

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Cylindrocarpon* spp. (*Dactylonectria*
spp.) ASOCIADOS A LA NECROSIS DE RAÍZ Y CORONA DE FRUTILLA

por

Micaela VIGLIECCA FRANK

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

MONTEVIDEO
URUGUAY
2020

Tesis aprobada por:

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

Ing. Agr. MSc. Pablo González

Ing. Agr. Dr. Esteban Vicente

Fecha: 09 de julio de 2020

Autora: -----
Micaela Vigliecca Frank

AGRADECIMIENTOS

A los directores de tesis por su constante guía, dedicación y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Al grupo disciplinario del Laboratorio de Fitopatología por siempre estar dispuestos a brindar su ayuda. A Alex Machín por la enseñanza de las primeras técnicas de laboratorio para la realización de esta tesis.

A mi familia por el apoyo y sostén durante toda la carrera.

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.....	3
2.4. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN URUGUAY.....	3
2.5. ENFERMEDADES DE RAÍZ Y CORONA.....	3
2.6. PODREDUMBRE DE RAÍZ NEGRA POR <i>Cylindrocarpon</i> spp.....	4
2.6.1. <u>Distribución mundial</u>	4
2.6.2. <u>Descripción taxonómica y morfológica</u>	5
2.6.3. <u>Descripción del género</u>	6
2.6.4. <u>Síntomas en frutilla</u>	7
2.6.5. <u>Rango de hospederos</u>	7
2.6.6. <u>Ciclo de desarrollo de la enfermedad</u>	8
2.6.7. <u>Condiciones que favorecen el desarrollo de la enfermedad</u>	8
2.6.8. <u>Prácticas de manejo para enfermedades de raíz y corona en frutilla</u>	9
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	12
3.1. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	12
3.1.1. <u>Extracción de ADN</u>	12
3.1.2. <u>Amplificación por PCR y secuenciación</u>	13
3.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA.....	14
3.3. PRUEBA DE PATOGENICIDAD.....	14

3.4.	RE-AISLAMIENTOS DE HONGOS A PARTIR DE RAÍZ Y CORONA.....	15
4.	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	17
4.1.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	17
4.2.	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA.....	17
4.3.	PRUEBA DE PATOGENICIDAD.....	20
5.	<u>CONCLUSIONES</u>	24
6.	<u>RESUMEN</u>	25
7.	<u>SUMMARY</u>	26
8.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	27

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Origen de los aislados de <i>Cylindrocarpon</i> spp. utilizados.....	12
2. Características del cebador <i>HIS</i>	13
3. Aislados de <i>Dactylonectria novozelandica</i> , <i>D. ecuadoriensis</i> y <i>D. macrodidyma</i> identificados mediante la secuencia parcial del gen <i>HIS</i> (histona <i>H3</i>)	17
4. Características morfológicas de los conidios de <i>Dactylonectria novozelandica</i> , <i>D. ecuadoriensis</i> y <i>D. macrodidyma</i>	19
Figura No.	
1. <i>Cylindrocarpon</i> spp.	5
2. Inoculación de plantas de frutilla cv. INIA Guapa.....	15
3. Crecimiento de <i>Dactylonectria novozelandica</i> y conidios	18
4. Crecimiento de <i>Dactylonectria ecuadoriensis</i> y conidios	18
5. Crecimiento de <i>Dactylonectria macrodidyma</i> y conidios.....	19
6. Síntomas en plantas de frutilla cv. INIA Guapa inoculadas con <i>Dactylonectria novozelandica</i>	21
7. Síntomas en plantas de frutilla cv. INIA Guapa inoculadas con <i>Dactylonectria ecuadoriensis</i>	21
8. Síntomas en plantas de frutilla cv. INIA Guapa inoculadas con <i>Dactylonectria macrodidyma</i>	22
9. Plantas de frutilla cv. INIA Guapa sin inocular	22

1. INTRODUCCIÓN

La frutilla (*Fragaria X ananassa* Duch.) en Uruguay se cultiva fundamentalmente en dos regiones, en el Sur en los departamentos de Canelones y San José, y en el Norte, en Salto. El cultivo tiene un rol estratégico en los sistemas prediales en donde se encuentra, su importancia radica en el uso intensivo de recursos, principalmente mano de obra y capital, generando altos márgenes de ganancia por unidad de superficie (Scarlatto, 2015).

La producción de frutilla ha sido perjudicada por una alta mortandad de plantas en el litoral Norte del país asociada a enfermedades de raíz y corona producidas por un complejo de patógenos que emergieron en el año 2015. Esta mortandad alcanzó pérdidas entre 30-50 % en cultivos destinados a la producción de fruta. Además, la pérdida fue total en plantas madres para viveros (Vicente et al., 2018).

En Uruguay se asociaron a la muerte de plantas los géneros *Neopestalotiopsis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Cylindrocarpon*, *Macrophomina*, *Verticillium*, *Pythium* y *Phytophthora*. Dentro del complejo de hongos *Cylindrocarpon* spp. se aisló en una frecuencia de 42,4 % ocupando el tercer lugar en cuanto a incidencia antecedido por *Neopestalotiopsis* sp. (81,8 %) y *Fusarium* spp. (75,7 %) de acuerdo con el relevamiento realizado por Machín (2017). El conocer cuáles son las especies del complejo que causan la necrosis de raíz y corona, es el primer paso necesario para la selección de las medidas de manejo que controlen la enfermedad.

Se desconocen las especies y la patogenicidad de los aislados de *Cylindrocarpon* asociados a la necrosis de raíz y corona de frutilla en Uruguay, así este trabajo plantea como objetivo caracterizar los aislados de *Cylindrocarpon* spp. mediante análisis molecular, morfológico y de patogenicidad en plantas de frutilla.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ORIGEN

La frutilla pertenece a la división Magnoliophyta (Angiospermae), clase Magnoliopsida (Dicotiledoneae), subclase Rosidae, orden Rosales, familia Rosaceae, subfamilia Rosoideae, tribu Potentillea y género *Fragaria* (Folquer 1986, Cronquist 1988).

Antiguamente en América del Norte se cultivaba la frutilla nativa *Fragaria virginiana* la cual poseía la capacidad de resistir bajas temperaturas y la sequía. Posteriormente en 1700 se descubrió en Chile una nueva variedad *Fragaria chiloensis*, la cual tenía un alto nivel de producción, pero su adaptación frente a un amplio rango de climas era restringida. En 1714 ocurrió la hibridación de *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana* dando lugar al cultivo actualmente utilizado *Fragaria X ananassa* Duch., su genotipo es octoploide al igual que el de las especies que le dieron origen (Husaini y Zaki, 2016).

A partir de 1800 *Fragaria X ananassa* Duch. constituye la especie botánica básica de las variedades de frutilla comerciales (Folquer, 1986).

2.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Fragaria X ananassa posee un hábito de vida perenne, en Uruguay se cultiva como anual o bianual, debido a que luego de este período los problemas sanitarios reducen la calidad y la productividad (Giménez, 2008).

Se reproduce vegetativamente por medio de los estolones, estos dan origen a las plantas hijas y en forma sexuada a través de semillas contenidas en los aquenios. La primera forma de reproducción se usa para fines comerciales mientras que la segunda es utilizada para mejoramiento genético (Giménez et al., 2003).

La planta está constituida por la corona, sistema radicular, hojas, flores, frutos y estolones. La corona de la planta constituye un tallo corto y cilíndrico, su color natural es el blanco, por lo que cualquier alteración produce decoloraciones, necrosis y/o podredumbres. El sistema radicular se forma a partir de la corona y se concentra en los primeros 15 cm de suelo. Las hojas son trifoliadas y se forman en los nudos de la corona disponiéndose en forma de espiral. Las inflorescencias se forman a partir de meristemas terminales de la corona, el número de inflorescencias formadas es variable y depende del cultivar y el clima. Los estolones son órganos vegetativos que se forman a partir de las yemas axilares de las hojas. El estolón posee nudos, en los cuales se desarrollan nuevas plantas o plantas hijas (Giménez et al., 2003).

2.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y SOCIAL

La frutilla es un cultivo muy popular mundialmente y tiene una alta demanda en los mercados frescos al igual que en la industria frutícola (Husaini y Abdin, 2008).

El principal productor es China con 2.955.453 toneladas, le sigue Estados Unidos con 1.296.272 toneladas, luego México con 653.639 toneladas, lo escolta Turquía con 440.968 toneladas y en quinto lugar se encuentra Egipto con 362.639 toneladas. El área cosechada en el mundo es de 372.361 hectáreas y la producción mundial es de 8.337.099 toneladas (FAO, 2018).

Por su parte Uruguay produjo 3198 toneladas en la zafra 2014/2015. La superficie ocupada por la producción de frutilla es de 130 hectáreas, 84 en el Sur y 46 en el Norte (MGAP. DIEA, 2019).

2.4. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN URUGUAY

La zona litoral Norte es la que produce la mayor parte de la frutilla en los meses de otoño, invierno y primavera temprana utilizando variedades de día corto. El sistema productivo se basa en cultivo protegido, ya sea en túneles o invernaderos. Las plantas se producen localmente en viveros bajo invernaderos ubicados en los mismos predios de producción de fruta, los estolones enraízan directamente en el suelo para luego trasplantarse a raíz cubierta. Es un sistema muy intensivo con incorporación de tecnología, permitiendo obtener rendimientos de hasta 50-60 t/ha. El cultivar más utilizado es INIA Ágata, de origen nacional producto del mejoramiento genético de frutilla del INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria). En menor porcentaje de utilización se encuentran las variedades extranjeras Sabrina y Marisol (Vicente y Giménez 2017, Vicente et al. 2018, 2019).

En la zona Sur se realizan principalmente cultivos a campo en verano para abastecer al mercado durante primavera y verano. Las variedades empleadas son de día corto y día neutro, las plantas son tipo frigo importadas en su mayoría de España, Estados Unidos y Chile. Las plantas verdes producidas localmente ocupan una superficie menor en esta zona. El sistema es intensivo y también con alta incorporación de tecnología. Los mejores rendimientos llegan a 35-40 t/ha. En cuanto a los cultivares los más difundidos son San Andreas, Aromas y Camino Real (Giménez y Lenzi 2015, Vicente y Giménez 2017).

2.5. ENFERMEDADES DE RAÍZ Y CORONA

Los síntomas de la enfermedad se visualizan inicialmente en la parte aérea de la planta, corresponden a síntomas foliares los cuales consisten en

coloración amarillenta a marrón, se observa marchitamiento y arrugado de las hojas. A su vez se presenta desecación y pobre desarrollo de los frutos, marchitamiento y muerte de las plantas. Esto es consecuencia de la destrucción del sistema radicular lo que limita la capacidad de la planta para absorber agua y nutrientes provocado por varios hongos capaces de atacar y destruir raíces secundarias e invadir raíces primarias. Además, se manifiestan síntomas asociados a la infección de corona como decoloración de los tejidos internos, dicha infección puede derivar de la raíz o directamente de la corona (De los Santos et al. 2003, Maas 2004).

Las enfermedades radicales son causadas por patógenos habitantes del suelo y se caracterizan por: pasar la mayor parte de su vida en el suelo, infectar órganos subterráneos y poseer la capacidad de sobrevivir en el suelo por largos períodos de tiempo aun en ausencia de hospederos por lo que las etapas de sobrevivencia y diseminación se dan en el suelo, aunque algunos hongos son capaces de diseminarse por viento o por aire (Correia et al., 2014).

Estas enfermedades pueden ser causadas por una o por combinaciones de patógenos, incluidos una o más especies de *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Rhizoctonia* spp., *Verticilium* spp. (Maas, 1998), *Phytophthora* spp. (Maas, 2004), *Cylindrocarpon destructans* (*Ilyonectria radícicola*, Manici et al., 2005), *Armillaria mellea*, *Idriella lunata*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Garrido et al., 2011), *Macrophomina phaseolina* (Koike et al., 2013), *Pythium* spp. (Watanabe 1977, Ishiguro et al. 2014), y *Neopestalotiopsis clavispora* (Chamorro et al., 2016).

En Uruguay se asociaron a la necrosis de raíz y corona los géneros *Neopestalotiopsis* sp. (81,8 %), *Fusarium* spp. (75,7 %), *Cylindrocarpon* spp. (42,4 %), *Rhizoctonia* spp. (24,2 %), *Pythium* spp. (9 %), *Macrophomina* sp. (6 %), *Phytophthora* spp. (3 %) y *Verticillium* spp. (3 %). Se identificó *Neopestalotiopsis clavispora* y se determinó la patogenicidad en plantas de frutilla (Machín et al., 2019). Además, se identificaron las especies de *M. phaseolina*, *Phytophthora cactorum*, *Dactylonectria novozelandica* y *D. macrodidyma*, estas dos últimas asociadas por primera vez a la muerte de plantas en frutilla (Machín, 2017).

2.6. PODREDUMBRE DE RAÍZ NEGRA POR *Cylindrocarpon* spp.

2.6.1. Distribución mundial

La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en las regiones productoras de frutilla. La especie *Cylindrocarpon destructans* (*Ilyonectria radícicola*) se aisló de raíces y coronas de frutilla en Gran Bretaña (Matturi y Senton, 1964), en Corea del Sur (Sung et al., 1985), en Estados Unidos (Yuen

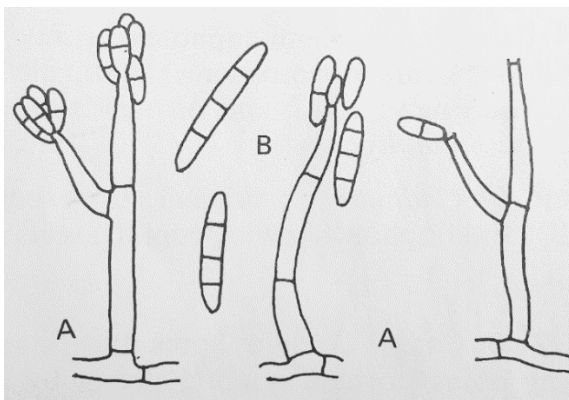
et al., 1991), en Sudáfrica (Botha, 2002), en Italia (Manici et al., 2005), en Suecia (Morocco, 2006) y en Australia (Fang et al., 2011).

Así también *Ilyonectria crassa*, *I. pseudodestructans*, *I. robusta*, *C. obtusisporium* y *Dactylonectria torresensis* se aislaron en Alemania (Weber y Entrop, 2017). Esta última especie también se asoció a la enfermedad en Holanda y Estados Unidos (Ferrer, 2015). Mientras en Uruguay se asociaron a la enfermedad *D. macrodydima* y *D. novozelandica* en plantas de frutilla en Salto (Machín, 2017).

2.6.2. Descripción taxonómica y morfológica

El género *Cylindrocarpon* pertenece a la división Myxomycota, se encuentra dentro de la subdivisión Deuteromycotina, en la que se ubican hongos imperfectos y pertenece a la clase Hyphomycetes, los numerosos géneros de hongos pertenecientes a esta clase se agrupan en un único orden denominado Hyphales, antiguos Moniliales (Barnett y Hunter 1972, Agrios 2007).

Cylindrocarpon posee conidióforos erectos, delgados, hialinos, que se ramifican escasamente de forma irregular terminando en fiálides delgadas generalmente de color conspicuo. Los conidios (esporas asexuales) en su mayoría poseen de 3 a 4 septos, aunque esto puede variar, son hialinos, de paredes lisas y cilíndricos producidos sucesivamente agregándose en pequeños fascículos (Figura No. 1). Se distingue por un micelio aéreo de crecimiento rápido, hialino o de color brillante y de textura aterciopelada lanosa (Barnett y Hunter 1972, Domsch et al. 1980).



a) Conidióforos con conidios unidos; b) Conidios.

Figura No. 1. *Cylindrocarpon* spp.

Fuente: tomado de Barnett y Hunter (1972).

Inicialmente el telomorfo de *Cylindrocarpon* se asoció al género *Neonectria* (perteneciente a la división Myxomycota, subdivisión Ascomycotina, clase Ascomycetes, orden Hypocreales y familia Nectriaceae) con más de 50 especies identificadas (Mantiri et al. 2001, Agrios 2007, Hawksworth et al., citados por Alaniz 2008, Chaverri et al. 2011). Las especies de *Neonectria* se caracterizan por poseer peritecios subglobosos a obpiriformes, lisos a rugosos de color rojo; las ascosporas (esporas sexuales) son hialinas generalmente bicelulares (Rossman et al., citados por Chaverri et al., 2011).

Posteriormente, en base a características morfológicas y datos moleculares, *Neonectria* se dividió en distintos grupos: *Rugonectria* (*N. rugulosa*), *Thelonectria* (*N. mammoidea*/*N. veuillotiana*), *Ilyonectria* (*N. radicola*) y *Campylocarpon* del que no se conoce su forma asexual (Chaverri et al., 2011).

Recientes estudios filogenéticos mostraron que *Ilyonectria* es parafilético por lo que se estableció el género *Dactylonectria*, el mismo incluye especies existentes previamente en *Ilyonectria* (Cabral et al. 2012, Lombard et al. 2014).

2.6.3. Descripción del género

El género *Cylindrocarpon* fue nombrado por primera vez por H. W. Wollenweber en 1913 con *C. cylindroides* como la especie tipo. Esta sección correspondía a los anamorfos de la sección Willkommioetes de *Nectria*, caracterizados por no producir clamidosporas (Khorasani 2013, Ferrer 2015).

En 1917 Wollenweber amplió el concepto de *Cylindrocarpon* para incluir especies que produjeran clamidosporas en el micelio en medio de cultivo, como *Cylindrocarpon destructans*, miembro más importante de este grupo (Brayford, citado por Ferrer, 2015).

Booth, citado por Khorasani (2013) en 1966 en su revisión taxonómica dividió el género en cuatro grupos basado en la presencia o ausencia de clamidosporas y microconidios. Ellos son: grupo 1 (clamidosporas ausentes y microconidios presentes); grupo 2 (clamidosporas ausentes y microconidios ausentes); grupo 3 (clamidosporas presentes y microconidios presentes) y grupo 4 (clamidosporas presentes y microconidios ausentes). Samuels y Brayford (1990) discreparon con esta división por el hecho de que una misma especie pueda ubicarse en más de un grupo.

Otros estudios dividieron el género *Cylindrocarpon* en tres clados en base al análisis filogenético de secuencias del ADN mitocondrial (Mantiri et al., 2001). A partir de este se denominaron cuatro nuevos géneros: *Neonectria*

(clado I de Mantiri et al. /grupo 1 de Booth), *Thelonectria* (clado II de Mantiri et al. /grupo 2 de Booth), *Rugonectria* (clado II de Mantiri et al. /grupo 2 de Booth) e *Ilyonectria* (clado III de Mantiri et al. /grupo 3 de Booth). En esta clasificación los tres clados se correlacionan a los tres primeros grupos de Booth (Chaverri et al. 2011, Lawrence et al. 2019).

Dentro del género *Ilyonectria* se incluye a *Cylindrocarpon macrodidymum* (*Ilyonectria macrodidyma*), entre otras especies. A partir de estudios multigénicos se determinó la existencia de polimorfismos dentro de *I. macrodidyma* como consecuencia de esto se describieron seis nuevas especies en el complejo *I. macrodidyma*, ellas son: *Dactylonectria alcacerensis*, *D. macrodidyma*, *D. novozelandica*, *D. torresensis*, *D. ecuadoriensis* y *D. valentina* (las dos últimas estrechamente relacionadas con *D. vitis*, Cabral et al. 2012, Lombard et al. 2014, Lawrence et al. 2019).

2.6.4. Síntomas en frutilla

Los síntomas producidos por *Cylindrocarpon* spp. consisten en amarillamiento, marchitez de hojas y necrosis generalizada en raíz y corona. Se manifiesta también una reducción en el crecimiento de la raíz, en consecuencia, las plantas pierden vigor (Sweetingham 1983, Adhikari et al. 2013).

2.6.5. Rango de hospederos

El género *Cylindrocarpon* spp. es comúnmente habitante de la rizosfera de una amplia variedad de especies de plantas, tanto herbáceas como leñosas causando importantes enfermedades de raíz de plantas agrícolas, así como en plántulas de coníferas en viveros, donde se aísla frecuentemente de tejidos enfermos en asociación con otros potenciales patógenos (Sweetingham 1983, Brayford, citado por Khorasani 2013).

En cuanto a los géneros de plantas *Cylindrocarpon* spp. es capaz de causar pudrición de raíces en distintos hospederos como: *Abies*, *Aster*, *Beta*, *Fragaria*, *Panax*, *Juglans*, *Lilium*, *Malus*, *Narcissus*, *Pinus*, *Prunus*, *Rhododendron*, *Solanum*, *Vitis*, entre otros, de acuerdo con Coyier y Roave, citados por Besoain y Piontelli (1999). Campbell, citado por Besoain y Piontelli (1999) asegura la presencia de *Cylindrocarpon* spp. asociada a raíces en otras especies vegetales, siendo un habitante común de la rizosfera, es decir sin causar enfermedad en los hospederos, por lo que se deben realizar pruebas de patogenicidad para constatar la asociación entre el patógeno y la planta.

En Uruguay se sabe que *Neonectria galligena* es patógeno de manzano y peral (Koch et al., citados por Abreo et al., 2010). Además, se aislaron las especies *Campylocarpon pseudofasciculare*, *Cylindrocarpon destructans*, *C.*

liriodendri, *C. macrodidymum*, *C. olidum* y *C. pauciseptatum* asociadas a la enfermedad de pie negro en vid (Abreo et al., 2010).

2.6.6. Ciclo de desarrollo de la enfermedad

Como hongo habitante del suelo y de actividad saprofítica tiene la capacidad de sobrevivir en residuos de plantas y en estructuras de resistencia, permaneciendo viable en ausencia de plantas hospederas incluso luego de rotaciones de cultivos, lo que dificulta la eliminación del hongo una vez que se introdujo en el área del cultivo (Wheeler y Rush, citados por Correia et al., 2014). A su vez se ha constatado que *Cylindrocarpon* spp. puede sobrevivir indefinidamente en raíces jóvenes y células corticales superficiales, sin afectar la sanidad de las plantas (Kope et al., 1996). Esto significa que raíces colonizadas no son un indicador adecuado del nivel de enfermedad (James et al., citados por Kope et al., 1996).

La sobrevivencia de *Cylindrocarpon* spp. en el suelo depende del crecimiento y propagación de micelios, así como la producción de clamidosporas y conidios (Khorasani, 2013). Las clamidosporas le proporcionan al hongo la capacidad de sobrevivir en el suelo durante largos períodos de tiempo y los conidios le permiten la dispersión a través del agua del suelo (Petit et al., 2011).

Para la infección, las esporas deben entrar en contacto con la superficie de la raíz, luego la hifa ingresa a través de heridas a las raíces y es capaz de descomponer las células del córtex, restringiendo así la absorción y el posterior transporte de nutrientes (Petit et al., 2011).

El mecanismo de patogenicidad de este grupo de hongos incluye la capacidad de producir fitotoxinas (Andolfi et al., 2011). En Australia, aislamientos de *Cylindrocarpon* spp. mostraron producción in vitro de Brefeldin A, un compuesto de acción fitotóxica y antifúngica; este compuesto podría inhibir a otros hongos y favorecer el establecimiento de *Cylindrocarpon* spp. en la rizosfera causando supresión en el crecimiento de la raíz. Experimentos realizados mostraron una reducción significativa en el crecimiento de plantas de frutilla asociado a Brefeldin A (Sweetingham, 1983).

2.6.7. Condiciones que favorecen el desarrollo de la enfermedad

Las especies pertenecientes al género *Cylindrocarpon* spp. poseen la capacidad de crecer en bajas concentraciones de oxígeno por lo que pueden encontrarse tanto en suelos superficiales como a varios centímetros de profundidad. A su vez la rápida germinación de esporas y crecimiento micelial le confieren una gran habilidad competitiva permitiéndole colonizar raíces jóvenes,

a esto se la suma su habilidad de usar nitrógeno orgánico como inorgánico (Garrido et al. 2004, Khorasani 2013).

Agustí-Brisach y Armengol (2012) observaron el crecimiento micelial de aislados de *Cylindrocarpon* spp. (tres aislados pertenecientes a *C. liriodendri*, tres de *C. macrodidymum* y tres de *C. pauciseptatum*) en un rango de 5° a 30° C, siendo su temperatura óptima entre 20° y 25° C, en cuanto al pH el crecimiento se observó en un rango de 4 a 8 aunque se demostró que *Cylindrocarpon* spp. se desarrolla mejor en condiciones ácidas que neutras. La esporulación ocurrió en las tres especies a diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25 y 30° C), pH (4, 5, 6, 7 y 8) y potenciales de agua (-0.5, -1.0, -2.0, -3.0, -4.0 y -5.0 MPa). En cuanto a la producción de clamidosporas no se vio afectada por las distintas temperaturas, pH y potenciales de agua, aunque ningún aislado produjo clamidosporas entre 5 y 10° C (Agustí-Brisach y Armengol 2012, Farh et al. 2017).

Sweetingham (1983) menciona el estrés en las plantas como condición necesaria para que *Cylindrocarpon* spp. se reproduzca. Asociado a esto, heridas en las raíces muestran una mayor susceptibilidad a la infección por este patógeno (Farh et al., 2017).

Otro factor que determina la incidencia de la enfermedad es la edad de la planta, aunque esta se puede encontrar durante todo el ciclo de su vida, raíces más jóvenes evidencian una mayor incidencia de *Cylindrocarpon* spp. Experimentos realizados en ginseng (*Panax ginseng*) exhibieron dichos resultados y los mismos fueron asociados a la inmadurez de la pared celular de la raíz en plantas jóvenes (Farh et al., 2017).

El tipo de suelo afecta también al desarrollo de la enfermedad, suelos arcillosos con alta capacidad de retener humedad favorecen el crecimiento de *Cylindrocarpon* spp. (Maas 1987, Michereff et al., citados por Ceja-Torres et al. 2008). A su vez Gams y Domsch, citados por Sweetingham (1983) mencionan que las especies de *Cylindrocarpon* spp. se relacionan frecuentemente a la fracción orgánica del suelo.

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

Para el control de las enfermedades de raíz y corona es necesario implementar un conjunto de medidas de manejo integrado. Las medidas aplicadas deben lograr un equilibrio planta-patógeno-ambiente que minimice los daños y tengan una alta probabilidad de incorporación por parte de los productores (Khorasani 2013, Vicente et al. 2018).

El buen manejo del suelo es esencial, por lo tanto, se recomienda la preparación del terreno con antelación a la plantación. Esto incluye: el agregado de materia orgánica, la inclusión de abonos verdes, sistematización de los cuadros para asegurar un buen drenaje y aireación, canteros altos y uso de mulch (Giménez et al. 2003, Vicente et al. 2018).

Otro elemento clave es el uso de material de propagación sano para evitar la dispersión de enfermedades de raíz y corona mediante tres alternativas: producir plantas para el cultivo en viveros aislados de la zona de producción de frutilla, aislamiento relativo de los viveros dentro de los predios o utilización de plantas madres micropropagadas en los viveros todos los años (Vicente et al., 2018).

Es de gran importancia la eliminación y destrucción de rastrojos, plantas y frutos afectados, así como la solarización en combinación o no con biofumigación, esto contribuye a bajar la población de los hongos en el suelo, lo cual es una estrategia de control muy apropiada para este tipo de enfermedades (Giménez et al., 2003).

Se deben realizar rotaciones con cultivos no susceptibles a estas enfermedades o con abonos verdes, y el control adecuado de malezas, para cortar en algunos casos los ciclos de los hongos y en consecuencia tener menores niveles de enfermedad (Giménez et al., 2003).

Conjuntamente la inclusión de cultivares resistentes o tolerantes a enfermedades de raíz y corona contribuye a la reducción de la incidencia de la necrosis de raíz y corona. Así en el 2016 INIA liberó el cultivar INIA Ágata el cual posee una resistencia media a alta a enfermedades de raíz y corona, y del cual se constató un uso creciente por parte de los productores de Salto, debido a la menor mortandad de plantas en comparación con las variedades susceptibles (Giménez et al. 2003, Vicente et al. 2018).

En cuanto al control químico de estas enfermedades, se sabe que su efectividad es relativa debido principalmente a que hasta el momento no existen principios activos con buena acción en el suelo. A esto se le suma los efectos negativos ambientales, sociales y económicos que conlleva el uso de fungicidas (Giménez et al. 2003, Vicente et al. 2018).

El uso de agentes de control biológico se presenta como una alternativa a la aplicación de fungicidas de síntesis química, pero hasta el momento los estudios se encuentran a nivel experimental. Evaluaciones de antagonismo directo mediante ensayos *in vitro* de cultivos duales se realizaron entre *Trichoderma* sp., *Streptomyces lydicus* o *Bacillus* sp., con *Cylindrocarpon* sp. Los tres antagonistas ejercieron algún grado de inhibición sobre el crecimiento

radial del patógeno alcanzando valores de 81,5 %, 96,1 % y 71,1 % respectivamente. Estos organismos podrían ser considerados potenciales agentes de control biológico para el manejo de la enfermedad (Pinto, 2014).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el año 2019, en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República (Montevideo).

Se utilizaron seis aislados de *Cylindrocarpon* spp. de la colección del Laboratorio de Fitopatología provenientes de plantas de frutilla de Salto 2018 (Cuadro No. 1) y conservados a -20° C en papel filtro dentro de sobres esterilizados.

Cuadro No. 1. Origen de los aislados de *Cylindrocarpon* spp. utilizados

Aislado No.	Variedad	Zona de aislamiento
33	Clon T38.2	Raíz
92	Clon U20.4	Raíz
117	Yurí	Corona
128	Clon Q67.3	Raíz
131	Clon T38.2	Corona
137	Ágata	Raíz

3.1. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Se realizó la identificación molecular de los seis aislados de *Cylindrocarpon* spp. para ello se efectuó la extracción de ADN, su posterior amplificación por PCR y secuenciación.

3.1.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó empleando el protocolo de Paolucci et al. (1999) con modificaciones. El cual consiste en retirar todo el micelio con espátula de la superficie de cada placa de las seis colonias puras, con 13 días de edad y se colocó en tubos eppendorf de 1,5 ml identificados para cada hongo. 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 homogeneizó por 10 segundos y después se colocaron los tubos a baño maría (65° C) por 30 minutos, durante el mismo se invirtieron los tubos cinco veces cada 10 minutos.

Se adicionó 300 µl de NaCl, luego se volvieron a invertir los tubos suavemente para homogeneizar y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4° C. Se retiró 500 µl del sobrenadante y se lo

colocó en un nuevo tubo y se añadió 500 µl de Isopropanol (-20° C), se homogeneizó invirtiendo los tubos suavemente 20 veces y luego se llevó al freezer por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante cinco minutos a 4° C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se enjuagó dos veces con 200 µl de alcohol 70 %, invirtiendo los tubos 10 veces y se centrifugó cinco minutos a 13000 rpm (4° C). Se descartó el alcohol y se dejó secando el pellet en estufa (aproximadamente 45 minutos a 40° C). Luego se lo resuspendió en 48 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 se colocó a 37° C por 30 minutos para luego guardarlos en el freezer (-20° C).

Se determinó la concentración de ADN de las muestras mediante Nanodrop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific, ajustando la concentración a 25 ng/µl.

3.1.2. Amplificación por PCR y secuenciación

La amplificación mediante PCR se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler. La mezcla para la reacción de la amplificación estaba compuesta por buffer 10X (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 8)) 2,5 µl, nucleótidos (dNTP) 0,8 µM, 0,5µl de cada uno de los cebadores, ADN 1 µl, DMSO 0,5 µl, y por último se agregó Taq polimerasa (MgCl incluido) 0,2 µl, el volumen final de la reacción fue de 25 µl alcanzado con 19 µl de agua MQ. Las características de los cebadores utilizados se detallan a continuación.

Cuadro No. 2. Características del cebador *HIS*

Locus	Cebadores	Secuencias 5'- 3'	Fragmento (pb)	Referencia
<i>HIS</i>	CyIH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG	500	Crous et al. (2004)
	CyIH3R	AGCTGGATGTCCTTGGACTG		

El programa de amplificación consistió en una primera desnaturalización a 94° C durante dos minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales consistía en desnaturalización a 94° C durante 30 segundos, luego 60° C por 30 segundos y 72° C por 45 segundos. Por último, se realizó una extensión final de 72° C por 10 minutos.

Los productos de amplificación se analizaron utilizando 2 µl de cada muestra los cuales se homogeneizaron con 1 µl de colorante violeta DYE para luego realizar la electroforesis en gel de agarosa 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). Además, se incluyó en el gel una muestra como control negativo (sin ADN) para descartar posibles contaminaciones de la PCR. La electroforesis se realizó durante 25 minutos, a 90 voltios y 400 amperios.

Para visualizar los productos de amplificación de la PCR se tiñeron los geles con una solución acuosa y GelRed (Biotium, Estados Unidos (5 μ l GelRed, 2 ml NaCl 0,1 M y 48 ml de agua)) durante 30 minutos. Luego los geles se expusieron a luz UV en transiluminador (DyNA 17 Light Dual Intensity UV Transiluminator, Labnet Internacional Inc., USA), para la visualización y fotodocumentación de las bandas.

Los productos de las PCR se enviaron a secuenciar a 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.

3.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Para la caracterización morfológica de las especies se procedió de acuerdo con lo descrito por Halleen et al. (2006), se utilizó un aislado puro de cada especie en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) incubados por 20 días a 24° C, bajo luz ultravioleta. Las observaciones microscópicas se realizaron en un microscopio óptico Olympus CX41 a 40X de aumento, registrándose el largo y ancho de 50 conidios a través del programa DinoCapture 2.0. Además, se observaron características de los conidios como su forma y cantidad de septos.

También se caracterizaron las colonias por color y textura, utilizando lo descrito por Domsch et al. (1980).

3.3. PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Se utilizaron 35 plantas madres de frutilla micropropagadas del cultivar INIA Guapa de 69 días de edad en macetas de 1 litro con sustrato Bas Van Buuren (BVB), compuesto por 70 % de turba rubia y 30 % de turba negra. Las plantas se mantuvieron a 20 \pm 5° C y 80 % de humedad relativa en una cámara de crecimiento en Facultad de Agronomía con un fotoperíodo de 14 horas.

Las plantas se inocularon con seis aislados de *Cylindrocarpon* spp. utilizando el método de Rego et al. (2001), el cual consiste en retirar las plantas de las macetas para seguidamente lavar las raíces con agua corriente. Se utilizó una colonia de cada aislado de 25 días de edad desarrollada en medio de cultivo PDA, bajo luz ultravioleta. Para preparar el inóculo se le agregó 25 ml de

agua destilada estéril (ADE) a cada placa y se raspo mecánicamente la superficie con ansa de Drigalski, la suspensión de conidios se filtró a través de una gasa estéril y se ajustó la concentración a 10^6 conidios.ml⁻¹ (concentración calculada a partir de Cámara de Neubauer). Luego se adicionó una gota de Tween 20 a la suspensión para evitar conglomerados de conidios y obtener una concentración más homogénea de los mismos (Gilchrist-Saavedra et al., 2005).

Por cada aislado se inocularon cinco plantas sumergiendo las raíces en una suspensión de conidios durante 30 minutos (Figura No. 2a). A las plantas utilizadas como testigo se les realizó el mismo tratamiento sumergiendo sus raíces en ADE. Luego se volvieron a plantar en macetas individuales de 1 litro, que contenían sustrato BVB. Se cubrieron con nylon transparente durante 24 horas (Figura No. 2b, Adhikari et al., 2013). La disposición de las plantas fue al azar y fueron regadas periódicamente con agua destilada.



a) Raíces sumergidas en suspensión de conidios; b) Plantas inoculadas cubiertas con nylon transparente.

Figura No. 2. Inoculación de plantas de frutilla cv. INIA Guapa

3.4. RE-AISLAMIENTOS DE HONGOS A PARTIR DE RAÍZ Y CORONA

Las plantas de frutilla inoculadas con síntomas de la enfermedad fueron lavadas bajo agua corriente con el fin de remover la tierra adherida a las mismas. Luego se cortaron cinco secciones de la zona de avance de la lesión en raíz y corona, se desinfectaron superficialmente en alcohol 70° por 50-60 segundos y se enjuagaron tres veces con ADE, se dejaron secar en papel filtro esterilizado y para finalizar se colocaron en placas de Petri con agar-agua y antibiótico (estreptomina 0,02 %) y se incubaron a 24° C por 72-96 horas.

Las colonias que se desarrollaron a partir de las muestras de tejidos infectados se transfirieron a PDA y se incubaron durante 20 días en incubadora con UV. A los hongos re-aislados se les realizó la caracterización morfológica, la extracción de ADN y posterior amplificación por PCR y secuenciación para su identificación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Las seis muestras de ADN de *Cylindrocarpon* spp. se amplificaron con los cebadores de la región génica *his3* y se obtuvo un fragmento de aproximadamente 500 pares de bases. A través del alineamiento de las secuencias de los aislados con las depositadas en el GenBank se identificaron los organismos a nivel de especie con alto porcentaje de identidad (Cuadro No. 3).

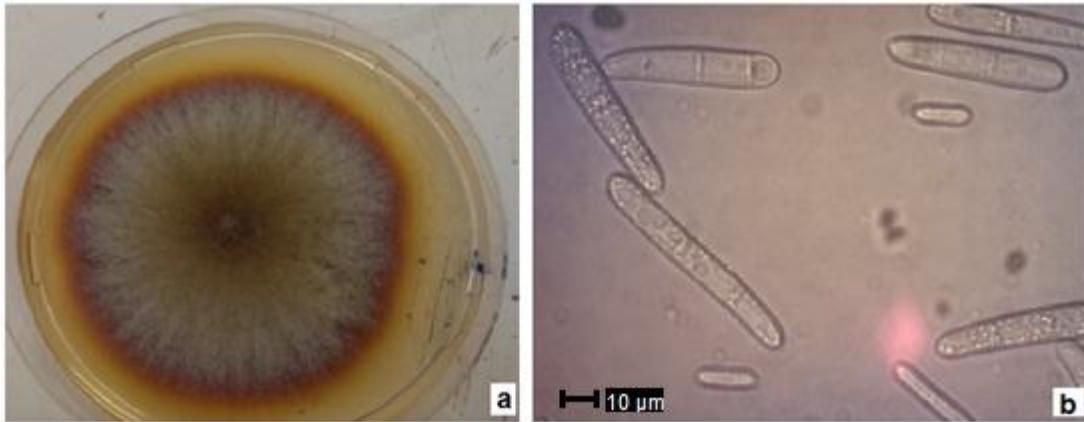
Cuadro No. 3. Aislados de *Dactylonectria novozelandica*, *D. ecuadoriensis* y *D. macrodidyma* identificados mediante la secuencia parcial del gen *HIS* (histona *H3*)

Aislado No.	Secuencia de referencia <i>H3</i>	Identidad (%)	Especie
33	MK409914.1	100	<i>Dactylonectria novozelandica</i>
92	MK409914.1	100	<i>Dactylonectria novozelandica</i>
128	MK409914.1	100	<i>Dactylonectria novozelandica</i>
117	MF683683.1	99,53	<i>Dactylonectria ecuadoriensis</i>
137	MF683683.1	99,32	<i>Dactylonectria ecuadoriensis</i>
131	MK409903.1	99,55	<i>Dactylonectria macrodidyma</i>

4.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

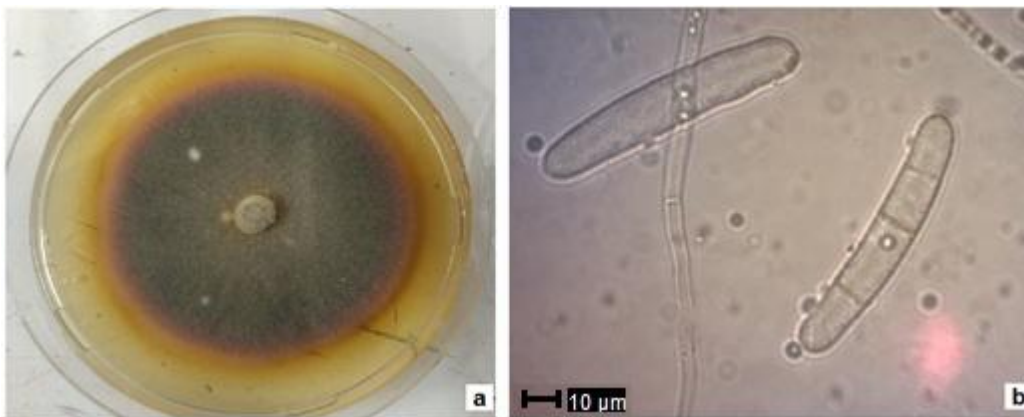
Se caracterizaron morfológicamente los aislados No. 92, No. 117 y No. 131. Cada aislado produjo micelio aéreo de textura algodonosa (Domsch et al. 1980, Aiello et al. 2015) y de color naranja a marrón oscuro (Figura No. 3a, No. 4a y No. 5a) concordando con la descripción de Domsch et al. (1980), de crecimiento relativamente lento.

Luego de 20 días se observaron abundantes conidios hialinos de paredes lisas, en su mayoría rectos con extremos redondeados, con 3 septos transversales, pero a menudo variables (Figura No. 3b, No. 4b y No. 5b), coincidiendo con la descripción de Barnett y Hunter (1972), Domsch et al. (1980), Adhikari et al. (2013).



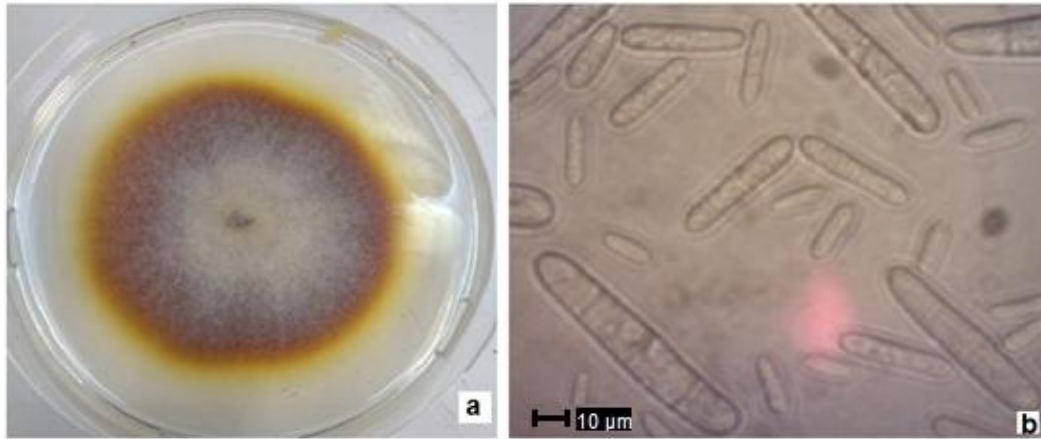
a) Colonia en placa de Petri con medio de cultivo PDA a los 20 días de incubación; b) Conidios y microconidios (40X).

Figura No. 3. Crecimiento de *Dactylonectria novozelandica* y conidios



a) Colonia en placa de Petri con medio de cultivo PDA a los 20 días de incubación; b) Conidios (40X).

Figura No. 4. Crecimiento de *Dactylonectria ecuadoriensis* y conidios



a) Colonia en placa de Petri con medio de cultivo PDA a los 20 días de incubación; b) Conidios y microconidios (40X).

Figura No. 5. Crecimiento de *Dactylonectria macrodidyma* y conidios

Los resultados promedio de *D. novozelandica* son similares a los proporcionados por Cabral et al. (2012), 38,4 x 6,5 µm tamaño conidial y 3 septos. Así también las medidas promedio de *D. ecuadoriensis* son cercanas a las proporcionadas por Lawrence et al. (2019), 41,0 x 7,0 µm tamaño conidial y 3 septos. Además, los valores promedio de *D. macrodidyma* son semejantes a los de Alaniz et al. (2007), 35,9 x 5,8 µm tamaño conidial y 3 septos. Comparando el tamaño conidial promedio de las especies, *D. ecuadoriensis* resultó 10,2-12,2 x 1,8 µm mayor en relación a las otras dos especies (Cuadro No. 4).

A través de la identificación morfológica de los conidios no se pudieron diferenciar las especies de *D. novozelandica* y *D. macrodidyma*, mientras por el análisis molecular se identificaron las tres especies.

Cuadro No. 4. Características morfológicas de los conidios de *Dactylonectria novozelandica*, *D. ecuadoriensis* y *D. macrodidyma*

Especie	No. de septos	No. promedio de septos	Tamaño conidial (µm)	Tamaño conidial promedio (µm)
<i>Dactylonectria novozelandica</i>	2-3	3	27,3-45,8 x 4,1-7,3	37,7 x 5,9
<i>Dactylonectria ecuadoriensis</i>	2-3	3	42-53,8 x 5,4-10,2	48,3 x 7,7
<i>Dactylonectria macrodidyma</i>	2-3	3	27,1-50,6 x 4,1-7,7	36,1 x 5,9

4.3. PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Las 30 plantas inoculadas con los seis aislados (tres pertenecientes a *Dactylonectria novozelandica*, dos de la especie *D. ecuadoriensis* y un único aislado de *D. macrodidyma*) exhibieron síntomas foliares entre los 9-14 días, pero en la raíz y corona se observaron a los 137 días.

Los síntomas foliares se observaron en todas las plantas y se manifestaron como necrosis en bordes de hojas y en la totalidad de la mismas comenzando por las hojas exteriores (Figura No. 6a, No. 7a y No. 8a). A partir de los nueve días posteriores a la inoculación se pudieron observar los síntomas mencionados en plantas inoculadas con aislados de *Dactylonectria novozelandica*, correspondiendo al menor período de incubación. Mientras que para *D. ecuadoriensis* y *D. macrodidyma* los síntomas se visualizaron a partir de los 14 días.

Los sistemas radiculares presentaron síntomas con un 100 % de incidencia para las tres especies, los mismos consistieron en necrosis, las raíces afectadas mostraron una coloración marrón oscura a negra (Figura No. 6b, No. 7b y No. 8b).

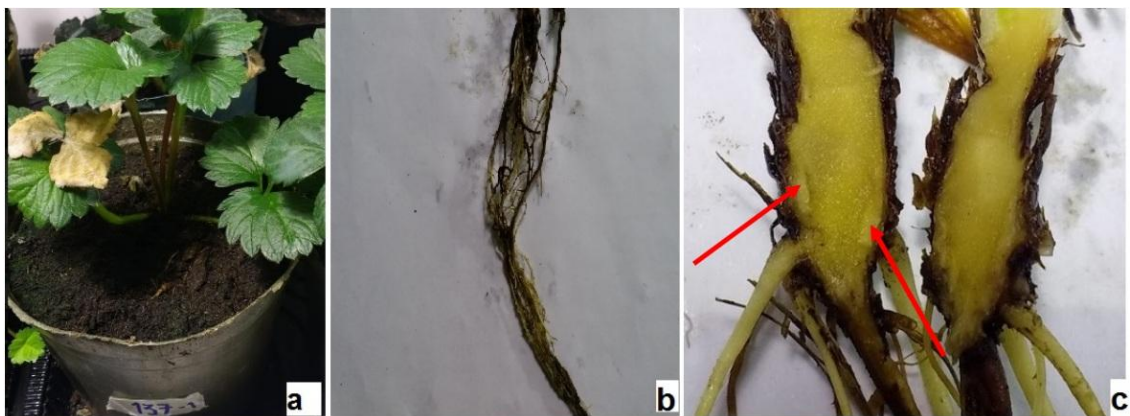
En cuanto a las coronas de las plantas inoculadas con *Dactylonectria* spp., todas desarrollaron síntomas incipientes con decoloración en la base del tejido (Figura No. 6c, No. 7c y No. 8c). Probablemente no se observaron síntomas como necrosis de los tejidos vasculares con coloración roja, marrón o negra debido a que están más relacionados con plantas muertas de frutilla que con plantas enfermas (Fang et al., 2011).

A partir de las plantas con síntomas se realizaron los aislamientos desde la raíz y corona. La identidad de los re-aislados se confirmó mediante la identificación molecular y morfológica. Las plantas testigo sin inocular se mantuvieron sanas (Figura No. 9) y no se aisló *Dactylonectria* spp. de sus tejidos.



a) Necrosis en hojas adultas; b) Necrosis de raíz; c) Lesión incipiente en corona.

Figura No. 6. Síntomas en plantas de frutilla cv. INIA Guapa inoculadas con *Dactylonectria novozelandica*



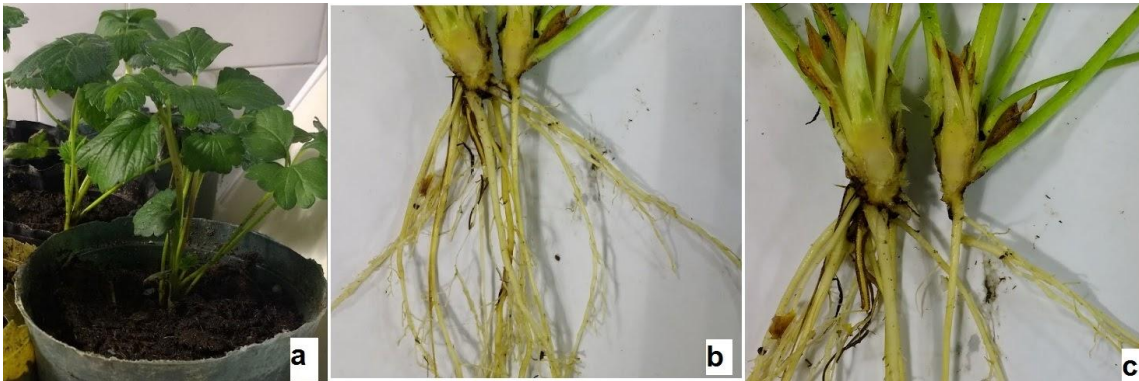
a) Necrosis en hojas adultas; b) Necrosis de raíz; c) Lesión incipiente en corona.

Figura No. 7. Síntomas en plantas de frutilla cv. INIA Guapa inoculadas con *Dactylonectria ecuadoriensis*



a) Necrosis en hojas adultas; b) Necrosis de raíz; c) Lesión incipiente en corona.

Figura No. 8. Síntomas en plantas de frutilla cv. INIA Guapa inoculadas con *Dactylonectria macrodidyma*



a) Folíolos sanos; b) Sistema radicular sano; c) Corona sana.

Figura No. 9. Plantas de frutilla cv. INIA Guapa sin inocular

Las especies de *Dactylonectria novozelandica* y *D. macrodidyma* se reportaron patógenas de vid en diferentes regiones de América, Europa y Oceanía (Alaniz 2008, Abreo et al. 2010, Dos Santos et al. 2014, Aiello et al. 2015). También se reportaron en Australia como agentes causales de la podredumbre de la raíz en palto (Vitale et al. 2012, Parkinson et al. 2017). A su vez en España las dos especies se asociaron a plantas forestales en viveros con daños en el sistema radicular (Ferrer, 2015). Ambas especies se aislaron de raíces con síntomas de enfermedad en cerezo y pistacho en Estados Unidos (Lawrence et al., 2019) y también se asociaron a la mortandad de plantas de frutilla en Uruguay (Machín, 2017). En Estados Unidos *D. macrodidyma* se aisló como patógena en olivo, mientras en citrus se

desarrolló a partir de raíces con síntomas de podredumbre seca (Úrbez-Torres et al. 2012, Adesemoye et al. 2016).

Dactylonectria ecuadoriensis se asoció a raíces enfermas de *Piper* spp., *Cyathea lasiosora*, *Socratea exorrhiza* y *Carludovica palmata* en Ecuador. Mientras que en Estados Unidos se aisló de olivo con síntomas de podredumbre de raíz (Gordillo y Decock 2017, Lawrence et al. 2019), sin reportes de patogenicidad en especies de plantas.

En base a los resultados de este trabajo se identificaron *Dactylonectria novozelandica*, *D. ecuadoriensis* y *D. macrodidyma* causando necrosis de raíz y corona en frutilla.

En futuros trabajos será necesario ampliar el conocimiento de la colección de aislados de *Cylindrocarpon* spp. para así conocer la incidencia de las especies y su patogenicidad. Será oportuno la realización de estudios epidemiológicos, así como de susceptibilidad en diferentes variedades de frutilla y también evaluar agentes de biocontrol en el control de la necrosis de raíz y corona.

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo es el primero en determinar la patogenicidad de *Dactylonectria novozelandica*, *D. ecuadoriensis* y *D. macrodidyma* en frutilla.

En base a las condiciones que se realizó el ensayo se identificaron las especies *Dactylonectria novozelandica*, *D. ecuadoriensis* y *D. macrodidyma* causando necrosis de raíz y corona en frutilla. De esta manera las tres especies también forman parte del complejo de patógenos que causan las enfermedades de raíz y corona de frutilla en Uruguay.

6. RESUMEN

El cultivo de frutilla se encuentra distribuido en dos zonas de importancia en Uruguay, en el Sur en los departamentos de Canelones y San José, y en el Norte, en Salto. El valor del cultivo en los sistemas prediales radica en el uso intensivo de recursos, fundamentalmente mano de obra y capital, generando altos márgenes de ganancia por unidad de superficie. Desde 2015, se ha observado una alta mortandad de plantas debido a enfermedades de raíz y corona producidas por un complejo de patógenos. Asociado a la muerte de plantas de frutilla en Salto, *Cylindrocarpon* spp. se aisló en una frecuencia de 42,4 % ocupando el tercer lugar en cuanto a incidencia. El objetivo de este trabajo fue caracterizar los aislados de *Cylindrocarpon* spp. mediante análisis molecular, morfológico y de patogenicidad en plantas de frutilla. Se caracterizaron molecular y morfológicamente seis aislados. A partir de ellos se inocularon 30 plantas de frutilla del cultivar INIA Guapa para probar su patogenicidad en cámara de crecimiento del Laboratorio de Fitopatología de Facultad de Agronomía, Universidad de la República (Montevideo). Las especies identificadas fueron *Dactylonectria novozelandica*, *D. ecuadoriensis* y *D. macrodidyma*. Los síntomas observados fueron necrosis en bordes de hojas y en la totalidad de estas, necrosis en los sistemas radiculares y lesiones incipientes en coronas como decoloraciones en la base de las mismas. De las plantas sintomáticas que se realizaron los re-aislamientos se recuperaron a partir de raíz y corona los hongos con los que fueron inoculadas. El presente trabajo es el primero en determinar la patogenicidad de *D. novozelandica*, *D. ecuadoriensis* y *D. macrodidyma* en frutilla. En base a las condiciones que se realizó el ensayo se identificaron las especies *D. novozelandica*, *D. ecuadoriensis* y *D. macrodidyma* causando necrosis de raíz y corona en frutilla, formando parte del complejo de patógenos que causan enfermedades de raíz y corona de frutilla en Uruguay.

Palabras clave: *Cylindrocarpon* spp.; Identificación molecular y morfológica; Prueba de patogenicidad; *Dactylonectria novozelandica*; *Dactylonectria macrodidyma*; *Dactylonectria ecuadroiensis*; Necrosis de raíz y corona en frutilla.

7. SUMMARY

Strawberry crop is distributed in two main areas: Canelones and San Jose in the South and Salto in North. The value of this crop in farm systems lies in the intensive use of resources, workforce and capital, generating high profit margins per unit area. Since 2015, an important death of plants has been observed related to crown and root diseases caused by a pathogens complex. Associated with the death of strawberry plants in Salto, *Cylindrocarpon* spp. was isolated with a frequency of 42,4 % ranking third in terms of incidence. The aim of this work was to characterize isolations of *Cylindrocarpon* spp. by molecular and morphological analyses and test their pathogenicity in strawberry plants. Six isolates were molecularly and morphologically characterized. From them, 30 INIA Guapa strawberry plants were inoculated to test their pathogenicity in a growth chamber in the Phytopathology Laboratory of the Faculty of Agronomy, University of the Republic (Montevideo). The identified species were *Dactylonectria novozelandica*, *D. macrodidyma* and *D. ecuadoriensis*. The observed symptoms were necrosis in leaf edges and in all of them, the root systems showed necrosis and incipient lesions were observed in the crowns as discolorations at the base from them. From the symptomatical plants that the re-isolations were made, the fungus which they were inoculated with, was recovered from the roots and crowns. The present work is the first to determine the pathogenicity of *D. novozelandica*, *D. ecuadoriensis* and *D. macrodidyma* in strawberry. Based on the conditions that the test was carried out, the species *D. novozelandica*, *D. ecuadoriensis* and *D. macrodidyma* were identified causing root and crown necrosis in strawberry, being part of the pathogens complex that cause root and crown diseases in strawberries in Uruguay.

Keywords: *Cylindrocarpon* spp.; Molecular and morphological identification; Pathogenicity tests; *Dactylonectria novozelandica*; *Dactylonectria macrodidyma*; *Dactylonectria ecuadoriensis*; Strawberry root and crown rot.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abreo, E.; Martínez, S.; Bettucci, L.; Lupo, S. 2010. Morphological and molecular characterisation of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot disease of grapevines in Uruguay. (en línea). Australasian Plant Pathology. 39(5):446-452. Consultado 7 jun. 2019. Disponible en <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/3271/1/Martinez-arb-2010-2.pdf>
2. Adesemoye, A. O.; Mayorquin, J. S.; Peacock, B. B.; Moreno, K.; Hajeri, S.; Yokomi, R.; Eskalen, A. 2016. Association of *Neonectria macrodidyma* with dry root rot of citrus in California. (en línea). Journal of Plant Pathology and Microbiology. 8(1):391-394. Consultado 18 mar. 2020. Disponible en https://digitalcommons.unl.edu/plantpathpapers/552/?utm_source=digitalcommons.unl.edu%2Fplantpathpapers%2F552&utm_medium=PDF&utm_campaign=PDFCoverPages
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 5 jun. 2019. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/2013/September/Pages/97_9_1251.1.aspx
4. Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5th. ed. Amsterdam, Elsevier. 922 p.
5. _____. 2007. Fitopatología. 2^a. ed. México, Limusa. 838 p.
6. Agustí-Brisach, C.; Armengol, J. 2012. Effects of temperature, pH and water potential on mycelial growth, sporulation and chlamydospore production in culture of *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot of grapevines. (en línea). Phytopathologia Mediterranea. 51(1):37-50. Consultado 4 jun. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/267800963_Effects_of_temperature_pH_and_water_potential_on_mycelial_growth_sporulation_and_chlamydospore_production_in_culture_of_Cylindrocarpon_spp_associated_with_black_foot_of_grapevines
7. Aiello, D.; Guarnaccia, V.; Epifani, F.; Perrone, G.; Polizzi, G. 2015. '*Cylindrocarpon*' and *Ilyonectria* species causing root and crown rot disease of potted laurustinus plants in Italy. (en línea). Journal

of Phytopathology. 163(7):675-680. Consultado 18 jun. 2019.
Disponible en
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jph.12306>

8. Alaniz, S.; León, M.; Vicent, J.; García-Jiménez, J.; Abad-Campos, P.; Armengol, J. 2007. Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain. (en línea). Plant Disease. 91(9):1187-1193. Consultado 7 jun. 2019. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-91-9-1187>
9. _____. 2008. Caracterización y control de *Cylindrocarpon* spp. agente causal del pie negro de la vid. (en línea). Tesis Dr. Valencia, España. Universidad Politécnica de Valencia. 164 p. Consultado 28 oct. 2019. Disponible en <https://riunet.upv.es/handle/10251/2422?show=full>
10. Andolfi, A.; Mugnai, L.; Luque, J.; Surico, G.; Cimmino, A.; Evidente, A. 2011. Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. (en línea). Toxins. 3(12):1569-1605. Consultado 29 may. 2019. Disponible en <https://www.mdpi.com/2072-6651/3/12/1569/htm>
11. Barnett, H. L.; Hunter, B. B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd. ed. Minneapolis, Burgess. 241 p.
12. Besoain, X.; Piontelli, E. 1999. Pudrición negra en raicillas de palto (*Persea americana* Mill.) por *Cylindrocarpon destructans*: patogenicidad y aspectos epidemiológicos. (en línea). Boletín Micológico. 14(1):41-47. Consultado 4 jun. 2019. Disponible en <https://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/917/884>
13. Booth, C. 1966. The genus *Cylindrocarpon*. (en línea). Mycological Papers. 104:1-56. Consultado 11 jun. 2020. Disponible en <http://www.wi.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?TableKey=1468261600000061&Rec=2138&Fields=All>
14. Botha, A. 2002. A study on the etiology and epidemiology of black root rot of strawberries in the Western Cape. (en línea). Tesis MSc. Stellenbosch, South Africa. University of Stellenbosch. 86 p. Consultado 26 feb. 2020. Disponible en <http://scholar.sun.ac.za/handle/10019.1/52712>

15. Cabral, A.; Rego, C.; Nascimento, T.; Oliveira, H.; Groenewald, J. Z.; Crous, P. W. 2012. Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. (en línea). Fungal Biology. 116(1):62-80. Consultado 2 dic. 2019. Disponible en <http://www.wi.knaw.nl/images/ResearchGroups/Phytopathology/pdf/Cabral%20et%20al%202011b.pdf>
16. Ceja-Torres, L. F.; Mora-Aguilera, G.; Teliz, D.; Mora-Aguilera, A.; Sánchez-García, P.; Muñoz-Ruiz, C.; Tlapal-Bolaños, B.; De La Torre-Almaraz, R. 2008. Ocurrencia de hongos y etiología de la secadera de la fresa con diferentes sistemas de manejo agronómico. (en línea). Agrociencia. 42(4):451-461. Consultado 8 jun. 2019. Disponible en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000400008
17. 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 5 jun. 2019. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-11-15-1308-PDN>
18. Chaverri, P.; Salgado, C.; Hirooka, Y.; Rossman, A. Y.; Samuels, G. J. 2011. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. (en línea). Studies in Mycology. 68(1):57-78. Consultado 29 may. 2019. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061614600427>
19. Correia, K. C.; Conforto, C.; Michereff, S. J. 2014. Manejo integrado de doenças do sistema radicular: bases científicas, estratégias e práticas. (en línea). In: Freitas, A.; Dorneals, G.; Pereira Silva, J. C.; Salum, L.; Pimenta, L.; Pedroso, L.; Guimarães, M.; Azevedo de Paula, P.; Martins, S. eds. Sanidade de raízes. Pernambuco, Suprema. pp. 191-234. Consultado 8 jun. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/266136988_Manejo_integrado_de_doencas_do_sistema_radicular_bases_cientificas_estrategias_e_praticas

20. Cronquist, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. 2nd. ed. New York, New York Botanical Garden. 555 p.
21. Crous, P. W.; Groenewald, J. Z.; Risede, J. M.; Simoneau, P.; Hywel-Jones, N. L. 2004. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. (en línea). Studies in Mycology. 50(2):415-430. Consultado 18 jun. 2019. Disponible en [https://www.studiesinmycology.org/sim/Sim50/041-Calonectria species and their Cylindrocladium anamorphs species with sphaeropedunculate vesicles.pdf](https://www.studiesinmycology.org/sim/Sim50/041-Calonectria%20species%20and%20their%20Cylindrocladium%20anamorphs%20species%20with%20sphaeropedunculate%20vesicles.pdf)
22. De los Santos, B.; Barrau, C.; Romero, F. 2003. Strawberry fungal diseases. (en línea). Journal of Food Agriculture and Environment. 1(3):129-132. Consultado 20 may. 2020. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/266908187 Strawberry fungal diseases](https://www.researchgate.net/publication/266908187_Strawberry_fungal_diseases)
23. Domsch, K. H.; Gams, W.; Anderson, T, H. 1980. Compendium of soil fungi. London, Academic Press. v.1, 859 p.
24. Dos Santos, R. F.; Blume, E.; Muniz, M. F. B.; Heckler, L. I.; Finger, G.; Maciel, C. G.; Harakawa, G.; Garrido, L. R. 2014. First report of *Ilyonectria macrodidyma* associated with black foot disease of grapevine in Brazil. (en línea). Plant Disease. 98(1):156. Consultado 22 may. 2020. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-04-13-0424-PDN>
25. 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 26 feb. 2020. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/225629627 Severity of crown and root diseases of strawberry and associated fungal and oomycete pathogens in Western Australia](https://www.researchgate.net/publication/225629627_Severity_of_crown_and_root_diseases_of_strawberry_and_associated_fungal_and_oomycete_pathogens_in_Western_Australia)
26. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, IT). 2018. The statistical database FAOSTAT. (en línea). Rome. s.p. Consultado 2 mar. 2020. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>
27. Farh, M. E.; Kim, Y. J.; Kim, Y. J.; Yang, D. C. 2017. *Cylindrocarpon destructans*/*Ilyonectria radicolola*-species complex: causative

agent of ginseng root-rot disease and rusty symptoms. (en línea). Journal of Ginseng Research. 42(1):9-15. Consultado 9 jun. 2019. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226845316301774>

28. Ferrer, M. C. 2015. Identificación de anamorfos de tipo *Cylindrocarpon* procedentes de viveros forestales en España. (en línea). Tesis Mag. Valencia, España. Universidad Politécnica de Valencia. 32 p. Consultado 29 may. 2019. Disponible en https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/64363/tfm_Marc_Ferrer.pdf?sequence=1
29. Folquer, F. 1986. La frutilla o fresa: estudio de la planta y su producción comercial. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 150 p.
30. Garrido, C.; Carbú, M.; Fernández-Acero, F. J.; González-Rodríguez, V. E.; Cantoral, M. J. 2011. New insights in the study of strawberry fungal pathogens. (en línea). Genes, Genomes and Genomics. 5(1):24-39. Consultado 25 feb. 2020. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/262058167_New_insight_in_the_study_of_strawberry_fungal_pathogens
31. Garrido, L. R.; Sônego, O. R.; Urben, A. 2004. *Cylindrocarpon destructans* causador do “pé-preto” da videira no Rio Grande do Sul. (en línea). Fitopatología Brasileira. 29(5):548-550. Consultado 7 jun. 2019. Disponible en http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-41582004000500014&script=sci_abstract&tlng=pt
32. Gilchrist-Saavedra, L.; Fuentes-Dávila, G.; Martínez-Cano, C.; López-Atilano, R. M.; Duveiller, E.; Singh, R. P.; Henry, M.; García, I. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. (en línea). 2ª. ed. Ciudad de México, CIMMYT. 68 p. Consultado 28 jun. 2019. Disponible en <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/1272/94221.pdf?sequence=1>
33. 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).

34. _____. 2008. Seleção e multiplicação de clones de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.). (en línea). Tesis Dr. Santa María, Brasil. Universidade Federal de Santa María. 118 p. Consultado 18 jun. 2019. Disponible en <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/3165/GUSTAVOFRANQUEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
35. _____.; Lenzi, A. 2015. El primer cultivar de frutilla de día neutro de INIA: LBK 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).
36. Gordillo, A.; Decock, C. 2017. *Cylindrocarpon*-like (Ascomycota, Hypocreales) species from the Amazonian rain forests in Ecuador: additions to *Campyloctenium* and *Dactylonectria*. (en línea). *Cryptogamie Mycologie*. 38(4):409-434. Consultado 3 dic. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/322434970_Cylindrocarpon-like_Ascomycota_Hypocreales_Species_from_the_Amazonian_Rain_Forests_in_Ecuador_Additions_to_Campyloctenium_and_Dactylonectria
37. Halleen, F.; Hans-Josef, S.; Johannes, Z. G.; Rego, C.; Oliveira, H.; Crous, P. W. 2006. *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevines. (en línea). *Studies in Mycology*. 55(1):227-234. Consultado 4 jun. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/40114449_Neonectria_liriodendri_sp_nov_the_main_causal_agent_of_black_foot_disease_of_grapevines
38. Husaini, A. M.; Abdin, M. Z. 2008. Development of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants tolerant to salt stress. (en línea). *Plant Science*. 174(4):446-455. Consultado 18 may. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/222086830_Development_of_transgenic_strawberry_Fragaria_x_ananassa_Duch_plants_tolerant_to_salt_stress

39. _____; Zaki, F. A. 2016. Strawberries: a general Account. In: Husani, A. M.; Neri, D. eds. Strawberry growth, development and diseases. Wallingford, CABI. pp. 1-9.
40. INIA; UdelaR. FA; MGAP. DIGEGRA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, UY; Universidad de la República. Facultad de Agronomía, UY; Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de la Granja, UY). 2007. Normas de producción integrada de frutilla. (en línea). Montevideo. 26 p. Consultado 19 may. 2019. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/descarga/normas-de-produccion-integrada-para-frutilla-sur-2007>
41. 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 18 may. 2020. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s10327-014-0520-8>
42. Khorasani, M. 2013. *Cylindrocarpon* species in Pacific Northwest Douglas-fir nurseries: diversity and effects of temperature and fungicides on mycelial growth. (en línea). Tesis MSc. Seattle, United States. University of Washington. 88 p. Consultado 29 may. 2019. Disponible en <https://digital.lib.washington.edu/researchworks/handle/1773/23693>
43. Koike, S. T.; 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 18 may. 2020. Disponible en <https://www.calstrawberry.com/Portals/2/Reports/Research%20Reports/Production%20Guidelines/English/Charcoal%20Rot%20of%20Strawberry%20-%202013.pdf?ver=2018-01-12-155447-970>
44. Kope, H. H.; Axelrood, P. E.; Sutherland, J.; Reddy, M. S. 1996. Prevalence and incidence of the root-inhabiting fungi, *Fusarium*, *Cylindrocarpon* and *Pythium*, on container-grown Douglas-fir and spruce seedlings in British Columbia. (en línea). New Forests. 12(1):55-67. Consultado 10 jun. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/226721104_Prevalence

[and incidence of the root-inhabiting fungi Fusarium Cylindrocarpon and Pythium on container-grown Douglas-fir and spruce seedlings in British Columbia](#)

45. Lawrence, D. P.; Nouri, M. T.; Trouillas, F. P. 2019. Taxonomy and multi-locus phylogeny of cylindrocarpon-like species associated with diseased roots of grapevine and other fruit and nut crops in California. (en línea). Fungal Systematics and Evolution. 4(1):59-75. Consultado 3 dic. 2019. Disponible en <http://www.fusejournal.org/images/Issues/Vol4Art6.pdf>
46. Lombard, L.; Van Der Merwe, N. A.; Groenewald, J. Z.; Crous, P. W. 2014. Lineages in *Nectriaceae*: re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. (en línea). Phytopathologia Mediterranea. 53(3):340-357. Consultado 14 mar. 2020. Disponible en https://www.fabinet.up.ac.za/publication/pdfs/2118-lombard_van_der_merwe_et_al_dactylonectria.pdf
47. Maas, J. L. 1987. Compendium of strawberry diseases. St Paul, Minnesota, APS. 138 p.
48. _____. 1998. Compendium of strawberry diseases. 2nd. ed. St. Paul, Minnesota, APS. 98 p.
49. _____. 2004. Strawberry disease management. (en línea). In: Naqvi, S. A. M. H. ed. Diseases of fruits and vegetables. Dordrecht, Kluwer. v.2, pp. 441-483. Consultado 14 abr. 2019. Disponible en https://link-springer-com.proxy.timbo.org.uy:88/chapter/10.1007/1-4020-2607-2_12
50. Machín, J. A. 2017. Identificación de los organismos asociados a la muerte de plantas de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) en el departamento de Salto, Uruguay. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 41 p.
51. _____.; González, P.; Vicente, E.; Estelda, C.; Ghelfi, J.; Silvera-Pérez, E. 2019. First report of root and crown rot caused by *Neopestalotiopsis clavispora* on strawberry in Uruguay. (en línea). Plant Disease. 103(11):2946. Consultado 25 feb. 2020. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-05-19-0948-PDN>

52. 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 feb. 2020. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1744-7348.2005.040051.x#accessDenialLayout>
53. Mantiri, F. R.; Samuels, G. J.; Rahe, J. E.; Honda, B. M. 2001. Phylogenetic relationships in *Neonectria* species having *Cylindrocarpon* anamorphs inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. (en línea). *Canadian Journal of Botany*. 79(1):334-340. Consultado 29 may. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Feky_Mantiri/publication/237154616_Phylogenetic_relationships_in_Neonectria_species_having_Cylindrocarpon_anamorphs_inferred_from_mitochondrial_ribosomal_DNA_sequences/links/564e456408ae1ef9296c78eb/Phylogenetic-relationships-in-Neonectria-species-having-Cylindrocarpon-anamorphs-inferred-from-mitochondrial-ribosomal-DNA-sequences.pdf
54. Matturi, S. T.; Senton, H. 1964. Distribution and status in the soil of *Cylindrocarpon* species. (en línea). *Transactions of the British Mycological Society*. 47(4):577-587. Consultado 17 mar. 2020. Disponible en https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/48532190/s0007-1536_2864_2980037-120160902-31222-1ige68o.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DDistribution_and_status_in_the_soil_of_C.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20200317%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20200317T130836Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=1b893d2ff78053821cd4a8abf16131c39f704007ffba329c82342273c390a45f
55. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2019. Anuario estadístico agropecuario 2019. (en línea). Montevideo. 255 p. Consultado 30 oct. 2019. Disponible en

<https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2019/Anuario2019.pdf>

56. Morocko, I. 2006. Characterization of the strawberry pathogen *Gnomonia fragariae*, and biocontrol possibilities. (en línea). Thesis PhD. Uppsala, Sweden. University of Agricultural Sciences. 43 p. Consultado 26 feb. 2020. Disponible en [https://pub.epsilon.slu.se/1181/1/ISBN91-576-7120-6\(Morocko\).pdf](https://pub.epsilon.slu.se/1181/1/ISBN91-576-7120-6(Morocko).pdf)
57. Paolucci, F.; Rubini, A.; Granetti, B.; Arcioni, S. 1999. Rapid molecular approach for reliable identification *Tuber* spp. ectomycorrhizae. (en línea). Fems Microbiology Ecology. 28(1):23-30. Consultado 5 jun. 2019. Disponible en <https://academic.oup.com/femsec/article/28/1/23/433929>
58. Parkinson, L. E.; Shivas, R. G.; Dann, E. K. 2017. Pathogenicity of nectriaceous fungi on avocado in Australia. (en línea). Phytopathology. 107(12):1479-1485. Consultado 25 may. 2020. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-03-17-0084-R>
59. Petit, E.; Barriault, E.; Baumgartner, K.; Wilcox, W. F.; Rolshausen, P. E. 2011. *Cylindrocarpon* species associated with black-foot of grapevine in Northeastern United States and Southeastern Canada. (en línea). American Journal of Enology and Viticulture. 62(2):177-183. Consultado 7 jun. 2019. Disponible en https://www.academia.edu/20943007/Cylindrocarpon_Species_Associated_with_Black-Foot_of_Grapevine_in_Northeastern_United_States_and_Southeastern_Canada
60. Pinto, G. F. 2014. Evaluación in vitro de antagonistas sobre cepas seleccionadas de *Cylindrocarpon macrodidymum* Halleen, Schroers & Crous, agente causal de la enfermedad del pie negro de la vid (*Vitis vinifera* L.). (en línea). Tesis Ing. Agr. Santiago de Chile, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. 41 p. Consultado 10 abr. 2020. Disponible en <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/148277/Pinto-%20Evaluaci%C3%B3n%20de%20antagonistas%20%282014%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

61. Rego, C.; Nascimento, T.; Oliveira, H. 2001. Characterisation of *Cylindrocarpon destructans* isolates from grapevines in Portugal. (en línea). *Phytopathologia Mediterranea*. 40(1):343-350. Consultado 4 jun. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/277801492_Characterisation_of_Cylindrocarpon_destructans_Isolates_from_Grapevines_in_Portugal
62. Samuels, G. J.; Brayford, D. 1990. Variation in *Nectria radicola* and its anamorph, *Cylindrocarpon destructans*. (en línea). *Mycological Research*. 94(4):433-442. Consultado 29 may. 2019. Disponible en <https://kundoc.com/pdf-variation-in-nectria-radicola-and-its-anamorph-cylindrocarpon-destructans-.html>
63. Scarlato, M. 2015. El cultivo de frutilla en el Sur del Uruguay: principales variables que explican los resultados productivos. Tesis Mag. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 136 p.
64. Sung, J. M.; Song, Y. M.; Yang, S. S. 1985. Identification of *Cylindrocarpon destructans* associated with root rot disease of strawberry. (en línea). *The Korean Journal of Mycology*. 13(3):179-183. Consultado 17 mar. 2020. Disponible en <http://www.koreascience.or.kr/article/JAKO198503040067227.page>
65. Sweetingham, M. W. 1983. Studies on the nature of the pathogenicity of soil-borne *Cylindrocarpon* species. (en línea). Tesis PhD. Hobart, Australia. University of Tasmania. 202 p. Consultado 7 jun. 2019. Disponible en <https://eprints.utas.edu.au/3136/>
66. 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 jun. 2019. Disponible en <https://academic.oup.com/mbe/article/28/10/2731/973375>
67. Úrbez-Torres, J. R.; Peduto, F.; Gubler, W. D. 2012. First report of *Ilyonectria macrodidyma* causing root rot of olive trees (*Olea europaea*) in California. (en línea). *Plant Disease*. 96(9):1378. Consultado 3 dic. 2019. Disponible en

https://www.researchgate.net/publication/263929671_First_Report_of_Ilyonectria_macrodidyma_Causing_Root_Rot_of_Olive_Trees_Olea_europaea_in_California

68. Vicente, C. E.; Giménez, G. 2017. Frutillas. In: González, M.; Giménez, G. eds. Catálogo de cultivares hortícolas. 2ª. ed. Montevideo, INIA. pp. 29-39 (Boletín de Divulgación no. 113).
69. _____; Manzoni, A.; Arruabarrena, A.; Varela, P.; González, M.; De Hegedüs, P. 2018. Alternativas para enfrentar la mortandad de plantas de frutilla en la zona de Salto. Un desafío para el sistema de innovación regional. (en línea). Revista INIA. no. 53:42-47. Consultado 17 jun. 2019. Disponible en <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/10727/1/revista-INIA-53-Jun.2018.-p.42-47.pdf>
70. _____; _____; Giambiasi, M.; Lado, J.; Varela, P.; Arruabarrena, A.; Silvera, E.; Machín, A.; González Arcos, M. 2019. La búsqueda de variedades de frutilla adaptadas al nuevo escenario de la zona de Salto. (en línea). Revista INIA. no. 57:18-22. Consultado 1 nov. 2019. Disponible en <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/Revista-INIA-57-Junio-2019-p8-22.pdf>
71. Vitale, A.; Aiello, D.; Guarnaccia, V.; Perrone, G.; Stea, G.; Polizzi, G. 2012. First report of root rot caused by *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma* on avocado (*Persea americana*) in Italy. (en línea). Journal of Phytopathology. 160(3):156-159. Consultado 22 may. 2020. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1439-0434.2011.01869.x>
72. Watanabe, T. 1977. Pathogenicity of *Pythium myriotylum* isolated from strawberry roots in Japan. (en línea). Phytopathological Society Japan. 43:306-309. Consultado 18 may. 2020. Disponible en https://www.istage.ist.go.jp/article/jjphytopath1918/43/3/43_3_306.pdf
73. Weber, R.; Entrop, A. P. 2017. *Dactylonectria torresensis* as the main component of the black root rot complex of strawberries and raspberries in Northern Germany. (en línea). Erwerbs-Obstbau. 59(1):157-169. Consultado 26 feb. 2020. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10341-017-0343-9>

74. 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(4):416-420. Consultado 26 feb. 2020. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1991Abstracts/PD_75_416.htm