology* 50: e12587.

Loewe, V., Pineda, G. y Delard, C. 2001. Cerezo común: una alternativa para producir madera de alto valor. ResearchGate. [En línea] Recuperado en: <https://www.researchgate.net/publication/263102634_Cerezo_comun_Prunus_avium_L_una_alternativa_para_producir_madera_de_alto_valor>. Consultado el: 01 de junio de 2022.

Luo, Y., Ma, R., Barrera, E., Gusella, G. and Michailides, T. J. 2022. Effects of Temperature on Development of Canker-Causing Pathogens in Almond and Prune. *Plant Disease* 106: 2424-2432.

Madar, Z., Solel, Z. and Kimchi, M. 2007. First Report of *Cytospora* Canker Caused by *Cytospora chrysosperma* on White Poplar in Israel. *Plant Disease* 88: 220-220.

Mejías, F. 2019. Efecto del clima sobre la expresión de escaldado superficial en peras (*Pyrus communis* L.) cv. Packham's Triumph. Memoria para optar a título de Ingeniero Agrónomo. Talca, Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca. 49 p.

Méndez, E. 2011. Identificación y control *in vitro* de *Cytospora* spp. como agente causal de muerte en madera en manzanos de la Región del Maule. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Talca, Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca. 31 p.

Miller, S. T., Otto, K. L., Sterle, D., Minas, I. S. and Stewart, J. E. 2019. Preventive Fungicidal Control of *Cytospora leucostoma* in Peach Orchards in Colorado. *Plant Disease* 103: 1138-1147.

Dirección Meteorológica de Chile (METEOCHILE). 2023. Servicios Climáticos. Temperatura 2022. Dirección General de Aeronáutica Civil. [En línea] Recuperado en: <https://climatologia.meteochile.gob.cl/application/historico/datosDescarga/340031>. Consultado el 19 de febrero de 2023.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2017. Agricultura Chilena: reflexiones y desafíos al 2030. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. [En línea] Recuperado en: https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2018/01/ReflexDesaf_2030-1.pdf >. Consultado el 06 de junio del 2022.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2022a. Estadísticas Productivas. Estadísticas de Frutales. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. [En línea] Recuperado en: <https://www.odepa.gob.cl/estadisticas-del-sector/estadisticas-productivas>>. Consultado el 03 de mayo del 2022.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2022b. Frutas Frescas y Procesadas. Consultas Comercio exterior. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. [En línea] Recuperado en: <https://www.odepa.gob.cl/rubros/frutas-frescas-y-procesadas>>. Consultado el 24 de mayo del 2022.

Oksel, C., Avin, FA., Mirik, M. and Baysal-Gurel, F. 2022. Identification and Genetic Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from Sweet Cherry in Turkey. *Plant Disease* 106: 1253-1261.

Padilla, C., Lobos, O., Brevis, P. 2018. *Microbiología fundamental*. Primera edición. Editorial Universidad de Talca. Talca, Chile. 318 p.

Perdomo, O. P., Miniño, V., Rodríguez de Francisco, L. and León, Y. 2018. *Cytospora rhizophorae* Kohlm. & E. Kohlm (Valsaceae, Ascomycota) en la República Dominicana. *Ciencia, Ambiente y Clima* 1: 23-31.

Pinto, A., English, H., Alvarez, M. 1994. Principales enfermedades de los frutales de hojas caduca en Chile. INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias). [En línea] Recuperado en: <<https://hdl.handle.net/20.500.14001/38159>>. Consultado el 24 de mayo de 2022.

Ramella A., F. 2000. *Cytospora leucostoma* agente causal de una nueva cancrrosis del cerezo (*Prunus avium*) en Chile. INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias). [En línea] Recuperado en: <<https://hdl.handle.net/20.500.14001/54399>>. Consultado el 03 de mayo del 2022.

Royse, D.J. and Rise, S.M. 1978. The influence of fungi isolate from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology* 68: 603-607.

Santos da Silva, J., Bezerra, J., Dórea, C. and Vilela, R. 2020. First Report of Sudden Death of Clove Trees Caused by *Cytospora eugeniae* in Brazil. *Plant Disease* 104: 1868.

Sha, S., Wang, Z., Yan, C., Hao, H., Wang, L. and Feng, H. 2022. Identification of fungal species associated with apple canker in Tarim Basin China. *Plant Disease* 0.

Shindoi, M.M., Chamorro, D.L., Avico, E.L. y Sarco, P.C. 2020. Efecto de dos densidades de plantación en el cultivo de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) en Colonia Benitez Chaco. *Agrotecnia* 30: 105-111.

Stewart, JE., Miller, ST., Zink, FA., Caballero, J. and Tembrock, LR. 2022. Genetic and Phenotypic Characterization of the Fungal Pathogen *Cytospora plurivora* from Western Colorado Peach Orchards and the Development of a ddPCR Assay for Detection and Quantification. *Plant Disease* 112: 917-928.

Sutton, B, T., Aldwinckle, H., Agnello, A. and Walgenbach, J. 2014. Compendium of Apple and Pear Diseases and Pests. Editorial: Amer Phytopathological Society. Segunda edición. Minesota, USA. 224p.

Úrbez-Torres, J., Lawrence, D., Peduto, F. and Trouillas, F. 2020. Dieback of olive twigs and branches in California caused by *Cytospora oleicola* and the newly described species *Cytospora olivarum* spp. nov. *Plant Disease* 104: 1908-1917.

Vajna, L. and Kiss, L. 2008. First Report of Powdery Mildew on *Pyrus calleryana* Caused by *Podosphaera leucotricha*. *Plant Disease* 92: 176-176.

Valenzuela, Y. 2020. Eficiencia de protección de fungicidas comerciales formulados en pasta u líquido sobre heridas de poda en nogales var. Chandler contra *Diplodia mutila* causante de la muerte regresiva. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Talca, Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca. 39 p.

Venter, E., Lennox, CL. and Meitz-Hopkins, JC. 2017. First Report of *Cytospora punicae* Causing Post-Harvest Fruit Rot on Pomegranate in South Africa. *Plant Disease* 101: 631-631.

Wang, Y. and Wang, Y. 2020. Oxalic acid metabolism contributes to full virulence and pycnidial development in the poplar canker fungus *Cytospora chrysosperma*. *Phytopathology* 110: 1319-1325.

Webster, A.D. and Looney, N.E. 2004. Cherries: Crop Physiology, Production and Uses. First Edition. CABI Publishing. Cambridge, USA. 513 p.

Wilkes, J., Dale, G. T. and Old, K. M. 1989. Production of ethylene by *Endothia gyrosa* and *Cytospora eucalypticola* and its possible relationship to kino vein formation in *Eucalyptus maculata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34:171-180.

Zhao, SF., Guo, KF., El, I. and Yiming, A. 2018. First report of *Cytospora nivea* causing *Cytospora* canker on walnut (*Juglans regia* L.) in the Tianshan Mountains region of Xinjiang, China. *Plant Disease* 102: 2640-2640.