

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

IDENTIFICACIÓN DE LOS ORGANISMOS ASOCIADOS A LA MUERTE DE
PLANTAS DE FRUTILLA (*Fragaria ananassa* Duch.) EN EL DEPARTAMENTO DE
SALTO, URUGUAY

por

Jorge Alex MACHÍN BARREIRO

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.

MONTEVIDEO
URUGUAY
2017

Tesis aprobada por:

Director: -----
Ing. Agr. Dra. Elisa Silvera

Ing. Agr. MSc. Pablo González

Ing. Agr. MSc. Vivienne Gepp

Fecha: 27 de setiembre de 2017

Autor: -----
Jorge Alex Machín Barreiro

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a los productores que me recibieron en su predio para que este trabajo pudiera realizarse. También a los directores de tesis, por su constante apoyo, compromiso y dedicación a toda hora.

Al grupo disciplinario del Laboratorio de Fitopatología por brindar su ayuda cuando fue necesario. A Mateo Sánchez por estar siempre presente en actividades de campo y laboratorio.

Finalmente debo reconocer a mi familia por estar presente durante todos estos años de estudio y a Jennifer Bernal por su paciencia, comprensión y compañerismo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
2.1. ORIGEN.....	2
2.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	2
2.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y SOCIAL.....	2
2.4. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN URUGUAY.....	3
2.5. PATÓGENOS QUE PRODUCEN ENFERMEDADES DE RAÍZ Y CORONA.....	4
2.5.1. <i>Colletotrichum</i> spp.....	4
2.5.2. <i>Phytophthora</i> spp.....	5
2.5.3. <i>Rhizoctonia</i> spp.....	7
2.5.4. <i>Fusarium</i> spp.....	8
2.5.5. <i>Macrophomina phaseolina</i>	8
2.5.6. <i>Verticillium</i> spp.....	9
2.5.7. <u>Otros patógenos asociados a enfermedades de raíz y corona</u>	10
2.5.8. <u>Prácticas de manejo para enfermedades de raíz y corona en frutilla</u>	11
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	13
3.1. MUESTREO Y AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE RAÍZ Y CORONA.....	13
3.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA.....	14
3.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	14
3.3.1. <u>Extracción de ADN</u>	15
3.3.2. <u>Amplificación por PCR y secuenciación</u>	15
4. <u>RESULTADOS</u>	18
4.1. OBSERVACIÓN DE SÍNTOMAS.....	18
4.2. FRECUENCIA DE AISLADOS.....	19
4.3. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA.....	21
4.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	26
5. <u>DISCUSIÓN</u>	28

6. <u>CONCLUSIONES</u>	29
7. <u>RESUMEN</u>	30
8. <u>SUMMARY</u>	31
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	32

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Características de los cebadores ITS, EF1- α e HIS.....	16
 Figura No.	
1. Plantas de frutilla en producción.....	13
2. Necrosis de raíces y coronas de plantas de frutilla.....	18
3. Crecimiento de <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> en medio de cultivo PDA y estructura de identificación.....	21
4. Crecimiento de <i>Fusarium</i> spp. en medio de cultivo PDA y estructura de identificación.....	22
5. Crecimiento de <i>Cylindrocarpon</i> spp. en medio de cultivo PDA y estructura de identificación.....	23
6. Crecimiento de <i>Rhizoctonia</i> spp. en medio de cultivo PDA y estructura de identificación.....	23
7. Crecimiento de <i>Macrophomina phaseolina</i> en medio de cultivo PDA y estructura de identificación.....	24
8. Crecimiento de <i>Verticillium</i> spp. en medio de cultivo PDA y estructura de identificación.....	25
9. Estructuras de identificación de <i>Phytophthora cactorum</i>	25
10. Estructuras de identificación de <i>Pythium</i> spp.....	26
 Gráfica No.	
1. Porcentaje de organismos aislados de raíces y coronas.....	19
2. Géneros asociados a necrosis de raíz y corona en plantas de frutilla.....	20
3. Proporción de organismos asociados.....	21

1. INTRODUCCIÓN

La frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) es el tercer cultivo bajo protección más importante en el departamento de Salto, Uruguay. Se concentra básicamente en dos regiones, en el sur, principalmente San José y Canelones con 87 hectáreas y una producción anual de 1450 toneladas, en el litoral norte, particularmente en Salto con unas 42 hectáreas produciendo 1720 toneladas (MGAP. DIEA, 2015).

Dentro de los principales problemas del cultivo se encuentran las enfermedades de raíz y corona que producen la muerte de plantas afectando directamente el rendimiento. En plantas comerciales, las enfermedades son endémicas en Norte y Sudamérica, Europa y Asia (Maas, 1984).

Rebellato y Monteiro (1987) observaron hasta un 40 % de muerte de plantas de frutilla en el litoral norte de Uruguay. En el año 2015 se detectó una disminución en el rendimiento de cultivos de la zona debido a una importante mortandad de plantas (MGAP. DIGEGRA, 2015).

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar los organismos asociados a enfermedades de raíz y corona que causan la muerte de plantas de frutilla en el litoral norte.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ORIGEN

La frutilla o fresa es una planta de la familia de las Rosáceas, subfamilia Rosoideas, tribu Potentillea y género *Fragaria* (Folquer, 1986).

Según Reed, citado por Darrow (1966), se llegaron a describir más de 45 especies dentro del género *Fragaria*, investigaciones recientes relacionadas con la constitución cromosómica permitieron clarificar el confuso panorama sistemático, reduciéndose a 11 el número de especies válidas, todas las cuales poseen una estructura genética común con genomios de 7 cromosomas. Esto indicaría la existencia de un ancestro único para todas las especies de *Fragaria*.

La frutilla “de gran fruto”, moderna, apareció como consecuencia de cruzamientos casuales producidos en Europa entre *F. chiloensis* y *F. virginiana*, designados por Duchesne con el nombre científico *Fragaria x ananassa* Duch. o simplemente *Fragaria ananassa* Duch., que pasó a constituir la especie botánica básica de las variedades de frutilla comerciales (Folquer, 1986).

2.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Fragaria ananassa es una planta herbácea de bajo porte, que persiste varios años, especialmente en los climas frescos, como es lógico si tenemos en cuenta los centros de origen de sus formas ancestrales (Folquer, 1986).

La planta está constituida por un tallo corto denominado corona, un sistema radicular, hojas, flores, frutos y estolones. El desarrollo de la planta está afectado directamente por factores ambientales y de manejo. Por medio de los estolones se reproduce vegetativamente formando plantas hijas y sexualmente por semillas denominada aquenios. La propagación que se usa comercialmente es la vegetativa, mientras que la sexuada tiene fines para el mejoramiento genético (Giménez et al., 2003).

2.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y SOCIAL

Entre 2010 y 2014 la producción mundial de frutilla aumentó un 23% llegando a las 8.114.373 toneladas a nivel mundial. El principal productor es China, con 3.113.000 toneladas, seguido recientemente por Estados Unidos con 1.371.573 ton., México con 458.972 ton., Turquía con 376.070 ton. y España con 291.870 ton. (FAO, 2014).

En Uruguay, para la zafra 2013-2014 se plantaron 129 hectáreas de frutilla, 87 en el sur y 42 en el litoral norte y los rendimientos fueron de 16,7 y 40 toneladas por hectárea respectivamente, sumando una producción total de 3170 toneladas anuales. Se puede observar una mayor productividad en los cultivos del norte (MGAP. DIEA, 2015).

2.4. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN URUGUAY

Según Aldabe Dini (2000) en el norte del Uruguay se produce el plantín denominado planta fresca local, el cual se obtiene a partir de plantas madres, propias del cultivo anterior, o saneadas provenientes de micropropagación. Estas últimas tienen la ventaja de ser cultivadas *in vitro*, con lo cual se evitan hongos, bacterias y virus. El vivero se instala en los meses de octubre y noviembre para obtener plantas madres de buen tamaño a la hora de emitir los estolones.

El cultivo de frutilla protegido (invernaderos, macrotúneles o microtúneles) en Uruguay está principalmente localizado en la zona litoral norte y tiene como objetivo el abastecimiento del mercado nacional durante invierno y primavera temprana (Vicente et al., 2010), aprovechando la situación climática favorable para la producción precoz. La producción a campo se concentra en el sur (Giménez et al., 2003).

El trasplante de las variedades menos vigorosas se realiza alrededor de los últimos 10 días de marzo, y las variedades más vigorosas en los primeros 10 días de abril (Vicente et al., 2010).

En el norte del país predominan cultivares nacionales, de día corto, producto del mejoramiento genético de frutilla del INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria). Las variedades más plantadas son “INIA Yuri” ocupando 60 % del área, e “INIA Guapa” en un 30 %, también se plantan cultivares extranjeros como “Festival” (INIA, 2016).

El sistema de producción de la zona sur está basado en el uso de cultivares extranjeros de día corto y de día neutro, con plantas tipo “frigo” importadas principalmente de España, Estados Unidos y Chile (Vicente y Giménez, 2017). La variedad más difundida es “San Andreas” aunque todavía se plantan pequeñas áreas de “Aromas” y “Camino Real”, también hay pequeñas superficies ocupadas por cultivares nacionales (Giménez y Lenzi, 2015).

Los cultivares extranjeros plantados actualmente en Uruguay tienen buena producción y un fruto atractivo en tamaño, color y forma. Sin embargo, carecen de un buen aroma y de sabor, lo cual afecta el consumo. También son muy susceptibles a la mayoría de las enfermedades de corona, hoja y fruto presentes en nuestras condiciones. Esto es limitante en el rendimiento del cultivo porque ocasionan pérdida de plantas y

frutos e implica un incremento de aplicaciones de fitosanitarios, con el correspondiente impacto en el ambiente y la salud (Giménez y Lenzi, 2015).

Haciendo frente a esta problemática en 2015 se liberó “Mayte” (el primer cultivar de frutilla de día neutro de INIA), que presenta altos niveles de resistencia a la mayoría de las enfermedades de raíz y corona. Esto significa que el productor puede producir prácticamente sin la aplicación de fungicidas o restringirlas a un mínimo (Vicente y Giménez, 2017).

2.5. PATÓGENOS QUE PRODUCEN ENFERMEDADES DE RAÍZ Y CORONA

Las enfermedades pueden ser ocasionadas por uno o por combinaciones de hongos y/u oomicetes incluyendo una o más especies de *Fusarium* (Rebellato y Monteiro 1987, Maas 1998), *Neopestalotiopsis clavispora* (Dung et al. 2016, Chamorro et al. 2016), *Cylindrocarpon* spp. (Adhikari et al., 2013), *Rhizoctonia* spp. (Giménez et al. 2003, France 2013), *Macrophomina phaseolina* (Maas 1984, Rebellato y Monteiro 1987, Mertely et al. 2005, Koike et al. 2013), *Verticillium* spp. (Rebellato y Monteiro 1987, Bhat y Subbarao 1999), *Colletotrichum* spp. (Brooks 1931, Rebellato y Monteiro 1987, Howard 1992, Freeman y Katan 1997, Maas 1998, Bi et al. 2015), *Pythium* (Watanabe 1977, Rebellato y Monteiro 1987, Ishiguro et al. 2013), *Phytophthora* spp. (Rebellato y Monteiro 1987, Maas 2004).

Otras enfermedades como la podredumbre negra de raíces, puede ser causada por uno o varios patógenos (*Rhizoctonia* spp., *Cylindrocarpon* spp., *Fusarium* spp., y *Pythium* spp.) con o sin la interacción de otros factores tales como nematodos, bacterias, daño por frío, drenaje deficiente, agotamiento de oxígeno del suelo, desequilibrio de fertilidad del suelo y sequia (Maas, 1984).

2.5.1. *Colletotrichum* spp.

La enfermedad que produce las distintas especies de *Colletotrichum* se denomina antracnosis. Esta enfermedad es causada por *Colletotrichum fragariae* (Brooks, 1931), *C. acutatum* (Freeman y Katan, 1997), *C. gloeosporioides*, *C. dematium* (Howard et al. 1992, Maas 1998) y *C. truncatum* (Bi et al., 2015). El género *Colletotrichum* pertenece al reino Fungi, filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Glomerellales y familia Glomerellaceae (GenBank).

Freeman y Katan (1997) demostraron que coronas infectadas por *C. acutatum* manifiestan una putrefacción firme de color marrón-rojiza en su interior, también se observa necrosis radicular de color marrón oscuro, otros síntomas son el retraso del crecimiento y clorosis, seguido del colapso de las plantas.

La pudrición de la corona por antracnosis se considera un problema de vivero. Los plantines infectados trasplantados a campo muestran rápidamente síntomas de la enfermedad (Howard et al. 1992, McInnes et al. 1992, Freeman y Katan 1997).

Las especies de la antracnosis son habitantes naturales del suelo, tanto *C. gloeosporioides* como *C. acutatum* tienen un amplio rango de huéspedes, y no muestran especificidad de huésped (Farr et al. 1989, Freeman et al. 1998)

La temperatura óptima para la germinación de conidios es de 23 a 27,7° C, mientras que para el desarrollo de la enfermedad es de 17,6 a 26,5° C (Leandro et al., 2002). Maas (1984) afirma que una humedad del 100 % es la óptima para que la enfermedad se desarrolle.

Los conidios son producidos en acérvulos, los mismos son liberados y diseminados por la lluvia y el viento, pero también pueden ser dispersados por la mano de obra, en la ropa y calzado, y por las herramientas utilizadas para las tareas del cultivo (Agrios, 2017).

Este hongo puede sobrevivir en plantas infectadas, residuos de plantas, en malezas y como micelio y/o clamidosporas en el suelo (Maas, 1984).

2.5.2. Phytophthora spp.

El agente causal de la pudrición de corona es *Phytophthora cactorum* y en algunos casos puntuales es *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (Maas, 1984). El género *Phytophthora* pertenece al reino Chromista, clase Oomycetes, orden Peronosporales y familia Peronosporaceae (Agrios, 2017).

Los síntomas de esta enfermedad son necrosis de corona de color marrón oscura y la desintegración vascular, produciendo un marchitamiento repentino o colapso de las plantas (Maas, 1984). La necrosis puede comenzar en la parte superior o desde el punto de adhesión al estolón y progresa hacia la base o ápice respectivamente. Las raíces no se infectan pero se necrosan cuando la parte superior de la planta muere (Seemüller, citado por Maas, 2004).

Las plantas afectadas, parecen recuperarse y permanecen atrofiadas e improductivas, el retraso del crecimiento se puede confundir con síntomas de pudrición negra de la raíz o marchitez por *Verticillium* (Pettitt y Pegg, citados por Maas, 2004).

Las plantaciones establecidas a finales del verano no suelen aparecer afectadas hasta la primavera siguiente, especialmente cuando las plantas están bajo estrés durante la fructificación. El desarrollo de la enfermedad se ve acelerado por las altas temperaturas y el estrés hídrico que ocurre a menudo después del trasplante y durante el

desarrollo del fruto (Molot y Nourrisseau 1974, Lederer y Seemüller, citados por Maas 2004).

Las oosporas en el suelo o en los desechos de las plantas de frutilla proporcionan las fuentes iniciales de inóculo. Éstas germinan para producir zoosporangios y zoosporas que infectan las plantas, usualmente en sitios de heridas (Bell et al., 1997). Una vez que este oomycete se ha establecido en la corona es casi imposible erradicar la infección (Molot y Nourrisseau, 1978). *Phytophthora cactorum* puede atacar un amplio rango de hospederos (Agris, 2017).

Temperaturas de 18-24° C y humedad mayor a 80 % son las condiciones óptimas para el desarrollo de este oomycete. Las plantas que han sido dañadas por heladas severas, están predispuestas a la infección (Bell et al., 1997).

Phytophthora cactorum produce micelio de color blanco de crecimiento lento en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA). Erwin y Ribeiro (1996) observaron oosporas pleróticas con un diámetro entre 21 y 33 µm (promedio 27 µm) con anteridios paragáneo y esporangios generalmente ovoides y algunos elipsoides con una papila, con 28 a 52 µm de largo (promedio 37 µm) y entre 25 y 40 µm de ancho (promedio 34 µm).

Phytophthora fragariae var. *fragariae* es el organismo causal de la podredumbre de la “Estela roja”. La frutilla es el único huésped para esta enfermedad, y ocurre con más frecuencia en cultivos que se desarrollan en climas fríos y húmedos (Montgomerie 1977, Nickerson y Maas 1991, Milholland 1994).

Los síntomas se observan generalmente en primavera y durante el desarrollo del fruto, las plantas muestran retraso del crecimiento, marchitez y posteriormente muerte de la planta (Nickerson y Maas, 1991).

Este oomycete ingresa en las puntas de las raíces y continúa avanzando hacia la corona de la planta. A medida que la infección avanza en la raíz, se desarrolla una estela de color marrón- rojizo que destruye las raíces secundarias quedando solo las primarias oscuras, lo que da como resultado una apariencia característica del sistema radicular (Nickerson y Maas, 1991).

Este patógeno se introduce en nuevas áreas de cultivo, a través de plantas infectadas que no muestran síntomas visibles en vivero. Produce oosporas (estructuras de resistencia) dentro de las raíces infectadas y se liberan en el suelo cuando las raíces se descomponen. Se sabe que estas oosporas son viables durante 15 años en el suelo (Nickerson y Maas, 1991).

Las oosporas germinan formando zoosporangios como inóculo primario, sin embargo la mayoría de los zoosporangios se producen en la superficie de las raíces

infectadas. Éstos germinan para liberar zoosporas móviles que son atraídas por los metabolitos secundarios exudados por las raíces de frutillas sanas (Nickerson y Maas, 1991).

2.5.3. *Rhizoctonia* spp.

Rhizoctonia solani o *Rhizoctonia fragariae* son hongos comunes en los suelos agrícolas (Giménez et al. 2003, France 2013). El género *Rhizoctonia* pertenece al reino Fungi, filo Basidiomycota, clase Agaricomycetes, orden Cantharellales y familia Ceratobasidiaceae (GenBank).

Los síntomas de la enfermedad se manifiestan como una lesión entrante en la corona, de color marrón oscura que también afecta el tejido vascular en ese sitio (Giménez et al., 2003).

Las lesiones en raíz pueden observarse con temperaturas entre 2 y 18° C mientras que los daños en corona y bases de los pecíolos son ocasionados con una temperatura de 18-32° C (Maas, 1984). Alta humedad, exceso de materia orgánica y acumulación de tierra alrededor de la corona favorecen el desarrollo de la enfermedad (Cardoso, 1980).

Esta enfermedad aparece asociada a suelos pesados, de escasa estructura y drenaje deficiente. La sintomatología de la enfermedad se observa a fines de invierno y en primavera afectan a numerosas especies de plantas (Rebellato y Monteiro 1987, Giménez et al. 2003).

Las colonias de *Rhizoctonia* spp. en medio de cultivo PDA a 25° C son de color blanco a marrón claro produciendo micelio aéreo de rápido crecimiento. El micelio del hongo presenta ramificaciones en ángulo recto (Barnett y Hunter 1972, Zhong et al. 2016).

2.5.4. *Fusarium* spp.

Fusarium oxysporum f. sp. *fragariae* y *Fusarium solani* pueden producir graves pérdidas de plantas (Maas 1984, Rebellato y Monteiro 1987). El género *Fusarium* pertenece al reino Fungi, filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales y familia Nectriaceae (GenBank).

Bajo condiciones de clima fresco puede desarrollarse clorosis foliar y las coronas muestran una marcada coloración marrón-rojiza que puede confundirse con los síntomas de pudrición de la corona por *Colletotrichum* spp.. Sin embargo, a diferencia de la podredumbre de la corona por antracnosis, los tejidos de la corona presentan una

podrición seca y la decoloración vascular puede extenderse a las bases de las hojas a medida que avanza la enfermedad (Winks y Williams, 1965).

Esta enfermedad comienza como una infección de raíces y coronas que se vuelve sistémica y produce el colapso repentino de la planta. El desarrollo de estos síntomas es favorecido por las altas temperaturas y el estrés durante la fructificación, lo que hace que las hojas de las plantas infectadas se marchiten y mueran rápidamente (Winks y Williams, 1965).

En las partes infectadas de la planta se pueden producir masas viscosas, blancas o rosadas de conidios (esporodoquios). Estos hongos pueden producir clamidosporas (estructuras de resistencia) que se producen en el tejido vegetal infectado y se liberan en el suelo donde pueden permanecer viables durante largos periodos de tiempo (Winks y Williams, 1965).

Arroyo et al. (2009), describieron a *Fusarium* spp. en medio de cultivo PDA donde observaron colonias con una coloración blanca a púrpura claro y microconidios y macroconidios luego de nueve días de incubación a 25° C. Los microconidios son hialinos y ovales a cilíndricos, y los macroconidios presentaron una forma fusiforme con tres a cinco septas (Barnett y Hunter, 1972).

2.5.5. *Macrophomina phaseolina*

El hongo responsable de la pudrición carbonosa en frutilla es *Macrophomina phaseolina*. El género *Macrophomina* pertenece al reino Fungi, filo Ascomycota, clase Dothideomycetes, orden Botryosphaeriales y familia Botryosphaeriaceae (GenBank).

Los síntomas de esta enfermedad son necrosis del tejido vascular y cortical de las coronas de frutilla; las necrosis son de color anaranjado hasta café oscuro al igual que las raíces principales (Mertely et al. 2005, Koike et al. 2013). Los síntomas iniciales de esta enfermedad se manifiestan durante la fructificación, produciendo marchitamiento de hojas viejas y cambio de color, de verde a gris, luego todo el follaje se seca con la excepción de las hojas nuevas en la parte central de la planta y finalmente la planta muere (Koike et al., 2013).

La producción de fruta en las plantas infectadas puede disminuir antes de que se desarrollen los síntomas de enfermedad. El clima cálido y estrés en las plantas debido a bajo nivel de riego, también como otros factores, puede causar que la enfermedad se desarrolle rápida y severamente (Koike et al., 2013).

Cuando *M. phaseolina* infecta las plantas de frutilla, produce pequeñas estructuras para la sobrevivencia llamadas microesclerocios que permiten al patógeno persistir en los campos por mucho tiempo. Estas estructuras germinan en el suelo e

infectan la raíz y luego el micelio coloniza la corona y peciolos de la planta (Koike et al., 2013). *M. phaseolina* tiene un amplio rango de huéspedes, pudiendo atacar tallos y raíces de más de 500 especies de plantas (Partridge, s.f.).

La colonia de este hongo en medio de cultivo PDA produce micelio aéreo de color gris oscuro (Sánchez et al., 2013). Luego de 10 días de crecimiento a 25° C, Avilés et al. (2007) observaron abundantes esclerocios de forma esférica a irregular, los esclerocios presentan un tamaño de 55 a 190 µm de largo por 50 a 135 µm de ancho (105 × 74 µm promedio).

2.5.6. *Verticillium* spp.

Verticillium albo-atrum y *Verticillium dahliae*, son los agentes causales del marchitamiento por *Verticillium* en la frutilla. El género *Verticillium* pertenece al reino Fungi, filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Glomerellales y familia Plectosphaerellaceae (GenBank).

Los síntomas iniciales de la marchitez por *Verticillium* suelen aparecer durante períodos de estrés ambiental, como altas temperaturas (25-28° C), alta luminosidad y/ o sequía, y también durante la fructificación. Las hojas más externas comienzan a marchitarse, mientras que las hojas centrales permanecen verticales pero atrofiadas. La corona primaria y el sistema vascular de las raíces muestra una decoloración (Giménez et al., 2003).

La enfermedad es favorecida por crecimiento exuberante de la planta y alta disponibilidad de nitrógeno. La incidencia de esta enfermedad depende de la distribución del inóculo en el suelo así como presencia de cultivos y malezas susceptibles a *Verticillium* (Maas et al. 1989, Harris y Yang 1996).

La transmisión de la enfermedad de planta a planta es insignificante, pero el hongo puede ser transportado de un lugar a otro en plantas infectadas y desechos de plantas, por movimiento de agua y por cualquier agente que mueva el suelo a lugares no afectados (Bolda et al., 2013). Estos hongos tienen una amplia gama de huéspedes entre cultivos anuales, perennes y las malezas (Bhat y Subbarao, 1999).

Este hongo forma una estructura de sobrevivencia, llamadas microsclerocios, lo cual le permite sobrevivir en condiciones adversas y persistir entre cultivos hospederos. Los microsclerocios son masas densas de células (melanizadas) gruesas y oscuras que forman adentro de los tejidos de la planta hospedera (Bolda et al., 2013).

En medio de cultivo PDA *Verticillium* spp. produce micelio de color blanco y conidióforos delgados con fiálides verticiladas donde se observan conidios hialinos, elípticos unicelulares (Barnett y Hunter, 1972).

2.5.7. Otros patógenos asociados a enfermedades de raíz y corona

Se han reportado varios patógenos de los géneros, *Neopestalotiopsis*, *Cylindrocarpon*, *Pythium*, *Lasiodiplodia*, *Gnomonia*, *Phoma* y *Coniella* causando necrosis de raíces y coronas de frutillas en distintas zonas productoras del mundo.

Neopestalotiopsis clavispora es el organismo causal de la muerte de plantas de frutilla recientemente reportado en España (Chamorro et al., 2016) y en Vietnam (Dung et al., 2016). El género *Neopestalotiopsis* pertenece al reino Fungi, filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Xylariales y familia Sporocadaceae (GenBank).

Los síntomas que describe Dung (2016) son el secado del borde de las hojas jóvenes, el cual avanza hasta la mitad del área de las mismas. Luego se visualizan estos síntomas en las hojas viejas y si las condiciones ambientales favorecen el desarrollo de la enfermedad, la planta se marchita y muere. Las plantas que están severamente infectadas presentan hojas y flores completamente secas y raíces negras. Los síntomas en la corona consisten en la decoloración o áreas marrones necróticas tanto en la corona como en la raíz (Chamorro et al., 2016).

En medio de cultivo PDA, *Neopestalotiopsis clavispora* produce colonias de color blanco con borde ondulado y acérvulos negros luego de diez días de crecimiento. Los conidios son fusiformes a elipsoides con cinco células, las apicales y basales son hialinas, mientras que las centrales son de color marrón. Los conidios presentan un apéndice basal y de dos a cuatro apéndices apicales (Chamorro et al., 2016).

Las condiciones predisponentes para el desarrollo de la enfermedad causada por *N. clavispora* son las temperaturas entre 20 y 25° C y 95 a 100 % de humedad (Dung et al., 2016).

Cylindrocarpon destructans se ha aislado de raíces y coronas de frutilla en Italia (Manici et al., 2005), Suecia (Marocko, 2006) y en Australia (Fang et al., 2011). Los síntomas producidos por *Cylindrocarpon* spp. se manifiestan como amarillamiento, marchitez de hojas y necrosis generalizada de la raíz y corona (Adhikari et al., 2013).

Las colonias de *Cylindrocarpon* spp. en medio de cultivo PDA presentan crecimiento relativamente lento y gradualmente se vuelven amarillentas a parcialmente parduscas. Después de aproximadamente siete días, se observan abundantes conidios hialinos, generalmente rectos con ambos extremos redondeados, predominantemente con tres septas (Adhikari et al., 2013).

Muchas especies de *Pythium* se encuentran ampliamente distribuidas en los suelos y aguas del mundo, viviendo como organismos saprófitos o atacando raíces y semillas de muchas plantas (Agrios, 2017). Las especies de *Pythium* que pueden producir necrosis de raíces y coronas, como por ejemplo *Pythium helicoides* (Ishiguro et al., 2013), *Pythium ultimum* (Watanabe, 1977), *Pythium myriotylum* (Watanabe, 1977), *Pythium aphanidermatum* podría ser un patógeno débil de la frutilla (Ishiguro et al., 2013).

Estas especies se encuentran afectando semillas, raíces de plántulas en germinación y produciendo lesiones en tallos y raíces de plantas adultas y retraso en el crecimiento (Agrios, 2017). Los síntomas producidos por estos patógenos se caracterizan por amarillamiento y marchitez de hojas inferiores. Las raíces y coronas presentan necrosis húmeda de color marrón oscuro (Ishiguro et al., 2013).

Las pérdidas producidas varían considerablemente de acuerdo con la temperatura y humedad del suelo (Agrios, 2017). La temperatura óptima para el crecimiento de *Pythium helicoides* es entre 35 y 40° C (Ishiguro et al., 2013). En plantas de soja *Pythium aphanidermatum* presenta mayor virulencia con temperaturas entre 24 y 36° C y *Pythium ultimum* es más virulento con temperaturas entre 15 y 20° C (Thomson et al., 1971).

Estos patógenos pueden sobrevivir durante varios años en el suelo en estructuras de origen sexual llamadas oosporas, éstas germinan formando un esporangio que produce zoosporas capaces de moverse por unos cuantos minutos hasta encontrar un nuevo hospedero (Agrios, 2017).

Pythium spp. forman colonias de color blanco de rápido crecimiento, produciendo micelio cenocítico y esporangios terminales de forma esférica o filamentosa en medio de cultivo PDA.

En Turquía, se reportó a *Lasiodiplodia theobromae* como el agente causal de la muerte de plantas de frutilla. Los síntomas observados son marchitamiento y muerte de plantas, las raíces y coronas presentan necrosis de color oscuro (Yildis et al., 2014).

Gnomonia fragariae fue reportado como patógeno grave involucrado en la muerte de plantas de frutilla en Letonia y Suecia. Los síntomas observados incluyen necrosis de corona y lesiones de color negro en raíces y base de los pecíolos. La corteza de las raíces y pecíolos son los tejidos más gravemente afectados (Marocko, 2006).

2.5.8. Prácticas de manejo para enfermedades de raíz y corona en frutilla

Para el control de las enfermedades de raíz y corona es importante aplicar un conjunto de medidas culturales, biológicas y químicas. Se debe tener en cuenta que no

hay una medida de manejo que por sí sola sea suficiente para tener una adecuada sanidad en el cultivo de frutilla (Giménez et al., 2003).

Es de gran importancia evitar el ingreso de los patógenos a nuevas áreas de cultivo, utilizando plantas sanas (Giménez et al., 2003). También se debe evitar cualquier condición de estrés en el cultivo (Ouchi et al., 1992).

El uso de cultivares resistentes es la forma más confiable de evitar problemas de podredumbre por *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* (Okayama et al., 1988), *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* (Maas y Galletta, 1989), *Verticillium* ssp. (Maas et al., 1989) y por *Colletotrichum* spp. (Giménez et al., 2003).

Las prácticas como, solarización, biofumigación, control biológico, tratamientos de vapor en el suelo y desinfección anaeróbica del mismo, son muy eficientes para controlar estas enfermedades si se realizan adecuadamente (Koike et al., 2013).

Se debe realizar una correcta sistematización de los cuadros de cultivo y construir canteros altos para asegurar un buen drenaje y evitar encharcamientos. Utilizar abonos verdes, aplicar enmiendas orgánicas y mulch orgánico o de nylon. Un manejo adecuado del riego y fertilización es fundamental para evitar estrés en las plantas (Giménez et al. 2003, Maas 2004).

Elmer y LaMondia (1999) determinaron que rotaciones de frutilla con *Avena sativa* redujo las poblaciones de *Rhizoctonia* spp. reduciendo la infección de raíces por este patógeno.

Para oomycetes se han utilizado fungicidas tales como metalaxil y fosetyl-Al, sin embargo se han encontrado cepas resistentes al metalaxil (Nickerson y Maas 1991, Seemüller, citado por Maas 2004).

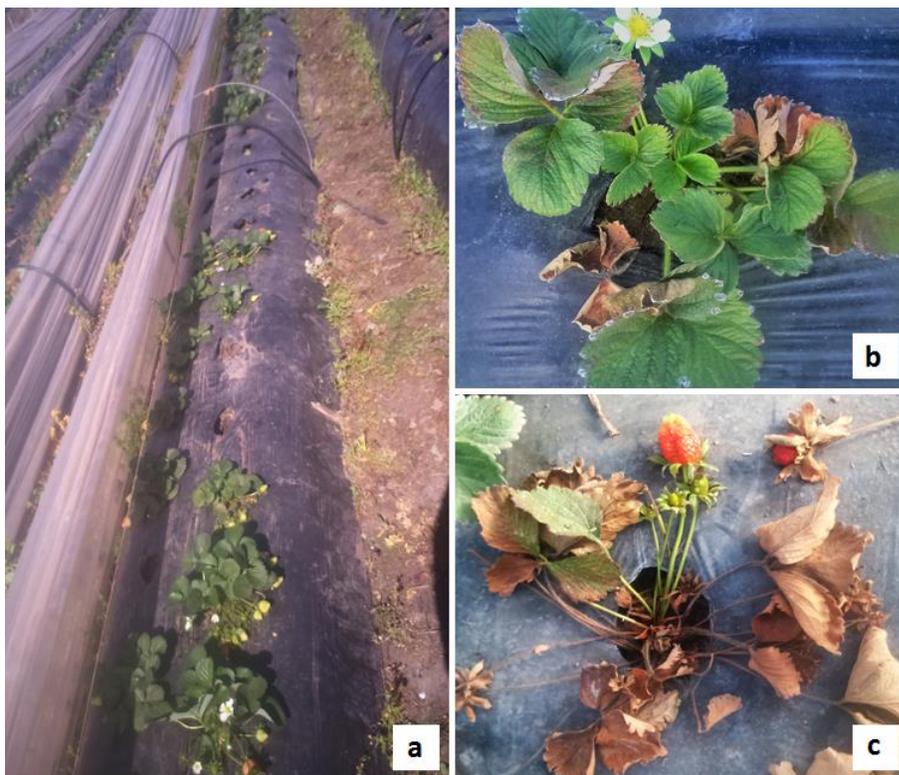
3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en los años 2016- 2017, en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República (Montevideo y Salto).

Se visitaron 19 predios hortícolas con historia de cultivo de frutilla en el departamento de Salto. Los mismos pertenecen a seis zonas: Colonia 18 de Julio, Colonia Osimani, Colonia Garibaldi, Hipódromo, Colonia Gestido y Granja Santana.

3.1. MUESTREO Y AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE RAÍZ Y CORONA

Se colectaron 33 plantas en estado de fructificación (agosto 2016), 16 plantas de la variedad INIA Guapa, 10 de INIA Yuri, tres de Festival y Benicia y una de INIA Ágata con síntomas de marchitamiento, hojas rojizas y secas. Posteriormente se procesaron las muestras en el laboratorio, donde se observó que las plantas presentaban necrosis en raíces y coronas.



a) Faltante de plantas de frutillas en micro túneles. b) Planta de frutilla con síntomas iniciales de la enfermedad. c) Planta de frutilla en etapa final de la enfermedad.

Figura No.1. Plantas de frutilla en producción.

Las plantas de frutilla se lavaron con agua corriente para remover el suelo adherido a las mismas. Se cortaron secciones (seis por un milímetro) de la zona de avance de la lesión de raíces y coronas posteriormente se desinfectaron con hipoclorito 1 % durante un minuto y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril (ADE), luego se secaron en papel de filtro esterilizado.

A partir de cada planta se cortaron y colocaron cuatro secciones de raíz y corona en placas de Petri con agar agua (AA) al 2 % y se incubaron a 25° C durante cuatro días. Se seleccionó un aislado de cada tipo de colonia y a partir de la punta de hifa se repicó a placas con PDA con sulfato de estreptomicina (0,02 %).

Los aislados se conservaron en papel de filtro esterilizado y almacenados a -20° C. Sin embargo *Rhizoctonia* spp. se conservó en tubos con sustrato compuesto por 400 gr de arena, 20 gr de salvado de trigo y 60 ml de ADE. Luego que el hongo colonizó todo el sustrato, se colocaron a 5° C.

3.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Los aislados puros se incubaron a 25° C entre cinco y 15 días, y mediante la utilización del microscopio óptico se logró observar características de micelio y otras estructuras que permite diferenciar el género de los organismos.

Mediante la utilización del manual ilustrado de Barnett y Hunter (1972) se identificaron los géneros de los hongos aislados de raíces y coronas. Mientras que los hongos del género *Macrophomina* se identificaron a través de los primeros reportes de Avilés et al. (2007), Sánchez et al. (2013) para *Macrophomina phaseolina*.

Los aislados que presentaron micelio cenocítico (sin tabique) se identificaron en Erwin y Ribeiro (1996).

3.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Para complementar la identificación, se realizó el análisis molecular a 15 aislados (cinco de *Neopestalotiopsis* sp., cuatro de *Fusarium* spp., dos de *Rhizoctonia* spp., dos de *Cylindrocarpon* spp., uno de *Macrophomina* sp., uno de *Phytophthora* sp.) seleccionados al azar.

3.3.1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se empleó el protocolo de Palocci et al. (1999) con modificaciones el cual consiste en retirar todo el micelio de la superficie de cada placa de colonias puras de cinco días de edad y su posterior colocación en tubos eppendorf de 2 ml. Luego se le agregó 200 µl de buffer de lisis (100 µl/ ml Tris HCl 200 Mm pH 7, 100 µl/ ml NaCl 250 Mm, 100 µl/ ml SDS 0,5 %, 100 µl/ ml EDTA 25 Mm + NaOH 10%) a cada tubo para permitir la ruptura de las paredes celulares y se los llevó al freezer (-20° C) por dos horas. Se retiraron los tubos del freezer y se rompió el micelio mediante pistilos esterilizados para luego agregarle 200 µl más de buffer de lisis. Posteriormente se homogenizó por 10 segundos y después se colocó los tubos a baño maría (65° C) durante 30 minutos.

Se adicionó 300 µl de cloruro de sodio y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4° C. Tras sacar los tubos de la centrífuga, se observó dos fases: una líquida y otra sólida. Se retiró 500 µl del sobrenadante y se lo colocó en un nuevo tubo y se adicionó 500 µl de Isopropanol (-20° C) y luego se llevó al freezer por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4° C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se enjuagó dos veces con 200 µl de alcohol 70 % y se centrifugó dos minutos a 10000 rpm (4° C). Se descartó el alcohol y se dejó secando el pellet en estufa (aproximadamente dos horas a 40° C). Luego se lo resuspendió en 100 µl de solución buffer TE estéril y filtrada (0,2 mM y pH 8,0) y se llevó a 65° C por 15 minutos. Se adicionó 2 µl de ARNasa/ tubo y por último, se llevó los tubos a 37° C para luego guardarlos en freezer.

Se determinó la concentración de ADN de las muestras mediante Nanodrop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific. Para ello se utilizó 2 µl de ADN (de la extracción) de cada muestra y se comparó con un patrón de agua MQ. Finalmente se ajustó a una concentración de 100ng/ µl de ADN.

3.3.2. Amplificación por PCR y secuenciación

La amplificación mediante la PCR se efectuó en un termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler. La mezcla de la reacción contenía, Buffer 1X (50 mM KCl, 10 mM TrisHCl (pH 8,0)), nucleótidos (20 mM), MgCl₂ (2,5 mM), cebadores (0,4 µM de cada uno), Taq polimerasa (1,25 U, SBS Genetech Co., Ltd., China) y 1 µl de ADN (100 ng/ µl), el volumen final de la mezcla fue 25 µl. Los cebadores que se utilizaron se listan en el Cuadro No.1.

Cuadro No.1. Características de los cebadores ITS, EF 1- α e HIS.

Locus	Cebadores	Secuencias 5' – 3'	Fragmentos (pb)	Referencia
ITS	ITS1 ^a	TCCGTAGGTGAACCTTGCGG	560	White et al. (1990)
	ITS4 ^b	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
	ITS6 ^c	GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG	824	
EF 1- α	EF1688F ^d	CGGTCACTTGATCTACAAGTGC	884	Phillips et al. (2005)
	EF11251R	CCTCGAACTCACCAGTACCG		
HIS	CylH3F ^e	AGGTCCACTGGTGGCAAG	500	Crous et al. (2004)
	CylH3R	AGCTGGATGTCTTGGACTG		

Cebadores para *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina*., *Rhizoctonia* spp.^{a,b}, *Pythium* spp. y *Phytophthora* spp.^{b,c}, *Neopestalotiopsis* sp.^d, *Cylindrocarpon*.^e spp.

Los fragmentos de la región ITS (utilizando los cebadores ITS1/ITS4) se amplificaron en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94° C por 3 minutos, seguida por 34 ciclos a 94° C por 30 segundos, 57° C por 30 segundos y 72° C por 45 segundos. La extensión final fue a 72° C durante 10 minutos. Mientras que para los cebadores ITS4/ ITS6 se diferenciaron de la anterior en la temperatura de hibridación (55° C), en la duración de cada temperatura dentro de los ciclos (1 minuto) y de la extensión final (5 minutos).

Las condiciones para la amplificación de la secuencia parcial del gen EF1 α (factor de elongación) consistieron en: desnaturalización inicial a 95° C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos a 95° C por 30 segundos, 55° C por 45 segundos y 72° C por un minuto y una extensión final de 72° C por 5 minutos. Así mismo los fragmentos de la secuencia parcial del gen H3 (histona) se amplificaron en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94° C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos a 94° C por 30 segundos, 60° C por 30 segundos y 72° C por 45 segundos y una extensión final de 72° C por 10 minutos.

De los productos de amplificación, dos microlitros se analizaron a través de electroforesis en geles de agarosa (SBS, China) al 1 %, utilizando Buffer TBE 1X (tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH=8,0). Para estimar el tamaño de las bandas se empleó un marcador de peso molecular conocido de 100 pb (Gene Ruler 1 kb DNA Ladder Plus, Fermentas, Alemania). También se incluyó en el gel, una muestra como control negativo (sin ADN) para descartar una posible contaminación en la PCR. Para la visualización de las bandas amplificadas, los geles se tiñeron en solución acuosa con GelRed (Biotium, Estados Unidos, 5 μ l GelRed, 2 ml NaCl 0,1 M y 48 ml de agua) por 30 minutos y foto-documentada sobre luz ultravioleta en transiluminador (DyNA

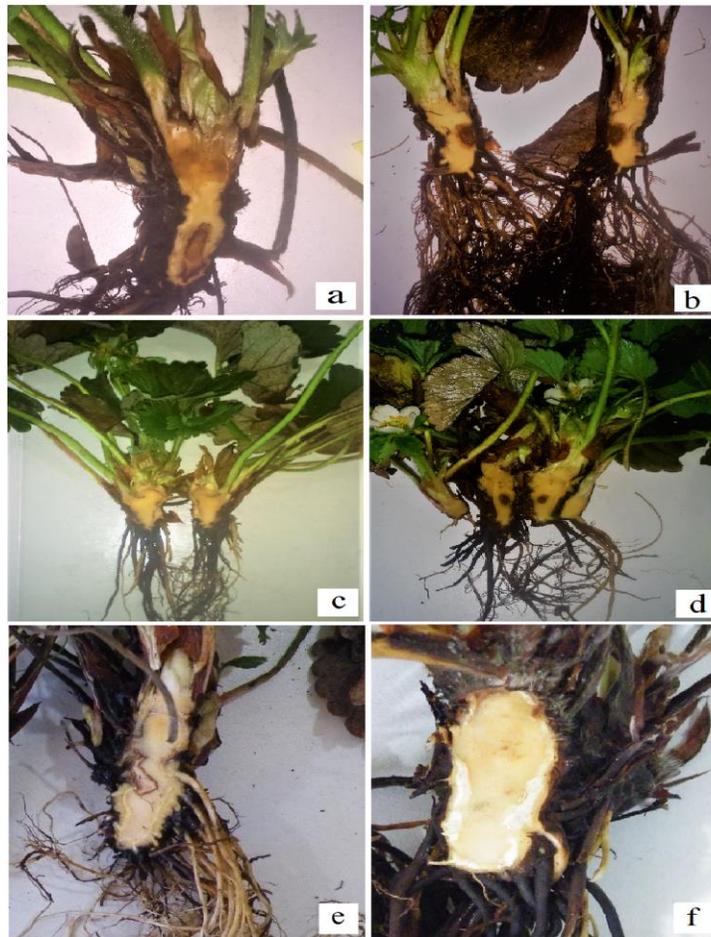
Light Dual Intensity UV Transiluminator, Labnet Internacional Inc., USA) para determinar la presencia de banda.

La secuenciación de los productos de la PCR se llevó a cabo en MacroGen Inc. (Corea), y las secuencias resultantes fueron editadas manualmente en el programa MEGA 5.1 (Tamura et al., 2011) para luego ser comparadas con las depositadas en el GenBank mediante búsqueda Blast.

4. RESULTADOS

4.1. OBSERVACIÓN DE SÍNTOMAS

Se observaron plantas cuyas hojas presentaban márgenes necrosados y en algunos casos hojas completamente necrosadas. En varios cultivos de frutilla se visualizó una coloración rojiza generalizada de las hojas. Al realizar los cortes de las plantas, el 95 % de las coronas presentaba necrosis interna del tejido con coloraciones que iban desde el rojo oscuro al marrón oscuro y en un caso se detectó decoloración del sistema vascular.



- a) Necrosis de raíz y corona asociada a *Pythium* spp., *Fusarium* spp. y a *Neopestalotiopsis* spp. b) Necrosis de raíz y corona asociada a *Neopestalotiopsis* sp. y a *Cylindrocarpon* spp. c) Decoloración vascular asociada a *Verticillium* spp. d) Necrosis de raíz asociada a *Rhizoctonia* spp. y a *Neopestalotiopsis* sp. e) Necrosis de raíz y corona asociada a *Phytophthora cactorum* y *Neopestalotiopsis* sp. f) Necrosis de raíz y corona asociada a *Macrophomina phaseolina*.

Figura No.2. Necrosis de raíces y coronas en plantas de frutilla.

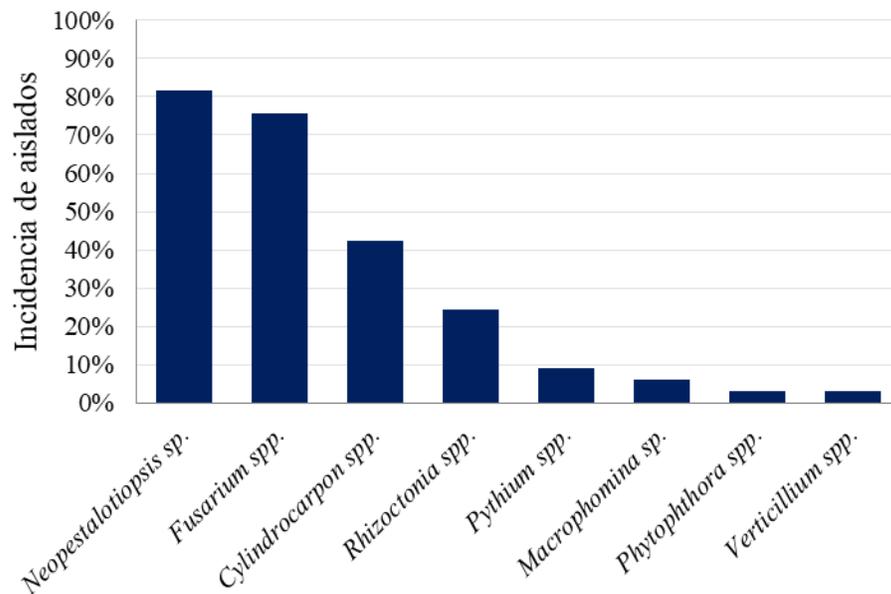
Aproximadamente el 90 % de las plantas presentó daños en el sistema radicular exhibiendo ausencia de raíces absorbentes, pequeñas necrosis (1 a 3 milímetros) hasta muerte de raíces enteras y canchales extendidos longitudinalmente en la raíz. Las raíces afectadas mostraron una coloración marrón oscuro a negro.

4.2. FRECUENCIA DE AISLADOS

A partir de las 33 plantas procesadas se obtuvieron 110 aislados y se identificaron seis géneros fúngicos: *Neopestalotiopsis*, *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Verticillium* y dos oomycetes: *Phytophthora* y *Pythium*.

Neopestalotiopsis sp. se aisló del 81,8 % de las plantas mientras que *Fusarium* spp. se encontró en el 75,7 %. *Cylindrocarpon* spp. y *Rhizoctonia* spp. se aislaron en el 42,4 y 24,2 % de las plantas respectivamente. Se encontraron en menor proporción se *Pythium* spp. (9 %), *Macrophomina* sp. (6 %), *Phytophthora* spp. (3 %) y *Verticillium* spp. (3 %, Gráfica No.1).

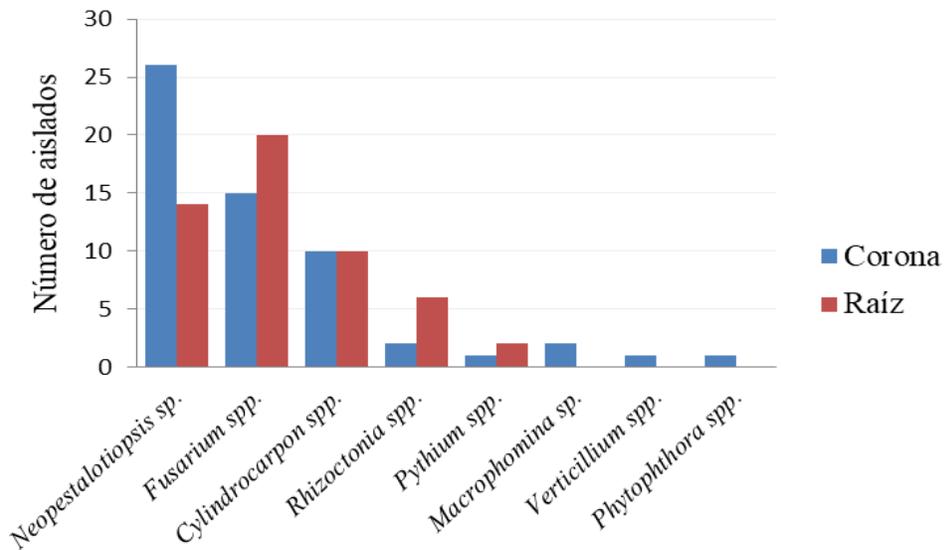
Gráfica No.1. Porcentaje de organismos aislados de raíces y coronas.



Los hongos y oomycetes se aislaron en diferentes frecuencias según el órgano de la planta. *Neopestalotiopsis* sp. se aisló más veces de corona (65 %), mientras que *Rhizoctonia* spp. fue más frecuentemente de raíces (75 %). Los géneros *Pythium* spp. y

Cylindrocarpon spp. estuvieron presentes en raíces y coronas en iguales proporciones (Gráfica No.2).

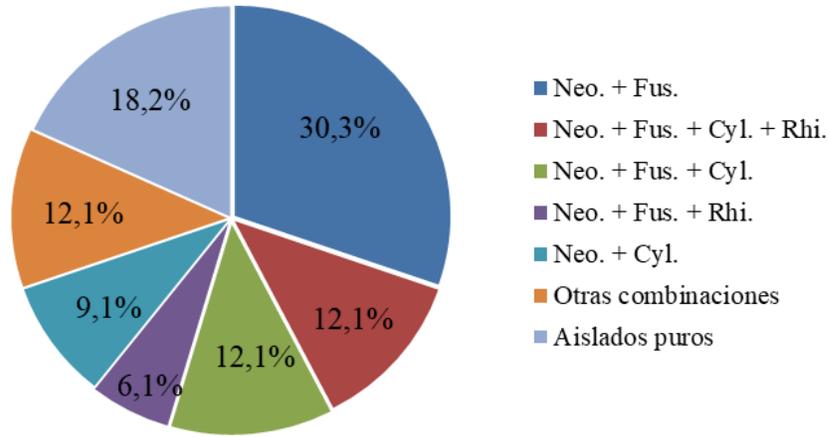
Gráfica No.2. Géneros asociados a necrosis de raíz y corona en plantas de frutilla.



Aproximadamente el 81,8 % de las plantas se aisló más de un organismo asociado a necrosis de raíces y coronas, mientras que en el 18,2 % restante se aisló un único hongo por planta. Estos fueron *Macrophomina* sp. y *Fusarium* spp. en dos plantas cada uno mientras que *Neopestalotiopsis* sp. y *Rhizoctonia* spp. en una planta cada uno (Gráfica No.3).

La combinación de organismos más frecuente fue la de *Neopestalotiopsis* sp. y *Fusarium* spp. que se encontró en 10 plantas como únicos hongos asociados a necrosis de raíz y corona. Así mismo en el 66,7 % se observaron combinaciones con *Rhizoctonia* spp., *Cylindrocarpon* spp. y *Pythium* spp. Además se observaron *Fusarium* spp. y *Cylindrocarpon* spp. en una planta, en otra *Neopestalotiopsis* sp., *Cylindrocarpon* spp., *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp. y por ultimo *Neopestalotiopsis* sp., *Cylindrocarpon* spp., *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., y *Pythium* spp..

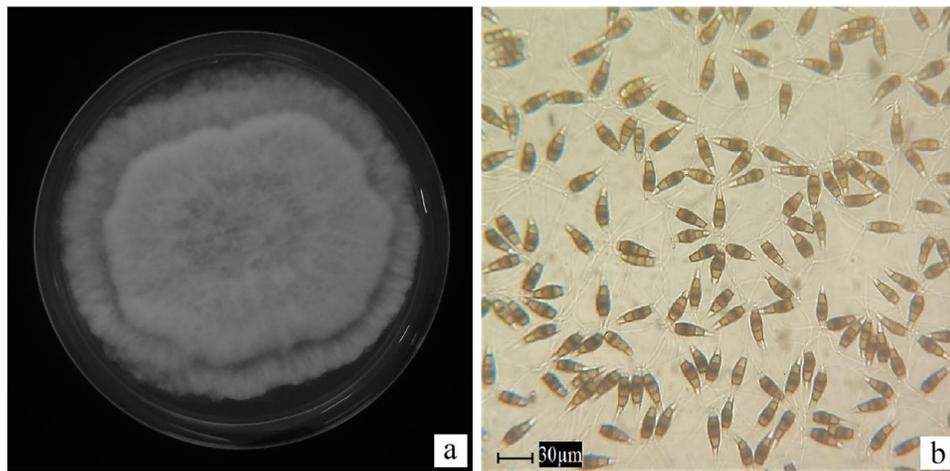
Gráfica No.3. Proporción de organismos asociados.



(Neo) *Neopestalotiopsis* sp. (Fus) *Fusarium* spp. (Cyl) *Cylindrocarpon* spp. (Rhi) *Rhizoctonia* spp.

4.3. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

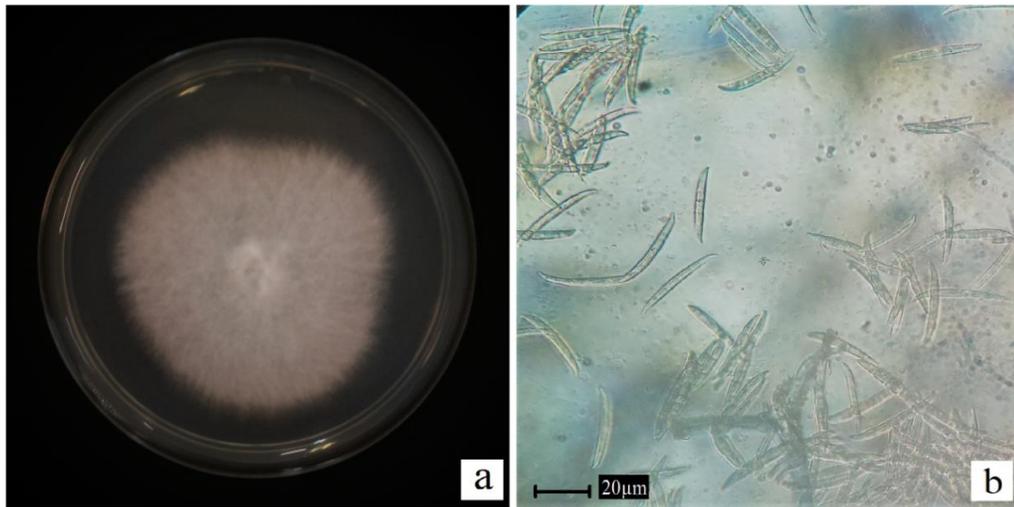
Neopestalotiopsis sp. (40) presentó crecimiento micelial algodonoso de color blanco y con borde ondulado (Figura No.3a). En colonias de 10 días de edad se observaron numerosos acérvulos de color negro. Éstos estaban formados por un gran número de conidios fusiformes con cinco células, similares a los descritos por Chamorro et al. (2016, Figura No.3b).



a) Colonia de *Neopestalotiopsis clavispora* en medio de cultivo PDA de nueve días de edad.
b) Conidios de *Neopestalotiopsis clavispora* (40X).

Figura No.3. Crecimiento de *Neopestalotiopsis clavispora* en medio de cultivo PDA y estructura de identificación.

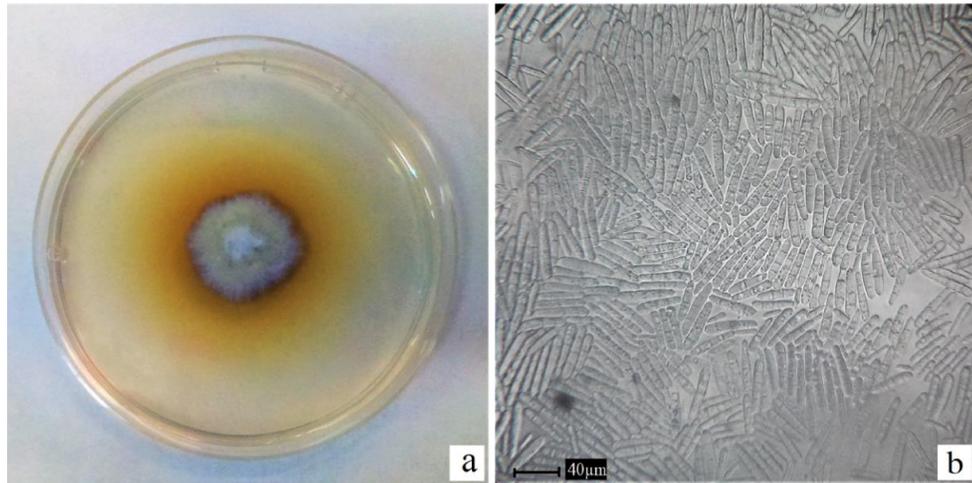
Las colonias de *Fusarium* spp. (35) mostraron una coloración blanca a púrpura claro (Figura No.4a). Luego de diez días de incubación a 25° C se observaron microconidios ovales y macroconidios fusiformes con 3 a 5 septas, coincidiendo con la descripción por Barnett y Hunter (1972), Arroyo et al. (2009, Figura No.4b).



a) Colonia de *Fusarium* spp. en medio de cultivo PDA con cinco días de edad.
b) Macroconidios *Fusarium* spp. (40X).

Figura No.4. Crecimiento de *Fusarium* spp. en medio de cultivo PDA y estructura de identificación.

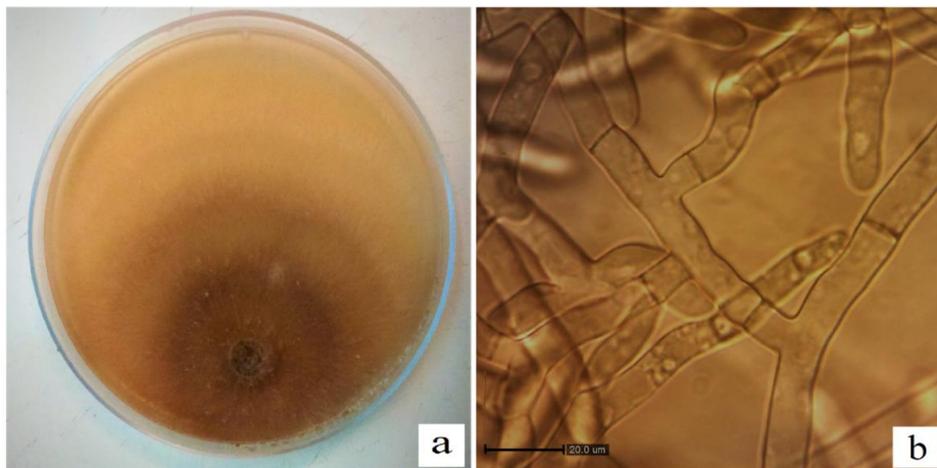
Se aislaron 20 colonias de *Cylindrocarpon* spp. produciendo micelio aéreo de color naranja a marrón oscuro (Figura No.5a) de crecimiento relativamente lento. Luego de diez días, se observaron abundantes conidios hialinos, generalmente rectos con ambos extremos redondeados (Figura No.5b), con tres septas coincidiendo con la descripción por Barnett y Hunter (1972), Adhikari et al. (2013).



a) Colonia de *Cyindrocarpon* spp. en medio de cultivo PDA con cinco días de edad.
 b) Macroconidios de *Cyindrocarpon* spp. (40X).

Figura No.5. Crecimiento de *Cyindrocarpon* spp. en medio de cultivo PDA y estructura de identificación.

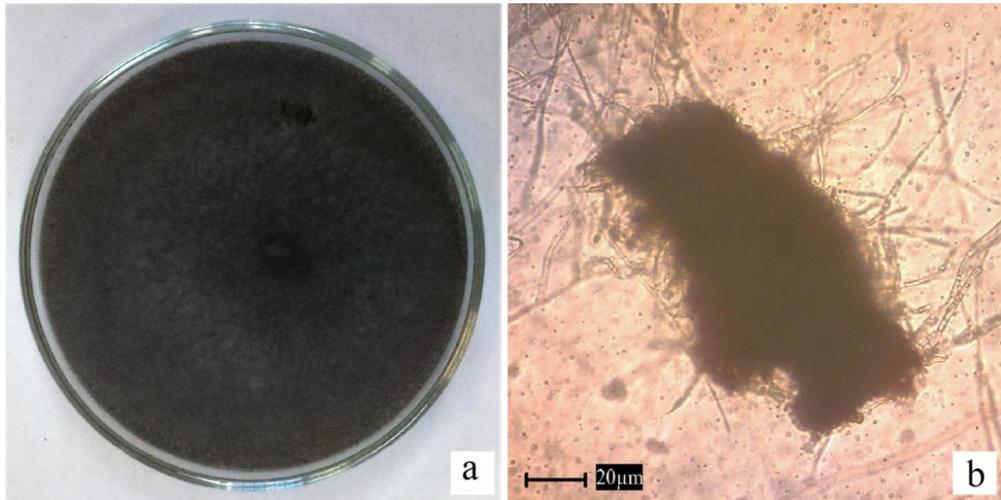
Las colonias de *Rhizoctonia* spp. (8) mostraron crecimiento muy rápido, produciendo abundante micelio de color marrón oscuro a marrón claro (Figura No.6a). No se observó presencia de esporas y el micelio del hongo presentó ramificaciones en ángulo recto similares a las descritas por Barnett y Hunter (1972), Zhong et al. (2016, Figura No.6b).



a) Colonia de *Rhizoctonia* sp. en medio de cultivo PDA.
 b) Micelio con ramificaciones en ángulo recto (40X).

Figura No.6. Crecimiento de *Rhizoctonia* spp. en medio de cultivo PDA y estructura de identificación.

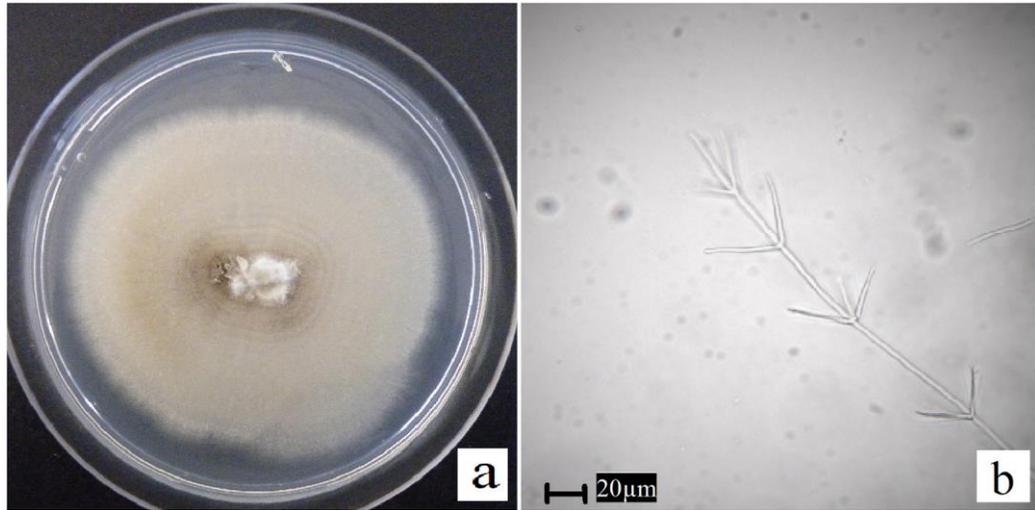
Las dos colonias de *Macrophomina* sp. presentaron crecimiento micelial aéreo de color gris oscuro (Figura No.7a) y luego de diez días se observaron microesclerocios de forma irregular (Figura No.7b), similares a los descritos por Avilés et al. (2007), Sánchez et al. (2013).



a) Colonia de *Macrophomina* sp. en medio de cultivo PDA.
b) Microesclerocio (40X).

Figura No.7. Crecimiento de *Macrophomina phaseolina* en medio de cultivo PDA y estructura de identificación.

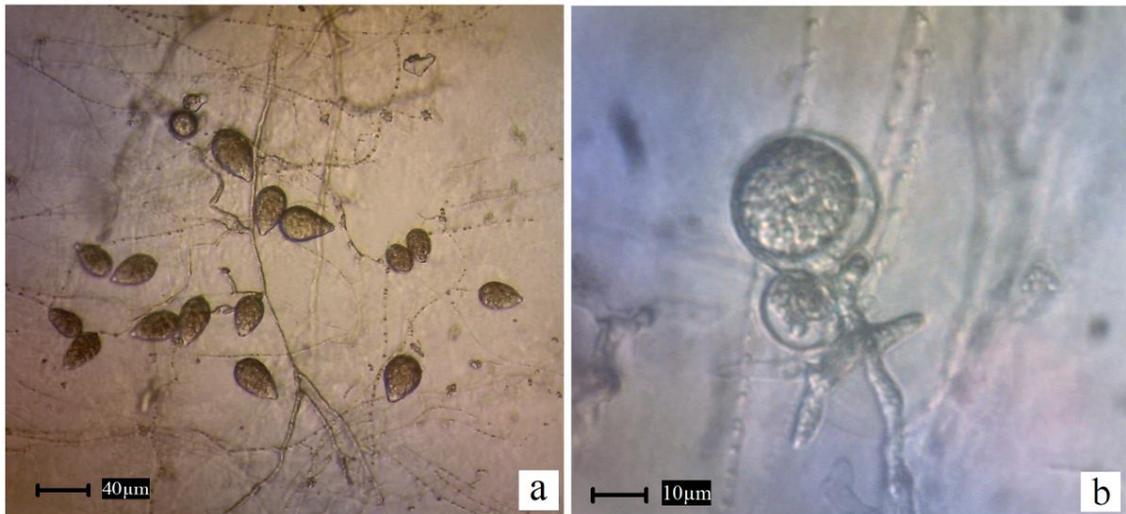
El aislado de *Verticillium* spp. presentó crecimiento lento, produciendo micelio de color blanco (Figura No.8a) y conidióforos delgados con fiálides verticiladas (Figura No.8b) donde se observaron conidios hialinos, elípticos unicelulares similares a los descritos por Barnett y Hunter (1972). Luego de 15 días se observó presencia de esclerocios de color negro.



a) Colonia de *Verticillium* spp. en medio de cultivo PDA.
 b) Fiálides verticiladas (40X).

Figura No.8. Crecimiento de *Verticillium* spp. en medio de cultivo PDA y estructura de identificación.

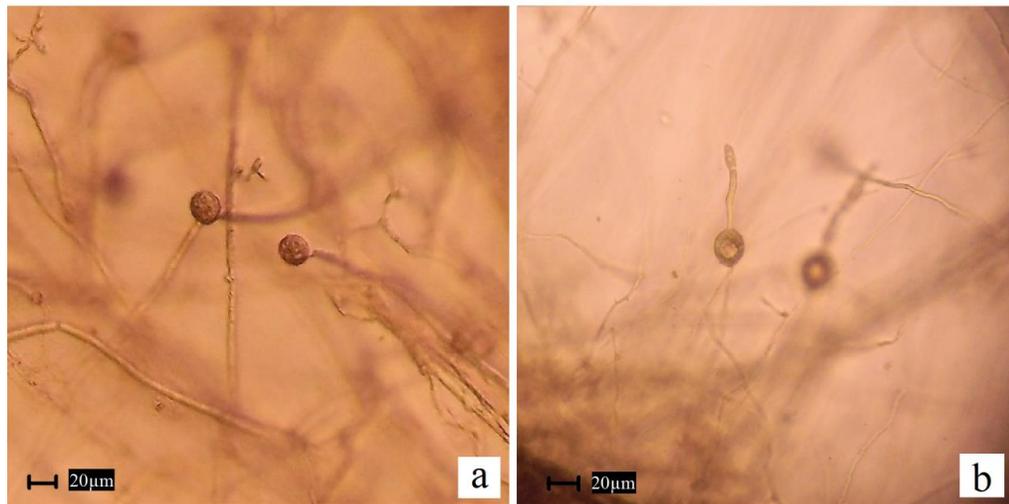
En el caso de *Phytophthora* spp. se observó micelio cenocítico de color blanco y de crecimiento lento, y se formaron esporangios elipsoides papilados y oosporas (Figura No.9a).



a) Micelio cenocítico, esporangios y una oospora (40X).
 b) Oospora en oogonio con anteridio paragíneo (60X).

Figura No.9. Estructuras de identificación de *Phytophthora cactorum*.

Las tres colonias de *Pythium* spp. mostraron rápido crecimiento produciendo abundante micelio de color blanco. Se observó micelio cenocítico, esporangios terminales (globosos y lisos) similares a las descritas por Agrios (2017) como se observa en la Figura No.10a.



a) Esporangios terminales sin papilas (40X).
b) Micelio cenocítico y esporangios germinados (40X).

Figura No.10. Estructuras de identificación de *Pythium* spp.

4.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Por medio del alineamiento de las secuencias de los aislados con las depositadas en el GenBank se identificaron los organismos a nivel de especie. Las cinco secuencias de *Neopestalotiopsis* sp. presentaron una identidad de 100 % con la cepa KU096881.1 de *Neopestalotiopsis clavispora*; mientras que las cuatro de *Fusarium* spp. tres presentaron una identidad de 99 % con la cepa KP964878.1 de *Fusarium oxysporum* y una mostró una identidad de 100 % con la cepa KP964908.1 de *Fusarium proliferatum*. En el caso de las dos secuencias de *Cylindrocarpon* spp. una presentó identidad de 100 % con las cepa HG977513.1 de *Dactylonectria novozelandica* y la otra presentó 100 % de identidad con la cepa KF633159.1 de *Dactylonectria macrodidyma*. La secuencia de *Macrophomina* sp. mostró una identidad de 100 % con la cepa KU578313.1 de *Macrophomina phaseolina*. Así la de *Phytophthora* spp. mostró una identidad del 99 % con la cepa KJ128036.1 de *Phytophthora cactorum*.

Por otro lado dos de las tres secuencias amplificadas de *Rhizoctonia* spp. mostraron una identidad de 99 % con la cepa AY927350.1 de *Ceratobasidium* spp. (telomorfo de *Rhizoctonia*) y la otra secuencia mostró una identidad de 99 % con la cepa

JQ859849.1 de *Rhizoctonia* sp. AG-A, no siendo posible identificar las especies de los aislados con los cebadores utilizados (ITS1/ ITS4).

5. DISCUSIÓN

La sintomatología observada en raíces y coronas coincidió con la descrita en la bibliografía. Sin embargo quedó en evidencia la dificultad de asociar un síntoma a un patógeno específico, esto se debe a que los síntomas provocados por distintos organismos son similares y en la mayoría de los casos se aisló más de un patógeno por planta.

En estudios realizados por Ceja et al. (2008) en México, Fang et al. (2010) en Australia, Koike y Bolda (2013) en California, encontraron que *Fusarium oxysporum* fue aislado en mayor frecuencia de plantas de frutilla. Sin embargo en Uruguay el hongo que se aisló más frecuentemente fue *Neopestalotiopsis* sp. seguido por *Fusarium* spp.

Neopestalotiopsis clavispora no había sido reportado hasta 2015 como patógeno de frutilla, hasta estudios realizados por Chamorro et al. (2016), Dung et al. (2016) que mostraron a *N. clavispora* como el agente causal de la necrosis de raíz y corona en frutilla. En Uruguay se reportó a esta especie causando muerte de ramas de arándanos (*Vaccinium corymbosum*, González et al., 2012), pero no se ha reportado como patógenos de frutilla.

El complejo de *Fusarium oxysporum* comprende tanto cepas patógenas como no patógenas. Las cepas patógenas se agrupan en formas especiales según la especificidad del huésped, *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* es patógeno específico de la frutilla (Arroyo et al. 2009, Koike 2009). En este trabajo se identificó *Fusarium oxysporum* y *Fusarium proliferatum* este último reportado como patógeno de espárragos, ajo y cebolla produciendo podredumbre de raíces (Molinero et al., 2010).

Cylindrocarpon destructans se aisló frecuentemente de plantas de frutilla (Manici et al. 2005, Marocko 2006, Fang et al. 2011), mientras que Adhikari et al. (2013) asociaron a *Cylindrocarpon* spp. como responsables de necrosis de raíces y coronas. Recientemente Weber y Entrop (2017) aislaron a *Dactylonectria torresensis* como responsable de necrosis de raíces. En este trabajo se aislaron *Dactylonectria novozelandica* y *Dactylonectria macrodidyma* (anamorfos de *Cylindrocarpon*) sin embargo no hay información que mencione a estas especies como patógenos de la frutilla.

Según France (2013) es común aislar *Rhizoctonia* spp., *Cylindrocarpon* spp. y *Fusarium* spp. tanto en forma individual o formando un complejo de hongos en las raíces. Es muy frecuente la asociación entre distintos patógenos los que en conjunto producen mayor daño. En este trabajo en el 81,8 % de las plantas se aisló más de un microorganismo formando distintos complejos.

6. CONCLUSIONES

Por primera vez en Uruguay se determinó que *Neopestalotiopsis clavispora*, *Dactylonectria novozelandica* y *Dactylonectria macrodidyma* están asociados a la muerte de plantas de frutilla.

Se determinó que los géneros *Neopestalotiopsis* sp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Cylindrocarpon* spp., *Macrophomina* sp., *Verticillium* spp., *Pythium* spp., y *Phytophthora* spp. están asociados a la muerte de plantas de frutilla en el departamento de Salto. Estos organismos se aislaron como único género presente o formando distintos complejos.

Existe la necesidad de identificar los microorganismos a nivel de especie y realizar prueba de patogenicidad de aquellos organismos que no estén reportados en el país. También es necesario conocer cuál es el organismo inicial de la enfermedad, y en qué momento del ciclo ocurre la infección de las plantas.

7. RESUMEN

El cultivo de frutilla es uno de los principales cultivos protegidos en el litoral norte del Uruguay, donde se observó una importante muerte de plantas. El objetivo de este trabajo fue identificar los organismos asociados a la muerte de plantas de frutilla en el departamento de Salto haciendo énfasis en enfermedades de raíz y corona. Se observaron y describieron los síntomas que aparecen asociados a la muerte de plantas y se aislaron e identificaron los agentes asociados mediante caracterización morfológica y el uso de herramientas moleculares. Para la toma de muestras, se visitaron diecinueve predios hortícolas distribuidos en seis zonas: Colonia 18 de Julio, Colonia Osimani, Colonia Garibaldi, Colonia Gestido, Hipódromo y Granja Santana. Se colectaron 33 plantas de frutilla (dieciséis plantas de la variedad INIA Guapa, diez de INIA Yuri, tres de Festival, tres de Benicia y una de INIA Ágata) con síntomas de marchitamiento, hojas rojizas, secas y necrosis interna de raíces y coronas. Las plantas colectadas se procesaron en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República (Montevideo y Salto). A partir de las 33 plantas procesadas se obtuvieron 110 aislados, donde *Neopestalotiopsis* sp. y *Fusarium* spp. fueron los hongos aislados en 81,8 % y 75,7 % de las plantas respectivamente. *Cylindrocarpon* spp. estuvo presente en el 42,4 % de las plantas, seguido por *Rhizoctonia* spp. en un 24,2 %, en menor proporción se aislaron *Pythium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Phytophthora cactorum* y *Verticillium* sp. en un 21 % de las plantas. Estos organismos se aislaron en el 18,2 % de las plantas como único hongo presente y en el 81,8 % se aislaron formando diferentes complejos. No se logró asociar un síntoma a un patógeno específico ya que un mismo síntoma puede ser provocado por varios patógenos y generalmente se aísla más de un patógeno de una necrosis.

Palabras clave: Identificación morfológica y molecular; *Neopestalotiopsis* sp.; *Fusarium* spp.; *Cylindrocarpon* spp.; *Rhizoctonia* spp.; *Pythium* spp.; *Macrophomina phaseolina*; *Phytophthora cactorum*; *Verticillium* sp.

8. SUMMARY

Strawberry is one of the main protected crops in the north coast of Uruguay, where an important death of plants was observed. The objective of this work was to identify the organisms associated with the death of plants of strawberry in the department of Salto emphasizing root and crown diseases. The symptoms associated with plant death were observed and described and the associated agents were isolated and identified by morphological characterization and the use of molecular tools. For the sampling, nineteen horticultural estates were distributed in six areas: Colonia 18 de Julio, Colonia Osimani, Colonia Garibaldi, Colonia Gestido, Hipodromo and Granja Santana. 33 strawberry plants (sixteen INIA Guapa plants, ten INIA Yuri plants, three Festival plants, three Benicia plants and one INIA Agate plant) were collected with symptoms of wilting, reddish or dry leaves, and internal necrosis of roots and crowns. The collected plants were processed in the Phytopathology Laboratory of the Faculty of Agronomy, University of the Republic (Montevideo and Salto). From the 33 plants processed, 110 isolates were obtained, where *Neopestalotiopsis* sp. and *Fusarium* spp. were isolated fungi in 81,8 % and 75,7 % of the plants respectively. *Cylindrocarpon* spp. was present in 42,4 % of the plants, followed by *Rhizoctonia* spp. in 24,2 %, to a lesser extent, *Pythium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Phytophthora cactorum* and *Verticillium* sp. in 21 % of the plants. These organisms were isolated in 18,2 % of the plants as the sole fungus present and in 81,8 % they were isolated forming different complexes. It was not possible to associate a symptom to a specific pathogen since the same symptom can be provoked by several pathogens and more than one pathogen is usually isolated from a necrosis.

Keywords: Morphological and molecular identification; *Neopestalotiopsis* sp.; *Fusarium* spp.; *Cylindrocarpon* spp.; *Rhizoctonia* spp.; *Pythium* spp.; *Macrophomina phaseolina*; *Phytophthora cactorum*; *Verticillium* sp.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. 2017. Fitopatología. 2ª. ed. México, D. F., Limusa. 838 p.
2. Aldabe Dini, L. 2000. Producción de hortalizas en Uruguay. Montevideo, Epsilon. 269 p.
3. Adhikari, T. B.; Hodges, C. S.; Louws, F. J. 2013. First report of *Cylindrocarpon* sp. associated with root rot disease of strawberry in North Carolina. (en línea). Plant Disease. 97(9): 1251. Consultado 6 may. 2017. Disponible en http://www.apsnet.org/publications/plantdisease/2013/September/Pages/97_9_1251.1.aspx
4. Avilés, M.; Castillo, S.; Bascon, J.; Zea-Bonilla, T.; Martín-Sánchez, P. M.; Pérez-Jiménez, R. M. 2008. First report of *Macrophomina phaseolina* causing crown and root of strawberry in Spain. (en línea). Plant Pathology. 57(2): 382. Consultado 2 may. 2017. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Manuel_Aviles3/publication/230366718_First_report_of_Macrophomina_phaseolina_causing_crown_and_root_rot_of_strawberry_in_Spain/links/542521390cf26120b7ac5c50/First-report-of-Macrophomina-phaseolina-causing-crown-and-root-rot-of-strawberry-in-Spain.pdf
5. Arroyo, F. T.; Llergo, Y.; Aguado, A.; Romero, F. 2009. First report of fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* on strawberry in Spain. (en línea). Plant Disease. 93(3): 323. Consultado 8 may. 2017. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-93-3-0323B>
6. Barnett, H.; Hunter, B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd. ed. Minneapolis, Burgess. 241 p.
7. Bell, J. A.; Simpson, D. W.; Harris, D. C. 1997. Development of a method for screening strawberry germplasm for resistance to *Phytophthora cactorum*. Acta Horticulturae. no. 439: 175-179.
8. Bhat, R. G.; Subbarao, K. V. 1999. Host range specificity in *Verticillium dahliae*. (en línea). Phytopathology. 89(12): 1218-1225. Consultado 18 mar. 2017. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18944648>
9. Bi, Y.; Guo, W.; Zhang, G. J.; Liu, S. C.; Chen, Y. 2017. First report of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose of strawberry in China. (en línea). Plant Disease. 101(5): 832. Consultado 6 may. 2017. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-07-16-1036-PDN>

10. Bolda, M.; Koike, S. 2013. 3 ago. 2013. Actualidades de marchitez de *Verticillium* en California en 2013. (en línea, blog). Davis, University of California. ANR. s.p. <http://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=11047>
11. Brooks, A. N. 1931. Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*. *Phytopathology*. 21(7): 739-744.
12. Cardoso, C. O. N. 1980. Doenças do morangueiro; *Fragaria vesca*. In: Galli, F. ed. Manual de fitopatología. São Paulo, Agronômica Ceres. pp.392-403.
13. Ceja, L.; Mora, G.; Téliz, D.; Mora, A.; Sánchez, P.; Muñoz, C.; Tlapal, B.; de la Torre, R. 2008. Ocurrencia de hongos y etiología de la secadera de la fresa com diferentes sistemas de manejo agronómico. (en línea). *Agrociencia*. 42: 451-461. Consultado 16 may. 2017. Disponible en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000400008
14. Chamorro, M.; Aguado, A.; de los Santos, B. 2016. First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. (en línea). *Plant Disease*. 100(7): 1495. Consultado 13 abr. 2017. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-11-15-1308-PDN>
15. Darrow, G. 1966. The strawberry; history, breeding and physiology. (en línea). New York, Holt, Rinehart and Winston. 447 p. Consultado 8 mar. 2017. Disponible en https://specialcollections.nal.usda.gov/speccoll/collectionsguide/darrow/Darrow_TheStrawberry.pdf
16. De Cal, A.; Martínez-Treceño, A.; López-Aranda, J. M.; Melgarejo, P. 2004. Chemical alternatives to methyl bromide in Spanish strawberry nurseries. (en línea). *Plant Disease*. 88(2): 210-214. Consultado 12 jul. 2017. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2004.88.2.210>
17. Dung, L. N.; Hoang Dai, P.; Ngoc Tuan, P. 2016. The first report of *Pestalotiopsis* sp. causing crown rot disease on strawberries in Dalat. (en línea). *Dalat University Journal of Science*. 6(3): 364-376. Consultado 2 mar. 2017. Disponible en <http://www.vjol.info/index.php/dhdl/article/viewFile/26325/22527>
18. Elad, Y.; Chet, I.; Henis, Y. 1981. Biological control of *Rhizoctonia solani* in strawberry fields by *Trichoderma harzianum*. (en línea). *Plant Soil*. 60(2):

- 245-254. Consultado 6 mar. 2017. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/248057717_Biological_control_of_Rhizoctonia_solani_in_strawberry_fields_by_Trichoderma_harzianum
19. Elmer, W. H.; LaMondia, J. A. 1999. Influence of ammonium sulfate and rotation crops on strawberry black root rot. (en línea). *Plant Disease*. 83(2): 119-123. Consultado 4 mar. 2017. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS.1999.83.2.119>
20. Erwin, D.; Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul, Minnesota, APS. 562 p.
21. Fang, X. L.; Phillips, D.; Hua, L.; Sivasithamparam, K.; Barbetti, M. J. 2011. Severity of crown and root diseases of strawberry and associated fungal and oomycete pathogens in western Australia. (en línea). *Australasian Plant Pathology*. 40(2): 109-119. Consultado 16 may. 2017. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s13313-010-0019-5>
22. _____; Kuo, J.; Usted, M. P.; Finnegan, P. M.; Barbetti, M. J. 2012. Comparative root colonization of strawberry cultivars Camarosa and Festival by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Fragariae*. (en línea). *Plant and Soil*. 358(1-2): 75-89. Consultado 16 may. 2017. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-012-1205-8>
23. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2014. The statistical database (FAOSTAT). (en línea). Rome. s.p. Consultado 10 mar. 2017. Disponible en <http://faostat.fao.org/>
24. Farr, D. F.; Bills, G. F.; Chamuris, G. P.; Rossman, A. Y. 1989. *Fungi on plants and plant products in the United States*. (en línea). *Mycology*. 82(3): 405-407. Consultado 7 mar. 2017. Disponible en https://www.jstor.org/stable/3759917?seq=1#fndtn-page_thumbnails_tab_contents
25. Folquer, F. 1986. *La frutilla o fresa; estudio de la planta y su producción comercial*. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 150 p.
26. France, A. 2013. Manejo de enfermedades en frutilla. *In*: Undurraga, P.; Vargas, S. eds. *Manual de frutilla*. Chillán, Centro Regional de Investigación Quilamapu. cap. 6, pp. 61- 72 (Boletín INIA no. 262).
27. Freeman, S.; Katan, T. 1997. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. (en línea).

- Phytopathology. 87(5): 516-521. Consultado 4 mar. 2017. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945106>
28. _____.; _____.; Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsable for anthracnose diseases of various fruits. (en línea). Plant Disease. 82(6): 596-605. Consultado 13 abr. 2017. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PDIS.1998.82.6.596>
29. Giménez, G.; Paullier, J.; Maeso, D. 2003. Identificación y manejo de las principales enfermedades y plagas en el cultivo de frutilla. Montevideo, INIA. 56 p. (Boletín de Divulgación no. 82).
30. _____.; Lenzi, A. 2015. El primer cultivar de frutilla de día neutro de INIA: L BK 36.1. In: Jornada de Divulgación Nuevo Sistema de Producción de Frutilla en el Sur del País (2015, Las Brujas, Canelones). Nuevo sistema de producción de frutilla en el sur del país. Montevideo, INIA. pp. 11- 13 (Actividades de Difusión no. 758).
31. González, P.; Alaniz, S.; Montelongo, M. J.; Rauduviniche, L.; Rebellato, J.; Silvera- Pérez, E.; Mondino, P. 2012. First report of *Pestalotiopsis clavispora* causing dieback on blueberry in Uruguay. (en línea). Plant Disease. 96(6): 914. Consultado 6 ago. 2017. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-12-11-1070-PDN>
32. Grantina- levina, L.; Kalnina, I. 2016. Strawberry crown rot; a common problem in 2015. (en línea). Environmental and Experimental Biology. 14: 51-52. Consultado 10 may. 2017. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Lelde_Grantina-Ievina/publication/299557475_Strawberry_crown_rot_-_a_common_problem_in_2015/links/56feb20b08ae1408e15d096e/Strawberry-crown-rot-a-common-problem-in-2015.pdf
33. Harris, D. C.; Yang, J. R. 1996. The relationship between the amount of *Verticillium dahliae* in soil and the incidence of strawberry wilt as a basis for disease risk prediction. (en línea). Plant Pathology. 45(1): 106-114. Consultado 3 mar. 2017. Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.1996.45.issue-1/issuetoc>
34. Howard, C. M.; Maas, J. L., Chandler; C. K.; Albregts, E. E. 1992. Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. (en línea). Plant Disease. 76(10): 976-981. Consultado 4 mar. 2017. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1992Articles/PlantDisease76n10_976.pdf

35. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, UY). 2016. Cultivares de frutilla en el litoral norte; Salto Grande. Montevideo. s.p.
36. Ishiguro, Y.; Otsubo, K.; Watanabe, H.; Suzuki, M.; Nakayama, K. Fukuda, T.; Fujinaga, M; Suga, H.; Kageyama, K. 2014. Root and crown rot of strawberry caused by *Pythium helicoides* and its distribution in strawberry production areas in Japan. (en línea). Journal of General Plant Pathology. 80(5): 423-429. Consultado 22 may. 2017. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s10327-014-0520-8>
37. Katznelson, H.; Richardson, L. T. 1948. Rhizosphere studies and associated microbiological phenomena in relation to strawberry root rot. (en línea). Scientific Agriculture. 28(7): 293-308. Consultado 4 mar. 2017. Disponible en http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.4141/sa-1948-0045?journalCode=sa#.WTnXoWg1_IV
38. Koike, S. T. 2008. Crown rot of strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in California. (en línea). Plant Disease. 92(8): 1253. Consultado 8 may. 2017. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-92-8-1253B>
39. _____; Gordon, T. R.; Daugorish, O.; Ajwa, H.; Martin, F. 2013. Charcoal rot of strawberry. (en línea). Watsonville, CA, California Strawberry Commission. 6 p. (Production Guideline. no. 10). Consultado 10 may. 2017. Disponible en <http://www.calstrawberry.com/Portals/0/Reports/Research%20Reports/Production%20Guidelines/English/Charcoal%20Rot%20of%20Strawberry%20-%202013.pdf>
40. Leandro, L. F. S.; Gleason, M. L.; Nutter, F. W.; Wegulo, S. N. Jr.; Dixon, P. M. 2002. Influence of temperature and wetness duration on conidia and appressoria of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. (en línea). Phytopathology. 93(4): 513- 520. Consultado 11 may. 2017. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2003.93.4.513>
41. Maas, J. L. 1984. Compendium of strawberry diseases. St. Paul, Minnesota, APS. 96 p.
42. _____; Galletta, G. J.; Draper, A. D. 1989. Resistance in strawberry to races of *Phytophthora fragariae* and to isolates of *Verticillium* from North America. (en línea). Acta Horticulturae. no. 265: 521-526. Consultado 12 mar. 2017. Disponible en http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=265_77

43. _____.; _____.; Wilhelm, S. 1991. Pest management systems for strawberry diseases. *In*: Pimentel, D. ed. CRC Handbook of pest management in agriculture. 2nd. ed. Boca Raton, FL, CRC. cap. 3, pp. 553-571.
44. _____. 1998. Compendium of strawberry diseases. 2nd. ed. St. Paul, Minnesota, APS. 98 p.
45. _____. 2004. Strawberry disease management. *In*: Naqvi, S. ed. Diseases of fruits and vegetables. Maryland, USDA. v. 2, pp. 441-483.
46. McInnes, T. B.; Black, L. L.; Gatti, J. M. 1992. Disease-free plants for management of strawberry anthracnose crown rot. (en línea). Plant Disease. 76(3): 260-264. Consultado 10 mar. 2017. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1992Articles/PlantDisease76n03_260.pdf
47. Manici, L. M.; Caputo, F.; Baruzzi, G. 2005. Additional experiences to elucidate the microbial component of soil suppressiveness towards strawberry black root rot complex. (en línea). Annals of Applied Biology. 146(4): 421-431. Consultado 25 may. 2017. Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744-7348.2005.040051.x/abstract>
48. Maroto Borrego, J. V.; López Galarza, S. 1988. Producción de fresas y fresones. Madrid, Mundi- Prensa. 119 p.
49. Mertely, J.; Seijo, T.; Peres, N. 2005. First report of *Macrophomina phaseolina* causing a crown rot of strawberry in Florida. (en línea). Plant Disease. 89(4): 434. Consultado 3 abr. 2017. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PD-89-0434A>
50. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2015. Encuesta hortícola Zona Sur y Litoral Norte 2014. (en línea). Montevideo. 22 p. (Serie de Encuestas no. 318). Consultado 8 abr. 2017. Disponible en <http://www2.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-ipr-produccion-vegetal-horticultura,O,es,0>
51. _____. DIGEGRA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de la Granja, UY). 2015. Anuario estadístico agropecuario 2015. Montevideo. pp. 107-109.

52. Milholland, R. D. 1994. A monograph of *Phytophthora fragariae* and the red stele disease of strawberry. Agricultural Research Service, NC. State University. Technical Bulletin no. 306. 35 p.
53. Molinero- Ruíz, L.; Rubio- Pérez, E.; González- Domínguez, E.; Basallote- Ureba, M. J. 2010. Alternative hosts for *Fusarium* spp. causing Crown root rot of asparagus in Spain. (en línea). Journal of Phytopathology. 159(2): 114-116. Consultado 6 ago. 2017. Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0434.2010.01723.x/full>
54. Molot, P. M.; Nourrisseau, J. G. 1974. Influence de quelques substances de croissance sur la sensibilité du fraisier aux attaques de *Phytophthora cactorum*. Fruits. no. 29: 697-702.
55. _____.; _____. 1978. Bilan des recherches réalisées par l' I.N.R.A. pour lutter contre le *Phytophthora cactorum* du fraisier. Revue Horticole: Pépiniéristes, Horticulteurs et Maraichers. 191: 23-33.
56. Montgomerie, I. G. 1977. Red core disease of strawberry. Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops. Horticultural Review no. 5. 47 p.
57. Morocko, I. 2006. Characterization of the strawberry pathogen *Gnomonia fragariae*, and biocontrol possibilities. Thesis PhD. Uppsala, Sweden. University of Agricultural Sciences. 43 p.
58. NCBI (National Center for Biotechnology Information, US). s.f. Taxonomy browser. (en línea). Bethesda. s.p. Consultado 15 nov. 2016. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>
59. Nickerson, N. L.; Maas, J. L. 1991. Red stele in North America. In: Dale, A.; Luby, J. J. eds. The strawberry into the 21st century. Portland, Timber Press. pp.195-201.
60. Ntahimpera, N.; Madden, L. V.; Wilson, L. L. 1997. Effect of rain distribution alteration on splash dispersal of *Colletotrichum acutatum*. (en línea). Phytopathology. 87(6): 649-655. Consultado 13 mar. 2017. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945084>
61. Ouchi, S.; Toyoda, H.; Morimoto, M.; Kurusu, T.; Matsuda, Y.; Goto, S.; Fukamizo, T. 1992. Integration of chitin-degrading microbes into biological control system for *Fusarium* wilt of strawberry. In: Tjamos, E. C.; Papaviza, G. C.; Cook, R. J. eds. Biological control of plant diseases. New York, Plenum. pp. 335-339.

62. Okayama, K.; Horimoto, K.; Kobatake, H.; Kodama, T.; Kitagawa, Y. 1988. Studies on the control of Fusarium wilt of strawberry by preceding crops I. Effects of preceding crops on Fusarium wilt of strawberry and presence of microorganisms in the soil. Bulletin Nara-ken Agricultural Experiment Station. 19: 67-78.
63. Palocci, F.; Rubini, A.; Granetti, B.; Arcioni, S. 1999. Rapid molecular approach for reliable identification Tuber spp. ectomyrrhizae. Fems Microbiology Ecology. 28(1): 23-30.
64. Patridge, D. s.f. *Macrophomina phaseolina*. Proyect PP728. (en línea). Raleigh, North Carolina State University. Department of Plant Pathology. College of Agriculture and Life Sciences. s.p. Consultado 18 may. 2017. Disponible en https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Macrophomina/macrophominia_phaseolinia.HTM
65. Phillips, A. J. L.; Alves, A.; Correia, A.; Luque, J. 2005. Two new species of Botryosphaeria with brown, 1-septate ascospores and Dothiorella anamorphs. (en línea). Mycologia. 97(2): 513-529. Consultado 12 may. 2017. Disponible en <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15572536.2006.11832826>
66. Rebellato, L.; Monteiro, C. 1987. El fenómeno de la muerte de plantas de frutilla en el Uruguay. In: Jornadas Nacionales de Horticultura (1as., 1987, Montevideo). Resúmenes. Montevideo, s.e. s.p.
67. Rodríguez, J. P; Hompanera, N. R. 1988. Producción de plantines para la multiplicación de frutilla. San Pedro, INTA. 38 p. (Manual de producción de semillas hortícolas fasc. 2).
68. Sánchez, S.; Gambardella, M.; Henríquez, J. M.; Díaz, I. 2013. First report of crown rot of strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in Chile. (en línea). Plant Disease. 97(7): 996. Consultado 4 may. 2017. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-12-12-1121-PDN>
69. Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. (en línea). Molecular Biology and Evolution. 28(10): 2731-2739. Consultado 5 mar. 2017. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546353>
70. Tanaka, M. A.; Passos, F. 2002. Caracterização patogênica de *Colletotrichum acutatum* e *c. fragariae* associados à antracnose do morangueiro. (en línea). Fitopatologia Brasileira. 27(5): s.p. Consultado 12 jul. 2017. Disponible en

http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-41582002000500008&script=sci_arttext

71. Thomson, T. B.; Athow, K. L.; Laviolette, F. A. 1971. The effect of temperature on the pathogenicity of *Pythium aphanidermatum*, *P. debaryanum* and *P. ultimum* on Soybean. (en línea). *Phytopathology*. 61: 933-935.
72. Shaw, D. V.; Larson, K. D. 1999. A meta-analysis of strawberry yield response to preplant soil fumigation with combinations of methyl bromide-chloropicrin and four alternative systems. (en línea). *HortScience*. 34(5): 839-845. Consultado 16 mar. 2017. Disponible en <http://hortsci.ashspublications.org/content/34/5/839.full.pdf>
73. Vicente, C. E.; Manzioni, A.; Giménez, G.; González, M.; Lado, J.; Buenahora, J.; Vilaró, F. 2010. Cultivar de frutilla Yuri (SGK3.2); mejorando la calidad de la oferta invernal. INIA. Hoja de divulgación no. 103. s.p.
74. _____.; Giménez, G. 2017. Frutillas. *In*: González, M.; Giménez, G. eds. Catálogo de cultivares hortícolas. 2^a. ed. Montevideo, INIA. pp. 29-39 (Boletín de Divulgación no. 113).
75. Watanabe, T. 1977. Pathogenicity of *Pythium myriotylum* isolated from strawberry roots in Japan. (en línea). *Phytopathological Society Japan*. 43: 306-309. Consultado 13 may. 2017. Disponible en https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjphytopath1918/43/3/43_3_306/article-char/ja/
76. White, T.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. *In*: Innis, M.; Gelfand, D.; Sininsky, J.; White, T. eds. *PCR protocols, a guide to methods and applications*. San Diego, California, Academic Press. pp. 315-322.
77. Wing, K. B.; Pritts, M. P.; Wilcox, W. F. 1994. Strawberry black root rot; a review. *Advances in Strawberry Research*. 13: 13-19.
78. _____.; _____.; _____. 1995. Biotic, edaphic, and cultural factors associated with strawberry black root rot in New York. (en línea). *HortScience*. 30(1): 86-90. Consultado 14 mar. 2017. Disponible en <http://hortsci.ashspublications.org/content/30/1/86.full.pdf+html>
79. Winks, B. L.; Williams, Y. N. 1965. A wilt of strawberry caused by a new form of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Agriculture and Animal Science*. 22: 475-479.

80. Yildiz, A.; Benlioglu, K.; Benlioglu, H. S. 2014. First report of strawberry dieback caused by *Lasiodiplodia theobromae*. (en línea). Plant Disease. 98(11): 1571. Consultado 12 may. 2017. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-11-13-1192-PDN>
81. Yuen, G. Y.; Schroth, M. N.; Weinhold, A. R.; Hancock, J. G. 1991. Effects of soil fumigation with methyl bromide and chloropicrin on root health and yield of strawberry. (en línea). Plant Disease. 75: 416-420. Consultado 12 mar. 2017. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1991Articles/PlantDisease75n04_416.PDF