

Enfermedades de cultivos frutales del Uruguay: hongos endófitos, patógenos latentes y fitopatógenos

**Tesis de Maestría en
Ciencias Biológicas,
Microbiología
UdelaR - PEDECIBA**

***Lic. Lucía Sessa
2016***



Enfermedades de cultivos frutales del Uruguay: hongos endófitos, patógenos latentes y fitopatógenos.

Lic. Lucía Sessa Jusid

Orientadora: Dra. Sandra Lupo

Co-Orientador: Dr. Eduardo Abreo

Financiamiento: ANII

Índice de Contenidos	<i>i</i>
Índice de Figuras y Tablas	<i>ii</i>
Resumen	<i>iii</i>
Agradecimientos	<i>iv</i>
1. Introducción	1
1.1 Fruticultura en Uruguay	1
1.2 Características y enfermedades de los cultivos	3
1.2.1 Cultivo de manzana	3
1.2.1.1 Enfermedades de la madera del manzano producidas por hongos	3
1.2.2 Cultivo de durazno	5
1.2.2.1 Enfermedades de la madera del duraznero producidas por hongos	6
1.2.3 Cultivo de pera	7
1.2.3.1 Enfermedades de la madera del peral producidas por hongos	8
1.2.4 Cultivo de arándano	8
1.2.4.1 Enfermedades de la madera del arándano producidas por hongos	9
1.3 Hongos endófitos	10
1.4 Hongos patógenos latentes	12
1.5 Hongos fitopatógenos	14
1.5.1 Botryosphaeriaceae	16
1.5.2 <i>Diaporthe</i> spp.	18
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Metodología	22
3.1 Muestreo	22
3.1.1 Hongos endófitos asociados a tejido sano	22
3.1.2 Hongos fitopatógenos asociados a síntoma	22
3.2 Aislamientos	22
3.3 Identificación	24
3.3.1 Identificación morfológica	24
3.3.2 Identificación molecular	24

3.4	Patogenicidad y virulencia	27
3.4.1	Inoculación bajo condiciones de laboratorio	27
3.4.2	Inoculación en campo	28
3.4.3	Evaluación de la patogenicidad	29
3.5	Cebadores específicos	30
3.5.1	Diseño	30
3.5.1.1	Determinación de la temperatura de hibridización	30
3.5.2	Evaluación de la especificidad	31
4.	Resultados	32
4.1	Identificación de hongos endófitos	32
4.2	Descripción de síntomas	35
4.3	Identificación de hongos fitopatógenos	40
4.3.1	Botryosphaeriaceae	42
4.3.2	<i>Diaporthe</i> spp.	49
4.3.3	Especies menos frecuentes	53
4.4	Patogenicidad bajo condiciones de laboratorio	65
4.4.1	Aislamientos endófitos	65
4.4.2	Aislamientos obtenidos de síntoma	68
4.5	Patogenicidad en campo	70
4.5.1	Aislamientos obtenidos de síntoma	71
4.6	Cebadores específicos	72
4.6.1	Diseño	72
4.6.1.1	Evaluación de la especificidad	73
5.	Discusión	75
5.1	Hongos endófitos	75
5.2	Hongos fitopatógenos	78
6.	Conclusiones	88
7.	Bibliografía	90

Índice de Figuras

Figura 1	Zonas de producción de frutales de hoja caduca	2
Figura 2	Aspecto de las colonias de hongos endófitos en medio	33
Figura 3	Síntomas observados en árboles de manzano	37
Figura 4	Síntomas observados en ramas de durazno	38
Figura 5	Síntomas observados en ramas de arándano	39
Figura 6	Morfotipos de aislamientos de Botryosphaeriaceae fitopatógenas	42
Figura 7	Uno de los 100 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región ITS	45
Figura 8	Uno de los 4 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región RPB2	47
Figura 9	Uno de los 6 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis concatenado de la región ITS y EF1- α	48
Figura 10	Uno de los 100 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis concatenado de la región ITS y EF1- α	51
Figura 11	Aislamientos de <i>Cytospora</i>	53
Figura 12	Uno de los 74 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región ITS	55
Figura 13	Morfotipos de aislamientos de <i>Paraconiothyrium</i> spp.	56
Figura 14	Uno de los 54 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región ITS	57
Figura 15	Aislamientos de <i>Phaeoacremonium</i> y <i>Pleurostomophora</i>	58
Figura 16	Uno de los 100 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región ITS	60
Figura 17	Uno de los 4 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región B-tub	61
Figura 18	Aislamientos de <i>Cylindrocarpon</i> spp.	62
Figura 19	Uno de los 6 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región ITS	63
Figura 20	Aislamientos de <i>Eutypa leptoplaca</i> , <i>Collophora rubra</i> y <i>Pestalotiopsis</i> sp.	64
Figura 21	Síntomas generados en ramas inoculadas con aislamientos endófitos bajo condiciones de laboratorio	67
Figura 22	Electroforesis en gel de agarosa al 1%	74
Figura 23	Electroforesis en gel de agarosa al 1%	74

Índice de Tablas

Tabla 1	Características de los cebadores utilizados	26
Tabla 2	Número de aislamientos y abundancias relativas de hongos endófitos presentes en las distintas especies frutales	34
Tabla 3	Especie de hongos asociados a síntomas en los distintos frutales	41
Tabla 4	Largo de la lesión producida por los aislamientos endófitos inoculados sobre ramas sanas de manzano, duraznero, peral y arándano bajo condiciones de laboratorio	66
Tabla 5	Lesión producida por la inoculación cruzada de aislamientos obtenidos de síntoma sobre ramas sanas de manzano, duraznero y peral bajo condiciones de laboratorio	69
Tabla 6	Largo de lesión producida por inoculación cruzada de aislamientos obtenidos de síntoma sobre ramas sanas de manzano, duraznero y peral en campo	71
Tabla 7	Cebadores específicos	72

Resumen

El presente trabajo abarcó el estudio de las especies de hongos presentes en la madera sana y en la madera enferma de los principales cultivos frutícolas de hoja caduca y de hoja perenne del Uruguay, incluyendo su identificación, evaluación de patogenicidad y diseño de metodología que permita su identificación temprana. Los cultivos de manzano, peral, duraznero y arándano albergaron una amplia diversidad de hongos endófitos, dentro de los cuales se encontraron numerosas especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae y al género *Diaporthe*. Los ensayos de patogenicidad en laboratorio permitieron caracterizar a *D. brasiliensis*, *D. foeniculacea*, *D. terebinthifolii* y *D. inconspicua* como especies endófitas estrictas y a las especies *B. dothidea*, *N. parvum*, *N. australe*, *Diaporthe* sp.2, *Diaporthe* sp.3, *D. serafinae*, *D. oxe*, y *D. infecunda* como especies patógenas latentes. El aislamiento a partir de plantas enfermas incluyó plantas con síntoma de cancro papiráceo, podredumbre interna, necrosis interna, gomosis y muerte regresiva de varas, entre otras. Asociados a dichos síntomas se obtuvieron aislamientos pertenecientes a 10 taxa, perteneciendo la gran mayoría a la familia Botryosphaeriaceae y al género *Diaporthe*. Los ensayos de patogenicidad en campo demostraron que todos los aislamientos de Botryosphaeriaceae y de *Diaporthe* evaluados fueron capaces de producir síntomas no sólo sobre el hospedero del cual fueron originalmente aislados sino que también sobre al menos un hospedero alternativo. *Diplodia mutila*, *Neofusicoccum australe* y *N. parvum* resultaron ser las especies de Botryosphaeriaceae más virulentas sobre manzano, peral y duraznero, a la vez que *N. parvum* fue una de las especies más frecuentemente aislada de síntoma. La especie de *Diaporthe* más virulenta sobre los tres frutales resultó ser *Diaporthe eres*. Se diseñó un par de cebadores específico para identificar las especies del complejo *N. parvum/ribis* que permitió su detección a partir de material vegetal tanto sintomático como asintomático.

Agradecimientos

Es una gran oportunidad para poder agradecer a todo el equipo del laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias-Ingeniería por todo el apoyo, la solidaridad y el gran compañerismo. Trabajar junto a ustedes es un placer.

En especial agradezco a mis directores de tesis Dra. Sandra Lupo y Dr. Eduardo Abreo por su constante compromiso y apoyo durante el desarrollo de esta tesis y por su confianza en mí.

Agradezco a mi co-tutora y jefa del laboratorio Dra. Lina Bettucci, primero y principal por permitirme formar parte del equipo y realizar la tesis allí y además por sus aportes durante la redacción de esta tesis.

Gracias a mi gran familia; la familia en la que nací y la familia que la vida me dio: mis amigos. Sin el apoyo de ustedes nada hubiera sido posible.

Gracias por enseñarme el poder de la curiosidad, la motivación y el esfuerzo personal.

1. Introducción

1.1 Fruticultura en Uruguay

En Uruguay el cultivo de árboles frutales de hoja caduca incluyendo el manzano (*Malus domestica* B.), peral (*Pyrus communis* L.), duraznero (*Prunus persica* L.) y de frutales perennes como el arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) ocupa una superficie estimada de 7.3 mil hectáreas (MGAP, 2012). Estas especies frutícolas concentran el mayor número de productores, superficie en producción y valor bruto de producción dentro de los frutales de hoja caduca en producción (Bergante, 2014).

En Uruguay se diferencian dos zonas productivas con condiciones agroclimáticas diferentes que condicionan la distribución de las distintas especies frutícolas. La zona Sur acumula más horas de frío durante el invierno, favoreciendo la producción de perales, manzanos y durazneros con altos requerimientos de frío invernal, mientras que la zona del Litoral Norte, con inviernos más cortos, favorece la producción de variedades tempranas, con menores requerimientos de frío, como algunos cultivares de duraznero (Figura 1). En cada zona se cultivan distintas especies bajo distintos modos de producción, que se refleja también en la importancia relativa de las exportaciones (DIEA, 2003).

El área productiva localizada en la zona Sur comprende los departamentos de Canelones, San José, Montevideo y en menor medida Colonia. En esta zona se localiza la producción comercial de todas las especies de frutales de hoja caduca, incluyendo las plantaciones de cultivares de duraznero de mayor requerimiento de frío invernal. La región sur concentra el 93% de las exportaciones, 96% de las plantas y el 99% de la producción de frutas de estas especies (DIEA, 2001). En esta zona también se encuentran concentradas las plantaciones de la vid euroasiática

Vitis vinifera L. (DIEA, 2001).

El área productiva localizada en la zona del Litoral Norte comprende los departamentos de Artigas, Salto, Paysandú, y en menor medida Tacuarembó, y aquí se localiza el cultivo de variedades tempranas de duraznero y de frutales de hojas perennes como el arándano. En esta zona se encuentra el 4% de las plantas totales, pero comprende aproximadamente el 10% de las plantas de duraznero y el 6% de su producción (DIEA, 2001). Si bien cada zona productiva se caracteriza por un tipo de cultivo, en ambas zonas se suelen cultivar tanto cultivos caducifolios como perennifolios. Además dentro de cada zona productiva, los pequeños y medianos productores suelen cultivar más de una especie frutícola.

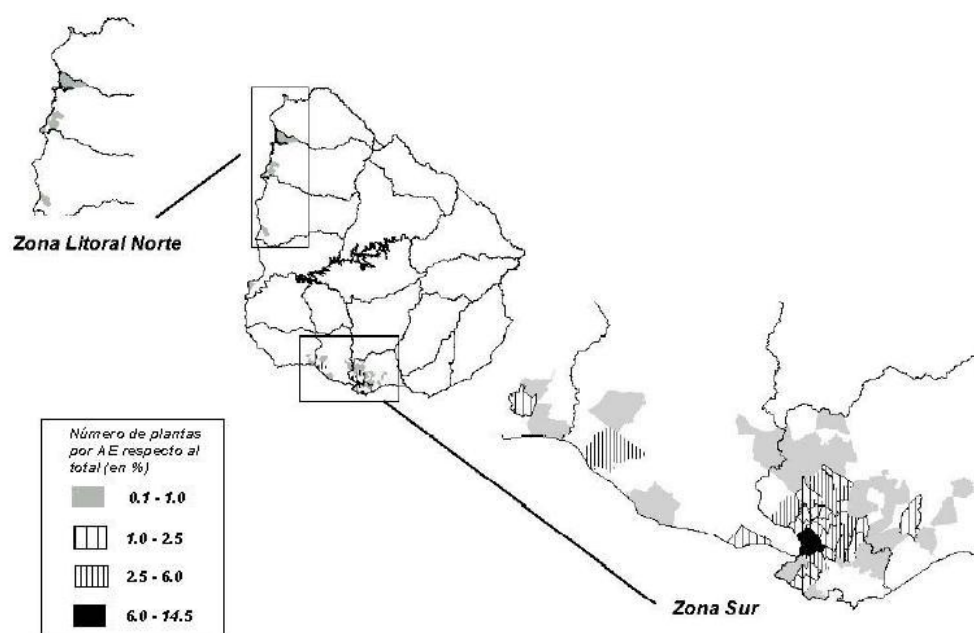


Figura 1 – Zonas de producción de frutales de hoja caduca.
Fuente: DIEA

1.2 Características y enfermedades de los cultivos

1.2.1 Cultivo de manzana

El cultivo de manzano (*Malus domestica*) se encuentra principalmente localizado en la zona sur de nuestro país. Es el frutal de hoja caduca con mayor superficie en producción (3268 ha) y mayor producción en toneladas (45626 ton) (Bergante, 2014). Es más resistente al frío que el peral y no necesita tanta cantidad de calor y luz para su maduración. La principal limitación para el cultivo del manzano es el requerimiento de horas frío, ya que requiere de 1200 a 1500 horas frío, en función de los cultivares, a temperaturas inferiores a los 7°C (Strand, 1999). El manzano se puede multiplicar por semilla, por acodo y por injerto. En nuestro país el manzano se suele multiplicar sobre portainjertos clonales. Las principales variedades cultivadas con mayores rendimientos de producción en toneladas son Granny Smith, Early Red One, Red Chief y Cripps Pink, entre otras (Bergante, 2014). El portainjerto M7 es el más utilizado, principalmente en las variedades rojas. El portainjerto M9 es usado en todas las variedades bicolors (Campi, 2014).

1.2.1.1 Enfermedades de la madera del manzano producidas por hongos

En manzanos, a nivel mundial, diversas especies pertenecientes al género *Diaporthe* se encuentran asociadas a la presencia de canchros o quemado de ramas. *Diaporthe eres* Nitschke (antes *Phomopsis cotoneastri*) se ha identificado como uno de los agentes causales de canchros en ramas en Uruguay (Abreo et al. 2012). *Diaporthe tankae* Kobayashi & Sakuma fue identificado como el agente causal de canchros y quemado de ramas en Japón (Fujita et al. 1988) y en Sudáfrica *Diaporthe ambigua* Nitschke está asociada a canchros en raíces (Smit et al. 1996).

Otros fitopatógenos asociados a la madera del manzano son las especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae; en Uruguay *Botryosphaeria dothidea* (Moug. ex Fr.) Ces. & De Not. ha sido reportada como el agente causal de canchros en ramas así como también *Diplodia seriata* De Not., *Neofusicoccum luteum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *N. parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips y *Diplodia pseudoseriata* C.A. Pérez, Blanchette, Slippers & M.J. Wingfield (Delgado, 2013).

Por otra parte, *B. dothidea* y *D. seriata* son los responsables de las enfermedades en fruto denominadas podredumbre blanca y podredumbre negra, respectivamente (Espinoza et al. 2008). *Diplodia seriata* y *Neofusicoccum ribis* (Slippers, Crous & M.J. Wingfield) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips se encuentran asociadas a síntomas de muerte regresiva (Cloete et al. 2011; Crous et al. 2000) al igual que *Leucostoma personii* (Nitschke) Höhn. (Crous et al. 2000).

En el este de Asia, incluyendo China, Japón y Corea, algunas especies de *Valsa* (anamorfo: *Cytospora*) incluida *Valsa ceratosperma* (Tode) Maire generan canchros en la madera de manzanos, una enfermedad denominada “cancro por Valsa” que causa serias pérdidas económicas en esta región (Wang et al. 2005; Lee et al. 2006; Abe et al. 2007).

Asociadas a raíces enfermas se encontraron las especies fitopatógenas *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten, *C. liriodendri* J.D. MacDon. & E.E. Butler, *C. macrodidymum* Schroers, Halleen & Crous y *C. pauciseptatum* Schroers & Crous (Tewoldemedhin et al. 2011). En Norteamérica y Europa se encuentra la especie cuarentenaria *Neonectria ditissima*, (Tul. & C. Tul.) Samuels & Rossman (*Cylindrocarpon heteronema*) agente causal de la enfermedad denominada “cancro europeo”. En Uruguay, especies de *Cylindrocarpon* han sido citadas asociadas a canchros en manzanos y perales, sin embargo el “cancro europeo” no se encuentra reportado en el país (Koch et al. 1981).

1.2.2 Cultivo de durazno

El cultivo del durazno (*Prunus persica* L.) se encuentra localizado principalmente en la zona sur de nuestro país, donde se concentra el 87 % de la producción (Montevideo, Canelones, San José y Colonia). El 13% restante de producción, principalmente variedades tempranas, se localiza en la zona del litoral norte (Salto y Artigas). Es el segundo frutal de hoja caduca con mayor superficie en producción (1664 ha) y producción en toneladas (16849 ton), luego del manzano (Bergante, 2014).

Es un cultivo de zona templada ya que no es muy resistente al frío. Requiere de 600 a 800 horas de frío y los nuevos cultivares requieren incluso menos (200-450 h) por debajo de 7°C. La falta de frío puede ser un problema si la elección de la variedad cultivada no es la adecuada ya que la necesidad de acumular frío invernal para brotar satisfactoriamente es una limitante a nivel del cultivo comercial de esta especie (Cabrera & Rodríguez, 2014). Si bien requiere alta luminosidad para producir frutos de alta calidad, el tronco y las ramas sufren con la excesiva insolación.

Actualmente el uso de diferentes portainjertos con distintos requerimientos le permite adaptarse a suelos con diversas características. Generalmente se usan portainjertos de propagación por semilla, con el cv. Pavía Moscatel representando el 94% de los portainjertos usados (Cabrera & Rodríguez, 2014).

1.2.2.1 Enfermedades de la madera del duraznero producidas por hongos

Asociados a enfermedades en ramas de duraznero a nivel mundial se han encontrado varias especies de la familia Botryosphaeriaceae como *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maub y *Cytospora cincta* Sacc. (Pusey, 1989; Ko & Sun, 1992). Más recientemente se ha encontrado a *Neofusicoccum australe* en vid en Suáfrica y Australia asociado a lesiones necróticas internas en la madera y recientemente ha sido reportado en duraznero. Además *Neofusicoccum vitifusiforme* (Van Niekerk & Crous) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips ha sido reportado en duraznero en Sudáfrica (Damm et al. 2007).

Por otra parte especies de *Diaporthe* han sido asociadas a enfermedades de la madera en duraznero. *Diaporthe amygdali* (Delacroix) Udayanga, PW Crous & KD Hyde (*Phomopsis amygdali*) se encuentra asociado al quemado de brotes y a canchros en ramas en varias regiones del mundo (Farr et al. 1999). En Grecia *Diaporthe eres* se encontró asociada a canchros y al quemado de ramas (Thomidis & Michailides, 2009).

Especies pertenecientes al género *Phaeoacremonium* han sido identificadas como agentes causales de necrosis en la madera de durazneros, nectarinos y ciruelos en Sudáfrica (Damm et al. 2008a).

1.2.3 Cultivo de pera

El cultivo del pera (*Pyrus communis*) se encuentra principalmente localizado en la zona sur de nuestro país. Es el tercer frutal de hoja caduca con mayor superficie en producción (899 ha) y producción en toneladas (8749 ton), luego del manzano y duraznero (Bergante, 2014).

Es un cultivo que prospera bien en climas templados y algo húmedos, siendo más resistente al frío que al calor. Se adecua mejor a climas cuyos inviernos cuentan con suficiente frío invernal, pocas heladas tardías y primaveras y veranos soleados con temperaturas no muy elevadas. Los perales requieren cerca de 900 a 1000 horas de frío, por debajo de 7.2°C durante el invierno para salir de su reposo (Strand, 1999).

La multiplicación del cultivo se realiza mayoritariamente por injerto, aunque a la semilla se recurre para obtener nuevas variedades o patrones de injerto. En nuestro país el injerto se realiza sobre portainjertos clonales, en donde las variedades de membrillero Adam's y el membrillero C son las predominantes (Campi, 2014). Los membrilleros son tolerantes al pulgón lanígero (*Eriosoma lanuginosum*), pero susceptibles a la sequía y al tizón de fuego (*Erwinia amylovora*). Su longevidad es bastante reducida, considerándosele en general no mayor de 30 años.

En Uruguay la variedad más importante es el cv. Williams, que produjo el 86,3% de las 8749 toneladas producidas en la zafra 2012/13. Las variedades Packam's, Abate Fetel y William precoz representaron el 10,8% de la producción (Bergante, 2014).

1.2.3.1 Enfermedades de la madera del peral producidas por hongos

Bajo las condiciones adecuadas de cultivo el peral es un árbol relativamente resistente a enfermedades fúngicas. Sin embargo cuando se descuidan aspectos relacionados a sus requerimientos nutricionales o manejo se vuelve susceptible a enfermedades.

En troncos y ramas de peral se ha identificado a *N. parvum* como el agente causal de canchales y muerte regresiva de ramas en China (Shen et al. 2010) y en Sudáfrica se ha encontrado *Diplodia seriata* (Crous et al. 2000). Recientemente en Sudáfrica asociadas a enfermedades en troncos se han encontrado especies de *Phaeoacremonium* spp. y *Paraconiothyrium brasiliensis* Verkley (Cloete et al. 2011) y asociada a canchales en raíces se encontró *Diaporthe ambigua* Nitschke (Smit et al. 1996).

1.2.4 Cultivo de arándano

El cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en Uruguay es una actividad relativamente reciente. En los últimos 10 años ha crecido en términos de volúmenes producidos y exportados, siendo su producción en la zafra 2013/14 de 2200 toneladas (Bergante, 2014). La distribución geográfica de las plantaciones es aproximadamente 55% en el norte (Salto y Paysandú) y 45% en el sur (Colonia, Canelones y Montevideo) (ADAU, 2013).

Los arándanos crecen mejor en climas moderados. Dependiendo de la variedad, requieren entre 400 y 1200 horas frío por debajo de 7°C para cumplir su receso invernal. El factor limitante para su desarrollo es el viento, que ocasiona la caída de frutos y produce rasgaduras en ellos, por lo que se emplean cortinas forestales perimetrales. O'Neal y Jewel son las variedades más plantadas en Uruguay (Bergante, 2014).

1.2.4.1 Enfermedades de la madera del arándano producidas por hongos

Asociadas a cultivos de arándano se han identificado las especies *B. dothidea* y *Neofusicoccum parvum* como agentes causales de quemado y muerte regresiva de ramas en China (Yu et al. 2012). Otras especies fitopatógenas que afectan a los arándanos pertenecen a los géneros *Fusicoccum*, *Phoma* y *Macrophomina* (Guerrero & Pérez, 2011). En Estados Unidos se ha asociado a *Phomopsis vaccinii* Shear como responsable del quemado de ramas y brotes (Ames et al. 1988; Farr et al. 2002). En nuestro país asociado a la muerte regresiva se reportó a *Pestalotiopsis clavispora* (G.F. Atk.) Steyaert (González et al. 2012). En Chile asociadas a canchros y dieback en plantaciones de arándano se identificaron las especies *Neofusicoccum parvum*, *N. australe* y *N. arbuti* (D.F. Farr & M. Elliott) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Pestalotiopsis clavispora*, *P. neglecta* (Thüm.) Steyaer y *Truncatella angustata* (Pers.) S. Hughes (Espinoza et al. 2008 y 2009).

1.3 Hongos Endófitos

Más de 100 años de investigación sugieren que la mayoría, sino todas las plantas en un ecosistema natural son simbioses con hongos micorrizicos y/o hongos endófitos (Rodríguez et al. 2009).

Existen diversas definiciones de “hongo endófito” (Hyde & Soytong, 2008), siendo la definición más utilizada por los micólogos aquella propuesta por Petrini (1991) en donde define a los hongos endófitos como aquellos capaces de colonizar los tejidos internos sanos de plantas y que persisten durante un cierto período de su ciclo vital sin causar sintomatología de enfermedad. Sin embargo también se ha definido la categoría de “endófito verdadero” para incluir únicamente a aquellos hongos cuya colonización nunca genera un síntoma de enfermedad visible (Mostert et al, 2000). En este trabajo se considerará “endófito verdadero” a aquel aislamiento obtenido a partir de tejido asintomático que sea incapaz de generar enfermedad en pruebas de patogenicidad y “patógeno latente” al aislamiento obtenido a partir de tejidos asintomáticos capaz de generar síntomas en ensayos de patogenicidad.

Se presume que los hongos endófitos comprenden más de un millón de especies (Arnold et al. 2000), siendo la mayoría Ascomycetes. Los hospederos vegetales generalmente albergan más de una especie de hongo endófito. Un gran número de especies fúngicas puede ser aislado a partir de los tejidos de una misma planta luego de ser esterilizada superficialmente; sin embargo, suele existir dominancia de una o unas pocas especies (Dugan & Roberts, 1994).

Los hongos endófitos se han clasificado en dos grandes grupos según su filogenia e historia de vida: Clavicipetaceos y no-Clavicipetaceos (Rodríguez et al. 2009); los primeros son los que habitan en gramíneas, mientras que los no-Clavicipetaceos agrupa a los hongos que no habitan gramíneas. En este trabajo nos referiremos a los hongos endófitos no-Clavicipetaceos.

Se han descrito variadas y variables interacciones entre los endófitos no-Clavicipetaceos con su planta hospedera, desde el mutualismo o el comensalismo críptico hasta la patogenicidad latente o explícita (Schulz & Boyle, 2005). La relación ecológica entre un hongo endófito y su respectivo hospedero es muy compleja; un endófito puede sobrevivir en una planta como simbionte brindando sustancias antifúngicas o antibacterianas de protección que inhiben o destruyen microorganismos patógenos invasores, puede brindar protección contra insectos herbívoros y/o contra nemátodos parasíticos (Delaye et al. 2013).

Ejemplos de hongos endófitos son algunas especies de *Diaporthe* frecuentemente presentes en tejidos asintomáticos de una gran variedad de especies vegetales (Murali et al. 2006, Botella & Diez, 2011). Actualmente el número de reportes de especies endófitas es muy amplio, haciendo hincapié en su potencial como productores de enzimas y metabolitos secundarios novedosos con actividad antibiótica, fungicida o anti cancerígena (Weber, 2009; Vesterlund et al. 2011). Otro ejemplo lo representa la familia Botryosphaeriaceae, la cual incluye una gran variedad de especies endófitas que permanecen en tejidos vegetales sanos durante largos períodos de tiempo (Crous et al. 2006; Slippers & Wingfield, 2007) y especies pertenecientes a *Pestalotiopsis*, frecuentemente presentes como endófitas y reportadas como productoras de metabolitos novedosos con aplicaciones a nivel medicinal, agrícola e industrial (Maharachchikumbura et al. 2014).

1.4 Hongos patógenos latentes

La latencia se define como el período comprendido entre el momento en que un patógeno penetra la planta y el momento en que comienza la relación parasítica (Verhoeff, 1974). Por lo tanto, según esta definición la latencia se refiere a infecciones dormantes y asintomáticas, por lo cual podemos considerar a los microorganismos en tal situación como “endófitos temporales” o “patógenos latentes” (Sánchez-Márquez et al. 2012), siendo esta la definición adoptada en este trabajo. Éstos podrían cambiar su estado de quiescente a patogénico cuando las condiciones resulten favorables para el huésped y/o desfavorables para el hospedero. Se ha reportado que un hongo endófito en un hospedero bajo cierta condición ambiental puede comportarse como fitopatógeno bajo una condición ambiental diferente en el mismo hospedero u en otro hospedero alternativo (Delaye et al. 2013).

Los endófitos en determinado hospedero generalmente se encuentran más relacionados con especies patógenas del mismo género que con especies endófitas del mismo género en otro hospedero alternativo. Los hongos endófitos y patógenos que se encuentran estrechamente relacionados poseen un ancestro en común, aunque el estilo de vida de dicho ancestro sea desconocido (Carroll, 1988; Saikkonen et al. 1998). Estudios filogenéticos recientes han demostrado que los hongos pueden cambiar su estilo de vida de endófito a patógeno (necrótrofo), mientras que el modo de vida biótrofo en general representa una característica evolutiva estable y separada de las anteriores (Delaye et al. 2013; García-Guzmán & Heil, 2013). Se han descrito varios mecanismos mediante los cuales un hongo puede transformarse de mutualista a patógeno y viceversa (Freeman & Rodriguez, 1993) así como también numerosos ejemplos de hongos que son endófitos en un hospedero pero son conocidos como fitopatógenos en un hospedero alternativo.

Por ejemplo *Diaporthe amygdali* conocido patógeno asociado a canchros y al quemado de varas de duraznero y almendro ha sido reportado como endófito en plantas de *Vitis vinifera* (van Niekerk et al. 2005).

1.5 Hongos Fitopatógenos

Aquellos hongos que generan enfermedades en las especies vegetales se denominan hongos fitopatógenos. Existen los hongos patógenos que se desarrollan en el tejido vivo de su hospedero (biótrofes), aquellos que sintetizan y secretan toxinas como mecanismo de colonización matando a los tejidos colonizados (necrótrofos) y aquellos que en una etapa inicial de su desarrollo se presentan como biótrofes y luego en determinada fase de la infección matan a los tejidos colonizados (hemibiótrofes) (Horbach et al. 2011). La mayoría de las especies fitopatógenas pertenecen a los filo Ascomycetes y Basidiomycetes.

Existen miles de especies de hongos fitopatógenos, responsables del 70% de las enfermedades vegetales conocidas (Carris et al. 2012). Estos pueden diferir en características de su ciclo de vida tan importantes como el modo de dispersión, el tipo de reproducción y los modos de infección (García-Guzmán & Morales, 2007). Los hongos fitopatógenos pueden infectar diversos órganos vegetales en diferentes estadios y de acuerdo a la anatomía y fisiología vegetal durante dichos estadios dependerá su estrategia de infección, colonización y supervivencia.

Solamente algunos hongos son capaces de generar enfermedad, dado que no sólo deben vencer barreras físicas propias de la composición del tejido vegetal, sino que también deben superar las respuestas activas de defensa de la planta. Existen diversas estrategias para la penetración, invasión, colonización y mecanismos de patogénesis y cada fase del proceso de infección requiere de la participación de diferentes factores de patogenicidad. Los factores de patogenicidad se encuentran codificados genéticamente, siendo variantes genéticas dentro de un género o especie fúngica (Prell & Day, 2001). Por todo esto es que el resultado de cualquier interacción dependerá de muchos factores tanto del hongo como de su hospedero (García-

Guzmán & Heil, 2013).

Los cultivos de árboles frutales son susceptibles a diversas enfermedades en ramas, hojas, brotes y frutos causadas por hongos. Los hongos fitopatógenos que afectan la madera de estos cultivos suelen ocasionar síntomas que pueden comprometer la viabilidad de la planta así como su rendimiento, incluyendo muerte regresiva, canchros en ramas y troncos principales, canchros en raíz, debilitamiento, y en algunos casos la muerte de árboles enteros (Pusey et al. 1995; Slippers et al 2007; van Niekerk et al. 2011).

1.5.1 Botryosphaeriaceae

La familia *Botryosphaeriaceae* incluye más de 2000 taxa y posee una amplia distribución a nivel mundial. Incluye especies patógenas que se asocian a un amplio rango de hospederos tanto Angiospermas como Gimnospermas de gran importancia ecológica y económica, especies que causan infecciones oportunistas en humanos y una gran variedad de especies endófitas que permanecen en tejidos vegetales sanos durante largos períodos de tiempo (Crous et al. 2006; Slippers & Wingfield, 2007).

Actualmente la correcta identificación de las especies pertenecientes a *Botryosphaeriaceae* se basa en la combinación de las características macro y micro morfológicas de los distintos aislamientos en cultivo puro y el uso de técnicas moleculares. Las características micro morfológicas consideradas son el grosor de la pared, la ornamentación, el color, la presencia u ausencia de septos y la forma y el tamaño de los conidios, la apariencia y el color del micelio. En particular se utiliza la región ITS del ADN ribosomal como una primera aproximación a la identificación, pero en general para poder distinguir entre especies muy relacionadas se utiliza la combinación de dos o más genes (Slippers et al. 2013).

En la actualidad se reconocen 17 géneros pertenecientes a la familia *Botryosphaeriaceae* en base a análisis filogenéticos multi-locus utilizando las secuencias de ADN de 5 loci (SSU, ITS, LSU, EF1- α y TUB) de diferentes aislamientos y especies tipo (Slippers et al. 2013). Estos géneros incluyen *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Pseudofusicoccum*, *Spencermartinsia* y *Phaeobotryon* entre otros.

Algunos autores sugieren que existe un patrón de asociación entre los miembros de la familia *Botryosphaeriaceae* y los grandes grupos de plantas (de Wet et al. 2008). Si bien muchas de las especies de esta familia poseen una distribución generalista, como *B. dothidea*, ocurriendo tanto

en Angiospermas como Gimnospermas, algunas especies ocurren exclusivamente en un grupo u en el otro. Por ejemplo la mayoría de las especies del género *Diplodia*, como *Diplodia pinea*, *D. scrobiculata* y *D. crupessi* se asociarían con más frecuencia a Gimnospermas y algunas pocas especies (*Diplodia seriata* y *D. mutila*) tanto a Gimnospermas como a Angiospermas (Alves et al. 2004; Slippers et al. 2007), las especies de *Lasiodiplodia* se encontrarían en ambos grupos de hospederos, mientras que las especies de *Dothiorella* parecerían estar restringidas a Angiospermas. Sin embargo otras investigaciones indicarían que estos patrones observados parecerían no ser efectivamente así, dado que Alves et al. (2013) encontraron especies de *Dothiorella* asociadas a especies de Gimnospermas como *Cupressus lusitanica* y *Juniperus communis* con altas frecuencias relativas. Estas variaciones en los patrones de asociación podrían deberse no solo al fuerte sesgo que existe hacia los estudios de *Botryosphaeriaceae* asociados a Angiospermas, sino también a las diferencias regionales y geográficas que afectan la afinidad de hospederos, como factores ambientales, presión de inóculo, competencia con diferentes comunidades endofíticas y diferencias fisiológicas del hospedero (Slippers et al. 2007).

Diversos síntomas de la enfermedad de madera de frutales incluyendo muerte regresiva, canchros, debilitamiento, y en algunos casos la muerte de árboles enteros (Pusey et al. 1995; Slippers et al 2007; van Niekerk et al. 2011) han sido atribuidas a la presencia de especies de *Botryosphaeriaceae*. Los géneros comúnmente encontrados en estudios de diversidad fúngica asociada a enfermedades en la madera de frutales son *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* y *Pseudofusicoccum*.

A nivel mundial, el “cancro por *Botryosphaeria*” afecta manzanos y perales y es causado por *B. dothidea* y *D. seriata*. *Botryosphaeria dothidea* afecta troncos, ramas y también frutas. La corteza externa del cancro se vuelve naranja o marrón y presenta una textura papirácea. *Botryosphaeria*

dothidea y *D. seriata* también pueden causar canchros con gomosis en los árboles de durazno (Britton & Hendrix, 1989, Crous et al. 2006), así como *L. theobromae* (Pusey et al. 1993). *Diplodia seriata* es comúnmente encontrada asociada a duraznero en todo el mundo y se ha encontrado en damasco en EE.UU., y en madera de duraznero y ciruelo en Sudáfrica (Slippers et al. 2007). Además, Crous et al. (2007) encontraron a *N. australe* asociada con síntomas de muerte regresiva de árboles de frutas con carozo. Otras especies descritas de *Prunus* spp. incluyen *Neofusicoccum australe* de *Prunus armeniaca* y *Prunus persica*, *N. vitifusiforme* de *P. persica* y *P. salicina*, *Dothiorella viticola* A.J.L. Phillips & J. Luque de *P. persica* var. *nucipersica* y *Diplodia pinea* de *P. persica* en Sudáfrica (Damm et al. 2007). *Neofusicoccum parvum* fue encontrado en árboles de pera en China que presentaban canchros y muerte regresiva (Shen et al. 2010) y *Diplodia mutila* fue hallado en Sudáfrica en madera necrótica de ciruelo en Paarl (Damm et al. 2007).

1.5.2 *Diaporthe* spp.

El género *Diaporthe* incluye alrededor de 1000 especies; muchas de las cuales son fitopatógenas, otras son endófitas, saprófitas y también agentes causales de problemas de salud en humanos y otros mamíferos (Van Warmelo et al. 1970; Kulik, 1984; Uecker, 1988; Rehner & Uecker, 1994; Sutton et al. 1997; Garcia-Reyne et al. 2011).

Actualmente en la identificación de las distintas especies de *Diaporthe* se emplean, además de las características macro y micro-morfológicas, técnicas moleculares que permiten establecer relaciones taxonómicas entre las especies y relacionarlas con sus características morfológicas. Las regiones de ADN utilizadas actualmente para realizar los análisis filogenéticos son las secuencias ITS de ADN ribosomal (van Niekerk et al. 2005; van Rensburg et al. 2006), los genes del locus mating-type llamado locus MAT y el gen del factor de elongación de la transducción 1 alfa, llamado EF1- α (Santos et al. 2010).

Las especies de *Diaporthe* frecuentemente se encuentran como endófitas de una variedad de huéspedes tanto en climas templados como tropicales y son muy comunes en la albura de las Angiospermas (Bussaban et al. 2001; Tomita, 2003; Rossman et al. 2007; Murali et al. 2006; Suryanarayanan et al. 2002; Botella & Diez, 2011; Gonzáles & Tello, 2011). Además existen muchos estudios en donde se reporta a *Diaporthe* spp. como saprófito de restos vegetales en descomposición, así como también especies endófitas latentes y patógenas que se convierten en colonizadores primarios de una amplia gama de materiales vegetales en descomposición (Promputtha et al. 2007; Kodsueb et al. 2008 a y b; Hyde et al. 2007; Promputtha et al. 2010). Por ejemplo *Diaporthe helianthi*, conocido patógeno de girasol, ha sido reportado en rastrojo de *Vitis vinifera* en Sudáfrica (van Niekerk et al. 2005).

Este género es conocido por incluir diversas especies muy importantes a nivel fitopatológico

dado a su amplio rango de hospederos y distribución geográfica (Rossman et al. 2007). A nivel mundial algunos de los síntomas asociados a especies de este género son podredumbre en raíces y frutos, canchros en ramas, moteado en hojas y deterioro en semillas (Udayanga et al. 2011; Santos & Phillips, 2009). Algunas de las especies más conocidas asociadas a síntomas en árboles frutales son *D. citri* F.A. Wol asociado a podredumbre del tallo y melanosis en cítricos (Udayanga et al. 2014), *D. amygdali* conocido patógeno asociado a canchros y al quemado de varas de duraznero y almendro (Diogo et al. 2010), *D. eres* asociado a canchros rojizos en ramas de manzano (Abreo et al. 2011), *D. ambigua* asociada a lesiones en árboles de manzano peral y duraznero con heridas hundidas y longitudinales (Gomes et al. 2013) y *D. ampelina* (Berkeley & M.A. Curtis) R.R. Gomes, C. Glienke & Crou asociada a enfermedades de poda de la vid, entre otras.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General:

Identificar y determinar si los hongos endófitos presentes en la madera sana de frutales son los mismos que se encuentran asociados a la madera enferma de frutales, y evaluar si éstos representan un riesgo fitosanitario para los frutales de hoja caduca en Uruguay.

2.2 Objetivos Específicos:

1. Identificar las especies de hongos endófitos con potencial fitopatogénico presentes en cultivos comerciales de manzano, durazno, peral y arándano.
2. Evaluar la patogenicidad de los aislamientos fúngicos endófitos con potencial fitopatogénico sobre las distintas especies frutales bajo condiciones controladas.
3. Identificar los hongos asociados a los síntomas observados en la madera de las distintas especies frutales.
4. Evaluar la patogenicidad de los aislamientos asociados a los síntomas sobre las distintas especies frutales bajo condiciones controladas y en el campo.
5. Diseñar y evaluar la especificidad de cebadores específicos para la detección temprana de géneros o especies fúngicas fitopatógenas de interés.

3. Metodología

3.1 Muestreo

3.1.1 Hongos endófitos asociados a tejido sano

La diversidad de la microbiota endofítica se estimó a partir de 10 ramas de apariencia sana de 1 año y 10 ramas de 2 años provenientes de árboles de variedades comerciales de las distintas especies frutales. Las muestras de manzano, peral y duraznero se obtuvieron de montes en producción localizados en Canelones de los cultivares Red Chief, Williams y Dixieland, respectivamente. Las muestras de arándano se obtuvieron de montes en producción localizados en la zona del Litoral Norte del país del cultivar O'neil. Se seleccionaron 10 árboles de la misma variedad de cada especie frutal, y de cada uno se cortó una rama de 1 año y una rama de 2 años. Las mismas fueron colocadas en bolsas de nylon limpias y fueron llevadas al laboratorio para su inmediato procesamiento.

3.1.2 Hongos fitopatógenos asociados a síntoma

El muestreo fue realizado en las dos zonas de producción en el Norte y Sur del país, en una búsqueda continua de árboles con síntomas. Las muestras se obtuvieron de diversos montes en producción y de variedades diversas. Las regiones de las cuales se obtuvieron muestras de madera con síntoma fueron Canelones, San Jose, Salto, Paysandú y Tacuarembó.

3.2 Aislamientos

Tanto las ramas sanas como aquellas con síntoma fueron cortadas en segmentos de 5 cm. Los segmentos fueron tratados con etanol al 70% durante 1 minuto, sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 4% durante 2 minutos y finalmente lavados con agua destilada estéril durante 2 minutos. Luego de la desinfección, se separó corteza de xilema de cada segmento y se cortaron en fragmentos de 3-4 x 1 mm (10 fragmentos corteza y de xilema por rama) los cuales fueron colocados en placas conteniendo Papa-dextrosa-agar (PDA) con ácido láctico (pH 4,5). La eficacia del proceso de desinfección antes descrito se evaluó mediante la impresión del exterior del material vegetal desinfectado sobre medio de cultivo PDA y su incubación durante 72 hs para verificar la ausencia de contaminantes.

Todas las placas sembradas fueron incubadas a 25 °C en alternancia de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad hasta que se observó crecimiento micelial. Luego de 7-20 días de incubación aproximadamente se contó el número de fragmentos de los que emergió micelio.

Dado que el crecimiento micelial proveniente de algunos fragmentos resultó ser más rápido que el de otros, una vez que se observó crecimiento se retiraron los fragmentos que no mostraban desarrollo de micelio a nuevas placas de PDA para permitir el desarrollo de hongos de crecimiento más lento. Cada micelio morfológicamente diferente fue transferido a medio de cultivo fresco para su posterior identificación.

En el caso del aislamiento de los hongos endófitos se calculó la frecuencia de colonización (F_c), la frecuencia de aislamiento (F_a) y las abundancias relativas de aislamiento (A_{br}) para cada especie vegetal, edad y tejido.

$\underline{Fc}$: $(n^{\circ}T_{\text{fragmentos colonizados}} / n^{\circ}T_{\text{fragmentos plaqueados}}) \times 100$. $\underline{Fa}$: $(n^{\circ}T_{\text{aislamientos}} / n^{\circ}T_{\text{fragmentos plaqueados}}) \times 100$. $\underline{Abr}$: $(n^{\circ} \text{aislamientos de una especie} / n^{\circ}T_{\text{aislamientos}}) \times 100$.

3.3 Identificación

3.3.1 Identificación Morfológica

Los aislamientos fúngicos obtenidos fueron agrupados por morfotipos según sus características macro y micromorfológicas y fueron identificados mediante los métodos micológicos habituales de acuerdo con claves de identificación específicas para cada género fúngico. Se observaron las características del micelio y la presencia de cuerpos fructíferos utilizando una lupa binocular estereoscópica y a nivel microscópico se observó el tamaño, color y forma de los conidios mediante preparados teñidos con cotton blue observados bajo microscopio óptico.

3.3.2 Identificación Molecular

Para el reconocimiento de especies que no pudieron ser identificadas por sus características morfológicas se aplicaron técnicas moleculares basadas en la amplificación de regiones de ADN y el posterior análisis filogenético de las secuencias obtenidas.

La extracción de ADN se realizó a partir del micelio vegetativo de los cultivos en PDA según la metodología propuesta por Lee & Taylor (1990) con modificaciones:

Se raspó el micelio con hoja de bisturí estéril y se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, luego se le agregó 400 μ l de buffer de lisis [Tris HCl pH8 (50 mM), EDTA Na_2 (50 mM), SDS 0,3%] y 5 μ l de proteinasa K 2% (m/v). A la mezcla se la lisó mecánicamente utilizando un machacador de plástico estéril hasta que se obtuvo una mezcla homogénea y se la incubó durante 30 minutos a 60°C. Posteriormente se le agregaron 112 μ l de NaCl 5 M y 52 μ l de CTAB 10X en agua

destilada y se incubó durante 10 minutos a 65°C. Se le agregaron 570 µl de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 v/v) se agitó enérgicamente y se incubó durante 30 minutos a -20°C.

Se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 rpm y aproximadamente 400 a 500 µl del sobrenadante fueron transferidos a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se agregó 20 µl de acetato de sodio 3 M y se incubó durante 30 minutos a -20°C. Se centrifugó nuevamente la mezcla durante 10 minutos a 10.000 rpm, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y se le agregaron suavemente 0,55 volúmenes de isopropanol. Se agitó suavemente y se incubó durante 30 minutos a -20°C. Se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 rpm, se descartó el sobrenadante y se agregaron 200 µl de etanol 70% (v/v). Se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 rpm, se descartó el etanol y se dejó secar el pellet a 37°C aproximadamente 1 hora. Una vez seco se resuspendió en 50-100 µl de agua destilada estéril a 60°C. Finalmente se agregó 1 µl de ARNasa (5 µg/ml), se incubó durante 60 minutos a 37°C y se almacenó a -20°C.

Se amplificó la región Internal Transcribed Spacer (ITS) del ADN ribosomal de 134 aislamientos representativos de los distintos morfotipos mediante PCR utilizando los cebadores generales ITS4 e ITS5 (White et al., 1990) que amplifican las regiones ITS1 e ITS2, incluyendo la subunidad 5.8S. Además, otros genes fueron amplificados y secuenciados según el género. Para *Leucostoma/Cytospora*, y *Phaeoacremonium* se amplificó parte del gen que codifica la β -tubulina (TUB) utilizando los cebadores Bt2a o T1 y Bt2b (Glass & Donaldson, 1995). Parte del gen que codifica al factor de elongación 1-alfa (EF1- α) fue amplificado utilizando los cebadores EF1-728F y EF1-986R (Carbone & Khon, 1999) para aquellos aislamientos identificados como *Diaporthe*, *N. australe/luteum*, *Diplodia seriata/pseudoseriata* y *Lasiodiplodia* sp.

De la misma forma, para aquellos aislamientos identificados como pertenecientes al complejo *Neofusicoccum parvum/ribis* se amplificó parte del gen que codifica la RNA polimerasa II (RPB2) usando los cebadores RPB2bot6F and RPBRbot7R (Sakalidis, 2004). Se utilizó un termociclador MultiGene Optimax TC9610 para llevar a cabo las amplificaciones y las condiciones para cada PCR fueron las descritas por los autores. Las secuencias de los cebadores y el tamaño esperado del amplicón en pares de bases se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 Características de los cebadores utilizados

Región	Cebadores	Secuencia	Tamaño de amplicón (pb)	Referencia
ITS	ITS 4	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC	600	White et al., 1990
	ITS5	5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG		
EF1-α	EF1-728F	5'CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	350	Carbone & Khon, 1999
	EF1-986R	5'TACTTGAAGGAACCCTTACC		
TUB	Bt2a	5'GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	450	Glass & Donaldson, 1995
	Bt2b	5'ACCCTCAGTG TAGTGACCCTTGGC		
RPB2	RPB2bot6F	5'GGTAGCGACGCTCACTCCC	500	Sakalidis, 2004
	RPBRbot7R	5'GGATGGATCTCGCAATGCG		

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 μ l conteniendo: 2,5 μ l de buffer 10X, 2,5 μ l de dNTPs (2,5mM), 0,75 μ l de MgCl₂ (50mM), 0,5 μ l de cada cebador (10 μ M), 2 μ l ADN y 0,25 μ l de Thermo Scientific™ Taq DNA Polimerasa (1U/ μ l).

Los productos de PCR fueron teñidos con el colorante EZ vision®One (Amresco®) y visualizados en gel de agarosa al 1% bajo luz UV. Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen (Seul, Korea) para su purificación y secuenciación.

Todas las secuencias obtenidas fueron corregidas manualmente y alineadas mediante Clustal W utilizando el programa MEGA versión 6 (Tamura et al. 2013) junto con secuencias correspondientes a aislamientos ex-tipo obtenidas de la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Para aquellos géneros representados por un sólo aislamiento se utilizó el programa Blastn del GenBank como herramienta complementaria para confirmar la identidad en caso de obtener un 97-100% de homología con aislamientos CBS (CBS Fungal Biodiversity Centre) depositados en la base de datos. Para el resto de los casos se realizaron análisis filogenéticos utilizando un gen o combinaciones de genes, dependiendo del género.

Los análisis filogenéticos fueron realizados por el método de máxima parsimonia en el programa MEGA6 y en el PAUP 4.0 (Swofford, 2002). Todas las especies aisladas e identificadas fueron incorporadas en la colección de hongos perteneciente al Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias-Facultad de Ingeniería, Universidad de la República conservadas en agua a -4°C y en glicerol al 10% a -80°C. Las secuencias generadas en este trabajo y aquellas suministradas por el Genbank incluidas en los análisis filogenéticos se detallan en la tabla 1 del anexo.

3.4 Patogenicidad y Virulencia

3.4.1 Inoculación bajo condiciones de laboratorio

Los ensayos de patogenicidad de los hongos aislados de ramas asintomáticas (hongos endófitos) se realizaron únicamente en condiciones de laboratorio sobre ramas de la misma especie frutal y variedad de la cual fueron obtenidos, con el objetivo de determinar su capacidad patogénica y así diferenciarlas de aquellas especies endófitas estrictas. Se inocularon 26 aislamientos de los cuales 16 pertenecen al género *Diaporthe*, 6 a la familia Botryosphaeriaceae,

2 al género *Cytospora* y 2 al género *Pestalotiopsis*.

En condiciones de laboratorio se realizaron inoculaciones cruzadas sobre ramas de duraznero, manzano y peral con el fin de seleccionar los aislamientos que serían utilizados en las pruebas de campo. En total se inocularon 19 aislamientos correspondientes a 19 especies diferentes; 7 pertenecieron a la familia Botryosphaeriaceae, 5 al género *Diaporthe*, 2 al género *Phaeoacremonium*, 2 al género *Coniothyrium*, 2 al género *Cytospora* y 1 al género *Collophora*.

Para realizar los ensayos de patogenicidad y virulencia se colectaron ramas sanas provenientes de árboles de manzano cv. Red Chief, duraznero cv. Dixieland, peral cv. Williams y arándano cv. Emerald y se llevaron inmediatamente al laboratorio.

Se las cortó en segmentos de aproximadamente 15-20 cm y se las desinfectó superficialmente al sumergirlas durante 2 minutos en etanol al 70%. Se secaron con papel estéril y se les sumergió los extremos en parafina derretida (40°C) como forma de prevenir la pérdida de agua. Se realizó un corte en forma de V utilizando un bisturí estéril para poder introducir un disco de 5 mm de PDA conteniendo micelio en activo crecimiento del aislamiento seleccionado (5 segmentos por aislamiento fúngico). A los segmentos de rama control se les inoculó un disco de agar (PDA) estéril. Luego se selló cada herida con parafilm como forma de evitar la desecación y la entrada de microorganismos externos. Todos los segmentos de rama se guardaron en bolsas transparentes estériles conteniendo una almohadilla de algodón húmeda estéril y se incubaron a 22-25 °C durante 20-30 días hasta que se observó el desarrollo de síntomas.

3.4.2 Inoculación en campo

Se seleccionaron los aislamientos provenientes de plantas con síntoma y que produjeron lesión en los experimentos *in vitro* para ser inoculadas en campo.

Las inoculaciones se realizaron en plantaciones de manzano, peral y duraznero pertenecientes a la estación experimental de INIA Las Brujas. Se inocularon 10 plantas asintomáticas invernales con cada uno de los aislamientos, una rama por planta. Las variedades de frutales fueron las mismas que las utilizadas para las inoculaciones en laboratorio.

Se realizó un corte en forma de V utilizando un bisturí estéril para poder introducir un disco de 5 mm de PDA conteniendo micelio en activo crecimiento del aislamiento seleccionado (10 ramas). A las ramas control se les inoculó un disco de agar (PDA) estéril. Luego se selló cada herida con parafilm como forma de evitar la desecación y la entrada de microorganismos externos.

El ensayo se mantuvo durante 30 o 40 días dependiendo del frutal.

3.4.3 Evaluación de Patogenicidad

Luego del periodo de incubación se calculó el número de ramas que desarrollaron lesiones necróticas y su extensión en centímetros utilizando regla ($\pm 0,1$). Se realizaron los análisis One way ANOVA y tests de Tukey para evaluar la patogenicidad y virulencia de los distintos aislamientos utilizando el programa PAST 2.17c (Hammer et al. 2001) y SigmaStat versión 3.5.

De todas las ramas evaluadas se re-aislaron los hongos en placas de PDA hasta su cultivo puro y se realizó su identificación mediante técnicas moleculares, como se ha descripto anteriormente, para verificar la presencia de la especie inoculada.

Una vez obtenida la secuencia de ADN correspondiente al re-aislamiento, se realizó un alineamiento para confirmar su identidad, utilizando las secuencias tipo depositadas en el GenBank y la secuencia de ADN correspondiente al aislamiento originalmente inoculado.

3.5. Cebadores específicos

3.5.1 Diseño

Para el diseño de cebadores específicos para género o especie de Botryosphaeriaceae se alinearon las secuencias de la región ITS de diversas especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae obtenidas del GenBank y las obtenidas en este trabajo utilizando el programa MEGA 6.0.

El diseño fue realizado manualmente y los posibles pares de cebadores fueron evaluados en los programas on-line Primer3web 4.0, Oligo Calculator 3.26 y NCBI Blast. Los cebadores seleccionados fueron sintetizados por Macrogen (Seul, Korea). Se determinó la temperatura de hibridación, especificidad y se los comparó con cebadores recientemente diseñados en otros países.

3.5.1.1 Determinación de la temperatura de hibridación

La temperatura de hibridación de los nuevos cebadores se determinó mediante PCR anidado en gradiente de temperatura.

En todos los casos se realizó una primera ronda de amplificación utilizando los cebadores generales ITS5/ITS4 (White et al., 1990) del ADN genómico de especies blanco y no blanco. El programa de amplificación utilizado fue el descrito por los autores. Los productos de PCR

obtenidos a partir de ADN de cultivos puros y de material vegetal colonizado fueron diluidos 1:100 con agua destilada y 2 µl fueron utilizados como molde para la segunda ronda de amplificación con cada par de cebadores.

En la segunda ronda de amplificación se utilizaron los productos de PCR obtenidos anteriormente en un programa de amplificación con gradiente de temperaturas de hibridación para determinar la temperatura específica adecuada para cada caso, y se usó como molde la especie blanco, especies no blanco y un control negativo. Las temperaturas evaluadas fueron desde 54 a 66°C. Las especies no blanco incluyeron especies relacionadas a las especies blanco y los controles negativos fueron las especies *Diaporthe amygdali* y *Alternaria* sp..

El programa de ciclado fue: 5 min a 94°C; 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a X°C y 1 min a 72°C; un período final de extensión de 10 min a 72°C y un ciclo final de 5 min a 4°C.

X: temperatura de hibridación

Los productos de la amplificación fueron teñidos con el colorante EZ vision®One (Amresco®) y visualizados en gel de agarosa al 1% bajo luz UV.

3.5.2 Evaluación de la especificidad

Una vez determinada la temperatura de hibridación y el número de ciclos en cada programa de amplificación se evaluó la especificidad de los cebadores realizando una ronda de amplificación utilizando como molde 2 µl de los productos de PCR diluidos 1:100 de las especies blanco y otras especies relacionadas.

4. Resultados

4.1. Identificación de hongos endófitos

Los aislamientos fúngicos obtenidos a partir de la corteza sana de ramas del año y de dos años de árboles de manzano, peral, duraznero y arándano se listan en la tabla 2. Se obtuvieron un total de 833 aislamientos correspondientes a 33 taxa. A partir de xilema no se obtuvieron aislamientos.

En todos los frutales la comunidad endofítica estuvo caracterizada por la presencia de una o unas pocas especies con abundancias relativas altas y la presencia de una variedad de especies poco abundantes (Tabla 2).

De los 33 taxa obtenidos, 5 pertenecieron a géneros o familias cuyo potencial fitopatógeno en madera de especies frutales ha sido previamente reportada. El número de taxa potencialmente fitopatógenos fue mayor en ramas de dos años que en ramas de un año.

Las especies encontradas pertenecieron a los géneros *Diaporthe*, *Coniothyrium*, *Cytospora* y *Pestalotiopsis* y a la familia *Botryosphaeriaceae*. Estas especies representaron el 20% de los aislamientos totales.

Los aislamientos de *Diaporthe* spp. fueron los más abundantes observándose su presencia en los cuatro hospederos y los más diversos en cuanto a sus características macromorfológicas (Figura 2). Su abundancia relativa fue mayor en ramas de peral (28%), seguido de manzano (11%) y arándano (10%). Los aislamientos pertenecientes a la familia *Botryosphaeriaceae* también se encontraron en los cuatro hospederos, sin embargo sus abundancias fueron mucho menores. Los aislamientos de *Coniothyrium* spp. se obtuvieron únicamente a partir de ramas de duraznero, mientras que los aislamientos de *Pestalotiopsis* spp. se obtuvieron de duraznero y

arándano. Los aislamientos *Cytospora* se obtuvieron de peral y arándano (Tabla 2).

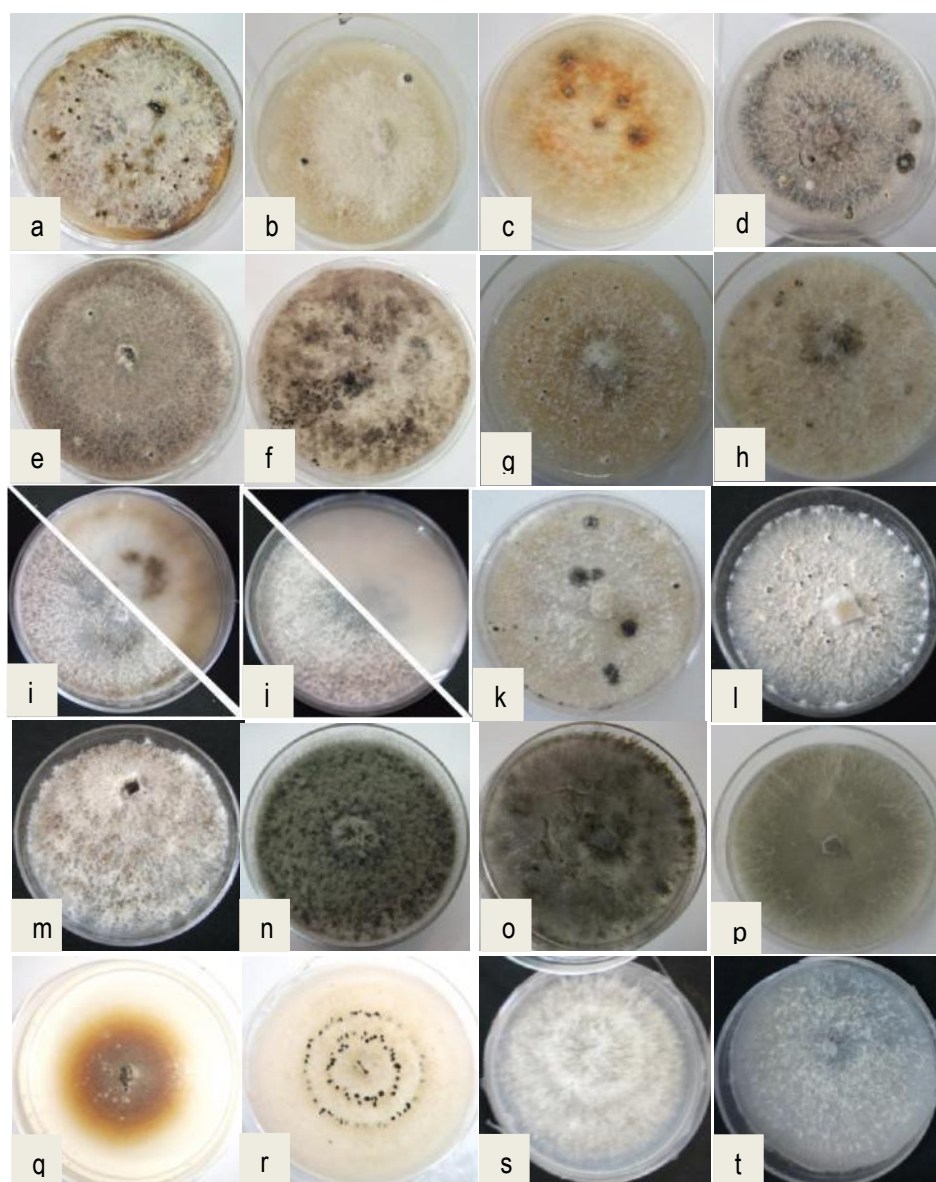


Figura 2 Aspecto de las colonias de hongos endófitos en medio PDA.

a-m: *Diaporthe* spp., **n-p:** *Botryosphaeriaceae*, **q:** *Coniothyrium* sp., **r-s:** *Pestalotiopsis* spp., **t:** *Cytospora* sp.

Tabla 2 Número de aislamientos y abundancias relativas de hongos endófitos presentes en las distintas especies frutales. En gris se destacan los taxa con potencial fitopatogénico.

Taxa	Duraznero Dixieland		Peral Williams		Manzano Red Chief		Arándano O'neil	
	1año	2años	1año	2años	1año	2años	1año	2años
<i>Alternaria</i> spp.	19/32%	68/38%	45/31%	38/28%	25/44%	27/56%	10/14%	55/39%
<i>Aureobasidium</i> spp.	13/22%	71/40%	25/17%	2/1,5%	9/16%	1/2%	9/13%	8/6%
<i>Botryosphaeriaceae</i>		1/0,5%		6/4%		2/4%	5/7%	5/3%
<i>Calcarisporium</i> spp.							2/3%	
<i>Chalaropsis</i> sp.				1/1%		.	1/1,5%	
<i>Cladosporium</i> spp.	5/8%		59/41%	5/3%	10/17%			9/6%
<i>Colletotrichum</i> spp.				3/2%			15/21%	
<i>Coniothyrium</i> spp.		3/2%						
<i>Cytospora</i> spp.				10/7%				15/10%
<i>Diaporthe</i> spp.		2/1%	14/10%	62/46%	7/12%	5/10%	4/6%	17/12%
<i>Epicoccum</i> spp.		27/15%					2/3%	4/2,5%
<i>Geotrichum</i> sp.							1/1,5%	
<i>Gliocladium</i> sp.							1/1,5%	
<i>Lecanicillium lecanii</i>	7/11%							
<i>Microsphaeropsis</i> sp.		3/2%						2/1%
<i>Nigrospora</i> sp.		2/1%				2/4%	2/3%	
<i>Penicillium</i> sp.	4/7%		1/1%	1/1%	1/2%			
<i>Pestalotiopsis</i> sp.		1/0,5%						6/4%
<i>Phoma</i> spp.	2/3%					2/4%	6/8%	
<i>Phyllosticta</i> sp.							2/3%	
<i>Pleospora herbarum</i>	1/2%							
<i>Seimatosporium kriegeianum</i>							2/3%	13/9%
<i>Stemphylium botryosum</i>	1/2%						1/1,5%	
<i>Torula</i> sp.							1/1,5%	
<i>Xylaria</i> sp.	1/2%							3/1,5%
m estéril blanco	7/11%			9/6%	5/9%	1/2%	3/4%	
m estéril blanco algodonoso						1/2%	1/1,5%	6/4%
m estéril rosado							1/1,5%	
m estéril mostaza				1/1%				3/1,5%
m estéril marrón oscuro						5/10%		
m estéril verde oscuro						2/4%		
m estéril amarillo								
m estéril gris verdoso				2/1,5%		1/2%	1/1,5%	1/0,5%
Fc (n°col/n°fplaq)*100	46%	99%	83%	87%	49%	40%	53%	88%
Aislamientos (833)	60	178	144	132	57	49	70	143
Fa (n°aisl/n°fplaq)*100	130%	180%	173%	152%	116%	123%	132%	163%
Taxa total (33)	10	9	5	12	6	11	20	14
Taxa posible endófitos - patógenos latentes	0	4	1	3	1	2	2	4

4.2 Descripción de Síntomas

Los principales síntomas encontrados en perales, manzanos, durazneros y arándanos fueron canchros hundidos y papiráceos, rajaduras en las ramas, ramas de varias edades secas, plantas o plantines muertos, plantas secas con ramas necrosadas y plantas de varios años con troncos que presentaron grandes canchros asociados a Basidiomycetes (Figura 3, 4, 5).

En manzanos se observaron diversos síntomas asociados al tronco principal, como canchros ennegrecidos (Figura 3-g), canchros hundidos de color rojizo que rodeaban el tronco en plantas de menos de dos años (Figura 3-a, b), canchros lenticulares (Figura 3-h), resquebrajamiento en la corteza (Figura 3-i) y podredumbre central (Figura 3-n). También se encontraron árboles secos en cuyo tronco principal se observó podredumbre central cuando se realizó un corte transversal (Figura 3-o). Además se observaron diversos síntomas presentes en ramas y varas, como por ejemplo canchros de color rojizo (Figura 3-d), necrosis apical en varas (Figura 3-k), ramas con canchros papiráceos con necrosis en el xilema (Figura 3- j, l, m) y canchros oscuros en ramas que cuando se las cortó transversalmente se observó el xilema necrosado (Figura 3-p, q, r, s).

En árboles de durazno la mayoría de los síntomas observados se encontraron en varas del año o en ramas jóvenes. Entre éstos se observaron ramas del año canchros blanquecinos que rodeaban las yemas (viruela de la púa) (Figura 4-a, b), canchros hundidos en ramas de 2 a 3 años con el xilema oscurecido (Figura 2- e), varas secas del año con zonas rojizas en la corteza (Figura 4- c, f, g) y ramas verdes con canchros oscuros bien definidos y en algunos casos con presencia de gomosis (Figura 4- i, k), entre otros.

En perales se observaron plantas secas que no brotaron en primavera y cuyas raíces se encontraban secas (Figura 5-h), plantines con rajaduras en la corteza y cuyo xilema estaba necrosado (Figura 5-i, j), plantas que presentaban necrosis en xilema en forma de V (Figura 5-g) y ramas con canchales y xilema necrosado (Figura 3-k, l, m).

En arándanos se observaron plantas secas que no brotaron en primavera cuyas raíces se encontraban secas con el xilema necrosado (Figura 5- a, b, c) y ramas de 2 años secas con coloraciones rojizas en la corteza (Figura 5- d, e, f).

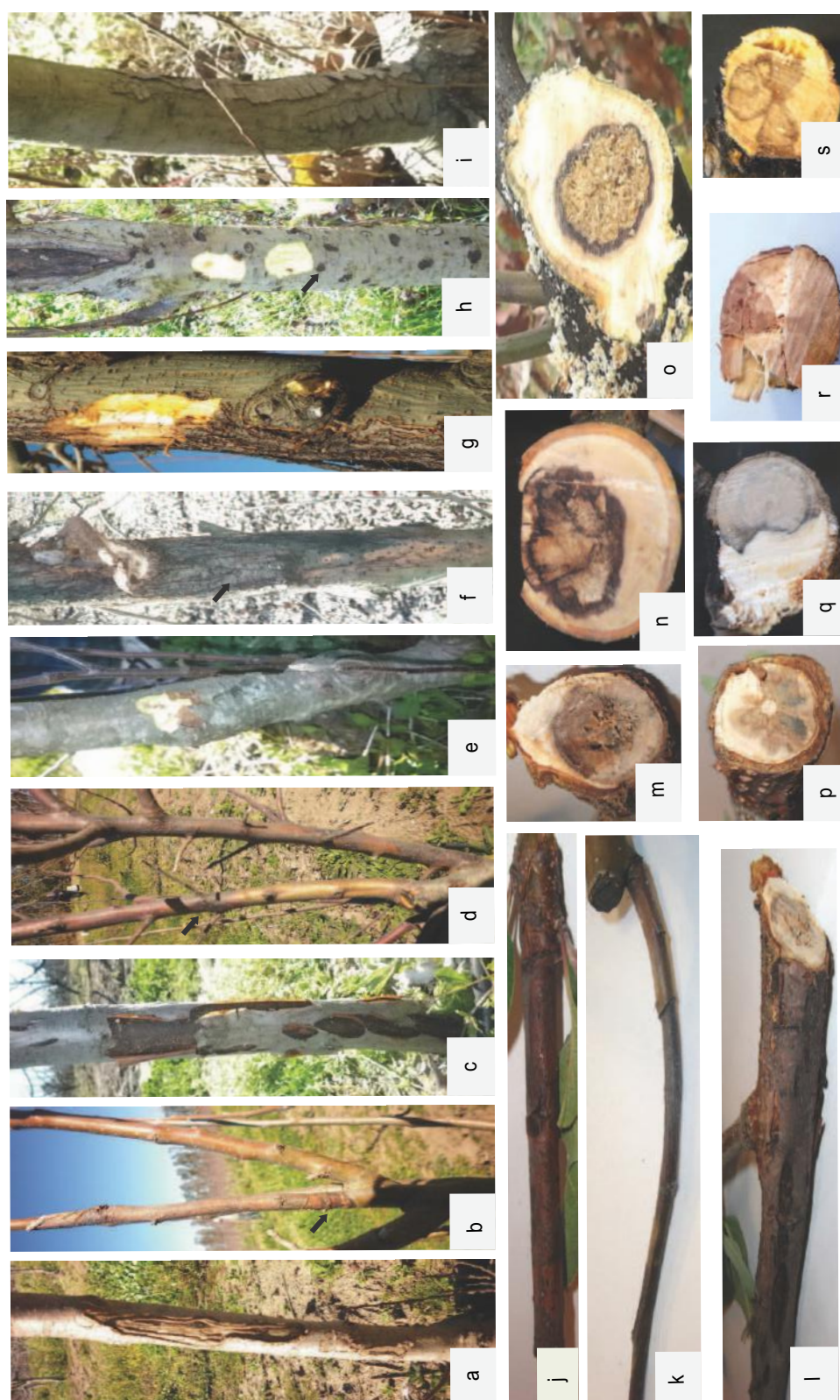


Figura 3 Síntomas observados en árboles de manzano.

a: Cancro hundido (*N. parvum*), **b:** Cancro hundido rojizo (*D. eres*, *D. foeniculacea*), **c:** Cancro papiráceo (*P. brasiliense*), **d:** Cancro rojizo (*B. dothidea*), **e:** Necrosis interna (tipo-*Coniothyrium*), **f:** Cancro (*P. brasiliense*), **g:** Cancro ennegrecido (*N. parvum*), **h:** Cancros lenticulares (*P. brasiliense*), **i:** Corteza resquebrajada (*L. theobromae*), **j:** Cancro papiráceo (*D. seriata*, *N. australe*), **k:** Necrosis apical (*D. seriata*), **l y m:** Cancro papiráceo (*N. parvum*, *D. seriata*), **n:** Podredumbre central (*Schizophyllum commune*), **o:** Podredumbre central (*Ph. aleophilum*, *Ph. mortoniae*, *Pl. richardsiae*), **p:** Necrosis interna (*N. parvum*), **q:** Necrosis interna (*N. parvum*), **r:** Necrosis interna (*D. mutila*), **s:** Necrosis interna (*Eutypa leptoplaca*).



Figura 4 Síntomas observados en ramas de duraznero.

a: Viruela de la púa (*Diplodia seriata*, *Diaporthe amygdali*), **b:** Viruela de la púa (*N. parvum*, *Cytospora eucalypticola*), **d:** Necrosis interna (*Diplodia pseudoseriata*), **e:** Necrosis interna (*Leucostoma persoonii*), **g:** Vara seca rojiza (*N. parvum*, *Diaporthe sp.*), **h:** Necrosis interna (*Pseudofusicoccum stromaticum*), **i:** Cancro con gomosis (*Diaporthe sp.*, *B. dothidea*), **j:** *Leucostoma persoonii*, **k:** Cancro con gomosis (*Diplodia seriata*, *Diaporthe amygdali*), **l:** Cancro con gomosis (*B. dothidea*), **m:** Necrosis apical (*D. amygdali*).



Figura 5 Síntomas observados en ramas de arándano (a-f) y peral (g-m).
a: Xilema necrosado (*Pestalotiopsis* sp.), **b:** Xilema necrosado (*Neofusicoccum parvum*), **c:** Xilema necrosado (*Pestalotiopsis* sp.), **d:** Corteza rojiza (*Diplodia seriata*), **e:** Corteza rojiza (*N. parvum*), **f:** Corteza rojiza (*Diaporthe* sp.), **g:** Necrosis en forma de V (*D. seriata*), **h:** Raíces necrosadas (*Cylindrocarpon* sp., *C. olidum*, *C. pauciseptatum*), **i y j:** Raíces necrosadas (*D. infecunda*, *D. eres*), **k:** Cancro con necrosis interna (*N. parvum*), **l:** Necrosis apical (*N. parvum*, *Diaporthe* sp.), **m:** Necrosis apical (*D. seriata*, *N. parvum*, *D. mutila*).

4.3. Identificación de hongos fitopatógenos

Asociados a los síntomas descritos anteriormente se obtuvo un total de 403 aislamientos pertenecientes a 10 taxa. La mayoría de los aislamientos se agrupó en dos grandes grupos de acuerdo a sus características macro y micromorfológicas: *Botryosphaeriaceae* (66%) y *Diaporthe* spp. (18%).

Los aislamientos menos frecuentes pertenecieron a los géneros *Paraconiothyrium*, *Cytospora/Leucostoma*, *Phaeoacremonium*, *Collophora*, *Cylindrocarpon*, *Eutypa*, *Pestalotiopsis* y *Pleurostomophora*.

Los aislamientos pertenecientes a *Botryosphaeriaceae* y *Diaporthe* spp. se obtuvieron de los cuatro frutales, mientras que los aislamientos menos frecuentes en algunos casos se encontraron asociados específicamente a un hospedero. Las especies de hongos encontradas en las distintas especies de frutales se listan en la tabla 3.

Tabla 3 Especies de hongos asociados a síntomas en los distintos frutales

Especie	Duraznero	Peral	Manzano	Arándano
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	+	+	+	
<i>Collophora rubra</i>	+			
<i>Cylindrocarpon olidum</i>		+		
<i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i>		+		
<i>Cytospora acaciae</i>				+
<i>Cytospora eucalypticola</i>	+			
<i>Cytospora</i> "tipo- <i>Cytospora</i> "	+			
<i>Diaporthe amygdali</i>	+			
<i>Diaporthe eres</i>		+	+	
<i>Diaporthe foeniculacea</i>			+	
<i>Diaporthe infecunda</i>		+		
<i>Diaporthe oxe</i>	+	+		
<i>Diaporthe phaseolorum</i>		+		
<i>Diaporthe</i> spp.	+	+		
<i>Diaporthe terebinthifolii</i>		+		+
<i>Diplodia seriata</i>	+	+	+	
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	+			
<i>Diplodia mutila</i>		+	+	
<i>Eutypa leptoplaca</i>			+	
<i>Ilyonectria robusta</i>		+		
<i>Pestalotiopsis</i> sp				+
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>			+	
<i>Leucostoma persoonii</i>	+			
<i>Neofusicoccum australe</i>			+	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	+	+	+	+
<i>Paraconiothyrium brasiliensis</i>			+	
<i>Peyronellaea glomerolata</i>	+			
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>			+	
<i>Phaeoacremonium mortoniae</i>			+	
<i>Pleurostomophora richardsiae</i>			+	
<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	+			+

4.3.1 Botryosphaeriaceae

Un total de 266 aislamientos mostraron las características macro y micromorfológicas correspondientes a aquellas observadas para las especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae, incluyendo un micelio aéreo de rápido crecimiento de color verdoso a grisáceo (Figura 6). De éstos, 19 fueron obtenidos como endófitos y 247 como fitopatógenos en las cuatro especies frutales. Dentro de los aislamientos fue posible distinguir cuatro morfotipos basado en el color y la forma de los conidios. Aquellos aislamientos con conidios hialinos y fusiformes fueron agrupados como “tipo-*Fusicoccum*” (Figura 6-a) y los aislamientos con conidios hialinos y globosos se agruparon como “tipo-*Botryosphaeria dothidea*” (Figura 6-b). Los aislamientos con conidios pigmentados y globosos se agruparon como “tipo-*Diplodia*” (Figura 6-c) y aquellos con conidios pigmentados, estriados y globosos se agruparon como “tipo-*Lasiodiplodia*” (Figura 6-d).

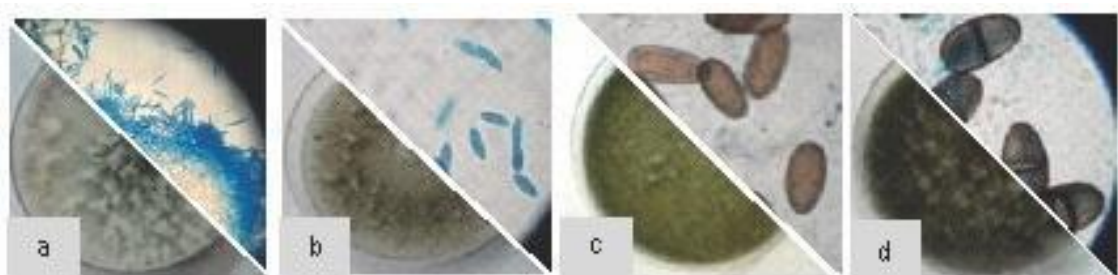
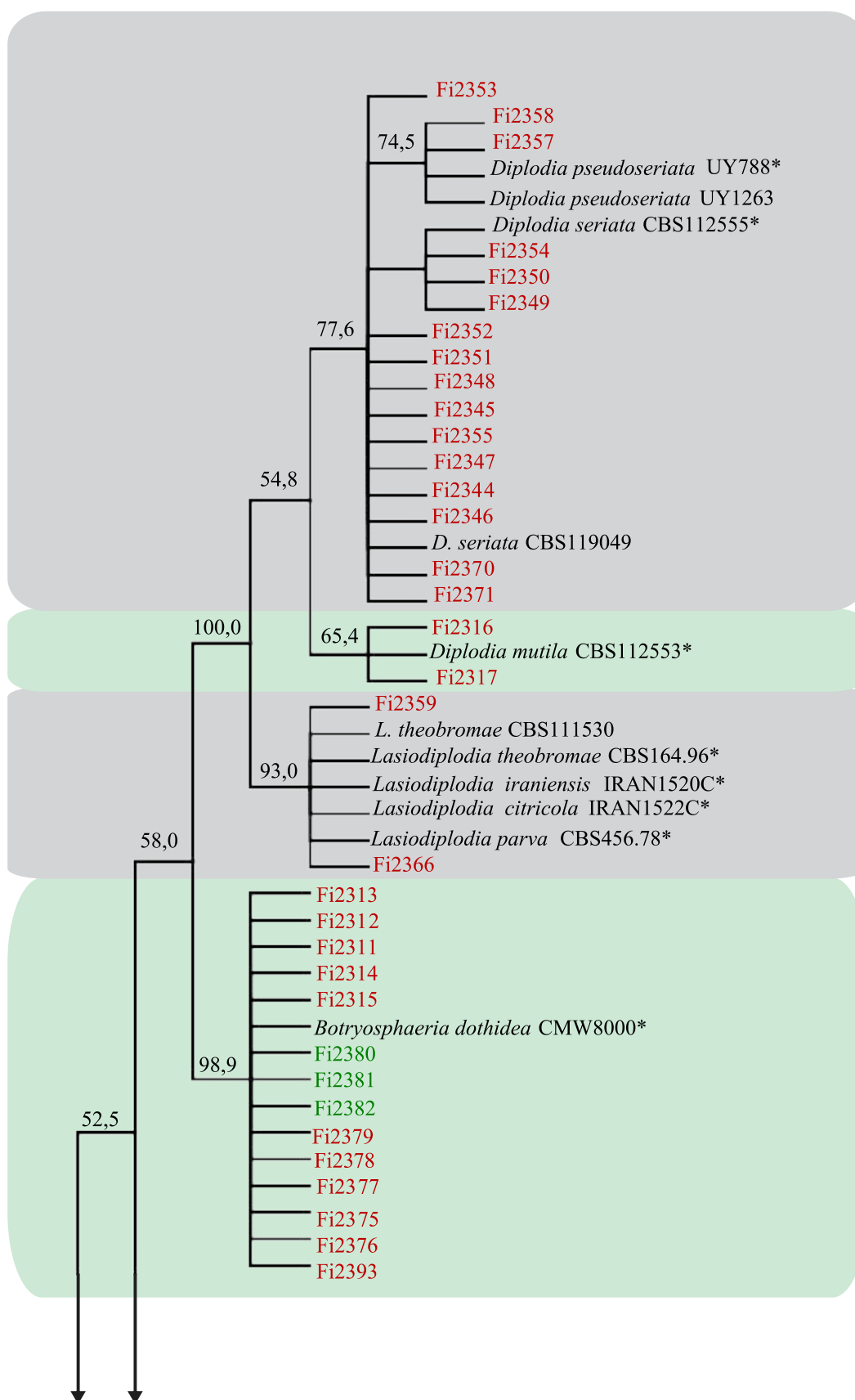


Figura 6 Morfotipos de aislamientos de Botryosphaeriaceae fitopatógenas. **a:** tipo-*Fusicoccum*, **b:** tipo-*Botryosphaeria dothidea*, **c:** tipo-*Diplodia*, **d:** tipo-*Lasiodiplodia*

Para identificar los aislamientos a nivel de especie se construyó un árbol filogenético con las secuencias de la región ITS en donde se incluyeron 352 caracteres. De éstos, 293 caracteres fueron constantes, 51 fueron parsimoniosamente informativos y 8 fueron no informativos. Al finalizar la búsqueda heurística se retuvieron los 100 árboles más parsimoniosos (TL: 96, CI: 0,7550, HI: 0,2500 y RI: 0,9776). La figura 7 muestra uno de los 100 árboles más parsimoniosos en el cual se observan siete clados. En el primer clado se agruparon 14 aislamientos con secuencias de *Diplodia seriata* (77,6% bootstrap) y se observó un sub-clado formado por dos secuencias (Fi2357 y Fi2358) que se agruparon con la secuencia tipo de *D. pseudoseriata* con un valor de bootstrap de 74,5%. El segundo clado comprendió las secuencias de los aislamientos Fi2316 y Fi2317 agrupadas con la secuencia tipo de *D. mutila* (65,4% bootstrap). El tercer clado (94,7% bootstrap) comprendió las secuencias de los aislamientos Fi2359 y Fi2366 y las secuencias de *Lasiodiplodia* spp.. El cuarto clado se encontró formado por 14 secuencias que se agruparon con las secuencias tipo de *Botryosphaeria dothidea* (98,9% bootstrap); estas secuencias pertenecieron a aislamientos obtenidos tanto a partir de síntomas como de tejidos sanos (endófitos). El quinto clado estuvo conformado por las secuencias de aislamientos de *Pseudofusicoccum* spp. (Fi2364 y Fi2365). En el sexto grupo se encontraron secuencias de aislamientos obtenidos tanto de ramas asintomáticas como con síntoma que se agruparon con secuencias del grupo *Neofusicoccum australe* y *Neofusicoccum luteum* (87,4% bootstrap). El séptimo grupo se encontró formado por secuencias obtenidas a partir de aislamientos tanto de patógenos como endófitos agrupadas con secuencias del complejo *Neofusicoccum parvum/Neofusicoccum ribis* (64,4% bootstrap). Estos dos últimos grupos no pudieron ser resueltos con las secuencias de ITS.

Para resolver el complejo *Neofusicoccum parvum*/*Neofusicoccum ribis* se obtuvo un árbol filogenético utilizando las secuencias de la región RPB2 que incluyó 567 caracteres. 538 de los cuales fueron constantes, 17 fueron parsimoniosamente informativos y 12 fueron no informativos. Al finalizar la búsqueda heurística se retuvieron los 4 árboles más parsimoniosos (TL: 30, CI: 0,9667, HI: 0,0333 y RI: 0,9804). La figura 8 muestra uno de los árboles más parsimoniosos en donde se observó que todos los aislamientos del complejo *N. parvum/ribis* se agruparon con secuencias de *Neofusicoccum parvum* (90,1% bootstrap).

Finalmente el árbol filogenético concatenado utilizando las secuencias de la región ITS y EF1- α de aquellos aislamientos en los clados formados por especies de *Diplodia*, *Lasiodiplodia* y el grupo *Neofusicoccum australe/luteum* permitió identificar las especies de estos grupos. En el análisis se incluyeron 618 caracteres totales, de los cuales 474 fueron constantes y 139 fueron parsimoniosamente informativos. Luego de la búsqueda heurística se retuvieron los 6 árboles más parsimoniosos (TL: 241, CI: 0.7884, HI: 0.2116 y RI: 0.9530). La figura 9 muestra uno de los árboles más parsimoniosos en donde se puede observar que el aislamiento Fi2364 se agrupó con secuencias de *Pseudofusicoccum* spp. (100% bootstrap). Los aislamientos Fi2357 y Fi2358 formaron un clado con las secuencias tipo de *D. pseudoseriata* UY788, con un sub-clado que correspondió a *D. seriata* (70.7% bootstrap). El aislamiento Fi2316 se agrupó con la secuencia tipo de *D. mutila* CBS112553 con un alto valor de bootstrap (100% bootstrap). El aislamiento Fi2359 formó un clado con *Lasiodiplodia theobromae* (84% bootstrap) y Fi2318 formó un clado con secuencias de *Neofusicoccum australe* (98.8% bootstrap).



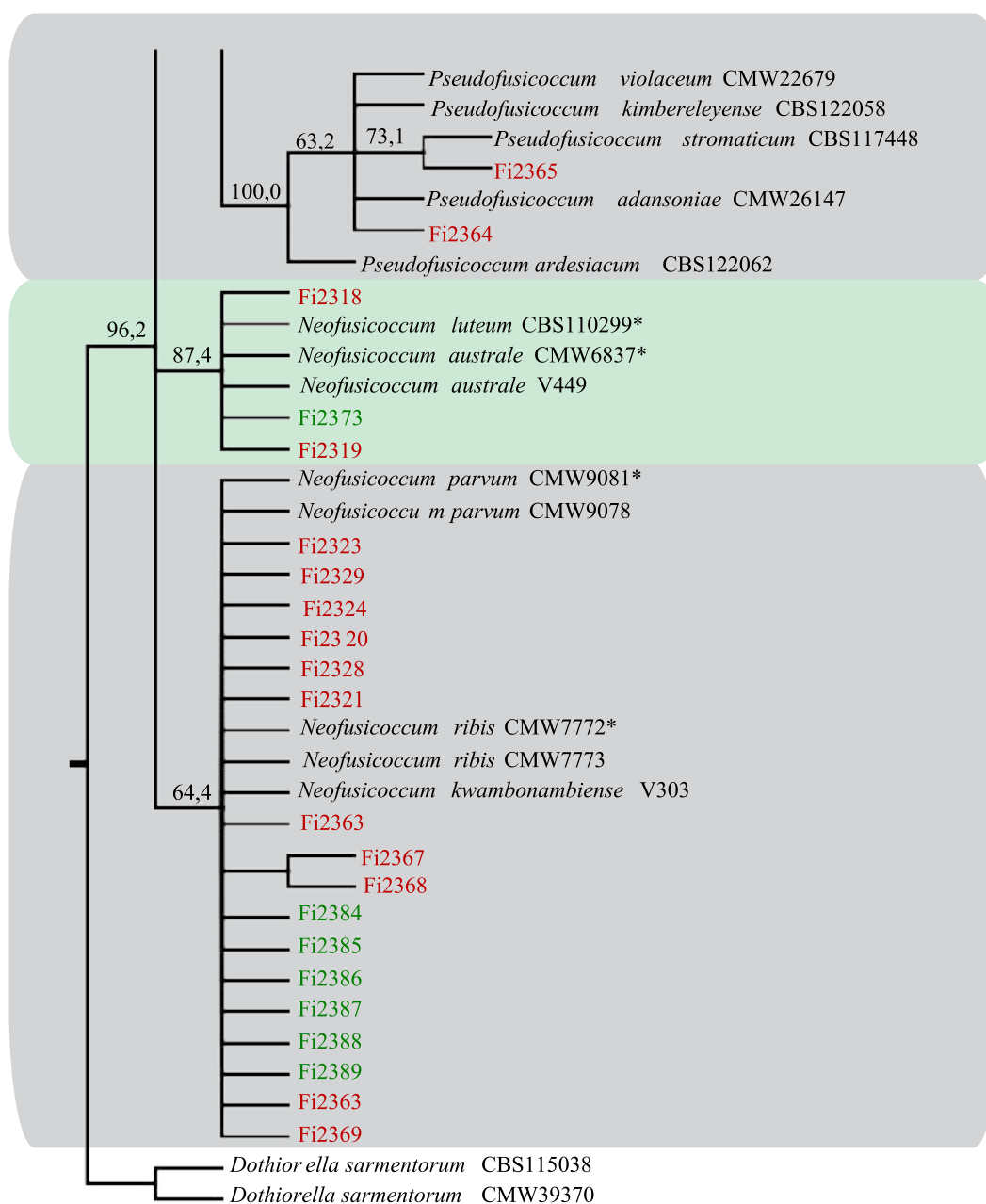


Figura 7 Uno de los 100 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región ITS. Los valores de bootstrap basados en 1000 réplicas se muestran en los nodos. Con asterisco se indican las secuencias correspondientes a especies tipo. El grupo externo fue *Dothiorella sarmentorum* CBS115038/CMW39370. En rojo se indican los aislamientos obtenidos de síntoma y en verde los aislamientos endófitos.

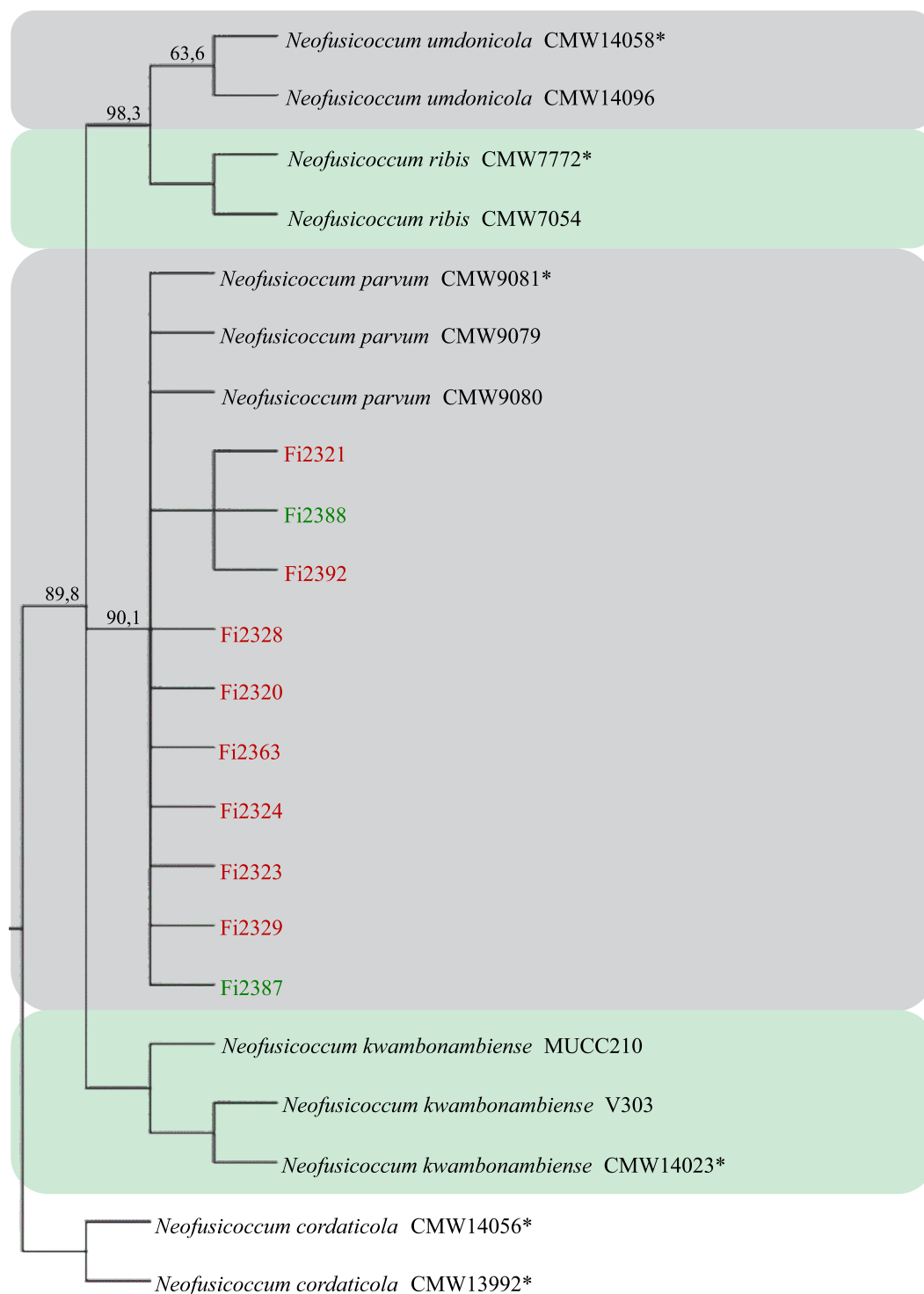


Figura 8 Uno de los 4 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región RPB2. Los valores de bootstrap basados en 1000 réplicas se muestran en los nodos. Con asterisco se indican las secuencias correspondientes a especies tipo. El grupo externo fue *Neofusicoccum cordaticola* CMW14056/CMW13992. En rojo se indican los aislamientos obtenidos de síntoma y en verde los aislamientos endófitos.

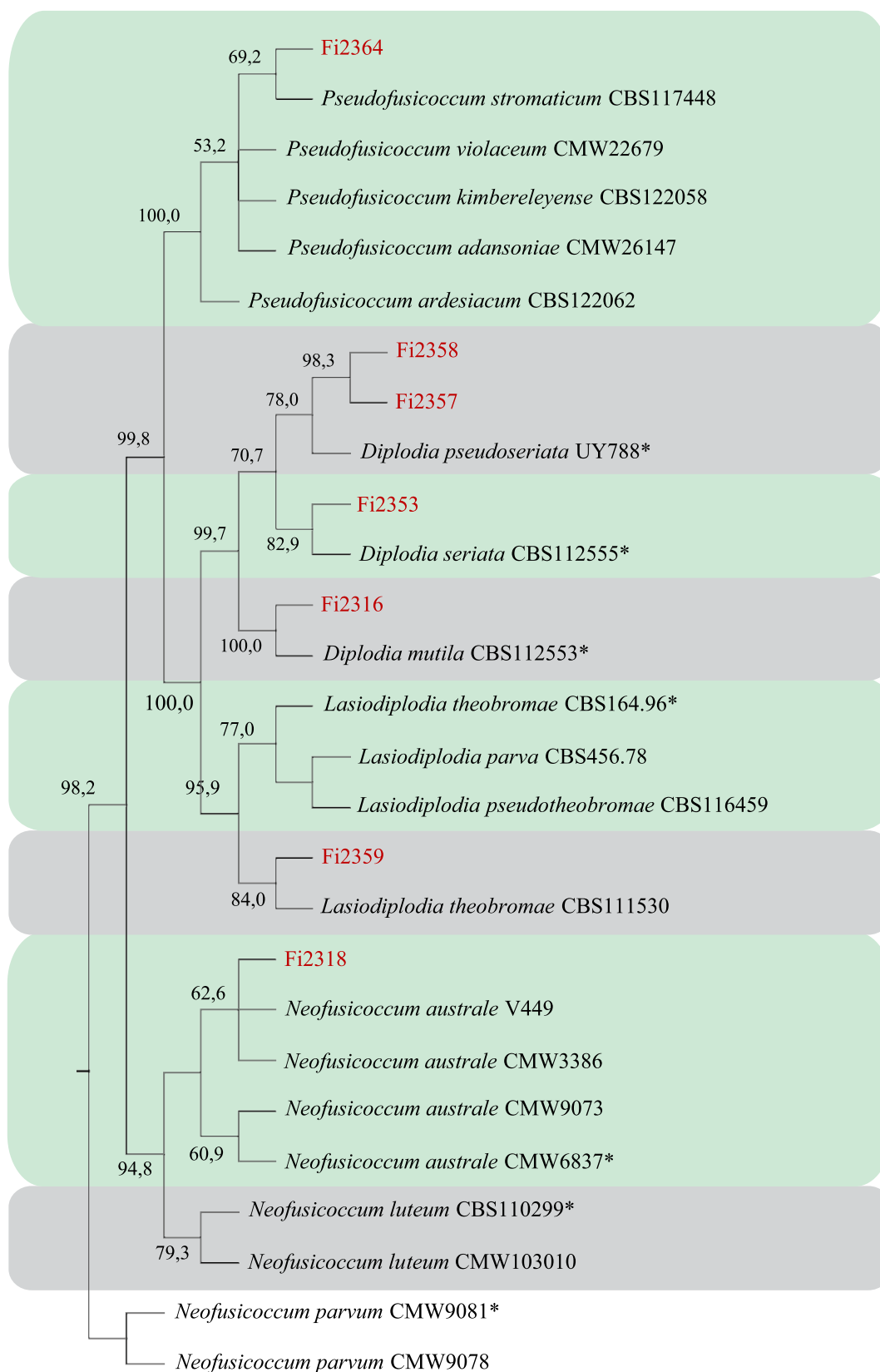


Figura 9 Uno de los 6 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis combinado de la región ITS y EF1-a. Los valores de bootstrap basados en 1000 réplicas se muestran en los nodos. Con asterisco se indican las secuencias correspondientes a especies tipo. El grupo externo fue *Neofusicoccum parvum* CMW9081/CMW9078. En rojo se indican los aislamientos obtenidos de síntoma.

4.3.2 *Diaporthe* spp.

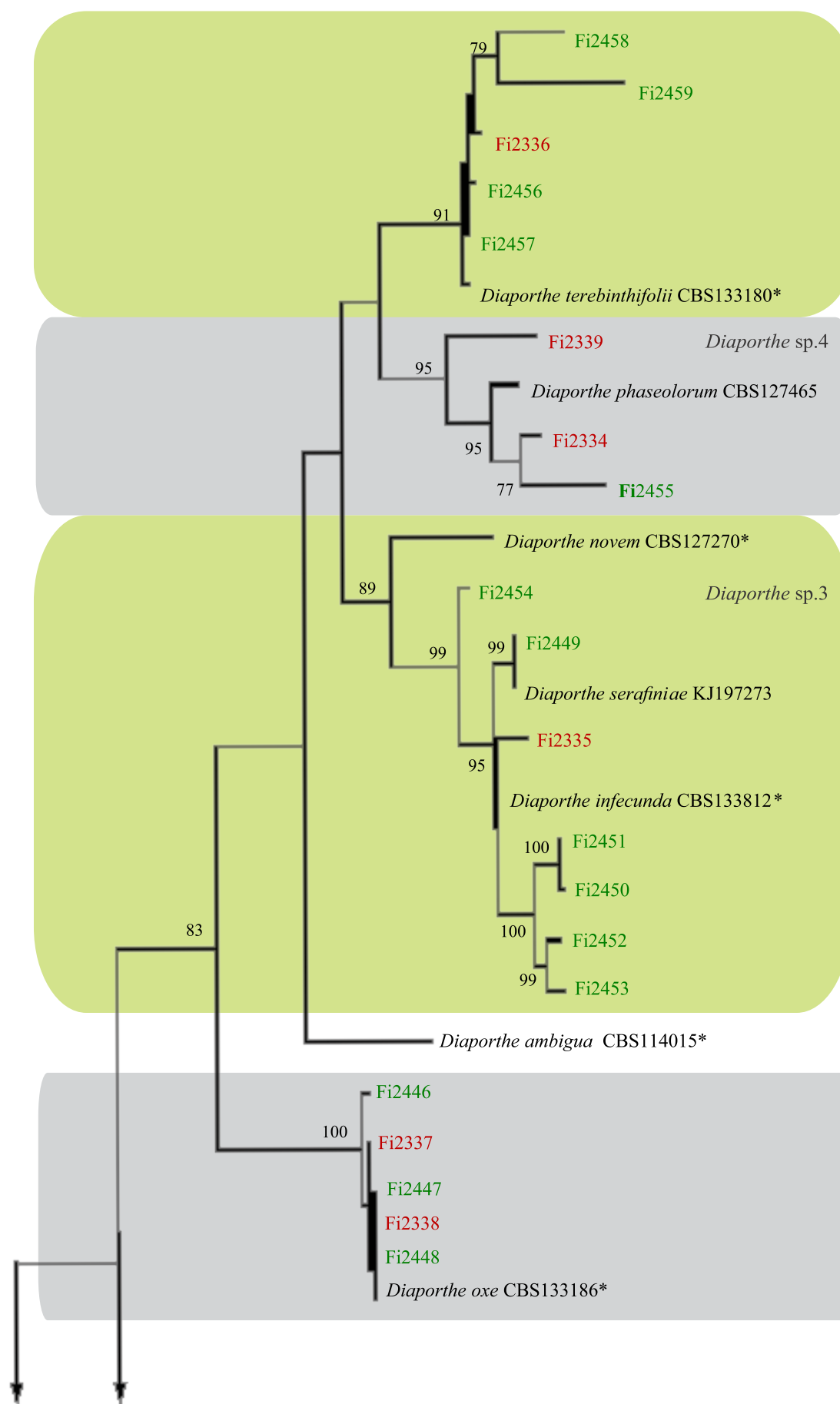
Un total de 185 aislamientos presentaron las características macromorfológicas correspondientes al género *Diaporthe*; 111 aislamientos fueron obtenidos como endófitos y 74 como fitopatógenos.

Para poder identificar las especies pertenecientes al género *Diaporthe* se construyó en primer lugar un árbol filogenético con las secuencias de la región ITS que incluyó 437 caracteres. De éstos, 318 fueron constantes, 98 fueron parsimoniosamente informativos y 21 fueron no informativos. Luego de la búsqueda heurística se retuvieron los 100 árboles más parsimoniosos (TL: 261, CI: 0,5977, HI: 0,4023 y RI: 0,911); en la figura 1 del anexo se muestra uno de los árboles más parsimoniosos. Luego se realizó un árbol filogenético con secuencias del factor de elongación (EF1- α) que incluyó 430 caracteres totales, de los cuales 75 fueron constantes y 266 fueron parsimoniosamente informativos. Luego de la búsqueda heurística se retuvieron los 30 árboles más parsimoniosos (TL: 1288, CI: 0,5256, HI: 0,4744 y RI: 0,8046). En la figura 2 del anexo se muestra uno de los árboles más parsimoniosos.

Finalmente se construyó un análisis filogenético concatenado con las secuencias de la región ITS y EF1- α que incluyó 554 caracteres totales. De éstos 319 fueron constantes y 155 fueron parsimoniosamente informativos. Luego de la búsqueda heurística se retuvieron los 100 árboles más parsimoniosos (TL: 706, CI: 0,5184, HI: 0,4816 y RI: 0,8095). En la figura 10 se muestra uno de los 100 árboles más parsimoniosos en donde se observaron 10 clados.

El primer clado se formó por 5 aislamientos junto con la secuencia tipo de *Diaporthe terebinthifolii* (91% bootstrap). El segundo clado se formó por la secuencia de un aislamiento fitopatógeno (Fi2339) que no se agrupó con ninguna de las secuencias del GenBank y que por lo tanto no pudo ser resuelto separado con un 95% de bootstrap de un sub-clado formado por una

secuencia fitopatógena y una endófita que se agruparon con *Diaporthe phaseolorum* (77% bootstrap). El tercer clado se formó por la secuencia de un aislamiento endófito (Fi2454) que no se agrupó con ninguna de las secuencias del GenBank y por lo tanto no pudo ser identificado a nivel de especie y un sub-clado que incluyó por un lado la secuencia del aislamiento Fi2449 y la secuencia de *Diaporthe serafiniae* agrupadas con un 99% de bootstrap y por otro lado 5 aislamientos agrupados con la secuencia tipo de *Diaporthe infecunda* (60% bootstrap). El cuarto clado se formó por 5 secuencias de hongos endófitos y fitopatógenos agrupados con la secuencia tipo de *Diaporthe oxe* con un valor de bootstrap de 100%. El quinto clado lo formaron las secuencias tipo de *D. eres* y *D. vaccinii*. El sexto clado se compuso por la secuencia del aislamiento Fi2310 con la secuencia tipo de *Diaporthe amygdali* con un valor de bootstrap de 100% y el séptimo clado se compuso por aislamiento endófito Fi2438 junto con la secuencia tipo de *Diaporthe brasiliensis* con un valor de bootstrap de 100%. El octavo clado se formó por las secuencias de los aislamientos Fi2439 y Fi2440 con la secuencia tipo de *Diaporthe inconspicua* (100% bootstrap). El noveno clado se formó por 4 secuencias que se agruparon con un 99% de valor de bootstrap; sin embargo no se agruparon con ninguna de las secuencias del GenBank por lo tanto no pudo ser resuelto. El clado número diez se formó por 4 secuencias agrupadas con la secuencia tipo de *Diaporthe foeniculacea* con un valor de bootstrap de 99%.



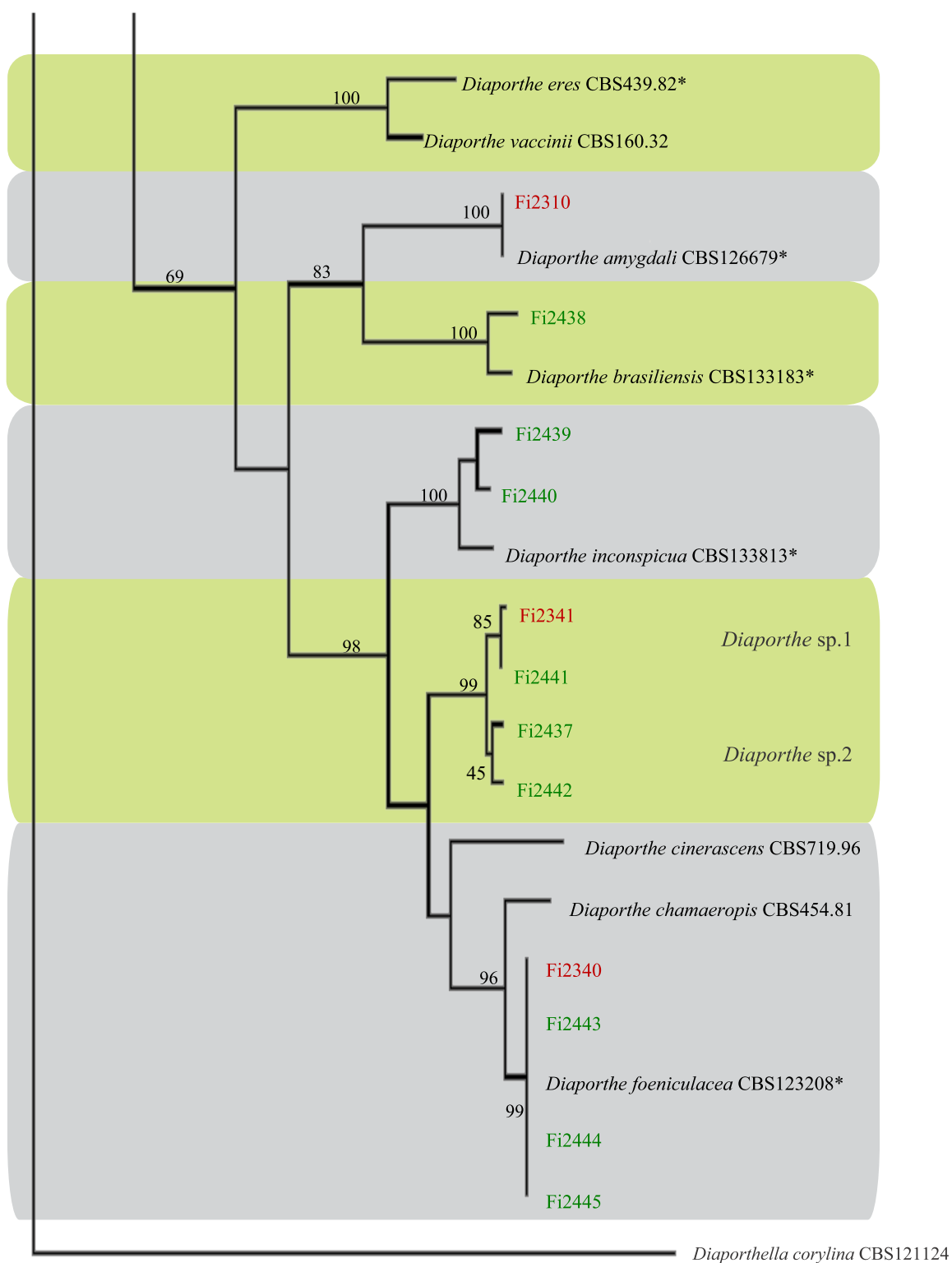


Figura 10 Uno de los 100 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis combinado de la región ITS y EF1-a. Los valores de bootstrap basados en 1000 réplicas se muestran en los nodos. Con asterisco se indican las secuencias correspondientes a especies tipo. El grupo externo fue *Diaporthella corylina* CBS121124. En rojo se indican los aislamientos obtenidos de síntoma y en verde los aislamientos endófitos.

4.3.3 Especies poco frecuentes

Se obtuvieron un total de 44 aislamientos que mostraron características macro y micromorfológicas similares a las de *Cytospora/Leucostoma*. En medio PDA se observó un micelio sumergido de coloración verde o grisácea, con una gran cantidad de estromas multiloculares inmersos en el medio de cultivo y en su superficie (Figura 11-a, b). Los conidios fueron hialinos y curvados (Figura 11-c). Veinticinco de estos aislamientos fueron obtenidos como endófitos de ramas de peral y arándano y 19 fueron obtenidos de madera de duraznero con síntoma.

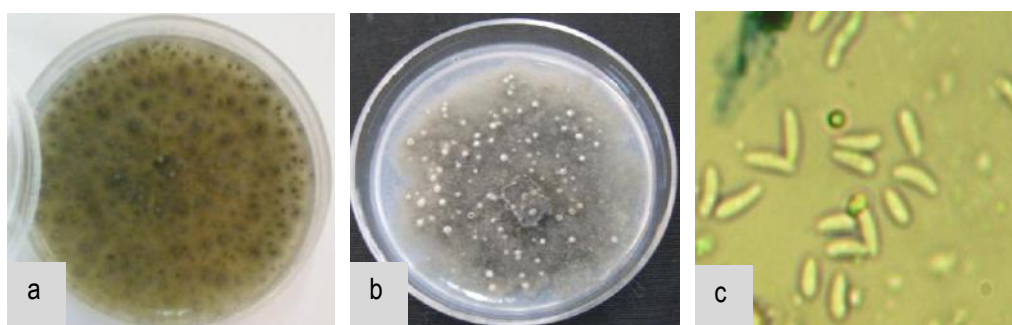


Figura 11 Aislamientos de *Cytospora*. **a** y **b**: aspecto de la colonia en PDA, **c**: conidios

El análisis de las secuencias de la región ITS incluyó un total de 569 caracteres de los cuales 409 fueron constates y 128 fueron parsimoniosamente informativos. Luego de la búsqueda heurística se retuvieron los 74 árboles más parsimoniosos (TL: 280, CI: 0,7679, HI: 0,2321, RI: 0,8997). En la figura 12 se muestra uno de los arboles más parsimoniosos en donde se observan siete clados.

El primer clado se compuso por 7 secuencias agrupadas con una secuencia representativa de los hongos “tipo-*Cytospora*” (100% bootstrap). El segundo clado se formó por la secuencia de un aislamiento endófito con *Cytospora acaciae* (100% bootstrap). El tercer clado se formó por un aislamiento fitopatógeno junto con la secuencia tipo de *Cytospora eucalypticola* (99,7% bootstrap). El cuarto clado lo formaron las secuencias CBS de *Leucostoma niveum*. El quinto clado resultó estar compuesto por los aislamientos fitopatógenos Fi2429 y Fi2430 con secuencias de *Leucostoma persoonii* (80,5% bootstrap). El sexto y séptimo clado lo formaron las secuencias tipo de *Leucostoma cinctum* y *Valsa malicola*, respectivamente.

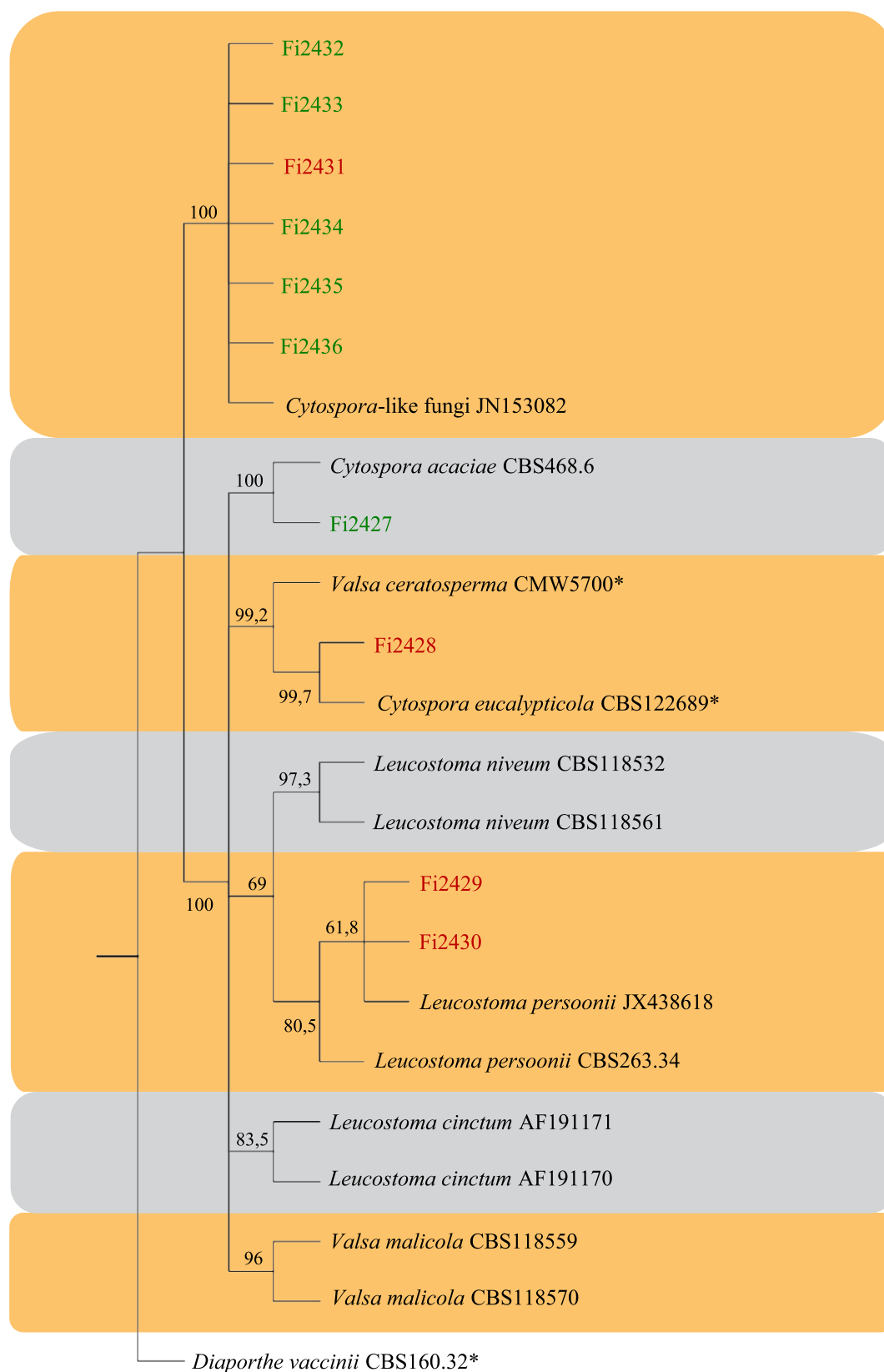


Figura 12 Uno de los 74 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región ITS. Los valores de bootstrap basados en 1000 réplicas se muestran en los nodos. Con asterisco se indican las secuencias correspondientes a especies tipo. El grupo externo fue *Diaporthe vaccinii* CBS160.32. En rojo se indican los aislamientos obtenidos de síntoma y en verde los aislamientos endófitos.

Un total de 31 aislamientos pertenecientes al género *Paraconiothyrium* presentaron un micelio aéreo escaso y en general exhibieron un crecimiento con anillos concéntricos sobre medio PDA. Los aislamientos se agruparon en tres morfotipos según la coloración del micelio en la zona del inóculo luego de 7 días de incubación; micelio de color verde claro, micelio de color rosa viejo y micelio de color mostaza (Figura 13). Sobre el micelio se observaron estromas que produjeron conidios pequeños sub-hialinos a pigmentados unicelulares o bicelulares.

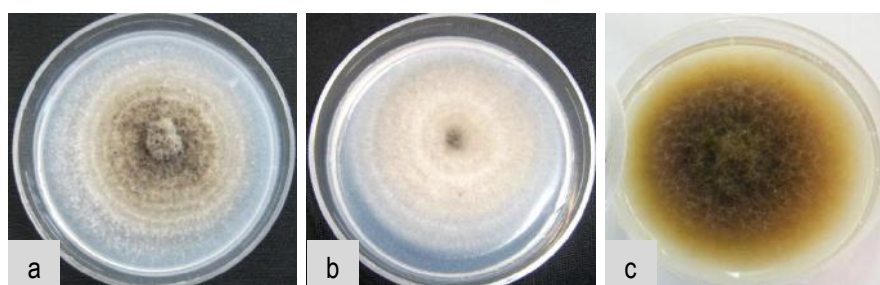


Figura 13 Morfotipos de aislamientos de *Paraconiothyrium* spp.
a y b: *P. brasiliense*, c: *Peyronellaea glomerata*

Su identificación a nivel de especie se realizó mediante análisis filogenéticos utilizando secuencias de la región ITS. El análisis incluyó 572 caracteres totales de los cuales 385 fueron constantes y 180 fueron parsimoniosamente informativos. Luego de la búsqueda heurística se retuvieron los 54 árboles más parsimoniosos (TL: 246, CI: 0.9268, HI: 0.0732 y RI: 0.9768). La figura 14 muestra uno de los árboles mas parsimoniosos en donde se observa que las secuencias de tres aislamientos se agruparon con secuencias de *Peyroneallaea glomerata* (ex *Coniothyrium glomerata*) (100% bootstrap) y 5 secuencias se agruparon en un clado junto con secuencias de *Paraconiothyrium brasiliensis* (87% bootstrap) incluyendo la secuencia tipo.

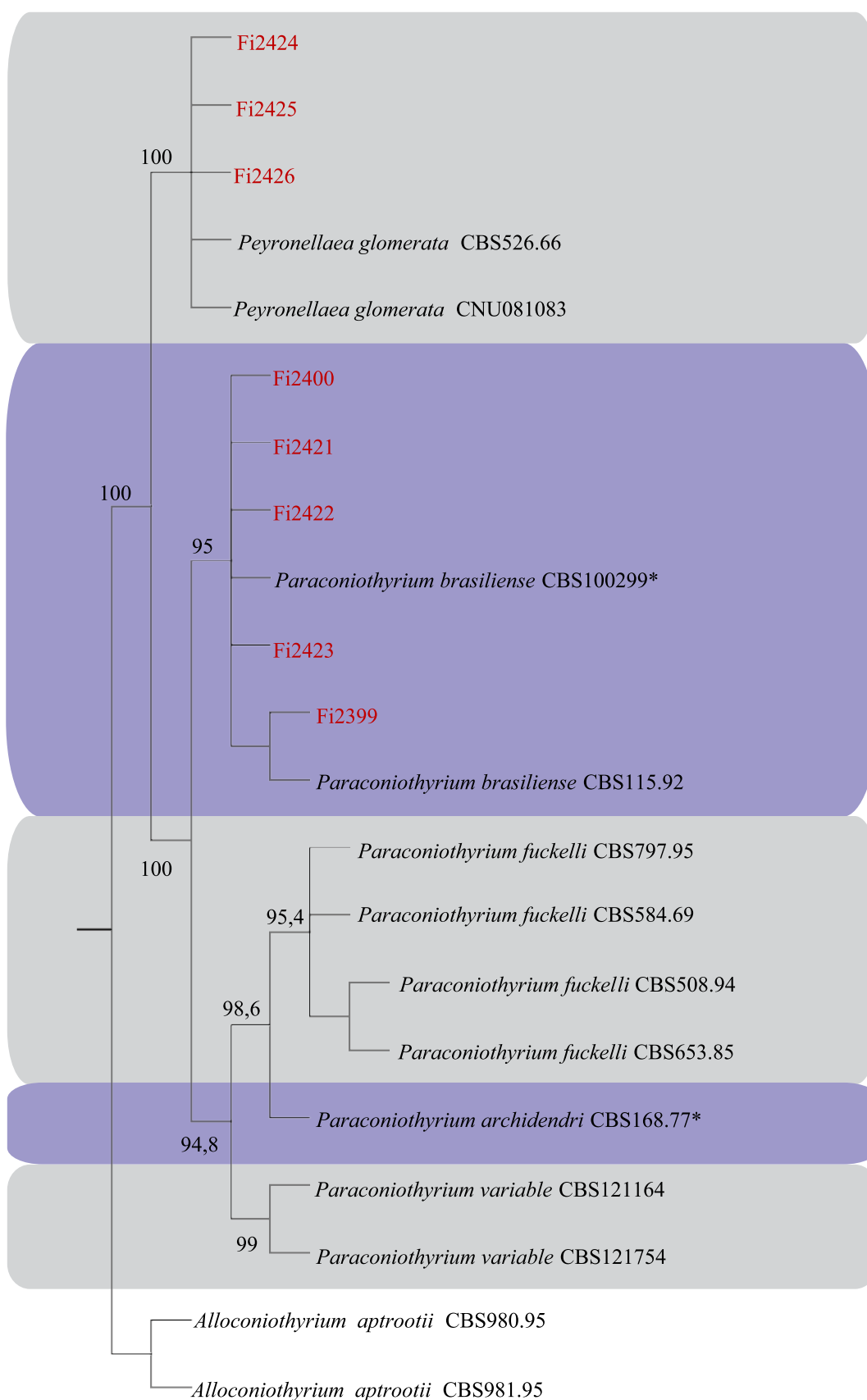


Figura 14 Uno de los 54 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región ITS. Los valores de bootstrap basados en 1000 réplicas se muestran en los nodos. Con asterisco se indican las secuencias correspondientes a especies tipo. El grupo externo fue *Alloconiothyrium aptrootii* CBS980.95/CBS981.95. En rojo se indican los aislamientos obtenidos de síntoma.

Los aislamientos identificados como *Phaeoacremonium* spp. y *Pleurostomophora richardsiae* (Figura 15) se obtuvieron de una zona necrosada central en el corte transversal de un tronco de manzano (Figura 3-o).



Figura 15 Aislamientos de *Phaeoacremonium* y *Pleurostomophora*. **a, b:** colonia y conidiogénesis de *Phaeoacremonium mortoniae*, **c:** *Pleurostomophora richardsiae*
Escala: 40µm

El análisis filogenético utilizando las secuencias de la región de cuatro aislamientos obtenidos incluyó 536 caracteres totales de los cuales 301 fueron constantes y 147 fueron parsimoniosamente informativos. Se retuvieron los 100 árboles más parsimoniosos (TL: 364, CI: 0.8434, HI: 0.1566, RI: 0.9092). En la figura 16 se observan 6 clados. El primer clado se formó por la secuencia del aislamiento Fi2398 junto con secuencias de *Phaeoacremonium aleophilum* (*Tognina minima*) y *Phaeoacremonium iraniamum* con un valor de bootstrap de 99,0% y por lo tanto este clado no pudo ser resuelto. En el segundo clado se observó el aislamiento Fi2397 agrupado con secuencias de *Phaeoacremonium mortoniae* (*Tognina fraxinopennsylvanica*) con un valor de bootstrap del 100%. Los aislamientos Fi2361 y Fi2362 se agruparon con secuencias tipo de *Pleurostomophora richardsiae* con un valor de bootstrap de 99,9%.

Se realizó un análisis filogenético con secuencias de la región Beta tubulina (B-tub) para identificar aquellos aislamientos que se agruparon con secuencias de *Phaeoacremonium aleophilum* y *Ph. iraniana*. El análisis incluyó 573 caracteres totales, de los cuales 307 fueron constantes y 187 fueron parsimoniosamente informativos. Luego de la búsqueda heurística se retuvieron los 4 árboles más parsimoniosos (TL: 406, CI: 0,8251, HI: 0,1749, RI: 0,8828). En la figura 17 se observó que la secuencia Fi2398 se agrupó junto con secuencias de *Phaeoacremonium aleophilum* con un valor de bootstrap del 100% y la secuencia Fi2397 junto con secuencias de *Phaeoacremonium mortoniae* (*Tognina fraxinopennsylvanica*) con un valor de bootstrap del 100%.

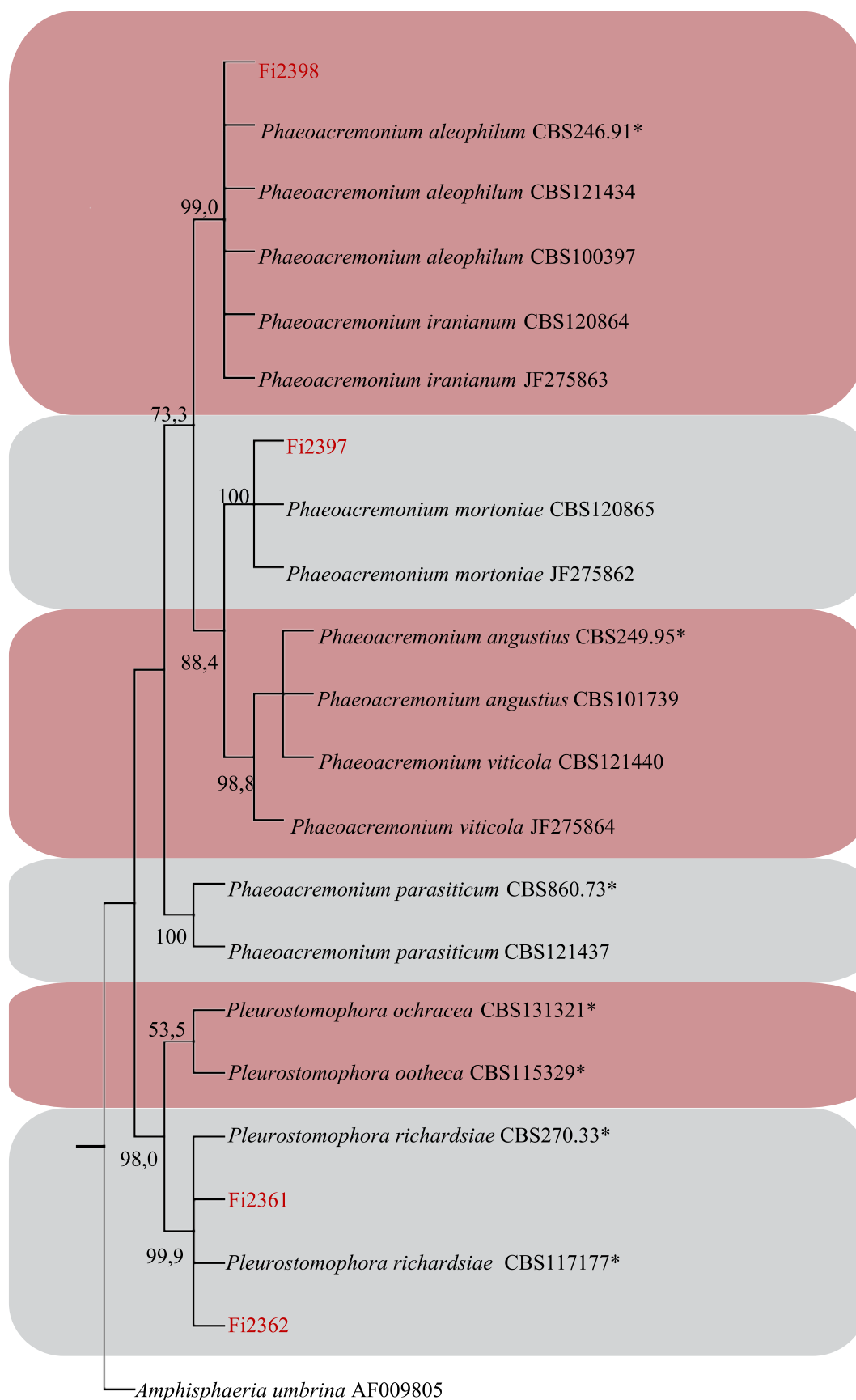


Figura 16 Uno de los 100 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región ITS. Los valores de bootstrap basados en 1000 réplicas se muestran en los nodos. Con asterisco se indican las secuencias correspondientes a especies tipo. El grupo externo fue *Amphisphaeria umbrina*. En rojo se indican los aislamientos obtenidos de síntoma.

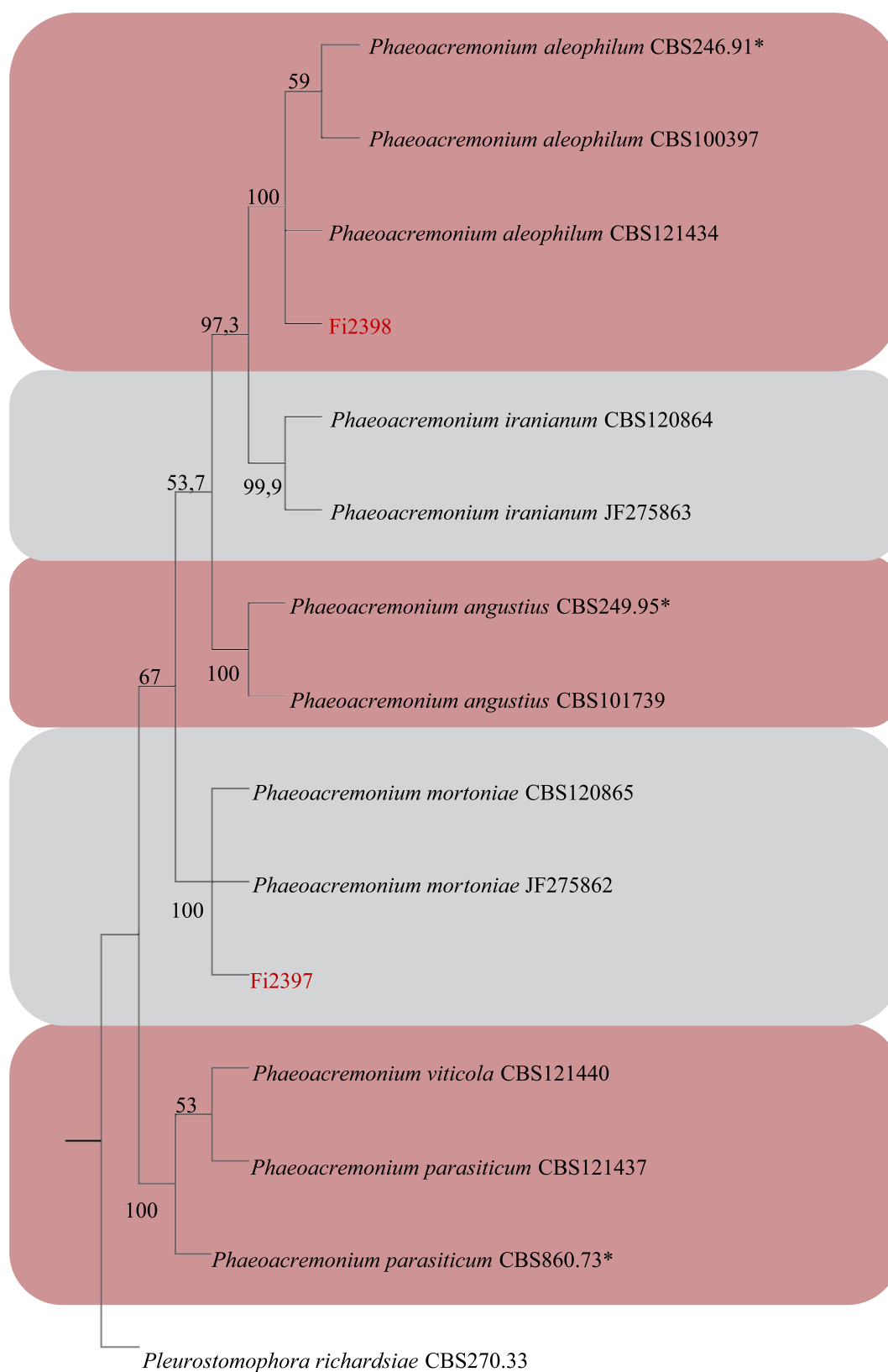


Figura 17 Uno de los 4 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región B-tub. Los valores de bootstrap basados en 1000 réplicas se muestran en los nodos. Con asterisco se indican las secuencias correspondientes a especies tipo. El grupo externo fue *Pleurostomophora richardsiae* CBS270.33. En rojo se indican los aislamientos obtenidos de síntoma.

Asociados a raíces secas de peral se obtuvieron cuatro aislamientos con características macro y micro morfológicas similares a las del género *Cylindrocarpon* (Figura 18). Dos de los aislamientos presentaron abundante micelio aéreo de aspecto algodonoso, de color rosa claro y amarillo (Figura 18- a, c). El tercer aislamiento se caracterizó por presentar escaso micelio aéreo de color blanco y producir una coloración amarronada en el medio de cultivo (Figura 18-d). En la figura 18 b se observa la presencia de fiálides laterales y macroconidios originándose de éstas.

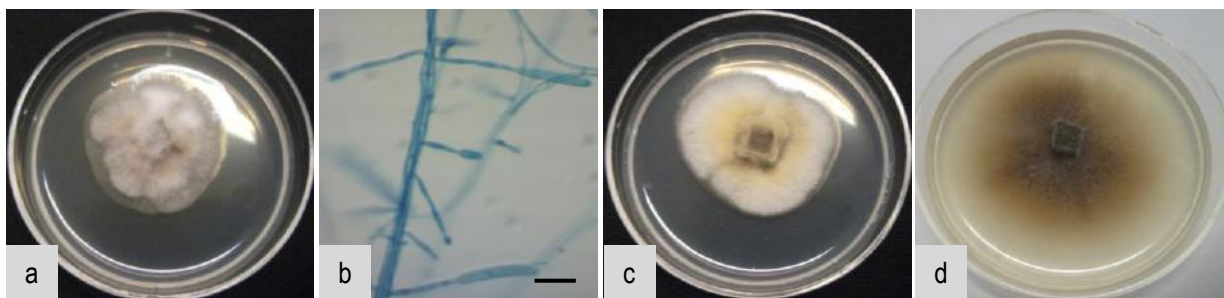


Figura 18 Aislamientos de *Cylindrocarpon* spp. **a, b:** *Cylindrocarpon olidum*, **c:** *Cylindrocarpon pauciseptatum*, **d:** *Ilyonectria robusta*. Escala: 20µm.

El análisis filogenético utilizando secuencias de la región ITS de los aislamientos incluyó 503 caracteres totales de los cuales 346 fueron constantes y 127 fueron parsimoniosamente informativos. Luego de la búsqueda heurística se retuvieron los 6 árboles más parsimoniosos (TL: 251, CI: 0.8446, HI: 0.1554, RI: 0.9093). En la figura 19 se muestra uno de los 6 árboles más parsimoniosos en donde se puede observar que los aislamientos se agruparon con secuencias tipo de *Cylindrocarpon olidum*, (99,5% bootstrap), *Ilyonectria robusta* (85,4 % bootstrap) y *Cylindrocarpon pauciseptatum* (100% bootstrap).

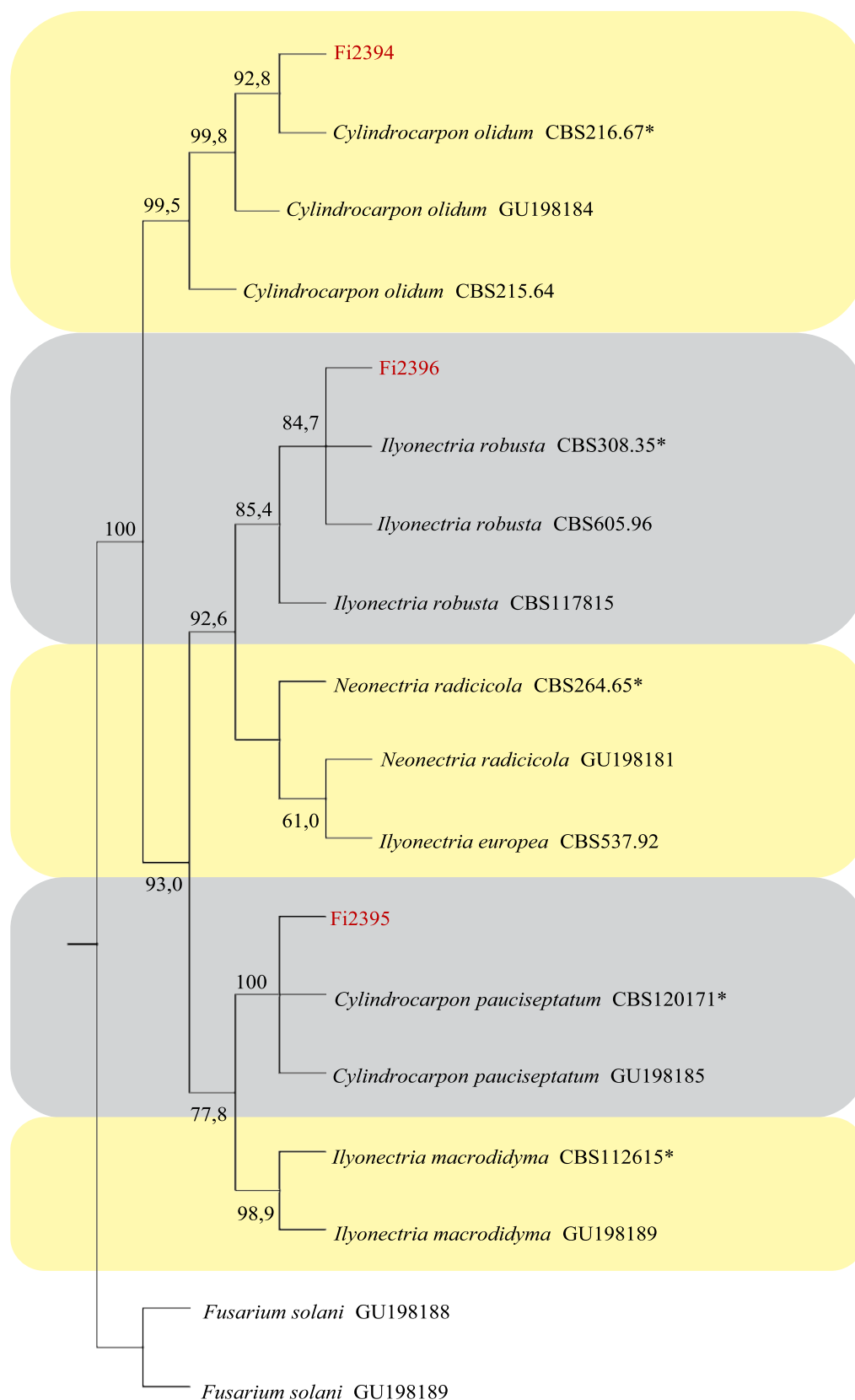


Figura 19 Uno de los 6 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región ITS. Los valores de bootstrap basados en 1000 réplicas se muestran en los nodos. Con asterisco se indican las secuencias correspondientes a especies tipo. El grupo externo fue *Fusarium solani* GU198188/198189. En rojo se indican los aislamientos obtenidos de sintoma.

En este estudio se obtuvo un único aislamiento (Fi2466) cuyas características macro y micromorfológicas permitieron ubicarlos dentro del género *Eutypa* (Figura 20-a). La secuencia de la región ITS de este aislamiento presentó un 97% de identidad con la secuencia tipo de *Eutypa leptoplaca* CBS 287.87 (AY684226).

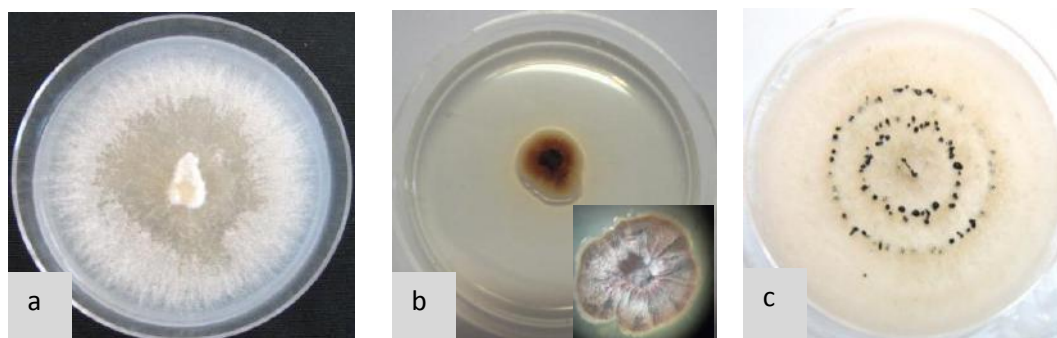


Figura 20 Aislamientos de **a:** *Eutypa leptoplaca*, **b:** *Collophora rubra*, **c:** *Pestalotiopsis* sp.

Además se obtuvieron dos aislamientos cuyas características macro y micromorfológicas permitió ubicarlos dentro del género *Collophora* (Figura 20-b), cuyas secuencias de la región ITS presentó un 99% de identidad con la secuencia tipo de *Collophora rubra* (NR119747).

Un total de 28 aislamientos identificados como *Pestalotiopsis* sp. (Figura 20-c) fueron obtenidos en este estudio. Siete se encontraron como endófitos en ramas de arándano y 21 asociados a raíces necrosadas de árboles de arándano.

4.4 Patogenicidad bajo condiciones de laboratorio

4.4.1 Aislamientos endófitos

Un aislamiento de cada especie obtenida como endófita fue inoculado en ramas sanas de la misma especie frutal de la cual fue aislado originalmente.

En total 17 aislamientos produjeron una lesión significativamente diferente a la observada sobre las ramas control (Tabla 4), por lo que se sugiere que estos aislamientos son patógenos latentes. De éstos, ocho aislamientos se correspondieron a 6 especies diferentes de *Diaporthe*, 1 aislamiento de *Cytospora*, 1 aislamiento de *Pestalotiopsis* y 6 aislamientos correspondientes a 3 especies diferentes de *Botryosphaeriaceae* (Tabla 4). Los hongos inoculados fueron re-aislados en todos los casos.

Los aislamientos de *D. brasiliensis*, *D. foeniculacea*, *D. inconspicua*, *D. terebinthifolii* y *Diaporthe* sp.1 y *Diaporthe* sp.2 inoculados en sus respectivos hospederos no produjeron una lesión significativamente diferente a la del control, mientras que los aislamientos de *D. infecunda*, *D. oxe*, *D. serafinae*, *Diaporthe* sp.2 y *Diaporthe* sp.3 inoculados en sus respectivos hospederos sí produjeron lesiones significativamente diferentes a las observadas en el control. Los síntomas producidos por distintos aislamientos sobre las distintas especies frutales en ocasiones fueron diferentes (Figura 21). El aislamiento de *D. infecunda* aislado e inoculado en manzano genero cancro hundido decolorado mientras que el aislamiento de la misma especie aislado e inoculado en peral produjo cancro oscuro alrededor de la herida de la inoculación.

Los tres aislamientos de *B. dothidea* inoculados en sus respectivos hospederos produjeron lesiones significativamente diferentes a las observadas en el control, al igual que los aislamientos de *N. parvum* y el aislamiento de *N. australe*.

Tabla 4 Largo de la lesión producida por los aislamientos endófitos inoculados sobre ramas sanas de manzano, duraznero, peral y arándano bajo condiciones de laboratorio.

Especie	Aislamiento	Origen	Promedio de lesión (cm) ^a			
			Peral	Manzano	Duraznero	Arándano
<i>Diaporthe brasiliensis</i>	Fi2438	P	0,95 d			
<i>Diaporthe foeniculacea</i>	Fi2445	P	0,95 d			
<i>Diaporthe foeniculacea</i>	Fi2444	M		1,22c		
<i>Diaporthe inconspicua</i>	Fi2439	P	0,95d			
<i>Diaporthe inconspicua</i>	Fi2440	P	0,96d			
<i>Diaporthe infecunda</i>	Fi2468	P	1,03c			
<i>Diaporthe infecunda</i>	Fi2452	M		5,18ab		
<i>Diaporthe oxo</i>	Fi2448	P	1,04c			
<i>Diaporthe oxo</i>	Fi2467	A				1,4b
<i>Diaporthe serafiniae</i>	Fi2449	M		3,11a		
<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	Fi2457	P	1,01d			
<i>Diaporthe</i> sp.1	Fi2441	P	0,95d			
<i>Diaporthe</i> sp.2	Fi2466	P	1,41b			
<i>Diaporthe</i> sp.2	Fi2437	A				4,15c
<i>Diaporthe</i> sp.2	Fi2442	P	0,87d			
<i>Diaporthe</i> sp.3	Fi2454	A				4,48c
<i>Tipo-Cytospora</i>	Fi2433	P	0,97d			
<i>Tipo-Cytospora</i>	Fi2435	A				5,47c
<i>B. dothidea</i>	Fi2461	P	5,15a			
<i>B. dothidea</i>	Fi2381	D			0,99a	
<i>B. dothidea</i>	Fi2380	A				1,27a
<i>N. australe</i>	Fi2373	M		6,0a		
<i>N. parvum</i>	Fi2384	P	4,91a			
<i>N. parvum</i>	Fi2388	A				13,58a
<i>Pestalotiopsis</i>	Fi2465	D			1,02a	
<i>Pestalotiopsis</i>	Fi2464	A				0,92d
Control (PDA)	C	C	0,92d	0,86c	0b	0,83d

a: Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa.

En negrita se destacan las especies con diferencia significativa con respecto al control.

P: peral, D: duraznero, M: manzano, C: control



Figura 21 Síntomas generados en ramas inoculadas con aislamientos endófitos bajo condiciones de laboratorio. a, b, e: manzano; c, f, g: peral; d, i: arándano; h, j: duraznero.

a: *Diaporthe infecunda* (Fi2452), b: *Diaporthe serafinae* (Fi2449), c: *D. infecunda* (Fi2468), d: *Diaporthe* sp.2 (Fi2437), e: *Neofusicoccum australe* (Fi2373), f: *N. parvum* (Fi2384), g: *Botryosphaeria dothidea* (Fi2461), h: *Botryosphaeria dothidea* (Fi2381), i: tipo-*Cytospora* (Fi2435), j: *Pestalotiopsis* sp. (Fi2465).

4.4.2 Aislamientos obtenidos de síntoma

En las inoculaciones bajo condiciones de laboratorio *D. infecunda*, *D. oxe* y *D. eres* produjeron lesión a diferencia de los controles en donde no se observó desarrollo de síntoma. *Diaporthe phaseolorum* y *Diaporthe* sp.1 sólo produjeron lesión sobre ramas de manzano y duraznero (Tabla 5).

Las especies de Botryosphaeriaceae *Diplodia mutila*, *Neofusicoccum parvum*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Pseudofusicoccum* sp. produjeron lesiones en todos los frutales variando su virulencia. *N. parvum*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Pseudofusicoccum* sp. presentaron una alta virulencia sobre las tres especies inoculadas. *B. dothidea* sólo causó lesión sobre duraznero y *D. pseudoseriata* y *Diplodia seriata* sólo causaron lesión sobre duraznero y manzano (Tabla 5, Tabla 2 Anexo).

Peyroneallaea glomerata, *Paraconiothyrium brasiliense*, *Cytospora eucalypticola*, *Phaeoacremonium aleophilum* y *Phaeoacremonium mortoniae* no produjeron lesión en ninguna de las especies frutales inoculadas. *Leucostoma persoonii* sólo produjo lesión en ramas de durazno con una alta virulencia y *Collophora rubra* produjo lesión sobre peral (Tabla 5, Tabla 2 Anexo).

Los hongos inoculados se re-aislaron del 80% de las ramas que presentaron lesión (Tabla 3 y 4 Anexo).

Tabla 5 Largo de lesión producida por la inoculación cruzada de aislamientos obtenidos de síntoma sobre ramas sanas de manzano, duraznero y peral bajo condiciones de laboratorio

Especie	Aislamiento	Origen	Peral	Manzano	Duraznero
			Promedio de lesión (cm) ^a		
<i>Diaporthe infecunda</i>	Fi2355	P	0,73 c	1,09 c	1,48 ab
<i>Diaporthe oxe</i>	Fi2338	P	0,84 bc	0,90 c	1,41 ab
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	Fi2334	P	0 d	1,58 ab	1,46 ab
<i>Diaporthe sp.1</i>	Fi2342	P	0 d	2,42 ab	0,96 c
<i>Diaporthe eres</i>	Fi2449	M	2,72 a	1,52 b	3,08 a
<i>Peyronellaea glomerolata</i>	Fi2425	D	0 d	0 d	0 d
<i>P. brasiliense</i>	Fi2423	M	0 d	0 d	0 d
<i>Cytospora eucalypticola</i>	Fi2428	D	0 d	0 d	0 d
<i>Leucostoma persoonii</i>	Fi2430	D	0 d	0 d	3,98 a
<i>B. dothidea</i>	Fi2311	M	0 d	0 d	1,26 bc
<i>Diplodia mutila</i>	Fi2316	P	2,20 a	0,80 c	2,88 a
<i>Diplodia seriata</i>	Fi2346	D	0 d	0,92 c	1,22 abc
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	Fi2358	D	0 d	1,12 bc	1,08 bc
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi2326	M	3,22 a	6,04 a	2,36 a
<i>L. theobromae</i>	Fi2359	M	5,32 a	4,30 a	3,16 a
<i>Pseudofusicoccum sp.</i>	Fi2364	D	0,94 b	3,36 a	1,25 b
<i>Collophora rubra</i>	Fi2360	D	0,76 bc	0 d	0 d
<i>Ph. aleophilum</i>	Fi2398	P	0 d	0 d	0 d
<i>Ph. mertoniae</i>	Fi2397	P	0 d	0 d	0 d
Control (PDA)	C	C	0 d	0 d	0 d

a: Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa

En negrita se destacan las especies con diferencia significativa con respecto al control en al menos un hospedero. P: peral. D: duraznero. M: manzano. C: control.

4.5 Patogenicidad en campo

4.5.1 Aislamientos obtenidos de síntoma

En la evaluación a campo se inocularon los aislamientos que produjeron lesión en los experimentos en el laboratorio. Un total de 12 aislamientos correspondientes a 12 especies; 6 de las cuales pertenecen a la familia *Botryosphaeriaceae*, 5 al género *Diaporthe* y una a *Leucostoma persoonii*.

En la tabla 6 se observa que todas las especies inoculadas produjeron lesión en los frutales inoculados, variando su virulencia (Tabla 5 y 6 del anexo).

En ramas de duraznero las especies de *Botryosphaeriaceae* más virulentas fueron *Diplodia mutila* y *Neofusicoccum australe*, en manzano *N. parvum* y *N. australe* y en peral *N. australe* (Tabla 6). Las especies de *Diaporthe* más virulentas en ramas de duraznero y manzano fueron *D. eres* y *D. phaseolorum* y en peral *D. eres* y *D. oxe*.

En todos los casos excepto *Leucostoma persoonii* se re-aisló el hongo inoculado (Tabla 7 del Anexo).

Tabla 6 Largo de lesión producida por inoculación cruzada de aislamientos obtenidos de síntoma sobre el xilema de ramas sanas de manzano, duraznero y peral en campo

Especie	Aislamiento	Origen	Peral	Manzano	Duraznero
			Promedio de lesión (cm) ^a		
<i>Diaporthe infecunda</i>	Fi2355	P	nd	1,10 c	1,51 b
<i>Diaporthe oxe</i>	Fi2338	P	0,82 a	0,83 c	1,50 b
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	Fi2334	P	nd	1,15 bc	1,72 ab
<i>Diaporthe</i> sp.1	Fi2342	P	nd	0,84 c	nd
<i>Diaporthe eres</i>	Fi2449	M	0,96 a	3,10 a	2,65 a
<i>Leucostoma persoonii</i>	Fi2430	D	nd	nd	1,47 a
<i>Diplodia mutila</i>	Fi2316	P	1,09 ab	0,87 ab	2,23 a
<i>Diplodia seriata</i>	Fi2346	D	nd	0,69 b	0,87 c
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	Fi2358	D	nd	0,81 b	0,98 c
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi2326	M	0,89 b	1,29 a	1,22 bc
<i>Neofusicoccum australe</i>	Fi2319	M	1,12 a	1,20 a	1,69 ab
<i>L. theobromae</i>	Fi2359	M	0,67 b	0,76 b	1,25 bc
Control (PDA)	C	C	0c	0d	0d

a: Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa.

P: peral, D: duraznero, M: manzano, C: control.

nd: no determinado.

4.6 Cebadores específicos

4.6.1 Diseño

Se diseñaron 5 pares de cebadores específicos para distintos géneros y especies de *Botryosphaeriaceae* usando el software Primer 3 (Figura 3-7 del Anexo).

Con el objetivo de identificar aislamientos pertenecientes al género *Lasiodiplodia* se diseñó el par LAS. Para identificar la especie *Diplodia mutila* se diseñó el par DMU y para identificar las especies relacionadas *Diplodia seriata* y *Diplodia pseudoseriata* se diseñó el par DSE. Además para identificar las especies del complejo *Neofusicoccum parvum/ribis* se diseñó el par NPR y para identificar las especies del complejo *Neofusicoccum australe/luteum* se diseñó el par NAL.

Las respectivas secuencias y los tamaños esperados del amplicón en pares de bases se muestran a continuación en la tabla 7.

Tabla 7 Cebadores diseñados

Primers	Género/Especie	Secuencia	Amplicón (pb)
LAS-F	Género <i>Lasiodiplodia</i>	5'AAA CGC AGA CGT CTG ATA AAC A	230
LAS-R		5'GCA GTG AGG ACG GTG CCC	
DMU-F	<i>Diplodia mutila</i>	5'TCG ACG TCT GAA AAA CAA GT	320
DMU-R		5'GAC GCC AAC CAC TCC AAA	
DSE-F	<i>D. seriata/pseudoseriata</i>	5'TCG ACG TCT GAT AAA CAA GT	230
DSE-R		5'CGC AGA GAG GAC GGC GCC	
NAL-F	<i>N. australe/luteum</i>	5'GTA AAC GTC GCA GTC TGA GA	200
NAL-R		5'GGG TTG AAA TGA CGC TCG AA	
NPR-F	<i>N. parvum/ribis</i>	5'ACT TCG CAG TCT GAA AAA CA	200
NPR-R		5'GGG TTG AAA TGA CGC TCG AA	

Las condiciones de ciclado del par de cebadores NPR resultaron ser 35 ciclos de amplificación con una temperatura de hibridización de 64°C, y las condiciones del par de cebadores DMU resultaron ser 35 ciclos de amplificación con una temperatura de hibridización de 65°C. Las temperaturas de hibridización específica de los pares de cebadores LAS, DMU y NAL no pudieron ser establecidas y por lo tanto fueron descartados.

4.6.1.1 Evaluación de la especificidad de los cebadores diseñados

En la figura 22 se muestra el resultado de la amplificación utilizando el set de cebadores NPR. Se observaron bandas de amplificación de aproximadamente 200 pb únicamente en los carriles en donde se sembraron los productos de amplificación correspondientes a la especie *Neofusicoccum parvum*, lo que sugiere que resultó ser específico para esta especie.

Los resultados de la amplificación utilizando el set de cebadores DMU se muestran en la figura 23. Aquí se observan bandas de amplificación de aproximadamente 300 pb en los carriles en donde se sembraron los productos de amplificación correspondientes a las especies *Diplodia mutila*, *Diplodia seriata*, *Diplodia pseudoseriata* y *Lasiodiplodia theobromae*.

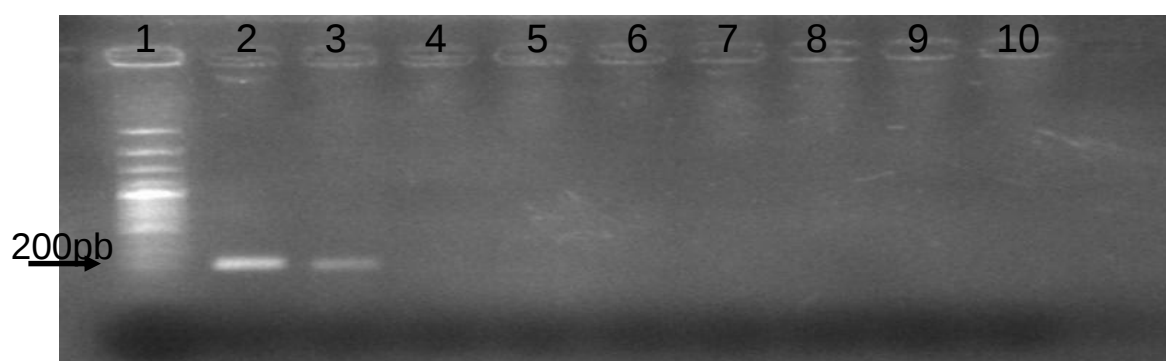


Figura 22 Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Se muestran los productos de amplificación de ADN obtenidos utilizando el cebador NPR.

Carril 1: Marcador de peso molecular, 2: *N. parvum* (endófito), 3: *N. parvum*, 4: *N. luteum*, 5: *N. australe*, 6: *L. theobromae*, 7: *D. seriata*, 8: *D. mutila*, 9: *D. pseudoseriata*, 10: *B. dothidea*.

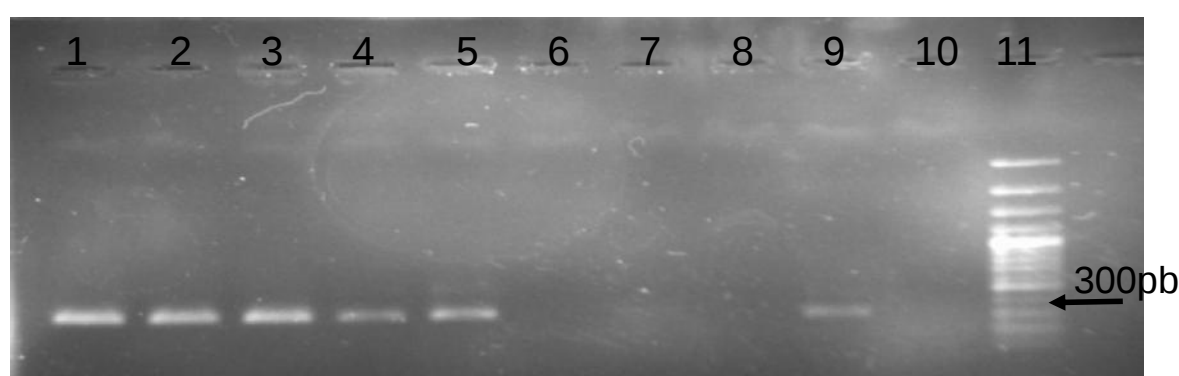


Figura 23 Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Se muestran los productos de amplificación de ADN obtenidos utilizando el cebador DMU

Carril 1: *D. mutila*, 2: *D. mutila*, 3: *D. mutila* (extraída de madera), 4: *D. seriata*, 5: *D. pseudoseriata*, 6: *N. parvum*, 7: *N. australe*, 8: *N. luteum*, 9: *L. theobromae*, 10: *B. dothidea*, 11: Marcador de peso molecular.

5. Discusión

5.1 Hongos endófitos

De los 833 aislamientos de hongos endófitos obtenidos en este estudio el 60% fue obtenido a partir de la corteza de las ramas más viejas, lo cual concuerda con lo observado por Johnston (1994) quien sugiere que la colonización de los tejidos aumenta con la edad, debido a una mayor exposición ambiental a diversas fuentes de inóculo que se traduce en una mayor invasión de los tejidos. La gran mayoría de los hongos endófitos encontrados pertenecieron al grupo Ascomycota, lo cual ha sido frecuentemente citado en estudios de comunidades endofíticas (Gazis & Chaverri, 2010). Todos los géneros de hongos endófitos encontrados en este estudio han sido previamente encontrados como endófitos en una gran variedad de especies vegetales (Photita et al. 2004; Gazis & Chaverri, 2010).

La composición de las comunidades de hongos endófitos en las cuatro especies frutales se encontró dominada por una o unas pocas especies muy abundantes y varias especies poco frecuentes. Este tipo de composición es frecuente encontrarla en las comunidades endofíticas, no sólo de madera sino de hojas y raíces de diversos cultivos (Vega et al. 2010; Huang et al. 2008). Los taxa dominantes fueron compartidos por las cuatro especies frutales (*Alternaria*, *Aureobasidium*, Botryosphaeriaceae, *Cladosporium* y *Diaporthe*), sin embargo sus abundancias relativas fueron diferentes en cada una.

El género más abundante tanto en ramas de un año como de dos años de duraznero, manzano y arándano fue *Alternaria*, mientras que en ramas de peral de un año fue *Cladosporium* y *Diaporthe* en ramas de dos años. Similares resultados fueron obtenidos por Johnston (1994) según los cuales las especies fúngicas que predominan en la comunidad endofítica de la corteza

de manzano son *A. alternata*, *A. pullulans*, *Phomopsis* sp. y *Cladosporium cladosporoides*.

Dentro de las comunidades endofíticas de las especies frutales analizadas en este estudio se encontraron numerosos taxa interesantes no sólo por su capacidad fitopatogénica tanto en fruto como en madera, sino por sus propiedades como agentes controladores de enfermedades.

Especies de *Lecanicillium*, como la obtenida en este trabajo con una abundancia relativa de 11% en cultivo de durazno es conocida como hongo endófito entomopatógeno de diversas especies de insectos plaga (Inglis et al. 2001), el género *Cladosporium* obtenido de las cuatro especies frutales comprende la especie *C. cladosporoides* que ha sido identificada como un hongo endófito entomopatógeno de mosca blanca y pulgones en Egipto (Abdel-Baky, 2000) y *Gliocladium roseum* obtenido en este estudio de arándano pertenece al reconocido género que comprende hongos biocontroladores con capacidades antagónicas frente a patógenos causantes de importantes pérdidas económicas (Sutton et al. 1997). Por otra parte *Alternaria alternata* es conocida como un patógeno oportunista de muchos cultivos frutales y vegetales tanto en campo como en almacenamiento en post-cosecha y como epífita en la superficie de hojas o saprótrofo del suelo (Guo et al. 2004). Además especies del género *Colletotrichum* se asocian a la podredumbre amarga del manzano (Alaniz et al. 2015; Velho et al. 2015) y a la antracnosis en fruto de papaya, mango, citrus, almendra y tomate entre otros (Freeman et al. 1998).

Aislamientos endófitos de *Diaporthe*, Botryosphaeriaceae, *Cytospora* y *Pestalotiopsis* fueron seleccionados para evaluar su capacidad fitopatogénica bajo condiciones de laboratorio debido no sólo a que diversos estudios señalan a especies de estos géneros y familias como patógenos latentes (Pérez et al. 2010; Gomes et al. 2013; Maharachchikumbura et al. 2011) sino que diversas especies pertenecientes a estos cuatro taxa fueron encontradas asociados a diversos síntomas en los relevamientos realizados sobre las mismas especies frutales a nivel nacional, lo

cual podría sugerir que se trata de patógenos latentes.

Las especies de *Diaporthe*, *D. brasiliensis*, *D. terebinthifolii* y *D. inconspicua* obtenidas como endófitas exclusivamente de peral y *D. foeniculacea* obtenida como endófito de peral y manzano no resultaron ser patógenas en los ensayos bajo condiciones de laboratorio, lo que sugiere que podrían considerarse como endófitas estrictas. Estas especies han sido recientemente descritas como endófitas de plantas medicinales de Brasil (Gomes et al. 2013), por lo cual aspectos relacionados a su patogenicidad, rango de hospederos y etiología aún no son conocidos. Por otra parte *D. serafinae* obtenida exclusivamente de manzano, *D. infecunda* obtenida de manzano y peral y *D. oxe* obtenida como endófito de peral y arándano fueron capaces de producir síntoma por lo cual podríamos considerar a estas especies como patógenas latentes. *Diaporthe terebinthifolii*, *D. foeniculacea*, *D. infecunda* y *D. oxe* estuvieron presentes en mantillo fresco de *Eugenia uruguayensis* como sapótrofos (García-Laviña et al. 2016).

Algunos aislamientos que no pudieron ser identificados a nivel de especie como *Diaporthe* sp.1 obtenida de peral, *Diaporthe* sp. 2 obtenida de peral y de arándano y *Diaporthe* sp. 3 obtenida únicamente de arándano podrían pertenecer a especies nuevas o especies aún no descritas. Entre 2012 y 2015 se han descrito 3 nuevas especies de *Diaporthe* en Tailandia (Udayanga et al. 2012), 8 nuevas especies en Australia (Thompson et al. 2015), 15 nuevas especies en Brasil (Gomes et al. 2013) y 7 nuevas especies en China (Huang et al. 2015) por lo cual sería deseable confirmar la posibilidad de que los aislamientos locales pertenezcan a nuevas especies aún no descritas.

Diaporthe sp.1 no resultó ser patógena en los ensayos bajo condiciones de laboratorio, por lo cual podría considerarse como endófito estricto, mientras que *Diaporthe* sp. 2 y *Diaporthe* sp. 3 fueron capaces de producir síntoma por lo cual podríamos considerarlas como patógenas

latentes.

De la familia Botryosphaeriaceae las especies obtenidas de tejidos asintomáticos en este estudio fueron *Botryosphaeria dothidea* a partir de peral, duraznero y arándano, *Neofusicoccum australe* en manzano y *N. parvum* en peral y arándano. En las pruebas de patogenicidad en condiciones de laboratorio realizadas con los aislamientos endófitos de estas especies no sólo se observó su patogenicidad, sino también su alta virulencia, pudiendo considerar a estas especies como patógenas latentes.

Los aislamientos de *Cytospora* identificados como “*Cytospora-like*” obtenidos de peral y arándano evaluados en condiciones de laboratorio mostraron diferencias en cuanto a su capacidad patogénica según el hospedero; el aislamiento obtenido de arándano resultó ser patógeno mientras que el que se obtuvo de peral no lo fue. Los aislamientos de *Pestalotiopsis* sp. obtenidos de duraznero y arándano mostraron diferencias en cuanto a su patogenicidad en los diferentes hospederos, resultando patógeno sólo el aislamiento proveniente de durazno.

5.2 Hongos fitopatógenos

Los 403 aislamientos obtenidos en este estudio asociados a síntoma se agruparon en 10 taxa; Botryosphaeriaceae, *Diaporthe*, *Paraconiothyrium*, *Cytospora*, *Leucostoma*, *Phaeoacremonium*, *Collophora*, *Cylindrocarpon*, *Pestalotiopsis*, *Eutypa* y *Pleurostomophora*. Varios de los géneros encontrados asociados a síntoma fueron encontrados con muy poca frecuencia, a la vez que muchos de los síntomas observados fueron encontrados en pocas ocasiones, por lo que no siempre se logró establecer una directa asociación entre una especie/es fúngicas y el síntoma observado.

La gran mayoría de los aislamientos obtenidos a partir de madera con síntomas pertenecieron a la familia Botryosphaeriaceae y al género *Diaporthe*, al igual que los aislamientos obtenidos como endófitos.

El análisis filogenético de las secuencias de ADN obtenidas permitió identificar 8 especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae; *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *D. pseudoseriata*, *D. mutila*, *Neofusicoccum australe*, *N. parvum*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Pseudofusicoccum* spp..

Si bien las ocho especies se encontraron asociadas a material vegetal con síntoma, solamente *B. dothidea*, *N. parvum* y *N. australe* habían sido también aisladas a partir de material vegetal sano, y su status como patógenos latentes había ya sido confirmado.

Además *D. pseudoseriata* y *Pseudofusicoccum* sp. en duraznero y *D. mutila* en peral representan nuevos reportes para nuestro país.

Botryosphaeria dothidea, *D. seriata* y *N. parvum* fueron las tres especies de Botryosphaeriaceae más frecuentemente aisladas a partir de síntomas. Estas especies son conocidas fitopatógenas

de árboles frutales de carozo y pepita a nivel mundial (Slippers et al. 2007; Damm et al. 2007; Cloete et al. 2011) y son reportadas en estudios sobre incidencia de Botryosphaeriaceae (Mehl et al. 2012). Su asociación con plantas de arándano ha sido reportada en Chile causando muerte regresiva y canchales en ramas (Espinoza et al. 2009). Estas especies en su conjunto se encontraron en los cuatro frutales, lo que sugiere su capacidad de invadir distintos hospederos y producir de los síntomas observados. Sin embargo en los ensayos de patogenicidad realizados en laboratorio y en campo solamente el aislamiento de *N. parvum* produjo necrosis en los tres hospederos, mientras que *D. seriata* produjo síntoma en manzano y duraznero.

Resulta interesante resaltar que en el ensayo de patogenicidad en condiciones de laboratorio el aislamiento de *B. dothidea* obtenido de síntoma no resultó patogénico en manzano y peral mientras que los tres aislamientos de la misma especie obtenidos como endófitos sí resultaron patogénicos en sus respectivos hospederos. Esta diferencia en la virulencia dentro de aislamientos de *B. dothidea* ha sido anteriormente observada en Uruguay (Pérez et al. 2010; Abreo, 2011).

Fue posible diseñar un par de cebadores específicos para identificar las especies del complejo *N. parvum/ribis* lo cual permitirá su detección a partir de material vegetal tanto sintomático como asintomático. Así, la identificación de una de las especies más frecuentes y virulentas en forma temprana a partir de material vegetal asintomático permitirá su diagnóstico temprano y podrá ser incluida como herramienta en los esquemas de multiplicación vegetativa de estos frutales. El cebador multi especies de *Botryosphaeria* diseñado por Ridgeway (2011) resultó ser útil para amplificar el ADN de los aislamientos locales de *B. dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *N. ribis*, *N. luteum*, *Diplodia mutila*, *D. seriata* y *Lasiodiplodia theobromae*, sin embargo no fue capaz de detectar a *Pseudofusicoccum* sp..

Las otras especies de Botryosphaeriaceae fueron encontradas en raras ocasiones y en general asociadas a un único hospedero y a un síntoma específico.

Neofusicoccum australe se encontró asociada a canchros papiráceos en ramas de manzano cv. Red Chief en una única plantación y además esta especie se obtuvo como endófito de manzano del mismo cultivar. Los estudios de patogenicidad utilizando el aislamiento obtenido de síntoma reveló su alta virulencia sobre las tres especies de frutales inoculadas, resultados que concuerdan con lo propuesto por Cloete et al. (2011) quienes evaluaron su virulencia sobre vid, manzano y peral. Además en el estudio de patogenicidad sobre manzano utilizando el aislamiento endófito de *N. australe* también demostró no sólo su capacidad patogénica sino su alta virulencia. Esta especie es conocida por ser muy virulenta sobre vid (Linaldeddu et al. 2010; Cloete et al. 2011) y además ha sido reportada asociada con enfermedades en manzano, peral, ciruelo, almendro y vid a nivel mundial (van Niekerk et al. 2004 y 2006; Damm et al. 2007; Slippers et al. 2007; Cloete et al. 2011). En viñedos en nuestro país fue aislada a partir de sarmientos asintomáticos (Abreo et al. 2013) y su asociación con canchros en ramas de manzano ha sido recientemente reportada en bajas frecuencias (Delgado, 2013).

Lasiodiplodia theobromae también fue obtenida de una única plantación de manzano cv. Cripps Pink ubicada en la región norte de nuestro país. En estudios previos realizados en Uruguay esta especie fue encontrada en baja frecuencia asociada a canchros en ramas de manzano (Delgado, 2013) y a síntomas de muerte regresiva en *Vitis vinifera* (Abreo et al. 2013). *Lasiodiplodia theobromae* es uno de los hongos patógenos más importantes de vid, asociado a canchros, muerte regresiva y brazo muerto en *Vitis vinifera* en México y California (Úrbez-Torres et al. 2008 y 2009), Perú (Rodríguez-Gálvez et al. 2014) y otras regiones cálidas de América. En este estudio *L. theobromae*, aislada de manzano, resultó ser patógena sobre manzano, duraznero y peral. Las bajas frecuencias de aislamiento de *L. theobromae* en Uruguay y otras regiones

templadas pueden deberse a las bajas temperaturas registradas fuera del rango de temperatura óptima de crecimiento de esta especie (Úrbez-Torres et al. 2010).

Diplodia mutila fue obtenida a partir de manzano y peral y aunque ha sido previamente reportada asociada a manzano (Delgado, 2013), es la primera vez que esta especie se encuentra asociada a peral. Esta especie ha sido reportada asociada a madera necrótica de ciruelos (*Prunus salicina*) en Sudáfrica (Damm et al. 2007) y de duraznero y damasco en Nueva Zelanda (Laundon, 1973). Damm et al. (2007) reportó la patogenicidad de *D. mutila* sobre varas de mandarino y ciruelo. Los estudios de patogenicidad en campo realizados en este trabajo revelaron que *D. mutila* aislada de peral resultó ser patógena sobre los tres hospederos y además fue la especie más virulenta sobre *Prunus persica*.

Diplodia pseudoseriata se encuentra ampliamente distribuida en bosques nativos de Mirtáceas en nuestro país (Pérez et al. 2010) y ha sido recientemente reportada asociada a canchros en ramas de manzano (Delgado, 2013). En este estudio *D. pseudoseriata* fue obtenida únicamente a partir de varas de duraznero con necrosis en el xilema, lo cual representa un primer reporte para este hospedero. Las pruebas de patogenicidad mostraron que esta especie no solo resultó patógena sobre duraznero sino también sobre manzano, aunque su virulencia fue menor en este caso.

Resulta interesante destacar que diversas especies del género *Botryosphaeria* han sido encontradas en nuestro país asociadas a enfermedades en árboles taxonómicamente distantes entre sí y distantes a los frutales analizados en este estudio (Pérez et al. 2010; Abreo et al, 2013). *Botryosphaeria dothidea* y especies del complejo *N. parvum/N. ribis* han sido reportadas en nuestro país asociadas tanto a *Eucalyptus* introducidos como a Mirtáceas nativas, vid y frutales y *Diplodia pseudoseriata* y *Spencermartinsia uruguayensis* en Mirtáceas (Pérez et al.

2010). Además *B. dothidea*, *D. seriata* y *N. australe* han sido asociadas a plantaciones de *Vitis vinifera* con síntomas de muerte regresiva y esca (Abreo et al. 2013).

El segundo grupo de hongos obtenido a partir de síntoma con altas frecuencias de aislamiento fue *Diaporthe*. En este estudio se identificaron 7 especies; *D. oxe*, *D. phaseolorum*, *D. foeniculacea*, *D. terebinthifolii*, *D. eres*, *D. infecunda* y *D. amygdali*. El aislamiento *Diaporthe* sp. 4 no pudo ser identificado a nivel de especie y posiblemente podría tratarse de una nueva especie.

En este estudio *D. amygdali* fue encontrada únicamente asociada al síntoma conocido como viruela de la púa en varas de duraznero, que se caracteriza por la presencia de canchales con gomosis. Esta especie es un conocido fitopatógeno asociado a canchales y quemado en varas de almendros (*Prunus dulcis*) y duraznero (*P. persica*) a nivel mundial (Diogo et al. 2010) y en nuestro país esta especie ha sido reportada asociada a viruela de la púa en durazneros y nectarinos (Alvares et al. 2014).

Diaporthe eres fue encontrada asociada a canchales hundidos rojizos en manzano lo cual ha sido previamente reportado por Abreo et al. (2012), además en este trabajo se encontró asociada a canchales en ramas de peral, lo cual representa un nuevo registro para nuestro país. En los estudios de patogenicidad en campo *D. eres* resultó ser la especie de *Diaporthe* más virulenta sobre los tres hospederos. Debido a la confirmación de la alta virulencia de esta especie, hasta hace poco desconocida, será necesario implementar medidas específicas para su control.

Diaporthe oxe, *D. infecunda* y *D. terebinthifolii* fueron obtenidas como endófitas y a partir de síntomas. Aislamientos de *D. oxe* y *D. infecunda* se comportaron de forma similar en los ensayos de patogenicidad. Los aislamientos obtenidos de síntoma demostraron ser patógenos sobre las tres especies frutales inoculadas revelando su capacidad de infectar hospederos alternativos; mientras que la inoculación de los aislamientos endófitos confirmaron su estatus como

“patógenos latentes”. Este comportamiento ha sido observado previamente dentro de este género, en donde la misma especie ha sido encontrada compartiendo modos de vida endofítico, patogénico y saprofítico en un mismo o en diferentes hospederos (Udayanga et al. 2011). Por otra parte *D. terebinthifolii* obtenida como endófita no demostró patogenicidad en los ensayos en condiciones de laboratorio en ninguna de las especies frutales, lo cual confirmaría su actividad como endófito verdadero.

Diaporthe phaseolorum se encontró como endófita de peral y también se encontró asociada a síntoma en ramas de peral. En los ensayos de patogenicidad el aislamiento inoculado resultó ser patógeno sobre las tres especies frutales inoculadas. Esta especie ha sido reportada como endófita de la planta medicinal *Maytenus ilicifolia* (Gomes et al. 2013) y también es una conocida especie fitopatógena de cultivo de soja (Santos et al. 2011). *Diaporthe foeniculacea* se encontró como endófita de peral y manzano y asociada a síntoma únicamente de manzano. Esta especie ha sido encontrada en Nueva Zelanda, España y Estados Unidos asociada a la pudrición del tallo en árboles frutales y ornamentales como *Ulmus*, *Malus*, *Pyrus* y *Citrus* (Udayanga et al. 2014; Huang et al. 2015). Los ensayos de patogenicidad con los aislamientos endófitos inoculados sobre peral y manzano no mostraron ser patógenos, por lo tanto se presume que los aislamientos inoculados son endófitos verdaderos.

Los géneros menos frecuentemente aislados de síntoma fueron *Cytospora*, *Paraconiothyrium*, *Phaeoacremonium*, *Pleurostomophora*, *Cylindrocarpon*, *Eutypa*, *Collophora* y *Pestalotiopsis*.

Cytospora eucalypticola fue obtenida de síntoma de duraznero. Sin embargo no resultó patógena en los ensayos de laboratorio. Esto concuerda con lo observado por Alonso et al. (2005) sobre plantines de *Eucalyptus*. Por otra parte algunos de los aislamientos endófitos identificados como “*Cytospora-like*” mostraron ser patógenos sobre arándano y no sobre peral. Si bien estos

aislamientos no pudieron ser identificados a nivel de especie, formaron un clado con secuencias de aislamientos endófitos de plantas nativas de Brasil reportadas como “*Cytospora-like*” por Abreu et al. (2012). *Leucostoma persoonii* fue aislada de síntoma en duraznero y resultó ser patógena con una alta virulencia tanto en condiciones de laboratorio como en campo. Esta especie es conocida por ser el agente causal del “cancro perenne” que afecta a las especies de *Prunus* como el duraznero, ciruelo y cerezo y a *Malus domestica* (Adams et al. 2002).

Paraconiothyrium brasiliense obtenida como fitopatógena a partir de manzano representa la única especie aislada de este género. Esta especie ha sido observada en peral y ha sido considerada como potencialmente patogénica en manzano (Cloete et al. 2011; Damm et al. 2008b). En este trabajo no se observó su patogenicidad en ninguno de los tres frutales inoculados bajo condiciones de laboratorio. *Collophora rubra* ha sido aislada de árboles de *Prunus* con necrosis, en especial nectarino y duraznero (Damm et al. 2010). En este estudio, fue aislada de duraznero y resultó ser patogénica sobre peral y duraznero, pero mostró baja virulencia.

Phaeoacremonium aleophilum y *Ph. mertoniae* se encontraron asociadas a la zona necrótica alrededor de la podredumbre interna en troncos de manzano. Estas especies han sido reportadas asociadas a necrosis del xilema en troncos de árboles de manzano y peral aunque resultaron ser patogénicos únicamente sobre manzano (Cloete et al. 2011). A su vez *P. aleophilum* es un reconocido patógeno de vid que causa esca y enfermedad de Petri en varias regiones del mundo. Y en nuestro país se asoció a la enfermedad de Petri y esca de la vid en varios cultivares (Abreu et al 2011). Si bien en nuestro estudio en los ensayos de patogenicidad en condiciones de laboratorio no se observó lesión sobre las ramas inoculadas no es posible descartar su patogenicidad ya que esta especie es de muy lento crecimiento y problemas metodológicos pudieron haber influido en el desarrollo de los síntomas. Por otra parte esta

diferencia en la patogenicidad podría deberse a la variabilidad de virulencia que existe naturalmente entre aislamientos de una misma especie.

Pleurostomophora richardsiae es un hongo del suelo y colonizador de madera (Bettucci et al. 1983). Además en la actualidad ha cobrado importancia agronómica debido a su asociación a la enfermedad de esca y enfermedad de Petri en California y Sudáfrica (Rolshausen et al. 2010; White et al. 2011). Esta especie ha sido reportada recientemente en Italia asociada a madera necrótica de vid (Carlucci et al. 2015) y ha sido asociada como el agente causal de canchros en olivos en Italia (Carlucci et al. 2013). En este estudio fue aislada de podredumbre interna en troncos de manzano, sin embargo debido a su tardía identificación, ningún aislamiento de esta especie fue seleccionado para estudios de patogenicidad, por lo cual no es posible concluir al respecto.

Eutypa leptoplaca fue obtenida de manzano. Si bien *Eutypa lata* es un importante patógeno de vid tanto a nivel mundial como a nivel nacional (Van Niekerk et al. 2011; Abreo, 2011) y ha sido recientemente reportada en *Pyrus* y *Malus* en Sudáfrica (Cloete et al. 2011) *E. leptoplaca* no presenta reporte en estas especies.

Collophora rubra se encuentra incluida dentro del conjunto de especies de *Collophora* que frecuentemente causan necrosis en la madera de durazneros y nectarinos (Damm et al. 2010), por lo cual no es sorprendente que en este estudio haya sido obtenido de duraznero. En los estudios de patogenicidad en laboratorio el aislamiento de *C. rubra* resultó patógeno sobre duraznero y manzano, con una baja virulencia.

Éste es el primer estudio en el cual se analizaron los hongos endófitos y patógenos de la madera de árboles frutales de hoja caduca, se determinaron las especies fúngicas asociadas a los diferentes síntomas y se pudo establecer la existencia de algunos endófitos verdaderos de

frutales específicos que no representarían riesgos para el estado sanitario de los mismos. También se pudo comprobar que varios de los principales patógenos que causan síntomas en la madera de los frutales pueden estar presentes como patógenos latentes en ramas a partir de los dos años formadas. Se diseñaron cebadores específicos para *N. parvum*, una de las especies más frecuentes y virulentas, para su detección durante la fase de latencia en tejidos asintomáticos.

6. Conclusiones

Estos frutales son hospederos que albergan una amplia diversidad de hongos endófitos. Los taxa dominantes fueron compartidos por las cuatro especies frutales (*Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeriaceae*, *Cladosporium* y *Diaporthe*), sin embargo sus abundancias relativas fueron diferentes en cada una. Dentro de las comunidades endofíticas de las especies frutales analizadas en este estudio se encontraron numerosos taxa con capacidad fitopatógena.

Aislamientos endófitos pertenecientes a *Diaporthe*, *Botryosphaeriaceae*, *Pestalotiopsis* y *Cytospora* (*D. infecunda*, *D. oxe*, *D. serafinae*, *D. terebinthifolii*, *Diaporthe* sp.2 y *Diaporthe* sp. 3, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* y *N. australe*, *Pestalotiopsis* sp. y *Cytospora* sp) resultaron ser patógenos, por lo tanto podría suceder que los síntomas de enfermedad observados en el campo no sólo tengan su origen en una infección externa, sino que podrían originarse por cambios en el modo de vida de los hongos endófitos los cuales bajo ciertas condiciones podían realizar el cambio de endófito a patógeno y podrían ser consideradas patógenos latentes.

Por otra parte, algunas especies como *Diaporthe brasiliensis*, *D. foeniculacea* y *D. inconspicua* podrían ser consideradas endófitos verdaderos, y su función no es aún conocida.

La gran mayoría de los aislamientos obtenidos a partir de madera con síntomas pertenecieron a la familia *Botryosphaeriaceae*. *Botryosphaeria dothidea*, *D. seriata* y *N. parvum* fueron las tres especies de *Botryosphaeriaceae* más frecuentemente aisladas a partir de síntomas, mientras que *D. pseudoseriata* y *Pseudofusicoccum* sp. en duraznero y *D. mutila*, *Diaporthe eres* y *D. phaseolorum* en peral representan nuevos reportes para estos hospederos.

Resulta interesante destacar que todos los aislamientos de *Botryosphaeriaceae* y todos los aislamientos de *Diaporthe* evaluados en campo fueron capaces de producir síntomas no sólo

sobre el hospedero del cual fueron originalmente aislados sino que también sobre al menos un hospedero alternativo. Eso sugiere que en el caso de que ocurra un salto de hospederos estos aislamientos podrían causar enfermedad en hospederos alternativos.

Fue posible diseñar un par de cebadores específico para identificar las especies del complejo *N. parvum/ribis* lo cual permitirá su detección a partir de material vegetal tanto sintomático como asintomático.

La información generada en este trabajo es importante para la implementación de buenas prácticas de manejo en los cultivos frutícolas.

7. Bibliografía

- Abe, K., Kotoda, N., Kato, H., & Soejima, J. **2007**. Resistance sources to Valsa canker (*Valsa ceratosperma*) in a germplasm collection of diverse *Malus* species. *Plant Breed*, 126: 449-453.
- Abdel-Baky N. F. **2000**. *Cladosporium* spp. An entomopathogenic fungus for controlling whiteflies and Aphids in Egypt. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 3: 1662-1667.
- Abreo, E., Martínez, S., Bettuci, L., & Lupo, S. **2011**. *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. in grapevines from Uruguay. *Phytopathologia Mediterranea*, 50: S77-S85.
- Abreo, E., Martínez, S., Sessa, L., Bettucci, L., & Lupo, S. **2012**. *Phomopsis cotoneastri* as a Pathogen Associated with Trunk Cankers and Death of Young Apple Trees cv. Cripps Pink. *Journal of Phytopathology*, 160: 434-435.
- Abreo, E., Martinez, S., Bettucci, L., & Lupo, S. **2013**. Characterization of Botryosphaeriaceae species associated with grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology*, 42, 241-249.
- Abreu, L. M., Costa, S. S., Pfenning, L. H., Takahashi, A., Larsen T. O., & Andersen, B. **2012**. Chemical and molecular characterization of *Phomopsis* and *Cytospora*-like endophytes from different host plants in Brazil. *Fungal Biology*, 116: 249-260.
- Adams, G. C., Surve-Iyer, R. S., & Iezzoni, A. F. **2002**. Ribosomal DNA sequence divergence and group I introns within the *Leucostoma* species *L. cinctum*, *L. persoonii*, and *L. parapersoonii* sp. nov., ascomycetes that cause Cytospora canker of fruit trees. *Mycologia*, 94: 947-967.
- ADAU. **2013**. URUGUAY XXI Instituto de Promoción de Inversiones y Exportaciones.web: <http://www.adau.com.uy/innovaportal/file/10264/1/frutas-frescas-en-uruguay.pdf>
- Alaniz, S., Hernandez, L., & Mondino, P. **2015**. *Colletotrichum fruticola* is the dominant and one of the most aggressive species causing bitter rot of apple in Uruguay. *Tropical Plant Pathology*, 4: 265-274.
- Alonso, R., Lupo, S., & Bettucci, L. **2005**. Pathogenicity evaluation of *Cytospora eucalypticola* isolated from *Eucalyptus* spp. cankers in Uruguay. *Fitopatologia Brasileira*, 30: 289-291.
- Alvares, M. I., Perdomo, E., Martinez, E. S., Mondino, P., & Alaniz, S. **2014**. *Phomopsis amygdali* principal agente causal de la viruela de la púa de durazneros y nectarinos en Uruguay. XIII Congreso Nacional de Hortifruticultura, p70.
- Alves, A., Correia, A., Luque, J., & Phillips, A. J. L. **2004**. *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. o *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorphs, *Diplodia mutila*. *Mycologia*, 96: 598-613.

- Alves, A., Barradas, C., Phillips, A. J. L., & Correia, A. **2013**. Diversity of *Botryosphaeriaceae* species associated with conifers in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, 135: 791-804.
- Ames, G. K., Gergerich, R. C., Weidemann, G. J., & Patterson, C. A. **1988**. First report of *Diaporthe vaccinii* on blueberry in Arkansas. *Plant Disease*, 72: 362.
- Arnold, A. E., Maynard, Z., Gilbert, G. S., Coley, P. D., & Kursar, T. A. **2000**. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, 3: 267-274.
- Bergante, A. **2014**. Anuario estadístico agropecuario 2014. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, pp 99-101. Web: <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2014/Diea-Anuario%202014-Digital01.pdf>
- Botella, L., & Diez, J. J. **2011**. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Diversity*, 47: 9-18.
- Bussaban, B., Lumyong, L., Lumyong, P., McKenzie, E. H. C., & Hyde, K. D. **2001**. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 943-948.
- Cabrera, D. & Rodríguez, P. **2014**. Manual del duraznero: La planta y la cosecha. Boletín de Divulgación N°108. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, pp 61-64.
- Campi, P. **2014**. Análisis de la evolución de la estructura varietal de plantas de manzano y peral. Serie Actividades de Difusión N°739. Instituto Nacional de investigación Agropecuaria, p 8. Web: <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/SAD%20739.pdf>
- Carbone, I., & Khon, L. M. **1999**. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553-556.
- Carlucci, A., Cibelli, A., Lops, F., Phillips, A. J. L., Ciccarone, C., & Raimondo, M. L. **2015**. *Pleurostomophora richardsiae* associated with trunk diseases of grapevines in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 54: 109-123.
- Carris, L. M., Little, C. R., & Stiles, C. M. **2012**. Introduction to Fungi. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2012-0426-0.
- Carroll, G. **1988**. Fungal endophytes in stems and leaves – from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69: 2-9.
- Cloete, M., Fourie, P. H., Damm, U., Crous, & P. W., 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: S176-S190.
- Crous, P. W., Phillips, A. J. L.; & Baxter, A. P. **2000**. Phytopathogenic fungi from South Africa. Department of Plant Pathology Press, University of Stellenbosch Printers, Stellenbosch, South Africa.

- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., & Marasas, W. F. O. **2006**. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology*, 55: 235-253.
- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Wingfield, M. J., & Phillips, A. J. L. **2007**. *Neofusicoccum mediterraneum*. *Fungal Planet* 19. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands.
- Damm, U., Fourie, P. H., & Crous, P. W. **2007**. *Aplosporella prunicola*, a novel species of anamorphic *Botryosphaeriaceae*. *Fungal Diversity*, 27: 35-43.
- Damm, U., Crous, P. W., & Fourie, P. H., **2007**. *Botryosphaeriaceae* as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia Africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia*, 99: 664-680.
- Damm, U., Mostert, L., Crous, P. W., & Fourie, P. H. **2008a**. Novel *Phaeoacremonium* species associated with necrotic wood of *Prunus* trees. *Persoonia*, 20: 87-102.
- Damm, U., Verkley, G. J. M., Crous, P. W., Fourie, P. H., Haegi, A., & Riccioni, L. **2008b**. Novel *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts. *Persoonia*, 20: 9-17.
- Damm, U., Fourie, P. H., & Crous, P. W. **2010**. *Coniochaeta (Lecythophora)*, *Collophora* gen. nov. and *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of *Prunus* trees. *Persoonia*, 24: 60-80.
- Delaye, L., García-Guzmán, G., & Heil, M. **2013**. Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens – are fungal lifestyles evolutionarily stable traits?. *Fungal diversity*, 60: 125-135.
- Delgado, L. M. **2013**. Caracterización de especies de *Botryosphaeriaceae* asociadas al cultivo de manzano en Uruguay. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA, UdelaR.
- de Wet, J., Slippers, B., Preisig, O., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. 2008. Phylogeny of the *Botryosphaeriaceae* reveals patterns of host association. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 46: 116-126.
- DIEA. **2001**. Importaciones y exportaciones de productos hortifrutícolas Enero-Diciembre 2000. Boletín N° 6.
- DIEA. **2003**. La fruta de hoja caduca en Uruguay. Web:
<http://www.mgap.gub.uy/portal/agxppdwn.aspx?7,5,112,O,S,0,1020%3BS%3B2%3B120,>
- Diogo, E. L. F., Santos, J. M., & Phillips, A. J. L. **2010**. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. *Fungal Diversity*, 44:107-115.
- Dugan F. M., & Roberts G. **1994**. Etiology of preharvest colonization of Bing cherry fruit by fungi. *Phytopathology*, 84: 1031-1036.
- Espinoza, J. G., Briceño, E. X., Keith, L. M., & Latorre, B. A. **2008**. Canker and twig dieback of

- blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. *Plant Disease*, 92:1407- 1414.
- Espinoza, J. G., Briceño, E. X., Chávez, E. R., Urbez-Torres, J. R., & Latorre, B. A. **2009**. *Neofusicoccum* spp. associated with stem canker and dieback of blueberry in Chile. *Plant Disease* 93: 1187-1194.
- Farr, D. F., Castlebury, L. A., & Pardo-Schultheiss, R. A. **1999**. *Phomopsis amygdali* causes peach shoot blight of cultivated peach trees in the southeastern United States. *Mycologia*, 9: 1008-1015.
- Farr, D. F., Castlebury, L. A., & Rossman, A. Y. **2002**. Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* blueberry and cranberry in the eastern United States. *Mycologia*, 94: 494-504.
- Freeman, S.; & Rodriguez. R. J. **1993**. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science*, 260: 75–78.
- Freeman, S., Katan, T., & Shabi, E. **1998**. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, 82: 516-521.
- Fujita, K., Sugiki, T., & Matsunaka, K. **1988**. Apple blight caused by *Diaporthe tanakae* in Aomori prefecture. Bulletin of the Aomori Crops Hortic Experimental Station, 6: 17-35.
- García-Guzmán G., & Morales, E. **2007**. Life-history strategies of plant pathogens: distribution patterns and phylogenetic analysis. *Ecology*, 88: 589-596.
- García-Guzmán, G., & Heil, M. **2013**. Life histories of hosts and pathogens predict patterns in tropical fungal plant diseases. *New Phytologist*, 201: 1077-1059.
- García-Laviña, C. X., Bettucci, L., & Tiscornia, S. **2016**. Fungal communities associated with *Eugenia Uruguayensis* (Myrtaceae) leaf litter in early stages of decomposition in Uruguay. *Sydowia*, 68: 2016-2039.
- Garcia-Reyne, A., & López-Medrano, F. **2011**. Cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: first report of human infection by this fungus. *Transplant Infectious Disease*, 13: 204-207.
- Gazis, R., & Chaverri, P. **2010**. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Tambopata, Peru. *Fungal Ecology*, 3: 240-254.
- Glass, N. L., & 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.
- Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenwald, J. Z., & Crous, P. W. **2013**. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, 31: 1-41.

- González, V., & Tello, M. L. **2011**. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*, 47: 29-42.
- González, P., Alaniz, S., Montelongo, M. J., Rauduvínich, L., Rebellato, J., Silvera-Pérez, & E., Mondino, P. **2012**. First Report of *Pestalotiopsis clavispora* Causing Dieback on Blueberry in Uruguay. *The American Phytopathological Society*, 96: 914.
- Guerrero, J., & Pérez, S. **2011**. Hongos fitopatógenos de la madera en arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en el sur de Chile. Resumen, Libro de Resúmenes XX Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología.
- Guo, L. D., Xu, L., Zheng, W. H., & Hyde, K. D. **2004**. Genetic variation of *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Pinus tabulaeformis* as determined by random amplified microsatellites (RAMS). *Fungal Diversity*, 13:53-65.
- Hammer, W., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. **2001**. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, 4, p 9.
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A. R., Knogge, W., & Deising, H. B. **2011**. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology*, 168: 51-62.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Hyde, K. D., Corke, H., & Sun, M. **2008**. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity*, 33: 61-75.
- Huang, F., Udayanga, D., Wang, X., Hou, X., Mei, X., Fu, Y., Hyde, K. D., & Li, H. **2015**. Endophytic *Diaporthe* associated with *Citrus*: A phylogenetic reassessment with seven new species from China. *Fungal Biology*, 119: 331-347.
- Hyde, K. D., Bussaban, B., Paulus, B., Crous, P. W., Lee, S. McKenzie, E. H. C., Photita, W., & Lumyong, S. **2007**. Biodiversity of saprobic fungi. *Biodiversity and Conservation*, 16: 17-35.
- Hyde, K. D., & Soyong, K. **2008**. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33: 163-173.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M. & Strasser, H. **2001**. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests, pp. 23-69, in T.M. Butt, C. Jackson & N. Magan (eds), *Fungi as Potential Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing, United Kingdom.
- Johnson, G. I., Mead, A. J., Cooke, A. W., & Dean, J. R. **1992**. Mango stem end rot pathogens – Fruit infection by endophytic colonisation of the inflorescence and pedicel. *Annals of Applied Biology*, 120: 225-234.
- Johnston, P. R. **1994**. Endophytes of apple and kiwifruit. Proc. 47th N. Z. Plant Protection Conference, 353-355.

- Kanematsu, S. **2002**. Variation in Japanese isolates of *Phomopsis* from fruit trees and their phylogenetic and taxonomic studies. *Journal of General Plant Pathology*, 68:263.
- Ko, Y., Sun, S. K. **1992**. Peach gummosis disease caused by *Botryosphaeria dothidea* in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin*, 1: 70-78.
- Koch, L., Boasso, C., Riccio, O., & Gandolfo, C. **1981**. Enfermedades de las plantas, hongos superiores y saprofitas en el Uruguay. Departamento de Comunicaciones. Dirección de Sanidad Vegetal. M. A. P. Uruguay.
- Kodsueb, R., McKenzie, E. H. C., Lumyong, S., & Hyde, K. D. **2008a**. Diversity of saprobic fungi on Magnoliaceae. *Fungal Diversity*, 30: 37-53.
- Kodsueb, R., McKenzie, E. H. C., Lumyong, S., & Hyde, K. D. **2008b**. Fungal succession on woody litter of *Magnolia liliiflora* (Magnoliaceae). *Fungal Diversity*, 30: 55-72.
- Kulik, M. M. **1984**. Symptomless infection, persistence, and production of pycnidia in host and non-host plants by *Phomopsis batatae*, *Phomopsis phaseoli*, and *Phomopsis sojae*, and the taxonomic implications. *Mycologia*, 76: 274-291.
- Laundon, G. F. **1973**. *Botryosphaeria obtusa*, *B. stevensii* and *Othia spireae* in New Zeland. *Transactions of the British Mycological Society*, 61: 369-374.
- Lee, D. H., Lee, S. W., Chi, K. H., Kim, D. A., & Uhm, J. Y. **2006**. Survey on the occurrence of apple disease in Korea from 1992 to 2000. *Plant Pathology*, 22: 375-380.
- Lee, S. B., & Taylor, J. W. **1990**. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis M. A., D.H.Gelfand, J.J.Snindky, T.J. White (ed), Academic Press, San Diego, CA, USA, pp 282-287.
- Linaldeddu, B. T., Scanu, B., Schiaffino, A., & Serra S. **2010**. First report of *Neofusicoccum australe* associated with grapevine cord on dieback in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*. 49: 417-420.
- Maharachchikumbura, S. S. N., Guo, L.D., Chukeatirote, E., Bahkali, A., Hyde, K. D. **2011**. *Pestalotiopsis*-morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity*, 50: 167-187.
- Maharachchikumbura, S. S. N., Hyde, K. D., Gorenwald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W. **2014**. *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79: 121-186.
- Mehl, J. W., Slippers, B., Roux, J., & Wingfield, M. J. **2011**. Botryosphaeriaceae associated with *Pterocarpus angolensis* (kiaat) in South Africa. *Mycologia*, 103, 534-553.
- Mehrabi, M., Mohammadi Goltapeh, E., & Fotouhifar, K. B. **2011**. Studies on Cytospora canker disease of apple trees in Semirom region of Iran. *Journal of Agricultural Technology*, 7: 967-982.

- MGAP. **2011**. Anuario Estadístico Agropecuario 2011.
- MGAP. **2012**. Anuario Estadístico Agropecuario 2012.
- Mostert, L. Crous, P. W., & Petrini, O. **2000**. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia*, 52: 46-58.
- Murali, T. S., Suryanarayanan, T. S., & Geeta, R. **2006**. Endophytic *Phomopsis* species: host range and implication for diversity estimates. *Canadian Journal of Microbiology*, 52: 673-680.
- Pérez, C. A., Wingfield, M. J., Slippers, B., Altier, N. A., & Blanchette, R. A. **2010**. Endophytic and canker-associated *Botryosphaeriaceae* occurring on non-native *Eucalyptus* and native *Myrtaceae* trees in Uruguay. *Fungal diversity*, 41: 53-69.
- Petrini, O. **1991**. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: Fokkema NJ, van den Huevel J, eds. *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp 175-187.
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie E. H. C. & Hyde, K. D. **2004**. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens?. *Fungal Diversity*, 16: 131-140.
- Prell, H., H., & Day, P. **2001**. *Plant-Fungal Pathogen interaction: A classical and molecular view*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. ISBN: 354066727X
- Promptuttha, I., Lumyong, S., Vijaykrishna, D., McKenzie, E. H. C., Hyde, K. D., & Jeewon, R. **2007**. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology*, 53: 579-590.
- Promptuttha, I., Hyde, K. D., McKenzie, E. H. C., Peberdy, J. F., & Lumyong, S. **2010**. Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes?. *Fungal Diversity*, 41: 89-99.
- Pusey, P. L. **1989**. Influence of water stress on susceptibility of nonwounded peach bark to *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease*, 73: 1000-1003.
- Pusey, P. L. **1993**. Role of *Botryosphaeria* species in peach tree gummosis on the basis of differential isolation from outer and inner bark. *Plant Disease*, 77: 170-174.
- Pusey, P. I., Kitajima, H., & Wu, Y. **1995**. Fungal gummosis. In: Ogawa JM, Zehr EI, Bird GW, Ritchie DF, Uriu K, Uyemoto JK (eds). *Compendium of stone fruit diseases*. St Paul, APS Press, p 98.
- Rehner, S. A., & Uecker, F. A. **1994**. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. *Canadian Journal of Botany*, 72: 1666-1674.
- Ridgway, H. J., Amponash, N. T., Brown, D. S. Baskarathevan, J., Jones, E. E., & Jaspers, M. V. **2011**. Detection of botryosphaeriaceous species in environmental samples using a multi-

- species primer pair. *Plant Pathology*, 60: 1118-1127.
- Rodriguez, R. J., White Jr., J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. **2009**. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182: 314-330.
- Rodriguez-Galvez, E., Maldonado, E., & Alves, A. **2014**. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. *European Journal of Plant Pathology*, 141: 477-489.
- Rolshausen, P. E., Úrbez-Torres, J. R., Rooney-Latham, S., Eskalen, A., Smith, R. J., & Gubler, W. D. **2010**. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61: 113-119.
- Rossman, A. Y., Farr, D. F., & Castlebury, L. A. **2007**. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. *Mycoscience*, 48: 135-144.
- Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, & M., Sullivan, T. J. **1998**. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 319-343.
- Sakalidis, M. L. **2004**. Resolving the *Botryosphaeria ribis* -*Botryosphaeria parva* species complex; a molecular and phenotypic investigation. Honors Thesis: School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Western Australia.
- Santos, J. M., & Phillips, A. J. I. **2009**. Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. *Fungal Diversity*, 34: 111-125.
- Santos, J. M., Correia, V. G., & Phillips, A. J. L. **2010**. Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. *Fungal Biology*, 114: 225-270.
- Sanchez-Marquez, S., Bills, G. F., Herrero, N., & Zabalgoitia, I. **2012**. Nonsystemic fungal endophytes of grasses. *Fungal Ecology*, 5: 289-297.
- Schulz, B., Boyle, C. **2005**. The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109: 661-686.
- Shen, Y. M., Chao, C. H., & Liu, H. L. **2010**. First report of *Neofusicoccum parvum* associated with stem canker and dieback of asian pear trees in Taiwan. *Plant Disease*, 94: 1062.
- Slippers, B., & 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., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., & 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. *Plant pathology*, 56: 128-139.
- Slippers, B., Boissin, E., Phillips, A. J. L., Groenwald, J. Z., Lombard, L., Wingfield, M. J., Postma, A., & Crous, P. W. **2013**. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriales*: a systematic and

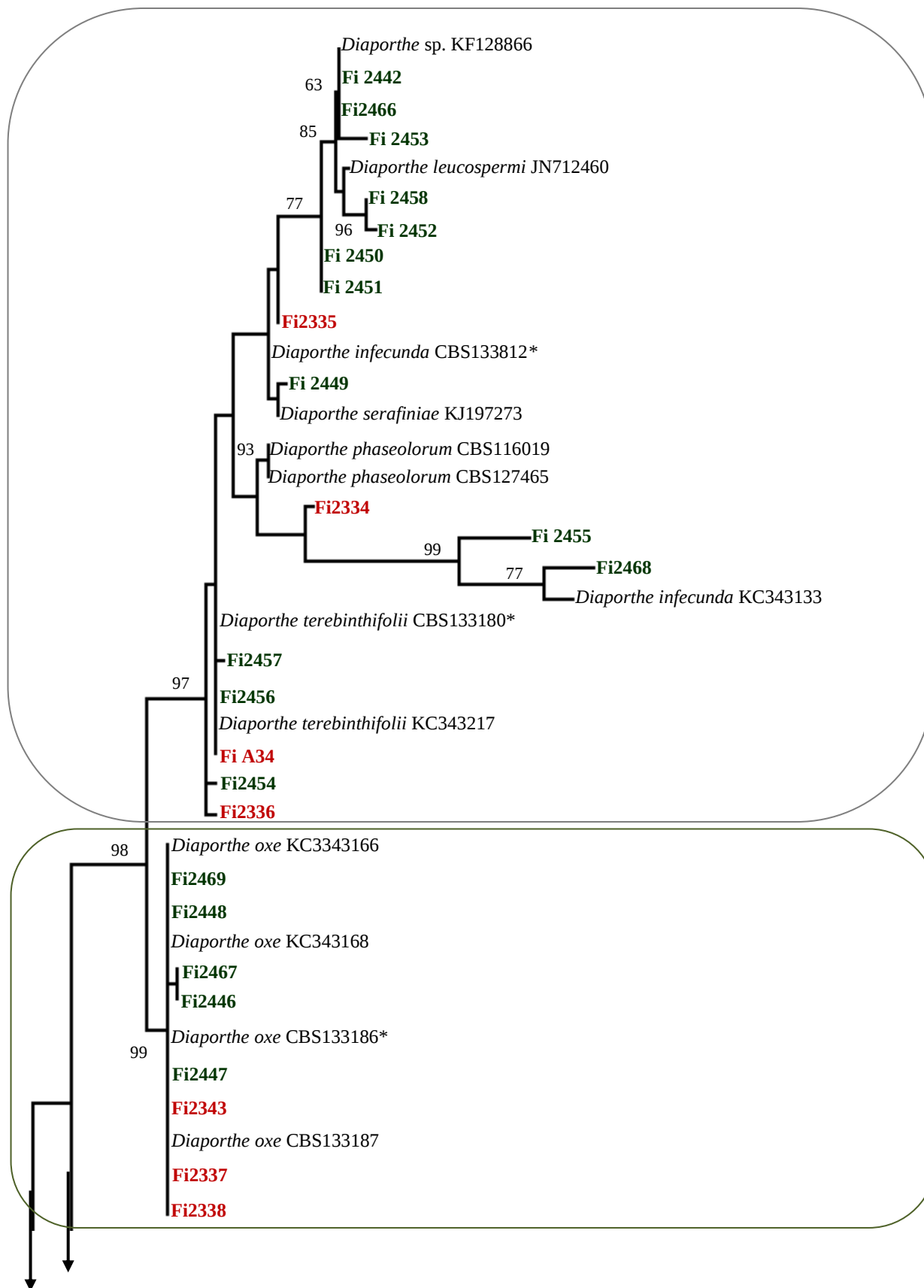
- evolutionary framework. *Studies in Mycology*, 76: 31-49.
- Smit, W. A., Viljoen, C. D., Wingfield, B. D., Wingfield, & M. J., Calitz, F. J. **1996**. A new canker disease of apple, pear, and plum rootstocks caused by *Diaporthe ambigua* in south Africa. *Plant Disease*, 80: 1331-1335.
- Strand, L. **1999**. Integrated Pest Management for Stone Fruits. UC ANR Publication 3389, p 15.
- Suryanarayanan, T. S., Murali, T. S., & Venkatesan, G. **2002**. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany*, 80: 818-826.
- Sutton, D. A., Fothergill, A. W., & Rinaldi, M. G. **1997**. Guide to clinically significant fungi, pp. 491.
- Sutton, J. S., Li, D., Peng, G., Yu, H., Zhang, P., & Valdebenito-Sanhueza, R. M. **1997**. *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant disease*, 81: 316-328.
- Swofford, D. L. **2002**. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10 (Alvitec). Sunderland: Sinauer.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. **2013**. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Tewoldemedhin, Y. T., Mazzola, M., Mostert, L., & McLeod, A. **2011**. *Cylindrocarpon* species associated with apple tree roots in South Africa and their quantification using real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 129: 637-651.
- Thomidis, T., & Michailides, T. J. **2009**. Studies on *Diaporthe eres* as a new pathogen of peach trees in Greece. *Plant Disease*, 93: 93-1297.
- Thompson, S. M., Tan, Y. P., Shivas, R. G., Neate, S. M., Morin, L., Bissett, A., & Aitken, E. A. B. **2015**. Green and brown bridges between weeds and crops reveal novel *Diaporthe* species in Australia. *Persoonia*, 35: 39-49.
- Tomita, F. **2003**. Endophytes in Southeast Asia and Japan: their taxonomic diversity and potential applications. *Fungal Diversity*, 14: 187-204.
- Udayanga, S., Liu, X., McKenxie, E. H. C., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H. A., & Hyde, K. D. **2011**. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity*, 20: 189-225.
- Udayanga, D., Liu, X., Crous, P. W., McKenxie, E. H. C., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. **2012**. A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). *Fungal Diversity*, 56: 157-171.
- Udayanga, D., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., & Hyde, K. D. **2014**. Species limits in *Diaporthe*: molecular re-assessment of *D. citri*, *D. cytosporella*, *D. foeniculina* and *D. rudis*. *Persoonia*,

32: 83-101.

- Uecker, F. A. **1988**. A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. Mycologia Memoir No. 13. Cramer Publishers, Berlin, pp 1-231.
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Guerrero, J. C., Guevara, J., & Gubler, W. D. **2008**. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*, 92: 519-529.
- Úrbez-Torres, J. R., & Gubler, W. D. **2009**. Pathogenicity and epidemiology of *Botryosphaeriaceae* from grapevines in California. *Plant Disease*, 93: 584-592.
- Úrbez-Torres, J. R., Bruez, E., Hurtado, J., Gubler, W. D. **2010**. Effect of temperature on conidial germination of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines. *Plant Disease*, 94: 1476-1484.
- van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Fourie, P. H., & Halleen, F. **2004**. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia*, 96: 781-798.
- van Niekerk, J. M., Groenewald, J. Z., Farr, D. F., Fourie, P. H., Halleen, F., & Crous, P. W. **2005**. Reassessment of *Phomopsis* species on grapevine. *Australasian Plant Pathology*, 34: 27-39.
- van Niekerk, J. M., Fourie, P. H., Halleen, F., & Crous, P. W. **2006**. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: S43-S54
- van Niekerk, J. M., Bester, W., Halleen, F., Crous, P. W., & Fourie, P. H. **2011**. The distribution and symptomatology of grapevine trunk disease pathogens are influenced by climate. *Phytopathologia Mediterranea*, 50: S98-S111.
- van Rensburg, J. C. J., Lamprecht, S. C., Groenewald, J. Z., Castlebury, L. A., & Crous, P. W. **2006**. Characterisation of *Phomopsis* spp. Associated with die-back of rooibos (*Aspalathus linearis*) in South Africa. *Studies in Mycology*, 55: 65-74.
- Van Warmelo K.T., Marasas, W. F. O., Adelaar, T. F., Kellerman, T. S., van Rensburg, I. B. J., & Minne, J. A. **1970**. Experimental evidence that lupinosis of sheep is a mycotoxicosis caused by the fungus *Phomopsis leptostromiformis* (Kuhn) Bubak. Journal of the South African Veterinary Medical Association, 41: 235-247.
- Vega, F. E., Simpkins, A., Aime, M. C., Posada, F., Peterson, S. W., Rehner, S. A., Infante, F., Castillo, A., & Arnold, A. E. **2010**. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico, and Puerto Rico. *Fungal Ecology*, 3: 122-138.
- Velho, A. C., Stadnik, M. J., Casanova, L., Mondino, P., & Alaniz, S. **2014**. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing apple bitter rot in Southern Brazil. *Plant Disease*, 98: 567.
- Verhoeff, K. **1974**. Latent Infections by Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 12: 99-110.

- Vesterlund, S. R., Helander, M., Faeth, S. H., Hyvönen, T., & Saikkonen, K. **2011**. Environmental conditions and host plant origin override endophyte effects on invertebrate communities. *Fungal Diversity*, 47: 109-118.
- Wang, L., Zang, R., Huang, L. L., Xie, F. Q., & Gao, X. N. **2005**. The investigation of apple tree Valsa canker in Guanzhong region of Shaanxi province. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*, 3:98–100.
- Weber, D. **2009**. Endophytic fungi, occurrence and metabolites. *Physiology and Genetics The Mycota*, 15: 153-195.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. W. **1990**. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Edited by Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. New York: Academic Press Inc., pp 315-322.
- White, C. L., Hallen, F., & Mostert, L. **2011**. Symptoms and fungi associate with esca in South African vineyards. *Phytopathologia Mediaterranea*, 50: S236-S246.
- Yu, L., Xu, S. G., Wu, X., & Zhao, J. R. **2012**. First Report of Stem Blight of Blueberry Caused by *Botryosphaeria dothidea* in China. *Plant Disease*, 96: 1697.

Anexo



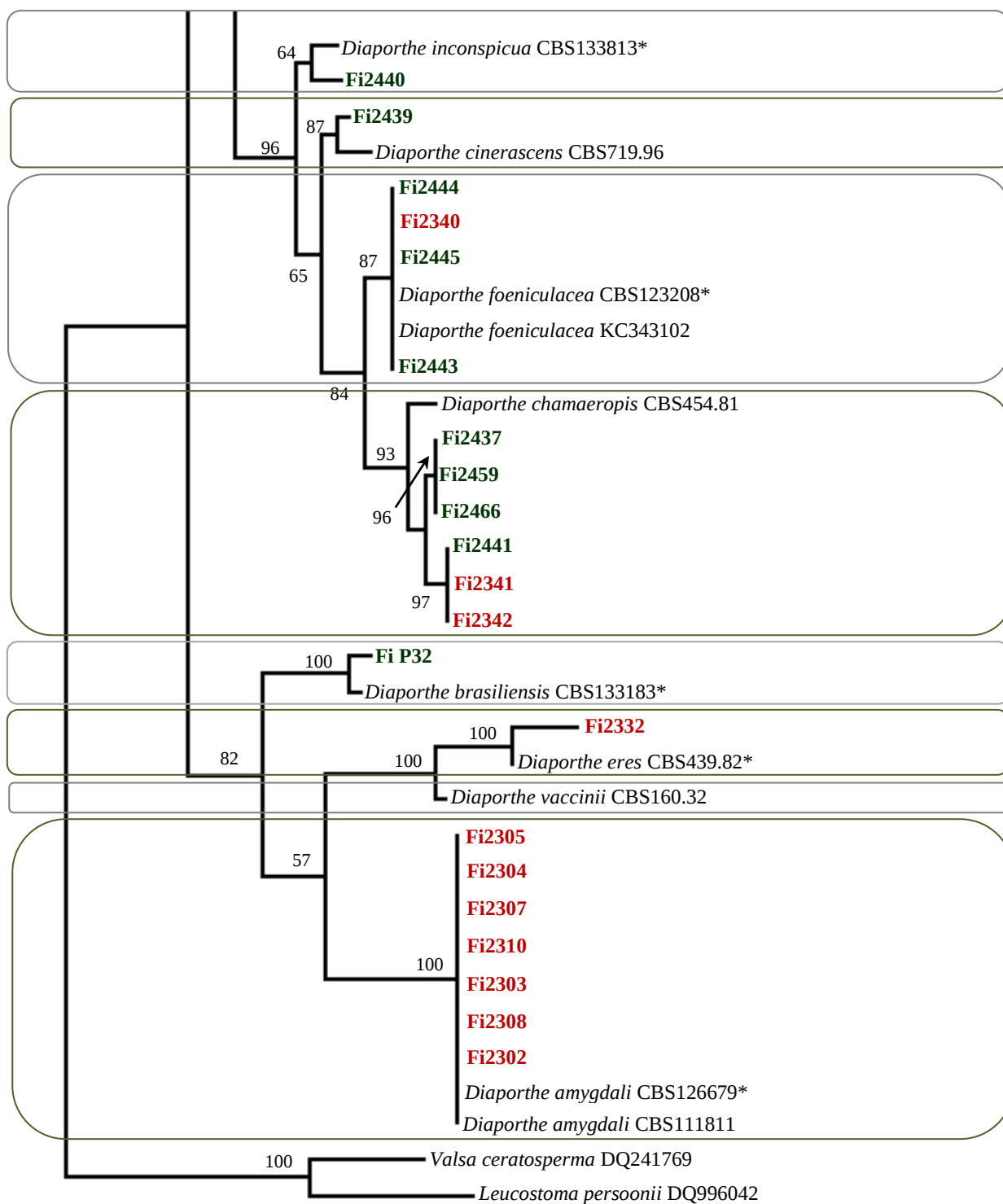
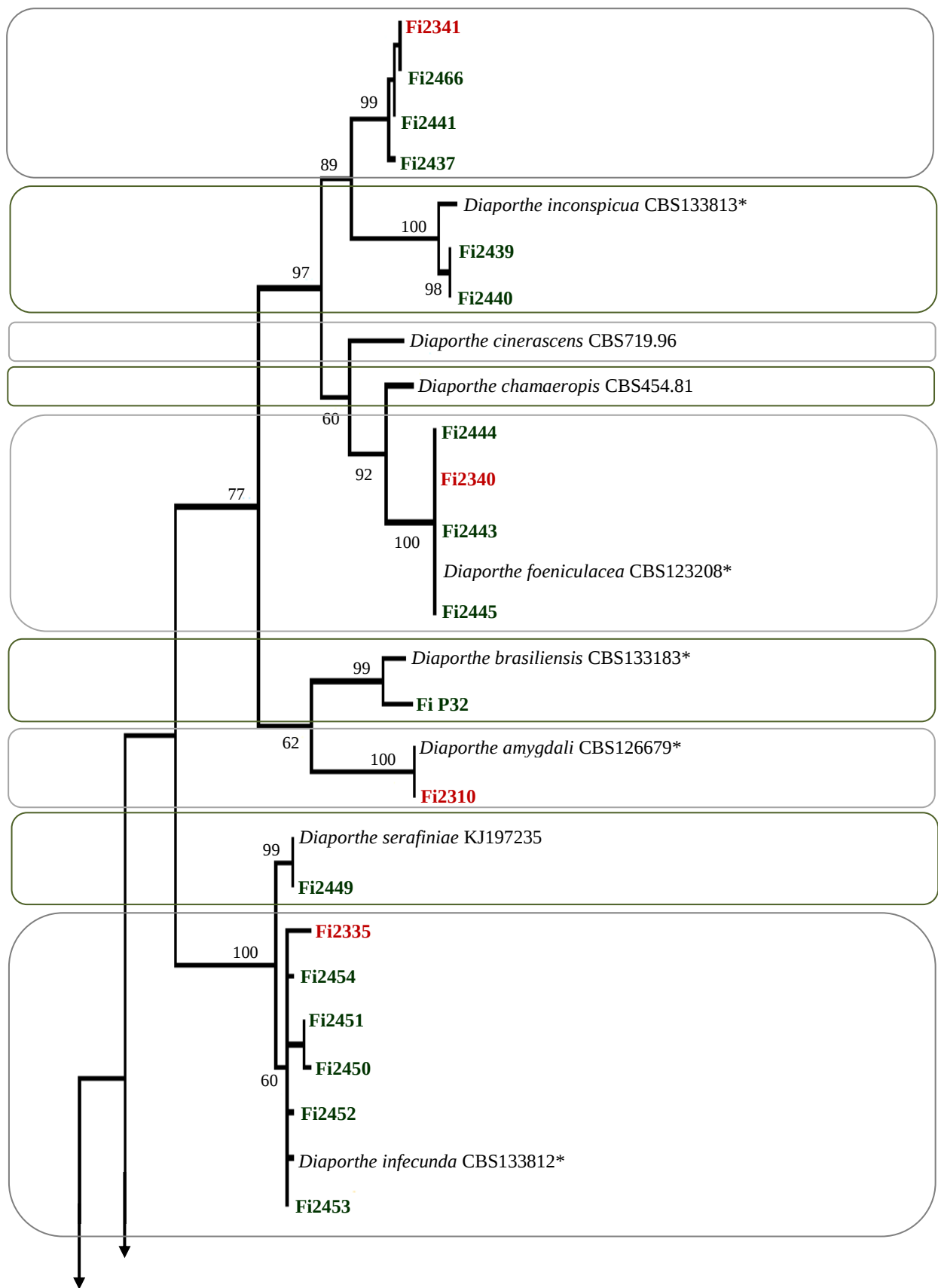


Figura 1 Uno de los 100 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región ITS. Los valores de bootstrap basados en 1000 réplicas se muestran en los nodos. Con asterisco se indican los aislamientos tipo. El grupo externo lo formaron *Valsa ceratosperma* y *Leucostoma persoonii*. En rojo se indican los aislamientos obtenidos de síntoma y en verde los aislamientos endófitos.



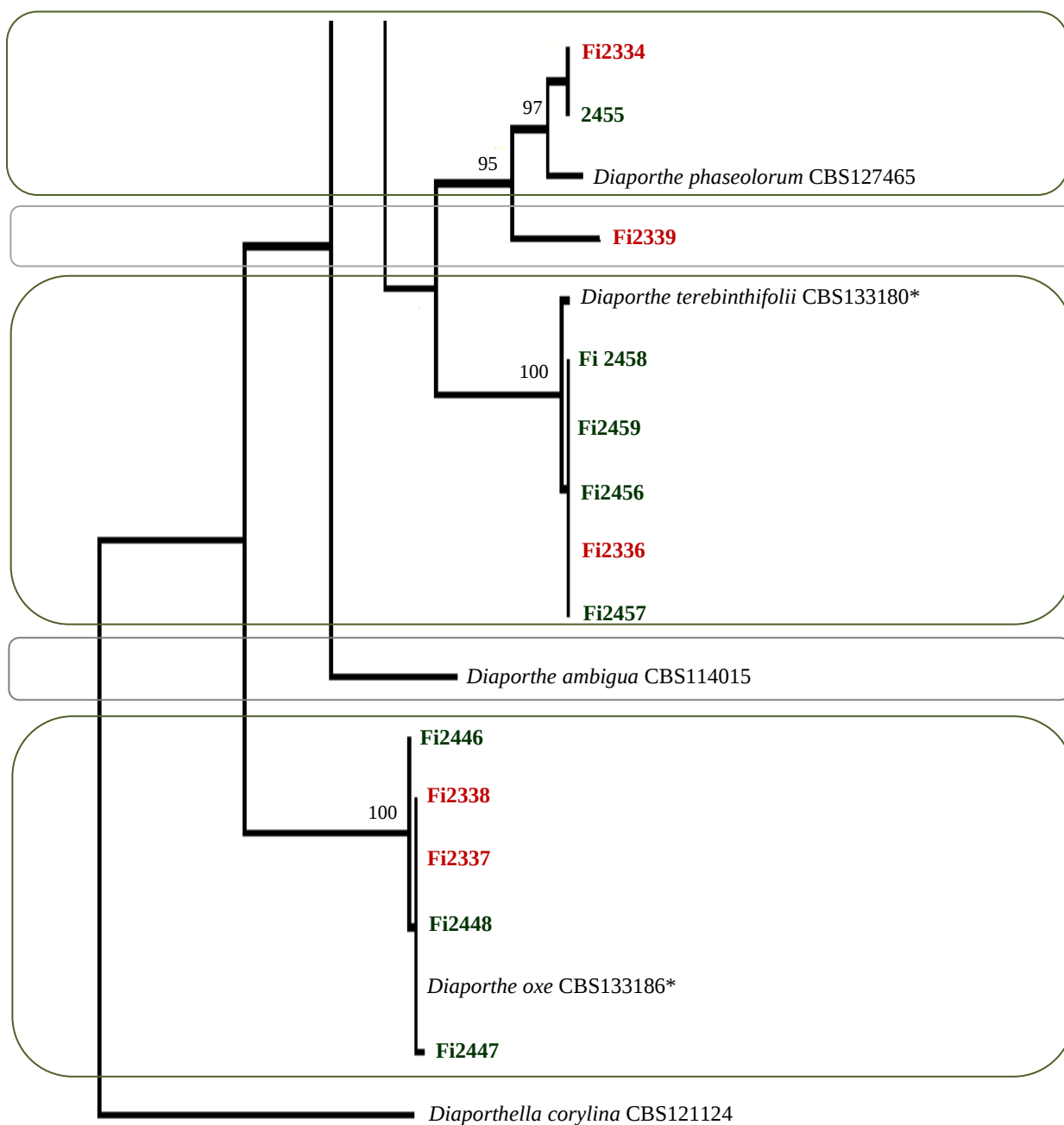


Figura 2 Uno de los 30 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región EF1- α . Los valores de bootstrap basados en 1000 réplicas se muestran en los nodos. Con asterisco se indican los aislamientos tipo. El grupo externo es *Diaporthella corylina*. En rojo se indican los aislamientos obtenidos de sintoma y en verde los aislamientos endófitos.

Figura 3 Salida del programa Primer 3. Características del par NPR.

Figura 4 Salida del programa Primer 3. Características del par DMU

```
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO      start   len    tm     gc%   any_th  3' th  hairpin seg
LEFT PRIMER      15    22    58.61  40.91   28.54   0.00   55.19 AAACGCAGACGTCGTGATAAACA
RIGHT PRIMER     250    18    63.07  72.22    0.00   0.00    0.00 GCAGTGAGGACGGTGCCC
SEQUENCE SIZE: 367
INCLUDED REGION SIZE: 367

PRODUCT SIZE: 236, PAIR ANY_TH COMPL: 11.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

  1  AAACCTCCAGTCAGTAACGCAGACGTCGTGATAAACAAAGTTAATAAACTAAAACCTTTCAAC
    >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

 61  AACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA

121  ATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCG

181  GGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGAATTGGGCACCG
                                     <<<<<<<<

241  TCCTCACTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCTGTTCAAGCCCTCAAGCGTAGT
    <<<<<<<<<<

301  AGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTGC GCCCGACGACACTTCTGAACTTTT

361  CTAAGG

KEYS (in order of precedence):
>>>>> left primer
<<<<<< right primer
```

Figura 5 Salida del programa Primer 3. Características del par LAS

Primer3 Output

```
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO      start   len    tm     gc%   any th   3' th   hairpin  seg
LEFT PRIMER      20    20    54.49   40.00   10.78    0.00    0.00    TCGACGTCTGATAAACAAGT
RIGHT PRIMER     251    18    65.78   77.78   19.07   19.07   45.25   CGCAGAGAGGACGGCGCC
SEQUENCE SIZE: 367
INCLUDED REGION SIZE: 367

PRODUCT SIZE: 232, PAIR ANY_TH COMPL: 11.87, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

  1  AAATCCAGTCAGTAAACGTCGACGTCTGATAAACCAAGTTAATAAACTAAAAC TTCAAC
    >>>>>>>>>>>>>>>>>>>

 61  AACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA

121  ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCG

181  GGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACAACCCTCAAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCGCCG
    <<<<<<<

241  TCCTCTCTGCGGACGCGCCTTAAAGACCTCGGCGGTGGCTGTTAGCCCTCAAGCGTAGT
    <<<<<<<<<<

301  AGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCGGACGAACCTTCTGAAC TTTT

361  CTAAGG

KEYS (in order of precedence):
>>>>> left primer
<<<<<< right primer
```

Figura 6 Salida del programa Primer 3. Características del par DSE

Figura 7 Salida del programa Primer 3. Características del par NAL

Figura 7 Salida del programa Primer 3. Características del par NAL

Tabla 1 Aislamientos incluidos en los análisis filogenéticos, genes secuenciados y números de acceso al GenBank

Especie	Código	Origen	Hospedero		Gen			
			Especie	Ubicación	ITS	EF1- α	RPB2	TUB
<i>Diaporthe ambigua</i>	CBS114015*				KC343010	KC343736		
<i>Diaporthe amygdali</i>	CBS126679*				GQ281791	KC343748		
<i>Diaporthe amygdali</i>	Fi2302	F	D		+			
<i>Diaporthe amygdali</i>	Fi2305	F	D		+			
<i>Diaporthe amygdali</i>	Fi2307	F	D		+			
<i>Diaporthe amygdali</i>	Fi2308	F	D		+			
<i>Diaporthe amygdali</i>	Fi2304	F	D		+			
<i>Diaporthe amygdali</i>	Fi2303	F	D		+			
<i>Diaporthe amygdali</i>	Fi2310	F	D		+	+		
<i>Diaporthe brasiliensis</i>	CBS133183*				KC343042	KC343768		
<i>Diaporthe brasiliensis</i>	Fi2438	E	P	Canelones	+	+		
<i>Diaporthe chamaeropsis</i>	CBS454.81				KC343048	KC343774		
<i>Diaporthe cinerascens</i>	CBS719.96				KC343050	KC343776		
<i>Diaporthe eres</i>	CBS439.82*				FJ889450	JQ250341		
<i>Diaporthe eres</i>	Fi2332	F	P		KR023622			
<i>Diaporthe eres</i>	Fi2333	F	M	Canelones	KR023623			
<i>Diaporthe foeniculacea</i>	CBS123208*				KC343104	KC343830		
<i>Diaporthe foeniculacea</i>	Fi2445	E	P	Canelones	+	+		
<i>Diaporthe foeniculacea</i>	Fi2443	E	P	Canelones	+	+		
<i>Diaporthe foeniculacea</i>	Fi2444	E	M	Canelones	+	+		
<i>Diaporthe foeniculacea</i>	Fi2340	F	M		KR023630	+		
<i>Diaporthe inconspicua</i>	CBS133813*				NR111849	KC343849		
<i>Diaporthe inconspicua</i>	Fi2440	E	P	Canelones	+	+		
<i>Diaporthe inconspicua</i>	Fi2439	E	P	Canelones	+	+		
<i>Diaporthe infecunda</i>	CBS133812*				KC343126	KC343852		
<i>Diaporthe infecunda</i>	Fi2468	E	P	Canelones	+			

<i>Diaporthe infecunda</i>	Fi2453	E	P	Canelones	+	+
<i>Diaporthe infecunda</i>	Fi2335	F	P		KR023625	+
<i>Diaporthe infecunda</i>	Fi2452	E	M	Canelones	+	+
<i>Diaporthe infecunda</i>	Fi2451	E	P	Canelones	+	+
<i>Diaporthe infecunda</i>	Fi2450	E	P	Canelones	+	+
<i>Diaporthe novem</i>	CBS127270*				KC343156	KC343882
<i>Diaporthe oxe</i>	CBS133186*				KC343164	KC343890
<i>Diaporthe oxe</i>	Fi2447	E	P	Canelones	+	+
<i>Diaporthe oxe</i>	Fi2337	F	P	Paysandú	KR023627	+
<i>Diaporthe oxe</i>	Fi2467	E	A	Salto	+	
<i>Diaporthe oxe</i>	Fi2446	E	A	Salto	+	+
<i>Diaporthe oxe</i>	Fi2338	F	P	Paysandú	KR023628	+
<i>Diaporthe oxe</i>	Fi2343	F	D		KR023633	
<i>Diaporthe oxe</i>	Fi2469	E	P	Canelones	+	
<i>Diaporthe oxe</i>	Fi2448	E	P	Canelones	+	+
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	CBS127465				KC343177	KC343903
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	Fi2455	E	P	Canelones	+	+
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	Fi2334	F	P	Paysandú	KR023624	+
<i>Diaporthe serafinae</i>	BRIP54136				KJ197273	KJ197235
<i>Diaporthe serafinae</i>	Fi2449	E	M	Canelones	+	+
<i>Diaporthe</i> sp.1	Fi2441	E	P	Canelones	+	+
<i>Diaporthe</i> sp.1	Fi2341	F	D	Tacuarembó	+	+
<i>Diaporthe</i> sp.1	Fi2342	F	P	Paysandú	KR023632	
<i>Diaporthe</i> sp.2	Fi2437	E	A	Salto	+	+
<i>Diaporthe</i> sp.2	Fi2466	E	P	Canelones	+	+
<i>Diaporthe</i> sp.2	Fi2442	E	P	Canelones	+	
<i>Diaporthe</i> sp.3	Fi2454	E	A	Salto	+	+
<i>Diaporthe</i> sp.4	Fi2339	F	P	Paysandú	+	+
<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	CBS133180*				KC343216	KC343942
<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	Fi2456	E	P	Canelones	+	+
<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	Fi2458	E	M	Canelones	+	+
<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	Fi2336	F	P	Paysandú	KR023626	+

<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	Fi2457	E	P	Canelones	+	+
<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	Fi2459	E	A	Salto	+	+
<i>Diaporthe vaccinii</i>	CBS1603.32				AF317578	KC343954
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW8000*			Suiza	AY236949	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Fi2380	E	A	Salto	+	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Fi2382	E	A	Salto	+	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Fi2381	E	D	Canelones	+	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Fi2461	E	P	Canelones	+	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Fi2311	F	M		KR002818	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Fi2393	F	M		+	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Fi2378	F	M		+	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Fi2379	F	D		+	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Fi2312	F	M	Canelones	KR002815	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Fi2313	F	M	Canelones	KR002816	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Fi2314	F	M	Canelones	KR002817	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Fi2377	F	P		+	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Fi2375	F	M	Paysandú	+	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Fi2315	F	M	San José	KR002819	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>		F	D	Tacuarembó	+	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>		F	D	Tacuarembó	+	
<i>Diplodia mutila</i>	CS112553*			Portugal	AY259093	AY573219
<i>Diplodia mutila</i>	Fi2316	F	P	Paysandú	KR002821	KT191040
<i>Diplodia mutila</i>	Fi2317	F	M	Canelones	KR002821	
<i>Diplodia seriata</i>	CBS112555*			Portugal	AY259094	AY573220
<i>Diplodia seriata</i>	CBS119049			Italia	DQ458889	
<i>Diplodia seriata</i>	Fi 2355	F	D	Canelones	KR023645	
<i>Diplodia seriata</i>	Fi 2351	F	D	Canelones	KR023641	
<i>Diplodia seriata</i>	Fi 2348	F	D	Canelones	KR023641	
<i>Diplodia seriata</i>	Fi 2346	F	D	Canelones	KR023636	
<i>Diplodia seriata</i>	Fi 2354	F	P	Canelones	KR023644	
<i>Diplodia seriata</i>	Fi 2350	F	P	Canelones	KR023640	

<i>Diplodia seriata</i>	Fi 2347	F	M	Canelones	KR023637	
<i>Diplodia seriata</i>	Fi 2344	F	M	Canelones	KR023634	
<i>Diplodia seriata</i>	Fi 2352	F	D	Canelones	KR023642	
<i>Diplodia seriata</i>	Fi 2349	F	P	Paysandú	KR023639	
<i>Diplodia seriata</i>	Fi2370	F	M	Canelones	+	
<i>Diplodia seriata</i>	Fi 2345	F	M	Canelones	KR023635	
<i>Diplodia seriata</i>	Fi 2353	F	M	Canelones	KR023643	KT191039
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	UY788*			Uruguay	EU080927	EU863181
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	UY1263			Uruguay	EU080933	
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	Fi2356	F	D		KJ364519	
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	Fi2357	F	D	Salto	KJ364520	KT191037
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	Fi2358	F	D	Salto	KJ364521	KT191038
<i>Neofusicoccum australe</i>	CMW6837*			Australia	AY339262	AY339270
<i>Neofusicoccum australe</i>	CMW9073			Australia		AY339269
<i>Neofusicoccum australe</i>	CMW3386			Australia		AY615157
<i>Neofusicoccum australe</i>	V449			Uruguay	JX271822	JX283452
<i>Neofusicoccum australe</i>	Fi2318	F	M	Canelones	KR002823	+
<i>Neofusicoccum australe</i>	Fi2319	F	M	Canelones	KR002822	
<i>Neofusicoccum australe</i>	Fi2373	E	M	Canelones	+	+
<i>Neofusicoccum luteum</i>	CBS110299*			Portugal	AY259091	AY573217
<i>Neofusicoccum luteum</i>	CMW103010			Portugal		AY339267
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CMW9081*			Nueva Zelanda	AY236943	AY236888 EU821963
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CMW9078			Nueva Zelanda	AY236940	AY236885
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CMW9080			Nueva Zelanda		EU821962
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi 2387	E	P	Canelones	+	+
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi2384	E	P	Canelones	+	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi 2388	E	A	Salto	+	+
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi2389	E	A	Salto	+	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi2385	E	A	Salto	+	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi2386	E	A	Salto	+	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi 2320	F	D	Salto	KR002824	KT191033
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi 2363	F	D	Salto	KT191028	KT191035

<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi 2321	F	D	Salto	KR002825	KT191031
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi 2322	F	P	Paysandú	KR002826	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi 2323	F	P	Paysandú	KR002827	KT191030
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi 2324	F	P	Paysandú	KR002828	KT191039
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi 2325	F	P	Paysandú	KR002889	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi 2392	F	M	San José	+	+
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi 2326	F	M	San José	KR002830	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi 2327	F	M	Canelones	KR002831	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi 2328	F	M	Canelones	KR002832	KT191034
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi 2329	F	M	Canelones	KR002833	KT191036
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi 2330	F	P	Canelones	KR002834	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi2331	F	P	Canelones	KR002835	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi2367	F	A	Salto	+	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi2368	F	A	Tacuarembó	+	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Fi2369	F	A	Salto	+	
<i>Neofusicoccum ribis</i>	CMW7772*		E	Estados Unidos	AY236935	EU821958
<i>Neofusicoccum ribis</i>	CMW7773		E	Estados Unidos	AY236936	
<i>Neofusicoccum ribis</i>	CMW7054			Estados Unidos		EU821960
<i>Neofusicoccum kwambonambiense</i>	V303			Uruguay	JX271829	JX83446
<i>Neofusicoccum kwambonambiense</i>	CMW14023*			Sud Africa		EU821930
<i>Neofusicoccum kwambonambiense</i>	MUCC210			Australia		EU339564
<i>Neofusicoccum umdonicola</i>	CMW14096*			Sud Africa		EU821943
<i>Neofusicoccum umdonicola</i>	CMW14058			Sud Africa		EU821934
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	CBS117488				KF766223	KF766437
<i>Pseudofusicoccum violaceum</i>	CMW22679			Sud Africa	FJ888447	FJ888442
<i>Pseudofusicoccum kimberleyense</i>	CBS122058				KF766222	EU144072
<i>Pseudofusicoccum adansoniae</i>	CMW26147				KF766220	EF585571
<i>Pseudofusicoccum ardesiacum</i>	CBS122062				KF766221	EU144075
<i>Pseudofusicoccum sp.</i>	Fi2364	F	D	Canelones	KT191029	+
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	Fi2365	F	A	Salto	+	+
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CBS164.96*			Nueva Guinea	AY640255	AY640258
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Fi2359	F	M	Paysandú	KR071127	KT191041

<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CBS111530				EF622074	EF622054
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Fi2366	F	A	Salto	+	+
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CBS116459				KF766472	EF622057
<i>Lasiodiplodia citricola</i>	IRAN1522C*					
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	IRAN1520C*					
<i>Lasiodiplodia prava</i>	CBS456.78*			Colombia	EF622083	EF622063
<i>Cytospora acaciae</i>	CBS468.6				DQ243804	
<i>Cytospora acaciae</i>	Fi2427	E	A	Salto	+	
<i>Cytospora eucalypticola</i>	CBS122689*				EU552120	
<i>Cytospora eucalypticola</i>	Fi2428	F	D		+	
<i>Cytospora</i> - like	CML195				JN153082	
<i>Cytospora</i> - like	Fi2432	E	A	Salto	+	
<i>Cytospora</i> - like	Fi2435	E	A	Salto	+	
<i>Cytospora</i> - like	Fi2432	F	D	Tacuarembó	+	
<i>Cytospora</i> - like	Fi2436	E	A	Salto	+	
<i>Cytospora</i> - like	Fi2434	E	A	Salto	+	
<i>Cytospora</i> - like	Fi2433	E	P		+	
<i>Leucostoma persoonii</i>	CBS263.34				AF191175	
<i>Leucostoma persoonii</i>					JX438618	
<i>Leucostoma persoonii</i>	Fi2430	F	D		+	
<i>Leucostoma persoonii</i>	Fi2429	F	D	Tacuarembó	+	
<i>Peyronellaea glomerata</i>	CBS526.66				FJ427013	
<i>Peyronellaea glomerata</i>	CNU081083				KC339777	
<i>Peyronellaea glomerata</i>	Fi2424	F	D	San José	+	
<i>Peyronellaea glomerata</i>	Fi2425	F	D		+	
<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	Fi2421	F	M	San José	+	+
<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	Fi2423	F	M	San José	+	
<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	Fi2422	F	M	Canelones	+	+
<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	Fi2400	F	M	San José	+	

<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	Fi2399	F	D		+	
<i>Cylindrocarpon olidum</i>	Fi2394	F	P		+	
<i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i>	Fi2395	F	P		+	
<i>Ilyonectria robusta</i>	Fi2396	F	P		+	
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	Fi2398	F	M		+	+
<i>Phaeoacremonium mortoniae</i>	Fi2397	F	M		+	+
<i>Pleurostomophora richardsiae</i>	Fi2361	F	A	Salto	+	+
<i>Pleurostomophora richardsiae</i>	Fi2362	F	A	Salto	+	+

Las secuencias en negrita fueron generadas en este estudio.

* indica secuencias ex tipo

F: aislamiento obtenido de síntoma, E: aislamiento obtenido de rama sana

M: manzano, P: peral, D: duraznero, A: arándano

Tabla 2 Largo de lesión producida por la inoculación de aislamientos obtenidos de síntoma sobre ramas sanas de peral, manzano y duraznero a los 12 días de inoculación bajo condiciones de laboratorio

Especie	Origen	Peral					Promedio
		Replicas					
<i>Diaporthe infecunda</i>	P	0	0	0,6	0,8	0,8	0,73
<i>Diaporthe oxe</i>	P	1,0	0,8	0,8	0,9	0,7	0,84
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	P	0	0	0	0	0	0
<i>Diaporthe sp.</i>	P	0	0	0	0	0	0
<i>Diaporthe eres</i>	M	2,0	1,7	1,9	5,0	3,0	2,72
<i>Peyronellaea glomerolata</i>	D	0	0	0	0	0	0
<i>P. brasiliensis</i>	M	0	0	0	0	0	0
<i>Cytospora eucalypticola</i>	D	0	0	0	0	0	0
<i>Leucostoma persoonii</i>	D	0	0	0	0	0	0
<i>B. dothidea</i>	M	0	0	0	0	0	0
<i>Diplodia mutila</i>	P	1,8	2,3	2,7	2,8	1,4	2,20
<i>Diplodia seriata</i>	D	0	0	0	0	0	0
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	D	0	0	0	0	0	0
<i>Neofusicoccum parvum</i>	M	4,0	3,2	2,0	2,3	4,6	3,22
<i>L. theobromae</i>	M	1,6	5,8	6,9	6,9	5,4	5,32
<i>Pseudofusicoccum sp.</i>	D	0,9	1,0	0,9	1,0	1,0	0,94
<i>Collophora rubra</i>	D	0,9	0,6	0,6	0,8	0,9	0,76
<i>Ph. angustius</i>	P	0	0	0	0	0	0
<i>Ph. mortoniae</i>	P	0	0	0	0	0	0
Control (PDA)	C	0	0	0	0	0	0

Continuación Tabla 2 Largo de lesión producida por la inoculación de aislamientos obtenidos de síntoma sobre ramas sanas de peral, manzano y duraznero a los 12 días de inoculación bajo condiciones de laboratorio

		Manzano					
Especie	Origen	Replicas					Promedio
<i>Diaporthe infecunda</i>	P	1,1	1	0,9	1,15	1,3	1,09
<i>Diaporthe oxe</i>	P	0,85	1,1	0,8	0,9	0,85	0,90
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	P	1,7	1,4	1,3	1,7	1,8	1,58
<i>Diaporthe sp.</i>	P	2,3	1,3	3,5	2,4	2,6	2,42
<i>Diaporthe eres</i>	M	1,35	1,6	1,4	1,95	1,3	1,52
<i>Peyronellaea glomerolata</i>	D	0	0	0	0	0	0
<i>P. brasiliensis</i>	M	0	0	0	0	0	0
<i>Cytospora eucalypticola</i>	D	0	0	0	0	0	0
<i>Leucostoma personii</i>	D	0	0	0	0	0	0
<i>B. dothidea</i>	M	0	0	0	0	0	0
<i>Diplodia mutila</i>	P	0,6	0,8	1	0,8	0,8	0,80
<i>Diplodia seriata</i>	D	0,5	1,2	0,6	1,3	1	0,92
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	D	0,8	1,2	1,5	1,1	1	1,12
<i>Neofusicoccum parvum</i>	M	2,9	1,8	7,5	6,5	11,5	6,04
<i>L. theobromae</i>	M	2	2	6	5,5	6	4,30
<i>Pseudofusicoccum sp.</i>	D	2,6	2,7	0,9	4,8	5,8	3,36
<i>Collophora rubra</i>	D	0	0	0	0	0	0
<i>Ph. angustius</i>	P	0	0	0	0	0	0
<i>Ph. mortoniae</i>	P	0	0	0	0	0	0
Control (PDA)	C	0	0	0	0	0	0

Continuación Tabla 2 Largo de lesión producida por la inoculación de aislamientos obtenidos de síntoma sobre ramas sanas de peral, manzano y duraznero a los 12 días de inoculación bajo condiciones de laboratorio

		Duraznero					
Especie	Origen	Replicas					Promedio
<i>Diaporthe infecunda</i>	P	0,9	0,9	1,3	1,0	3,3	1,48
<i>Diaporthe oxe</i>	P	1,4	1,6	1,7	1,3	1,1	1,41
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	P	0,9	1,1	3,2	1,1	1,0	1,46
<i>Diaporthe sp.</i>	P	0,9	1,0	1,0	0,9	1,0	0,96
<i>Diaporthe eres</i>	M	3,5	5,5	2,2	2,5	1,7	3,08
<i>Peyronellaea glomerolata</i>	D	0	0	0	0	0	0
<i>P. brasiliensis</i>	M	0	0	0	0	0	0
<i>Cytospora eucalypticola</i>	D	0	0	0	0	0	0
<i>Leucostoma persoonii</i>	D	5,0	7,0	3,1	3,8	1,0	3,98
<i>B. dothidea</i>	M	0,9	1,0	2,3	1,1	1,0	1,26
<i>Diplodia mutila</i>	P	2,9	2,7	3,5	2,7	2,6	2,88
<i>Diplodia seriata</i>	D	3,5	0	1,9	0	0,7	1,22
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	D	1,1	1,2	1,3	0,9	0,9	1,08
<i>Neofusicoccum parvum</i>	M	2,0	2,3	2,0	3,0	2,5	2,36
<i>L. theobromae</i>	M	2,7	2,2	4,0	3,7	3,2	3,16
<i>Pseudofusicoccum sp.</i>	D	1,1	1,0	1,1	1,2	1,9	1,3
<i>Collophora rubra</i>	D	1	0	0	0	0	0,16
<i>Ph. angustius</i>	P	0	0	0	0	0	0
<i>Ph. mortoniae</i>	P	0	0	0	0	0	0
Control (PDA)	C	0	0	0	0	0	0

Tabla 3 Número de ramas de peral, manzano y duraznero con desarrollo de lesión a los 12 días de inoculación bajo condiciones de laboratorio

Especie	Origen	Nº de ramas con lesión		
		Peral	Manzano	Duraznero
<i>Diaporthe infecunda</i>	P	3	5	5
<i>Diaporthe oxe</i>	P	5	5	5
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	P	0	5	5
<i>Diaporthe sp.</i>	P	5	5	5
<i>Diaporthe eres</i>	M	5	5	5
<i>Peyronellaea glomerolata</i>	D	0	0	0
<i>P. brasiliensis</i>	M	0	0	0
<i>Cytospora eucalypticola</i>	D	0	0	0
<i>Leucostoma persoonii</i>	D	0	0	5
<i>B. dothidea</i>	M	0	0	5
<i>Diplodia mutila</i>	P	5	5	5
<i>Diplodia seriata</i>	D	0	5	3
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	D	0	5	4
<i>Neofusicoccum parvum</i>	M	5	5	5
<i>L. theobromae</i>	M	5	5	5
<i>Pseudofusicoccum sp.</i>	D	5	5	5
<i>Collophora rubra</i>	D	5	0	1
<i>Ph. angustius</i>	P	0	0	0
<i>Ph. mortoniae</i>	P	0	0	0
Control (PDA)	C	0	0	0

Tabla 4 Número de ramas de peral, manzano y duraznero con re-aislamiento positivo

Especie	Origen	Nº de ramas con re-aislamiento		
		Peral	Manzano	Duraznero
<i>Diaporthe infecunda</i>	P	2	1	1
<i>Diaporthe oxe</i>	P	3	4	2
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	P	0	2	3
<i>Diaporthe sp.</i>	P	0	5	2
<i>Diaporthe eres</i>	M	5	5	5
<i>Peyronellaea glomerolata</i>	D	0	0	0
<i>P. brasiliensis</i>	M	0	0	0
<i>Cytospora eucalypticola</i>	D	0	0	0
<i>Leucostoma persoonii</i>	D	0	0	4
<i>B. dothidea</i>	M	0	0	3
<i>Diplodia mutila</i>	P	3	3	5
<i>Diplodia seriata</i>	D	0	3	1
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	D	0	4	1
<i>Neofusicoccum parvum</i>	M	4	5	3
<i>L. theobromae</i>	M	4	1	3
<i>Pseudofusicoccum sp.</i>	D	2	4	4
<i>Collophora rubra</i>	D	2	0	0
<i>Ph. angustius</i>	P	0	0	0
<i>Ph. mortoniae</i>	P	0	0	0
Control (PDA)	C	0	0	0

Tabla 5 Largo de lesión producida por la inoculación de aislamientos obtenidos de síntoma sobre ramas sanas de peral, manzano y duraznero a los 40 días de inoculación en condiciones de campo

Especie	Origen	Peral					Promedio
		Replicas					
<i>Diaporthe oxe</i>	P	0,7	0,7	0,8	0,7	0,7	0,82
		0,8	0,9	1,3	0,7	0,85	
<i>Diaporthe eres</i>	M	0,9	0,9	1,15	1,2	0,8	0,96
		1,1	1,0	0,7	1,0	0,8	
<i>Diplodia mutila</i>	P	0,7	1,0	1,1	1,0	1,1	1,09
		2,7	1,0	1,0	0,7	0,6	
<i>Neofusicoccum australe</i>	M	1,0	1,25	1,05	1,2	1,0	1,12
		1,15	1,0	1,0	1,15	1,4	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	M	0,7	1,1	0,8	1,0	0,8	0,89
		1,0	0,85	0,95	1,1	0,6	
<i>L. theobromae</i>	M	0,7	0,7	0,5	0,8	0,5	0,67
		0,7	0,7	0,5	0,8	0,8	
Control (PDA)	C	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	

Continuación Tabla 5 Largo de lesión producida por la inoculación de aislamientos obtenidos de síntoma sobre ramas sanas de peral, manzano y duraznero a los 40 días de inoculación en condiciones de campo

Especie	Origen	Manzano					Promedio
		Replicas					
<i>Diaporthe</i> sp.1	P	0,9	0,75	1,0	0,8	0,75	0,84
		0,8	0,9	0,7	0,9	0,85	
<i>Diaporthe infecunda</i>	P	0,9	1,1	0,8	1,0	0,9	1,10
		1,1	1,1	2,05	0,9	1,15	
<i>Diaporthe oxe</i>	P	1,0	0,7	0,9	0,7	0,8	0,83
		0,8	0,75	0,9	0,9	0,8	
<i>Diaporthe eres</i>	M	0,9	0,9	1,15	1,2	0,8	0,96
		1,1	1,0	0,7	1,0	0,8	
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	P	1,2	1,0	1,35	1,0	1,2	1,15
		1,0	1,4	1,15	0,9	1,25	
<i>Diplodia seriata</i>	D	0,6	0,7	0,6	0,7	0,7	0,69
		0,6	0,7	0,6	0,9	0,8	
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	D	0,8	1,0	0,75	0,7	0,8	0,81
		0,9	0,85	0,85	0,7	0,75	
<i>Diplodia mutila</i>	P	0,7	0,7	0,65	0,9	1,1	0,87
		0,7	1,0	1,3	0,7	0,9	
<i>Neofusicoccum australe</i>	M	1,0	1,25	1,05	1,2	1,0	1,12
		1,15	1,0	1,0	1,15	1,4	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	M	0,7	1,1	0,8	1,0	0,8	0,89
		1,0	0,85	0,95	1,1	0,6	
<i>L. theobromae</i>	M	0,7	0,8	0,85	0,8	0,6	0,76
		0,8	0,8	0,9	0,5	0,8	
Control (PDA)	C	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	

Continuación Tabla 5 Largo de lesión producida por la inoculación de aislamientos obtenidos de síntoma sobre ramas sanas de peral, manzano y duraznero a los 40 días de inoculación en condiciones de campo

Especie	Origen	Durazno					Promedio
		Replicas					
<i>Leucostoma persoonii</i>	D	1,0	1,0	1,3	0,9	1,3	1,47
		2,4	2,3	2,3	1,0	1,2	
<i>Diaporthe infecunda</i>	P	2,1	1,2	1,2	1,3	1,3	1,51
		1,3	1,1	2,1	2,0	1,5	
<i>Diaporthe oxe</i>	P	2,1	1,5	1,8	0,9	1,0	1,50
		1,4	1,5	1,3	1,6	1,9	
<i>Diaporthe eres</i>	M	1,7	1,7	2,4	2,3	3,5	2,65
		3,5	2,4	3,2	1,5	4,3	
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	P	1,5	1,9	1,9	1,9	1,4	1,72
		1,7	1,7	2,0	1,7	1,5	
<i>Diplodia seriata</i>	D	0,7	0,8	1,0	1,5	0,8	0,87
		0,6	0,7	1,0	1,0	0,6	
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	D	1,0	0,9	1,0	1,4	0,9	0,98
		1,0	0,8	1,0	0,9	0,9	
<i>Diplodia mutila</i>	P	2,3	2,5	1,9	2,2	2,3	2,23
		2,1	2,1	2,2	2,8	1,9	
<i>Neofusicoccum australe</i>	M	1,6	1,4	1,3	1,5	2,0	1,69
		2,0	1,6	2,3	1,5	1,7	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	M	0,9	1,0	1,1	0,9	2,0	1,22
		1,2	1,6	1,3	1,1	1,1	
<i>L. theobromae</i>	M	1,4	1,4	1,3	1,2	0,8	1,25
		1,3	1,7	1,1	1,5	0,8	
Control (PDA)	C	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	

Tabla 6 Número de ramas de peral, manzano y duraznero con desarrollo de lesión a los 40 días de inoculación en condiciones de campo

Especie	Origen	Nº de ramas con lesión		
		Peral	Manzano	Duraznero
<i>Diaporthe infecunda</i>	P		10	10
<i>Diaporthe oxe</i>	P	10	10	10
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	P		10	10
<i>Diaporthe sp.1</i>	P		10	
<i>Diaporthe eres</i>	M	10	10	10
<i>Leucostoma persoonii</i>	D			0
<i>Diplodia mutila</i>	P	10	10	10
<i>Diplodia seriata</i>	D		10	10
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	D		10	10
<i>Neofusicoccum australe</i>	M	10	10	10
<i>Neofusicoccum parvum</i>	M	9	10	10
<i>L. theobromae</i>	M	10	10	10
Control (PDA)	C	0	0	0

Tabla 7 Número de ramas de peral, manzano y duraznero con re-aislamiento positivo

Especie	Origen	Nº de ramas con re-aislamiento		
		Peral	Manzano	Duraznero
<i>Diaporthe infecunda</i>	P		8	9
<i>Diaporthe oxe</i>	P	5	10	6
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	P		9	10
<i>Diaporthe sp.</i>	P		10	
<i>Diaporthe eres</i>	M	7	9	8
<i>Leucostoma persoonii</i>	D			0
<i>Diplodia mutila</i>	P	8	10	10
<i>Diplodia seriata</i>	D		10	8
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	D		6	4
<i>Neofusicoccum australe</i>	M	9	10	7
<i>Neofusicoccum parvum</i>	M	9	10	10
<i>L. theobromae</i>	M	9	10	6
Control (PDA)	C	0	0	0

Los resultados parciales de esta tesis han sido publicados en una revista arbitrada, la cual se adjunta a continuación y actualmente se encuentran en redacción tres artículos.

*Sessa, L., Abreo, E., Bettucci, L., & Lupo, S. 2016. Botryosphaeriaceae species associated with wood diseases of stone and pome fruit trees: symptoms and virulence across different hosts in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*. DOI 10.1007/s10658-016-0936-4

**Diaporthe* species associated with wood diseases of stone and pome fruit trees: symptoms and virulence across different hosts in Uruguay. – En redacción.

*First report of *Pseudofusicoccum* sp. associated with wood diseases of stone and pome fruit trees in Uruguay. – En redacción.

*Endophytes and unfrequent pathogens associated with stone and pome fruit trees in Uruguay. – En redacción

Botryosphaeriaceae species associated with wood diseases of stone and pome fruits trees: symptoms and virulence across different hosts in Uruguay

Lucia Sessa · Eduardo Abreo · Lina Bettucci · Sandra Lupo

Accepted: 11 April 2016

© Koninklijke Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging 2016

Abstract Apple, pear and peach orchards are usually planted in close proximity, and they might share pathogenic fungal species affecting different plant organs. In particular, species of Botryosphaeriaceae have been indicated as responsible for wood diseases in these fruit species. Symptoms frequently observed in Uruguay include papyraceous cankers in apple trunks, dead shoots in pears, and gummosis in peach shoots and branches. Symptomatic tissues of these species were sampled, and fungi resembling species within Botryosphaeriaceae were isolated and identified based on phylogenetic analysis of the internal transcribed spacer region (ITS), part of the translation elongation factor 1- α gene (EF1- α) and part of the RNA polymerase II subunit gen (RPB2). Pathogenicity of selected isolates was assessed under laboratory and field conditions. *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum* were isolated from the three hosts from symptomatic tissues. However, only *N. parvum* proved to be pathogenic when inoculated on trees of all three species, while *D. seriata* showed pathogenicity towards apple and peach trees only. *Diplodia mutila* and *N. australe* were isolated less frequently and not from all the host species. However, they were the most virulent based on lesion length on all tested plant species. The fact that

fungal isolates obtained from one host could cause disease symptoms also in some of the alternative hosts suggests that cross infections are possible between apple, pear and peach trees. Finally, *Diplodia pseudoseriata* in *Prunus persica* and *Diplodia mutila* in *Pyrus communis*, are new records for these hosts in Uruguay.

Keywords Apple · Pear · Peach · Wood disease · Fungi

Introduction

Botryosphaeriaceae species are known to be the causal agents of several wood disease symptoms in stone and pome fruit trees including dieback, cankers in twigs, branches and main trunks, root cankers, decline, and in some cases death of whole trees (Pusey et al. 1995; Slippers et al. 2007; van Niekerk et al. 2011).

Worldwide, *Botryosphaeria* canker affects apple and pear trees and it is caused by *Botryosphaeria dothidea* and *Diplodia seriata*, *B. dothidea* affects trunks, twigs and also fruits. The external cortex of the canker turns orange or brown and exhibits a papyraceous texture. *Botryosphaeria dothidea*, *D. seriata* as well as *Lasiodiplodia theobromae* can also cause gummosis canker on peach trees (Britton and Hendrix 1989; Crous et al. 2006; Pusey 1993). *Diplodia seriata* is common on peach worldwide and has been found on apricot in USA, and on peach and plum wood in South Africa (Slippers et al. 2007). In addition, Slippers et al. (2007) found *Neofusicoccum australe* associated with dieback symptoms of stone fruit trees. Additional species

L. Sessa (✉) · L. Bettucci · S. Lupo
Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá, 4225 Montevideo, Uruguay
e-mail: luciasessaj@gmail.com

E. Abreo
Laboratorio de Bioproducción, INIA Las Brujas, Ruta 48 Km.10, Canelones, Uruguay

described from *Prunus* spp. include *Neofusicoccum australe* from *Prunus armeniaca* and *Prunus persica*, *N. vitifusiforme* from *P. persica* and *P. salicina*, *Dothiorella viticola* from *P. persica* var. *nucipersica* and *Diplodia pinea* from *P. persica* in South Africa (Damm et al. 2007). *Neofusicoccum parvum* was found on pear trees in Taiwan showing cankers and dieback (Shen et al. 2010) and *Diplodia mutila* was found on necrotic plum wood in South Africa (Damm et al. 2007).

In Uruguay, apple (*Malus domestica*), peach (*Prunus persica*) and pear (*Pyrus communis*) orchards occupy an estimated area of 7300 ha. Due to their climate requirements these deciduous species are grown mostly in the south of the country, where orchards of the three species are usually set in close proximity to each other and to vineyards. Since several botryosphaeraceous species have been reported associated with grapevines (Abreo et al. 2013) and with disease symptoms occurring on young shoots of apple trees in Uruguay (Delgado 2013), it seemed relevant to survey orchards to determine the existence of commonly shared fungal pathogens. Hence, the main aims of this study were to describe the symptoms of wood diseases in apple, pear and peach trees in Uruguay, to identify the species of Botryosphaeriaceae associated with them and evaluate their pathogenicity in cross-inoculations among the three host species.

Materials and methods

Sampling and fungal isolation

A field sampling was conducted on several cultivars of apple, pear and peach trees in commercial orchards from five fruit producing areas in Uruguay between January 2013 and July 2014 (Table 1). Most of the orchards were located in the south (Canelones and San Jose regions), and a few in the warmer northern territories (Paysandú, Salto and Tacuarembó) and all were run under integrated pest management strategies. Wood samples with symptoms such as cankers, gummosis, dead shoots, internal wood necrosis, shoot blights and dieback were collected (Fig. 1). In total 96 symptomatic trees were sampled: 39 from eight apple orchards, 41 from nine peach orchards and 16 from four pear orchards. Bark of the samples was removed, and symptomatic wood was surface-disinfected by sequential immersion in 70 %

ethanol for 60 s and 4 % NaOCl for 90 s, then washed with distilled sterile water and dried with sterilized paper. Pieces of xylem (2 × 2 mm) were excised from the margins between necrotic and healthy tissue and placed on 2 % potato-dextrose agar (PDA) amended with lactic acid (pH 4.5). Plates were incubated at 25 °C under 12 h light/dark periods until growth was detected. Subcultures were made from the growing hyphae onto fresh PDA plates and incubated under the same conditions. Typical isolates were selected for morphological and sequence analysis (Table 1).

Molecular characterization and phylogeny

Preliminary identification of isolates was performed using cultural, micro and macro morphological characteristics. All isolates were stored in the culture collection of the Mycology Laboratory of the Universidad de la República (UdelaR) in PDA plugs immersed in water and maintained at 4 °C.

Fungal genomic DNA was extracted from mycelium of pure fungal colonies after 10–14 days of growth on PDA according to the protocol of Lee and Taylor (1990) and used in PCR amplification of the internal transcribed spacer region ITS1 and ITS2, including the 5.8S subunit, using primers ITS5 and ITS4 (White et al. 1990). Additional primers for amplification were selected according to the taxa. Part of the translation elongation factor 1-alpha gene (EF1- α) was amplified using the primers EF1-728F and EF1-986R (Carbone and Khon 1999) for isolates identified as *Neofusicoccum australe/luteum*, *Diplodia seriata/pseudoseriata*, *Diplodia mutila*, *Pseudofusicoccum* sp. and *Lasioidiplodia* sp. Similarly, for the *Neofusicoccum parvum/ribis* complex, part of the RNA polymerase II subunit gen (RPB2) was amplified using the primers RPB2bot6F and RPBRbot7R (Sakalidis 2004). Conditions for each PCR were as described by the references cited above. PCR products were stained with EZ vision®One (Amresco®) and visualized on 1 % agarose gel under UV light. PCR products were purified and sequenced by Macrogen (Seoul, Korea). Sequences were submitted to GenBank (Table 1).

Sequences obtained were assembled and manually corrected using MEGA version 6 software (Tamura et al. 2013). Phylogenetic analyses of the newly generated sequences and reference sequences from GenBank were performed by maximum parsimony with PAUP 4.0b10

Table 1 Isolates of Botryosphaeriaceae species included in the phylogenetic analyses, genes sequenced and GenBank accession numbers

Species	Isolate	Host	Origin	GenBank no.		
		Species	Cultivar	ITS	EF-1 α	Rpb2
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW8000*	<i>Prunus</i> sp.		Switzerland	AY236949	
	Fi2314	<i>Malus domestica</i>	Unknown	Canelones, Uruguay	KR002818	
	Fi2311	<i>Malus domestica</i>	Cripps Pink	Canelones, Uruguay	KR002815	
	Fi2312	<i>Malus domestica</i>	Cripps Pink	Canelones, Uruguay	KR002816	
	Fi2313	<i>Malus domestica</i>	Cripps Pink	Canelones, Uruguay	KR002817	
	Fi2315	<i>Malus domestica</i>	Red Chief	San José, Uruguay	KR002819	
<i>Diplodia mutila</i>	CBS112553*	<i>Vitis vinifera</i>		Portugal	AY259093	AY573219
	Fi2317	<i>Malus domestica</i>	Cripps Pink	Canelones, Uruguay	KR002821	
	Fi2316	<i>Pyrus communis</i>	Williams	Paysandú, Uruguay	KR002820	KT191040
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	UY788*	<i>Blepharocalyx salicifolius</i>		Uruguay	EU080927	EU863181
	UY1263	<i>Myrciaria tenella</i>		Uruguay	EU080933	
	Fi2356	<i>Prunus persica</i> L.	Unknown	Uruguay	KJ364519	
	Fi2357	<i>Prunus persica</i> L.	Early Grande	Uruguay	KJ364520	KT191037
	Fi2358	<i>Prunus persica</i> L.	Early Grande	Uruguay	KJ364521	KT191038
<i>Diplodia seriata</i>	CBS112555*	<i>Vitis vinifera</i>		Portugal	AY259094	AY573220
	CBS119049	<i>Vitis</i> sp.		Italy	DQ458889	
	Fi2344	<i>Malus domestica</i>	Baigent	Canelones, Uruguay	KR023634	
	Fi2345	<i>Malus domestica</i>	Red Chief	Canelones, Uruguay	KR023635	
	Fi2346	<i>Prunus persica</i> L.	Pavia Moscatel	Canelones, Uruguay	KR023636	
	Fi2347	<i>Malus domestica</i>	Baigent	Canelones, Uruguay	KR023637	
	Fi2348	<i>Prunus persica</i> L.	Pavia Moscatel	Canelones, Uruguay	KR023638	
	Fi2349	<i>Pyrus communis</i>	Williams	Paysandú, Uruguay	KR023639	
	Fi2350	<i>Pyrus communis</i>	Williams	Canelones, Uruguay	KR023640	
	Fi2351	<i>Pyrus communis</i>	Pavia Moscatel	Canelones, Uruguay	KR023641	
	Fi2352	<i>Prunus persica</i> L.	Unknown	Canelones, Uruguay	KR023642	
	Fi2353	<i>Malus domestica</i>	Red Chief	Canelones, Uruguay	KR023643	KT191032
	Fi2354	<i>Pyrus communis</i>	Williams	Canelones, Uruguay	KR023644	
	Fi2355	<i>Prunus persica</i> L.	Pavia Moscatel	Canelones, Uruguay	KR023645	
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	CBS115038	<i>Malus pumila</i>		Netherlands	AY573206	
	CMW39370	<i>Cedrus atlantica</i>		Serbia	KF575011	
<i>Lasiodiplodia parva</i>	CBS456.78*	<i>Cassava</i> -field soil		Colombia	EF622083	EF622063
	CBS356.59	<i>Theobromae cacao</i>		Sri Lanka	EF622082	EF622062
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CBS456.78*	<i>Gmelina arborea</i>		Costa Rica	EF622077	EF622057
	CBS447.62	<i>Citrus aurantium</i>		Suriname	EF622081	EF622060
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CBS164.96*	Fruit on coral reef coast		New Guinea	AY640255	
	CBS111530				EF622074	EF622054
	Fi2359	<i>Malus domestica</i>	Cripps Pink	Paysandú, Uruguay	KR071127	KT191041
<i>Neofusicoccum australe</i>	CMW6837*	<i>Acacia</i> sp.		Australia	AY339262	AY339270
	CMW9073	<i>Acacia</i> sp.		Australia	AY339261	AY339269
	CMW3386	<i>Wollemia nobilis</i>		Australia	AY615165	AY615157
	V449	<i>Vitis</i> sp.		Uruguay	JX271822	JX283452
	Fi2318	<i>Malus domestica</i>	Red Chief	Canelones, Uruguay	KR002823	KT191042
	Fi2319	<i>Malus domestica</i>	Red Chief	Canelones, Uruguay	KR002822	
<i>Neofusicoccum cordaticola</i>	CMW14056*	<i>Syzygium cordatum</i>		South Africa		EU821933
	CMW13992	<i>Syzygium cordatum</i>		South Africa		EU821928

Table 1 (continued)

Species	Isolate	Host	Origin	GenBank no.	
<i>Neofusicoccum</i>	V303	<i>Vitis</i> sp.	Uruguay	JX271829	JX83446
<i>kwambonambiense</i>	CMW14023*	<i>Syzygium cordatum</i>	South Africa		EU821930
	MUCC210	<i>Corymbia torrelliana</i>	Australia		EU339564
<i>Neofusicoccum luteum</i>	CBS110299*	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	AY259091	AY573217
	CMW10310	<i>Vitis</i>	Portugal		AY339267
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CMW9081*	<i>Populus nigra</i>	New Zeland	AY236943	AY236888
	CMW9078	<i>Actinidia deliciosa</i>	New Zeland	AY236940	AY236885
	CMW9079	<i>Actinidia deliciosa</i>	New Zeland		EU863166
	CMW9080	<i>Populus nigra</i>	New Zeland		EU821962
	Fi2320	<i>Prunus persica</i> L.	Flor Dakin	Salto, Uruguay	<i>KR002824</i>
	Fi2363	<i>Prunus persica</i> L.	Flor Dakin	Salto, Uruguay	<i>KT191028</i>
	Fi2321	<i>Prunus persica</i> L.	Flor Dakin	Salto, Uruguay	<i>KR002825</i>
	Fi2322	<i>Pyrus communis</i>	Williams	Paysandú, Uruguay	<i>KR002826</i>
	Fi2323	<i>Pyrus communis</i>	Williams	Paysandú, Uruguay	<i>KR002827</i>
	Fi2324	<i>Pyrus communis</i>	Williams	Paysandú, Uruguay	<i>KR002828</i>
	Fi2325	<i>Pyrus communis</i>	Williams	Paysandú, Uruguay	<i>KR002829</i>
	Fi2326	<i>Malus domestica</i>	Cripps Pink	San José, Uruguay	<i>KR002830</i>
	Fi2327	<i>Malus domestica</i>	Cripps Pink	Canelones, Uruguay	<i>KR002831</i>
	Fi2328	<i>Malus domestica</i>	Red Chief	Canelones, Uruguay	<i>KR002832</i>
	Fi2329	<i>Malus domestica</i>	Red Chief	Canelones, Uruguay	<i>KR002833</i>
	Fi2330	<i>Pyrus communis</i>	Williams	Canelones, Uruguay	<i>KR002834</i>
	Fi2331	<i>Pyrus communis</i>	Williams	Canelones, Uruguay	<i>KR002835</i>
<i>Neofusicoccum ribis</i>	CMW7772*	<i>Eucalyptus ribis</i> sp.	U.S.A	AY236935	EU821958
	CMW7773	<i>Eucalyptus ribis</i> sp.	U.S.A	AY236936	
	CMW7054	<i>Ribes</i> sp.	U.S.A		EU821960
<i>Neofusicoccum umdonicola</i>	CMW14096*	<i>Syzygium cordatum</i>	South Africa		EU821943
	CMW14058	<i>Syzygium cordatum</i>	South Africa		EU821934
<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	Fi2364	<i>Prunus persica</i> L.	Early Grande	Canelones, Uruguay	<i>KT191029</i>
<i>Pseudofusicoccum adansoniae</i>	CMW26147			KF766220	EF585571
<i>Pseudofusicoccum ardesiacum</i>	CBS122062			KF766221	EU144075
<i>Pseudofusicoccum kimberleyense</i>	CBS122058			KF766222	EU144072
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	CBS117448			KF766223	KF766437
<i>Pseudofusicoccum violaceum</i>	CMW22679	<i>Pterocarpus angolensis</i>	South Africa	FJ888447	FJ888442

Sequence numbers in italics were obtained in the present study. All others were retrieved from GenBank. Letters in bold correspond to isolates used in the Pathogenicity trials

na data not available

*indicates ex-type

(Swofford 2002) by means of heuristic search option with simple taxa addition and tree bisection, and reconnection used as the branch-swapping algorithm. All characters were treated as unordered and of equal weight. Support of the nodes was determined by

analysis of 1000 bootstrap replicates (Hills and Bull 1993). Tree length (TL), consistency index (CI), and retention index (RI), were calculated. Alignments and trees were submitted to TreeBase (codes 17,894, 17,887, 17,895).



Fig. 1 Disease symptoms observed in twigs, branches and trunks of apple (a–h), peach (i, k) and pear (l) trees in Uruguay orchards a, b Internal brown necrosis, c Wedge-shaped necrosis, d, e Papyraceous canker, f Trunk sunken canker, g Streaked trunk, h

Small ellipsoid trunk cankers, i Canker with gummosis, internal necrosis, j Internal necrosis, k Wedge-shaped necrosis, l Apical dead shoot

Pathogenicity trials

Representative isolates of the identified species were included in a preliminary pathogenicity trial on detached shoots in the laboratory (Table 1). *Pseudofusicoccum* sp. was not included as it was not identified until later. One isolate of each species was inoculated in 1 year-old detached shoots of apple (cv. Red Chief), peach (cv. Dixieland) and pear (cv. Williams). Shoots were cut into 20 cm long segments, rinsed with tap water, surface disinfected with 70 % ethanol for 60 s and dried with sterile paper. A superficial wound was made on an intermediate internode using a disinfected blade. A 4-mm mycelium agar plug from a 1-week-old culture was placed in the wound and wrapped with parafilm. Each fungal isolate was inoculated in five shoots of each host species. Negative control comprised five shoots inoculated with non-colonized agar plugs. Shoots were placed into sterile nylon bags in a randomized block design consisting on three blocks or incubation chambers. Shoots were incubated at 25 °C under black light in moist chambers (RH > 90 %). Number of shoots with

necrosis and extent of lesions were evaluated after 20 days.

A second pathogenicity test using selected Botryosphaeriaceae isolates from the previous trial was conducted under field conditions on 1-year-old shoots of apple (cv. Red Chief), peach (cv. Dixieland) and pear (cv. Williams) trees. *B. dothidea* Fi2314 which showed no pathogenic activity in the preliminary test was not included for any host, while *D. pseudoseriata* and *D. seriata* were not included in the pear trial because they did not cause any symptom in this host in the laboratory trial. Ten shoots from last year growth (one shoot per tree) were inoculated with each fungal isolate in winter of 2014. A superficial wound was made on the internodes using a disinfected blade. A 4-mm mycelium agar plug from a 1-week-old culture was placed in the wound and wrapped with parafilm. Negative controls consisted of shoots inoculated with non-colonized agar plugs. Shoots were inspected for lesion development after 30 days post-inoculation; peach shoots were removed at day 30 when shoot necrosis was evident, placed in nylon bags and brought to the laboratory for

(Fig. 2). The first group comprised 12 isolates that formed a clade with sequences of *D. seriata* (62.8 % bootstrap support) and two sequences that formed a sub-clade with sequences of *D. pseudoseriata* (72 % bootstrap support). The second group was formed by two isolates that clustered with *D. mutila* (92 % bootstrap support). The third group contained isolate Fi2359 that formed a clade with sequences of *Lasiodiplodia* spp. (bootstrap support 87.4 %). The fourth clade was formed by five isolates that grouped with sequences of *B. dothidea* (99.8 % bootstrap support). Isolate Fi2318 formed the fifth group clustering with sequences of *N. australe/luteum* (bootstrap support of 96.6 %). Seven isolates comprised the sixth clade (69.2 % bootstrap support) with sequences of the *N. parvum/ribis* complex and therefore could not be fully resolved. The last group consisted of isolate Fi2364 that formed a clade with sequences of *Pseudofusicoccum* spp. (100 % bootstrap support).

Sequences of RNA polymerase II subunit gene (RPB2) of isolates within the *N. parvum/ribis* complex were used in a phylogenetic analysis with sequences retrieved from GenBank. Of totally 506 characters 480 were constant, and 14 were parsimony informative. After the heuristic search, the two most parsimonious trees were retained (TL = 27, CI = 0.9630, RI = 0.9744). One tree (Fig. 3) showed that all sequences analyzed formed a clade (85.5 % bootstrap support) with sequences of *N. parvum* including ex-type CMW9081 separated from other species (96.5 % bootstrap support).

Finally, a phylogenetic analysis was performed using concatenated EF1- α and ITS sequences of isolates in the *Diplodia* and *Lasiodiplodia* clusters and in the *N. australe/luteum* group that could not be fully resolved in the ITS phylogeny. Of 618 total characters, 474 were constant and 139 were parsimony informative. After a heuristic search the six most parsimonious trees were retained (TL = 241, CI = 0.7884, HI = 0.2116, RI = 0.9530). One of the trees (Fig. 4) showed that isolate Fi2364 clustered with sequences of *Pseudofusicoccum* spp. (100 % bootstrap support). Isolates Fi2357 and Fi2358 formed a group with the ex-type sequence of *D. pseudoseriata* UY788, separated from the *D. seriata* clade (70.7 % bootstrap support). Isolate Fi2316 grouped with a sequence of *D. mutila* ex-type CBS112553 (100 % bootstrap support). Isolate Fi2359 clustered with a sequence of *L. theobromae* (84 % bootstrap support) and isolate Fi2318 clustered with *N. australe* sequences (98.8 % bootstrap support).

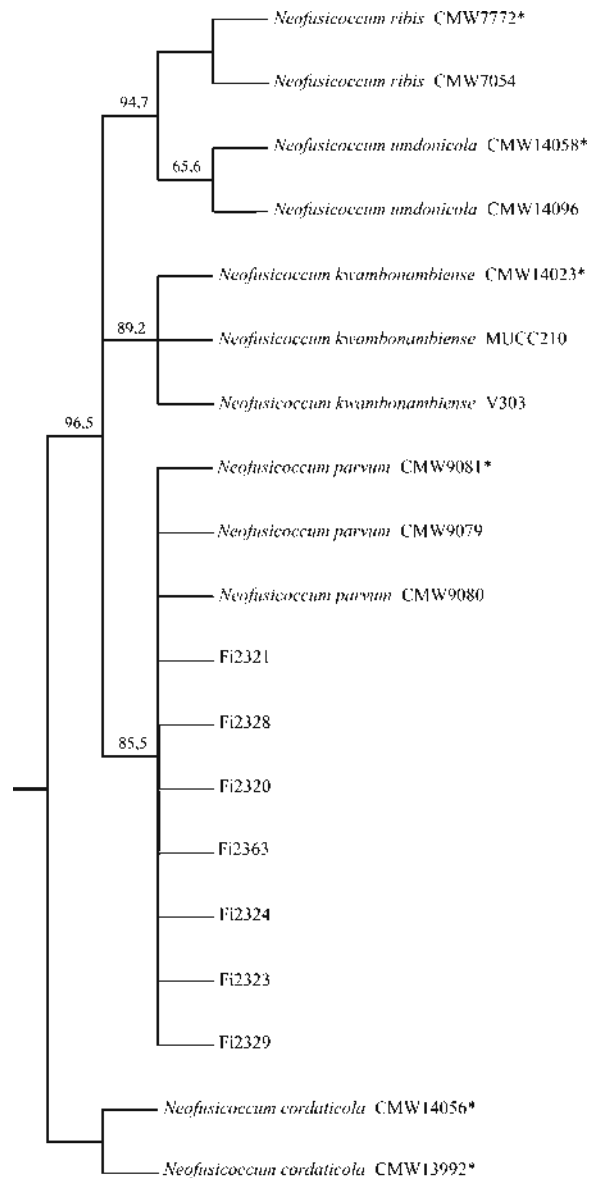


Fig. 3 One of 2 most parsimonious trees resulting from the analysis of sequences of the RNA polymerase II subunit (RPB2). Maximum-parsimony bootstrap support values based on 1000 replicates are shown in the nodes. Ex-type isolates are highlighted with an asterisk. The tree is rooted with two *Neofusicoccum cordaticola* isolates

Fungi and symptoms

Symptoms observed in the field survey included twig and branch cankers, gummosis, dead shoots and twigs and internal wood necrosis (Fig. 1).

The three botryosphaeriaceous species most frequently isolated in this study were *D. seriata* (29 %),

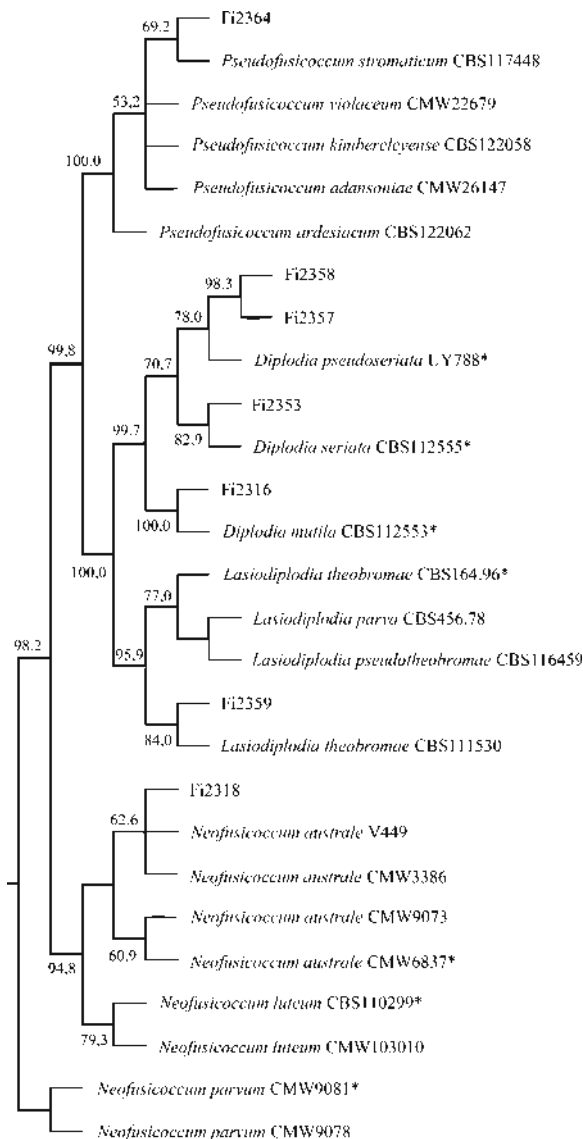


Fig. 4 One of 6 most parsimonious trees resulting from the analysis of combined ITS and partial elongation factor 1 α (EF1- α). Maximum-parsimony bootstrap support values based on 1000 replicates are shown in the nodes. Ex-type isolates are highlighted with an asterisk. The tree is rooted with two *Neofusicoccum parvum* isolates

N. parvum (27 %) and *B. dothidea* (24 %). Most of the isolates of *D. seriata* (51 %) and *B. dothidea* (77 %) were retrieved from apple trees while most of the *N. parvum* isolates (54 %) were from pear trees. These species were isolated from wood samples showing different symptoms in the three hosts and collected from multiple orchards in several fruit producing areas.

Botryosphaeria dothidea in apple trees was associated with branch and trunk papyraceous cankers (Fig. 1d and e), shoot and trunk brown cankers, small ellipsoid trunk cankers (Fig. 1h), twig necrosis and wedge-shaped necrosis (Fig. 1c). In peach and pear it was observed in necrotic twigs. *Neofusicoccum parvum* in apple trees was associated with internal brown necrosis (Fig. 1a and b), wedge-shaped necrosis (Fig. 1c), trunk sunken cankers (Fig. 1f) and papyraceous cankers. On peach and pear trees it was isolated from necrotic twigs and black cankers displaying wedge shaped necrosis when cross sectioned. *Diplodia seriata* was found in internal brown necrosis, twig cankers and apical dead shoots (Fig. 1i) on apple, peach and pear trees; in apple it was also associated with papyraceous cankers.

Other botryosphaeriaceous species, isolated in lower frequencies, were related with a particular symptom on a specific host and often isolated from a particular location. For example *N. australe* (11 %) was only found associated with apple branches showing papyraceous cankers sampled from an orchard of cv. Red Chief located in the southern region of Uruguay. *Diplodia pseudoseriata* (1 %) was found in cv. Early Grande peach trees showing twigs with internal necrotic xylem (Fig. 1j) and *L. theobromae* (3 %) occurred associated with streaked trunk cankers (Fig. 1g) on cv. Cripps Pink apple trees growing in the northern, warmer region of the country. *Diplodia mutila* (2 %) was observed in trunk cankers of cv. Cripps Pink apple trees and on apical dead shoots of cv. Williams pear trees. *Pseudofusicoccum* sp. (3 %) was isolated from cv. Early Grande peach branches showing cankers with gummosis, and internal necrosis when cross sectioned (Fig. 1i and k).

Pathogenicity trials

The preliminary laboratory test showed that isolates of all tested species except *B. dothidea* produced lesion in at least one host. *D. mutila*, *N. parvum*, *N. australe* and *L. theobromae* produced lesions on all three hosts and *D. seriata* and *D. pseudoseriata* produced lesions on apple and peach only (data not shown). Therefore, in addition to *B. dothidea*, *D. seriata* and *D. pseudoseriata* were not selected for inoculation in pear trees in the field trial.

The field experiment showed that apple, peach and pear cultivars were susceptible to all inoculated botryosphaeriaceous species (Table 2), confirming the results observed in the laboratory trial. Mean lesion

Table 2 Number of shoots (of 10) developing a lesion after artificial inoculation of six Botryosphaeriaceous species on peach, apple and pear trees, mean lesion lengths and number of shoots with positive re-isolation of individual isolates

Fungal species	Number of shoots with lesion			Mean of lesion length (mm) ^a			Number of shoots with positive re-isolation		
	Peach	Apple	Pear	Peach	Apple	Pear	Peach	Apple	Pear
<i>Diplodia mutila</i>	10	10	10	22,3 a	8,7 ab	10,9 ab	10	10	8
<i>D. pseudoseriata</i>	10	10	ND	9,8 c	8,1 b	ND	4	6	ND
<i>D. seriata</i>	10	10	ND	8,7 c	6,9 b	ND	8	10	ND
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	10	10	10	12,5 bc	7,6 b	6,7 b	6	10	9
<i>N. australe</i>	10	10	10	16,9 ab	12,0 a	11,2 a	7	10	9
<i>N. parvum</i>	10	10	9	12,2 bc	12,9 a	8,8 b	10	10	9
Agar plug	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ND not determined

^a Means followed by different letter are significantly different ($P = 0.05$)

lengths ranged from 8.7 to 22.3 mm on peach, 6.9 to 12.9 mm on apple and 6.7 to 11.2 mm on pear shoots. The most virulent species on peach were *D. mutila* and *N. australe* and the least virulent were *D. seriata* and *D. pseudoseriata*. On apple, the most virulent species were *N. parvum* and *N. australe* followed by *D. mutila*. On pear shoots, *N. australe* and *D. mutila* were the most virulent species followed by *N. parvum* and *L. theobromae* which did not differ significantly from each other. Control shoots showed no symptoms.

All six Botryosphaeriaceae species were reisolated from the margins of necrotic tissues of peach, apple and pear shoots showing significant difference from symptomless control shoots where no fungi were isolated.

Discussion

Deciduous fruit trees growing in temperate regions are prone to exhibit a wide range of wood symptoms caused by several fungal species. In this study eight species of Botryosphaeriaceae, including an unknown *Pseudofusicoccum* sp., were associated with wood disease symptoms of apple, pear and peach trees. These included *B. dothidea*, *D. seriata*, *D. pseudoseriata*, *D. mutila*, *N. parvum*, *N. australe* and *L. theobromae*.

Diplodia pseudoseriata on *P. persica* and *D. mutila* on *P. communis* are new records in these hosts in Uruguay.

Botryosphaeria dothidea, *D. seriata* and *N. parvum* were the three species most frequently isolated in this study. These are common pathogens of pome and stone

fruit trees worldwide (Damm et al. 2007; Slippers et al. 2007; Cloete et al. 2011) and are often isolated in incidence studies of botryosphaeriaceous fungi (Mehl et al. 2011). *Neofusicoccum parvum* was also the most frequent botryosphaeriaceous species found in Uruguay in grapevines (Abreo et al. 2013). The symptoms observed in this study associated with these species included internal wood necrosis, papyraceous cankers and twig and shoot cankers. These species were present in symptomatic tissues in the three host species, which suggests their capability to invade the three hosts and be responsible for the observed wood disease symptoms. However, in the pathogenicity trials, only *N. parvum* produced necrosis in the laboratory and field experiment in all three hosts, while *D. seriata* only produced symptoms in apple and peach trees and *B. dothidea* failed to produce symptoms in any host in the favorable conditions of the laboratory experiment. Although this species has often been associated with disease symptoms in several hosts (Crous et al. 2006; Úrbez-Torres and Gubler 2009), it has also been reported that some Uruguayan isolates of *B. dothidea* were not pathogenic when inoculated in *Eucalyptus grandis* stems (Pérez et al. 2010) and detached shoots of *Vitis vinifera* (Abreo 2011). The isolate of *B. dothidea* from the present investigation might be another non-pathogenic strain of this species. Further work is required to characterize and analyze the differences in pathogenicity among local populations of this species.

Other species were rarely found, and were often associated with one host species and to a specific symptom. *Neofusicoccum australe* was found associated with

papyraceous cankers in apple trees. This species is known to be very virulent on grapevine (Linaldeddu et al. 2010; Cloete et al. 2011), and it has also been reported associated with apple, pear, plum, almond and grapevine diseases worldwide (Van Niekerk et al. 2004, 2006; Damm et al. 2007; Slippers et al. 2007; Cloete et al. 2011). In grapevines in Uruguay, it was isolated only from asymptomatic canes from mother plants (Abreo et al. 2013), and its presence in apple bark cankers was recently reported in low frequencies (Delgado 2013). In our study *N. australe* was found associated with a specific symptom in a specific apple orchard. However, the pathogenicity trials revealed high virulence of this isolate to the three inoculated hosts, similarly to Cloete et al. (2011) who showed its virulence to grapevines, apple and pear trees.

Lasiodiplodia theobromae was obtained from a single apple orchard in the warmer northern territory. In previous studies in Uruguay, it was also found associated with apple bark cankers (Delgado 2013) and symptoms of die-back on *V. vinifera* but in very low frequency (Abreo et al. 2013). This species is regarded as one of the most important grapevine pathogens associated with cankers, dieback, and dead arm symptoms on *V. vinifera* in Mexico and California (Úrbez-Torres et al. 2008 and 2009), Perú (Rodríguez-Gálvez et al. 2014) and other warm regions in America. In this study, *L. theobromae* isolated from apple was pathogenic on apple, pear and peach trees. Low isolation frequencies of *L. theobromae* in Uruguay and other temperate regions could be due to lower temperatures than the optimal range which has been determined for this species (Úrbez-Torres et al. 2010).

Diplodia mutila was found on apple and pear trees and although it was previously reported on apple (Delgado 2013) this is the first time this species is associated with pear. This species was also reported associated with necrotic plum (*Prunus salicina*) wood in South Africa (Damm et al. 2007), and previously reported on peach and apricot in New Zealand (Laundon 1973). Damm et al. (2007) found that *D. mutila* was pathogenic to nectarine and plum on a detached-shoots pathogenicity trial. The pathogenicity tests conducted on trees in the present study revealed that *D. mutila* isolated from pear was pathogenic to all three hosts, and it was also the most virulent isolate to *P. persica*.

Diplodia pseudoseriata is widely distributed in native *Myrtaceae* forests in Uruguay (Pérez et al. 2010)

and was recently reported associated with apple stem cankers (Delgado 2013). In this study *D. pseudoseriata* was only found on peach showing necrotic xylem, and represents a new record in this host. The pathogenicity tests revealed that this species can be pathogenic on peach and also on apple, although virulence was lower on this host.

Interestingly, all of the isolates tested in the field were capable of producing symptoms not only in the host from which they had been originally isolated, but also in at least one alternative host. This suggests that these strains have the potential to cause disease in alternative host species provided host jumps occur. Remarkably, three of the least frequent species *L. theobromae*, *D. mutila* and *N. australe* were intermediately and highly virulent to the three host species. This might indicate that some sort of containment through cultural practices or standard sanitary measures is actually in place, or climate conditions might not be conducive for the spread of these pathogenic fungi and the associated symptoms.

Several of the species found in this study are well-known pathogens of grapevine (van Niekerk et al. 2004; Taylor et al. 2005; Damm et al. 2007; Cloete et al. 2011; Gramaje et al. 2012) and thus it is not surprising to find them in *Prunus*, *Pyrus* and *Malus* in Uruguay, where, orchards of these species are often planted adjacent to each other, as well as to vineyards.

In conclusion, several wood disease symptoms in apple, pear and peach trees in Uruguay were described, and eight species of Botryosphaeriaceae including *Pseudofusicoccum* sp. were found associated with them. The pathogenicity of isolates that were evaluated in the field trial revealed the ability of most of these species to cross infect the different hosts. Therefore, orchards of the three hosts could be considered potential reciprocal sources of pathogenic botryosphaeriaceous species. Due to its high frequency, high virulence and its ability to produce disease symptoms in shoots of all three hosts, *N. parvum* may be regarded as the potentially most damaging species, requiring further epidemiological studies. The information from this study regarding the identification of Botryosphaeriaceae species, their associated symptoms and pathogenicity in stone and pome fruit trees should be taken into account when devising appropriate sanitary measures for the prevention and management of wood diseases in orchards and vineyards planted in proximity.

Acknowledgments We thank Universidad de la República and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) for financial support and Tec. Ag. Pablo Rodríguez at INIA Las Brujas for providing symptomatic samples.

References

- Abreo, E. (2011). *Comunidad fúngica asociada a las enfermedades del tronco de la vid en Uruguay: Composición, diagnóstico molecular y patogenicidad. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas*. UdelaR, Uruguay: PEDECIBA.
- Abreo, E., Martínez, S., Bettucci, L., & Lupo, S. (2013). Characterization of Botryosphaeriaceae species associated with grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology*, 42, 241–249.
- Britton, K. O., & Hendrix, F. F. (1989). Infection of peach buds by *Botryosphaeria obtusa*. *Plant Disease*, 73, 68–68.
- Carbone, I., & Khon, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91, 553–556.
- Cloete, M., Fourie, H. P., Damm, U., Crous, P. W., & 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, S176–S190.
- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Reheeder, J., Marasas, W. F. O., Phillips, A. J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., & Groenewald, J. Z. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55, 235–253.
- Damm, U., Crous, P. W., & Fourie, P. H. (2007). Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia*, 99, 664–680.
- Delgado, L. (2013). *Caracterización de especies de Botryosphaeriaceae asociadas al cultivo de manzano en Uruguay, Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, opción Microbiología*. UdelaR, Uruguay: PEDECIBA.
- Gramaje, D., Agustí-Brisach, C., Pérez-Sierra, A., Moralejo, E., Olmo, D., Mostert, L., Damm, U., & Armengol, J. (2012). Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain). *Persoonia*, 28, 1–13.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, 9.
- Hills, D. M., & Bull, J. J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42, 182–192.
- Laundon, G. F. (1973). *Botryosphaeria obtusa*, *B. stevensii* and *Othia spireae* in New Zealand. *Transactions of the British Mycological Society*, 61, 369–374.
- Lee, S., & Taylor, J. (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp. 282–287). New York: Academic Press.
- Linaldeddu, B. T., Scanu, B., Schiaffino, A., & Serra, S. (2010). First report of *Neofusicoccum australe* associated with grapevine cordon dieback in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 49, 417–420.
- Mehl, J. W., Slippers, B., Roux, J., & Wingfield, M. J. (2011). Botryosphaeriaceae associated with *Pterocarpus angolensis* (kiaat) in South Africa. *Mycologia*, 103, 534–553.
- Pérez, C. A., Wingfield, M. J., Slippers, B., Altier, N. A., & Blanchette, R. A. (2010). Endophytic and canker-associated Botryosphaeriaceae occurring on non-native *Eucalyptus* and native *Myrtaceae* trees in Uruguay. *Fungal Diversity*, 41, 53–69.
- Pusey, P. L. (1993). Role of *Botryosphaeria* species in peach tree gummosis on the basis of differential isolation from outer and inner bark. *Plant Disease*, 77, 170–174.
- Pusey, P. L., Kitajima, H., & Wu, Y. (1995). Fungal gummosis. In J. M. Ogawa, E. I. Zehr, G. W. Bird, D. F. Ritchie, K. Uriu, & J. K. Uyemoto (Eds.), *Compendium of stone fruit diseases* (p. 98). St Paul: APS Press.
- Rodríguez-Gálvez, E., Maldonado, E., & Alves, A. (2014). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. *European Journal of Plant Pathology*, 141, 477–489.
- Sakalidis, M. L. (2004). *Resolving the Botryosphaeria ribis - Botryosphaeria parva species complex; a molecular and phenotypic investigation*. Honors Thesis: School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Western Australia.
- Shen, Y. M., Chao, C. H., & Liu, H. L. (2010). First report of *Neofusicoccum parvum* associated with stem canker and die-back of asian pear trees in Taiwan. *Plant Disease*, 94, 1062.
- Slippers, B., Smit, W. A., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., & 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. *Plant Pathology*, 56, 128–139.
- Swofford, D. L. (2002). *Paup*, Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.
- Taylor, A., Hardy, G. E. S. J., Wood, P., & Burgues, T. (2005). Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 34, 187–195.
- Úrbez-Torres, J. R., & Gubler, W. D. (2009). Pathogenicity and epidemiology of Botryosphaeriaceae from grapevines in California. *Plant Disease*, 93, 584–592.
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Guerrero, J. C., Guevara, J., & Gubler, W. D. (2008). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*, 92, 519–529.
- Úrbez-Torres, J. R., Bruez, E., Hurtado, J., & Gubler, W. D. (2010). Effect of temperature on conidial germination of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines. *Plant Disease*, 94, 1476–1484.
- van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Fourie, P. H., & Halleen, F. (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia*, 96, 781–798.

- van Niekerk, J. M., Fourie, P. H., Halleen, F., & Crous, P. W. (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 45, S43–S54.
- van Niekerk, J. M., Bester, W., Halleen, F., Crous, P. W., & Fourie, P. H. (2011). The distribution and symptomatology of grapevine trunk disease pathogens are influenced by climate. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, S98–S111.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315–322). San Diego: Academic Press.