



TESIS DE DOCTORADO

ETIOLOGÍA, EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL DE ESPECIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE EN MANZANO, OLIVO Y VID

Por

Laura Isabel Hernández Rodríguez

Ciencias Biológicas – Opción Microbiología

PEDECIBA Biología

Udelar

Director: Dra. Ing. Agr. Sandra Alaniz

Co-director: Dr. Ing. Agr. Pedro Mondino

Montevideo

Diciembre, 2024

Agradezco:

A mis tutores Sandra Alaniz y Pedro Mondino por haberme aceptado cómo estudiante a pesar de saber que no iba a ser un proceso rápido por mi nuevo trabajo en Servicios Agrícolas, por ser partícipes de mi trabajo de tesis, acompañarme y guiarme a lo largo de este camino que hoy damos por concluido.

Muy especialmente a Laura Lombardo por confiar en mí sin conocerme y haberme hecho la promesa, que cumplió hasta ahora, de permitirme tomar parte de mi tiempo de trabajo para la realización de la tesis y al Director de la Unidad, Leonardo Olivera por autorizarlo. A mis jefes inmediatos Andrés Villar primero y actualmente Ma. José Pérez por haberlo hecho posible.

A mi familia por compartir este proceso desde lo más íntimo. Durante la pandemia convertí mi cocina en laboratorio y la mesa de la sala ha sido mi escritorio durante todo este tiempo.

Mis hijas Lucía y Sofía que las amo con todo mi ser, por siempre estar a mi lado felices y orgullosas de mis logros.

Marcelo, mi fiel compañero, ha sido mi sostén e impulsor, desde que comencé facultad, llegando a fabricarme una cámara climatizada para que pudiera realizar mis ensayos de temperatura controlada durante la pandemia.

Mis papás y mi hermano que sin entender muy bien que es lo que hago me alientan de todos modos a continuar.

A todos los compañeros del laboratorio de Fitopatología de FAGRO que de una u otra forma fueron parte de éste proceso, especialmente Julia Carbone, Victoria Moreira y Franco Di Benedetti que colaboraron en mis ensayos. A las compañeras del norte Elisa Silvera y Pamela Lombardo que me colaboraron enviando muestras para completar la colección de olivos.

A mis amig@s por siempre alentarme a continuar!

A todos los que de una u otra forma contribuyeron para hoy esté culminado el Doctorado.

A la vida por estar aquí y ahora...

GRACIAS GRACIAS GRACIAS

ANII Beca de Maestría: Beca de Posgrado Nacional - POS_NAC_2015_1_110277

ANII Beca de Doctorado: Beca de Posgrado Nacional - POS_NAC_2018_1_151777

Alícuota de estudiantes – PEDECIBA Biología

CARÁTULA	Página
	i
AGRADECIMIENTOS	ii
FINANCIAMIENTO	iii
TABLA DE CONTENIDOS	iv
RESUMEN GENERAL	vi
INTRODUCCIÓN GENERAL	vii
La familia Botryosphaeriaceae	vii
Importancia de Botryosphaeriaceae en cultivos frutales	ix
Especies de Botryosphaeriaceae asociadas a cultivos frutales en Uruguay	x
Manejo de Botryosphaeriaceae en cultivos frutales	xii
HIPOTESIS	xiv
OBJETIVOS	xv
General	xv
Específicos	xv
CAPÍTULO 1	Diversidad de especies de Botryosphaeriaceae causantes de cancro del tallo y pudrición del fruto en olivo en Uruguay
	1
Introduction	2
Material y methods	3
<i>Field sampling and fungal isolates</i>	3
<i>Phenotypical characteristics</i>	5
<i>Phylogenetic analysis</i>	5
<i>Pathogenicity test</i>	10
Results	11
<i>Field sampling and fungal isolates</i>	11
<i>Phenotypical characteristics</i>	12
<i>Phylogenetic analysis</i>	12
<i>Pathogenicity test</i>	14
Discussion	18
CAPÍTULO 2	Rango de huéspedes y agresividad de aislados de la familia Botryosphaeriaceae obtenidos de manzanos, olivos y vides.
	22
Introducción	23
Materiales y métodos	24
<i>Material vegetal</i>	24
<i>Material fúngico utilizado</i>	24
<i>Proceso de inoculación y evaluación</i>	25
<i>Análisis estadístico</i>	26
Resultados	26
Discusión	30
CAPÍTULO 3	Capacidad de colonización de los hongos de la familia Botryosphaeriaceae en tejido leñoso asintomático y potenciales fungicidas para la protección de heridas de poda
	33
Introducción	34

Material es y métodos	36
<i>Material fúngico utilizado</i>	36
<i>Estimación de la colonización por Botryosphaereaceae del tejido leñoso asintomático</i>	36
<i>Evaluación de fungicidas in vitro</i>	37
Resultados	38
<i>Estimación de la colonización por Botryosphaereaceae del tejido leñoso asintomático</i>	38
<i>Evaluación de fungicidas in vitro</i>	40
Discusión	41
CONSIDERACIONES FINALES	46
REFEENCIAS	48

La familia Botryosphaeriaceae incluye un amplio y diverso grupo de hongos que causan canchros y muerte de árboles y arbustos en todo el mundo. En Uruguay, infectan frutales como el manzano, la vid y el olivo ocasionando canchros y podredumbre de fruto. Las especies de esta familia asociadas a manzano y vid ya han sido identificadas. En el caso de olivo, se aislaron 37 cepas desde ramas con canchros y frutos con podredumbre colectados de plantaciones a lo largo del país y se identificaron como *B. dothidea* (n=4), *B. wangensis* (n=11), *N. australe* (n=1), *N. cryptoaustrale* (n=9), *N. luteum* (n=7), *N. occulatum* (n=2), *D. seriata* (n=2) y *D. mutila* (n=1). Si bien cepas de las ocho especies ocasionaron canchros en ramas de olivo, las del género *Neofusicoccum* fueron significativamente más agresivas. Asimismo, *B. wangensis*, *N. cryptoaustrale*, *N. occulatum* y *D. mutila* son nuevos reportes para olivo a nivel mundial. Posteriormente, se estudió en mayor profundidad la capacidad de las especies poco específicas de esta familia para infectar y colonizar indistintamente diversos hospederos. Cuarenta cepas provenientes de los tres frutales fueron inoculadas en ramas del frutal del que fueron aislados y en los otros dos hospederos. Todas las cepas infectaron los tres frutales confirmando la ausencia de preferencia cepa-huésped. Asimismo, los aislados del género *Neofusicoccum*, en general, se comportaron como los más agresivos. También se estimó la capacidad de avance de las hifas de Botryosphaeriaceae en tejido asintomático con el fin de determinar la distancia mínima de poda. Por último, se evaluó, la sensibilidad de cepas de las especies predominantes a diversos fungicidas para conocer aquellos con potencial para proteger heridas de poda. Para el primer estudio se inocularon ramas de los tres frutales y se efectuaron re-aislamientos desde el borde del cancro y a 10, 20 y 30 cm. En todas las ramas se re-aislaron las cepas inoculadas desde el borde del cancro, dos cepas fueron recuperadas a 10 cm en al menos uno de los frutales y en ningún caso se recuperaron cepas a los 20 y 30 cm. Respecto a los fungicidas evaluados, tebuconazole y difenoconazole inhibieron satisfactoriamente el desarrollo de estos hongos al igual que azoxystrobin y pyraclostrobin, aunque en estos dos últimos se evidenciaron indicios de generación de resistencia por parte de algunas cepas. Metiltiofanato presentó un comportamiento intermedio al igual que mancozeb. Finalmente, ziram y captan fueron ineficientes.

Palabras clave: Botryosphaeriaceae, canchros, frutales, manejo integrado

La familia Botryosphaeriaceae

Los miembros de la familia Botryosphaeriaceae constituyen un amplio y diverso grupo de hongos conocidos por su capacidad para infectar numerosas plantas leñosas, nativas o introducidas, alrededor del mundo (Jami et al, 2014; Slippers et al, 2017; Yang et al, 2017). Entre sus huéspedes se encuentran una gran diversidad de árboles o arbustos forestales (Slippers et al, 2009; Alves et al, 2013; Jami et al, 2022; Feng et al, 2023), ornamentales (Pavlic et al, 2008; Osorio et al, 2017; Zlatković et al, 2018; Chen et al, 2020) y cultivos frutales (Damm et al, 2007; Moral et al, 2010; Phillips et al, 2012; Úrbez-Torres et al, 2013; Yan et al, 2013; Delgado et al, 2016; González-Domínguez et al, 2017; Scarlett et al, 2019; Guarnaccia et al, 2022).

Por mucho tiempo, estos hongos fueron catalogados como patógenos débiles desestimándose su rol como patógenos primarios (Phillips, 2002). Posteriormente se comprobó que pueden comportarse de forma muy agresiva pudiendo causar la muerte de su huésped en relativamente poco tiempo (Slippers y Wingfield, 2007). También hay evidencias de que algunos de estos patógenos pueden permanecer como endófitos o como patógenos latentes en el tejido vegetal para luego pasar a la fase patogénica, lo cual se ve favorecido cuando la planta es sometida a situaciones de estrés ambiental (Slippers y Wingfield, 2007; Ramabulana et al, 2022; Belair et al, 2023). Entre las causas de estrés más frecuentes se menciona la sequía, ocurrencia de heladas, daños por insectos, otros daños físicos o estrés por infecciones preexistentes (Ma et al, 2001; Crous et al, 2006; Slippers y Wingfield, 2007; Barradas et al, 2018).

Entre los hongos de la familia Botryosphaeriaceae se encuentran algunos de las especies polífagas más conocidos. Por ejemplo, se sabe que *Botryosphaeria dothidea* puede afectar a 514 especies de plantas, *Lasiodiplodia theobromae* a 549 y *Neofusicoccum parvum* a 295 (Silva-Valderrama et al, 2024). La capacidad de estos hongos para infectar múltiples huéspedes y migrar entre ellos, así como, su habilidad de permanecer como endófitos o en forma latente en el tejido vegetal, ha facilitado su propagación y establecimiento en nuevas áreas, incrementando su potencial como patógenos (Slippers et al, 2007; Mehl et al, 2017; Ramabulana et al, 2022). Una vez que ingresan a una nueva región, se instalan rápidamente al infectar a su huésped

habitual, pero también a otros menos relacionados (Burgess et al, 2018; Ramabulana et al, 2022). Además, su potencial de crecer en un amplio rango de temperaturas ha facilitado su adaptación a diversos ambientes. Aunque este rango puede variar entre especies, para la mayoría oscila entre 5 y 35 °C, con una temperatura óptima de alrededor de 25 °C (Berraf-Tebbal et al, 2014; Jami et al, 2014; Zlatkovic et al, 2016). Por esta razón, algunos autores atribuyen el reciente aumento de la actividad patógena de estos hongos y su expansión geográfica en Europa, al aumento de temperaturas en los últimos años y a la ocurrencia de condiciones meteorológicas extremas como consecuencia del cambio climático (Adamson et al, 2015; Fabre et al, 2011; Zlatković et al, 2016; Leal et al, 2024).

Entre los síntomas que causan los miembros de la familia Botryosphaeriaceae en sus huéspedes se incluyen manchas foliares, pudriciones en los frutos, aborto de la cápsula de la semilla, escoba de bruja o muerte regresiva, pero el síntoma principal son las lesiones necróticas en la madera. Estos patógenos infectan y colonizan las ramas y troncos de sus huéspedes ocasionando las lesiones conocidas como canchros. Usualmente, la colonización ocurre hacia ambos lados y en profundidad desde el punto de infección, anillando la rama o tronco colonizado. Como resultado la rama o árbol muere manteniendo sus hojas y frutos prendidos (Slippers y Wingfield, 2007; Slippers et al, 2017; Yang et al, 2017).

Recientemente la taxonomía del orden Botryosphaeriales ha sido objeto de una extensa revisión en base al análisis de las relaciones filogenéticas entre sus diversas familias y géneros (Liu et al, 2012; Phillips et al, 2013; 2019; Slipper et al, 2013; 2017; Crous et al, 2017; Yang et al, 2017). A pesar de ello, la identidad y la posición taxonómica de muchos aislados disponibles en la colección del Fungal Biodiversity Centre (CBS), aún sigue sin resolverse. Hasta el momento, se han descrito 18 géneros y 110 especies dentro de la familia Botryosphaeriaceae (Phillips et al, 2013; Yang et al, 2017). Entre estos géneros se destacan *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Neofusicoccum* y *Lasiodiplodia* por el alto número de especies que los integran, la variedad de huéspedes que infectan y su amplia distribución geográfica (Yang et al, 2017; Batista et al, 2021). A su vez, existe un grupo reducido de especies que se han encontrado asociadas a una gran diversidad de plantas alrededor del mundo. Entre estas especies poco específicas se encuentran *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia sapinea*, *D. seriata*, *Dothiorella sarmentorum*, *Neofusicoccum parvum*, *N. luteum* y *Lasiodiplodia theobromae* (Phillips et al, 2013; Batista et al, 2021; Ramabulana et al, 2022; Spetik et al, 2023).

Importancia de Botryosphaeriaceae en cultivos frutales

Existe una gran diversidad de especies frutales afectadas por hongos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae. En este grupo se incluyen cultivos producidos tanto en regiones tropicales como subtropicales, de hoja caduca como el almendro (Olmo et al, 2016) el manzano (Phillips et al, 2012) el peral (Garibaldi et al, 2012; Zhai et al, 2014) el duraznero (Wang et al, 2011; Sessa et al, 2021) el pistacho (Ma et al, 2001) o perennes como el mango (Sakalidis et al, 2011b), el olivo (Lazzizzera et al, 2008; Moral et al, 2010; Úrbez-Torres et al, 2013) y los citrus (Adesemoye et al, 2014). También se encuentran arbustos como el arándano (Tennakoon et al, 2017; Scarlett et al, 2019) o la vid (Phillips et al, 2002; Carlucci et al, 2015; Yang et al, 2017; Guarnaccia et al, 2022; Kenfaoui et al, 2022).

En Uruguay, resultados de investigación resaltan la importancia de estos hongos como patógenos del arándano (Rebellato, 2011; Sessa et al, 2018), la vid (Abreo et al, 2013), el manzano (Delgado et al, 2016; Sessa et al, 2016), el peral (Sessa et al, 2016), el duraznero (Sessa et al, 2016; Sessa et al, 2021) y el olivo (Alaniz et al, 2012; Conde et al, 2013). Tres de estos frutales se ubican entre los cuatro de mayor importancia económica en nuestro país. Éstos son el manzano con 2241 ha, la vid con 5991 ha (MGAP-DIEA, 2021a) y el olivo con 5819 ha de superficie total efectiva (MGAP-DIEA, 2021b). Además, la producción del manzano y la vid se concentra mayoritariamente en la región centro-sur, donde también se registra una parte de la producción de olivo.

Los miembros de Botryosphaeriaceae infectan la madera de los frutales a través de heridas, cortes de poda o aberturas naturales como las lenticelas generando luego las típicas lesiones denominadas canchros, tanto en tronco principal como en ramas secundarias (Delgado et al, 2016; Olmo et al, 2016; Sessa et al, 2016; Dong et al, 2021). La ocurrencia de estos canchros debilita y causa la muerte de ramas y árboles, incluso en plantaciones de excelente desarrollo, ocasionando cultivos heterogéneos por causa de los sucesivos replantes y podas de rejuvenecimiento (Delgado et al, 2016). Sobre la superficie de la madera muerta, suelen formarse las estructuras reproductivas de estos hongos, principalmente picnidios (origen asexual) que exudan masas de conidios en condiciones de alta humedad relativa (Úrbez-Torres 2011; Delgado et al, 2016), así como peritecios (origen sexual) que liberan ascosporas (Xue et al, 2021).

Además de los factores ambientales, algunas prácticas agronómicas también suelen ser causa de estrés en los frutales. Entre estas prácticas se encuentra el uso de porta injertos enanizantes, habitualmente utilizados en el cultivo de manzano plantado en

alta densidad. Esta práctica tiene por objetivo generar árboles de menor porte para facilitar tareas agronómicas rutinarias como la poda, el realeo o la cosecha, así como acelerar la entrada en producción (Delgado et al, 2016).

Los sistemas de conducción utilizados en algunos frutales, como la vid o el manzano producidos en alta densidad, también favorecen las infecciones por Botryosphaeriaceae. Estos sistemas requieren la utilización de materiales como postes y alambres para la conducción de las plantas, los que suelen causar heridas al estar en contacto con éstos, proporcionando vías de entrada para estos patógenos (Cabrera y Rodríguez, 2006). Por otro lado, las podas invernales de rutina (cuyo objetivo es conducir y renovar las plantas además de permitir un mayor ingreso de luz), generan heridas que incrementan sustancialmente las oportunidades de ingreso de estos patógenos. Particularmente, las plantas de vid tanto de vivero como de viñedos comerciales son muy susceptibles a las infecciones por hongos de la familia Botryosphaeriaceae debido a los numerosos cortes y heridas que se producen durante su proceso de propagación y producción comercial (Carbone et al, 2022; Leal et al, 2024).

Especies de hongos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae también tienen la capacidad de infectar frutos causando una podredumbre que avanza rápidamente afectando la totalidad de la fruta. Estas podredumbres son habituales en cultivos como el manzano, el olivo y el peral (Zhai et al, 2014; Alaniz et al, 2016; Delgado et al, 2016; Moral et al, 2019b). Al igual que en la madera muerta, sobre el fruto podrido suelen formarse las estructuras reproductivas de Botryosphaeriaceae.

Si bien la importancia económica de la podredumbre de los frutos suele ser sustancialmente menor en comparación con los canchros, éstos tienen implicancia en la epidemiología de la enfermedad. Es esperable que tanto las ramas como los frutos enfermos actúen como fuente de inóculo para la infección de ambos órganos, lo que ya ha sido demostrado en el cultivo de manzano. Delgado et al, (2016) encontraron que aislamientos de las diferentes especies de Botryosphaeriaceae asociadas a este frutal, fueron capaces de infectar indistintamente tanto la madera como los frutos.

Especies de Botryosphaeriaceae asociadas a cultivos frutales en Uruguay

Hasta el momento, se han aislado e identificado 10 especies de la familia Botryosphaeriaceae pertenecientes a cuatro géneros causando canchros en madera y/o

podredumbre de frutos en cultivos frutales producidos en Uruguay. En la vid se aislaron e identificaron las especies *B. dothidea*, *D. seriata*, *L. theobromae*, *N. australe*, *N. kwambonambiense*, *N. luteum* y *N. parvum* a partir de plantas con síntomas provenientes de plantaciones comerciales de diferentes edades (Abreo et al, 2013). Por otra parte, en el manzano las especies identificadas causando canchros y/o podredumbre de frutos fueron *B. dothidea*, *D. seriata*, *D. pseudoseriata*, *D. intermedia*, *D. mutila*, *L. theobromae*, *N. australe*, *N. luteum* y *N. parvum* (Delgado et al, 2016; Sessa et al, 2016, Sessa et al, 2018). En el peral las especies encontradas afectando la madera de este frutal fueron *D. mutila*, *D. seriata* y *N. parvum* (Sessa et al, 2016). En duraznero fueron encontradas *B. dothidea*, *D. seriata*, *D. pseudoseriata* y *N. parvum* (Sessa et al, 2016). Mientras tanto en el arándano, Rebellato (2011) aislaron cepas de esta familia desde madera con síntomas, pero no fueron identificadas a nivel de especie; en tanto que Sessa et al, (2018) aislaron *B. dothidea* y *N. parvum* desde madera aparentemente sana de este huésped. Finalmente, en el cultivo del olivo, si bien se sabe que hongos de esta familia son capaces de causar canchros en ramas y podredumbre en los frutos (Leoni et al, 2013), en este trabajo de tesis se identifican y caracterizan por primera vez en nuestro país las especies asociadas a este cultivo.

Varias de las especies de Botryosphaeriaceae, como *B. dothidea*, *D. seriata*, *N. parvum* o *N. luteum*, han sido aisladas de dos o más de estos frutales. Este hecho genera una dificultad adicional debido a que cepas de estas especies pueden infectar múltiples frutales. Normalmente, la alternancia espacial de un cultivo susceptible a una enfermedad con otros no susceptibles limita su desarrollo epidémico. Esto se debe a que el inóculo generado en un cultivo afectado no encuentra condiciones para desarrollarse en los cultivos linderos. Sin embargo, en este caso y al tratarse de patógenos polífagos, estos encontrarían condiciones propicias en los cultivos cercanos, incluso si son especies tan diferentes como el manzano, la vid o el olivo. Esta situación es especialmente relevante en la zona sur del país, donde se concentra la producción de la mayoría de estos frutales, los que estaría facilitando el desarrollo epidémico de estos patógenos polífagos (Adesemoye et al, 2014).

Por otra parte, se ha visto que existen diferencias en la agresividad entre algunas de estas especies patógenas. Particularmente, cepas del género *Neofusicoccum*, suelen tener un comportamiento notoriamente más agresivo en comparación con cepas de otras especies cuando son inoculadas en plantas sanas de mismo huésped del que han sido aisladas. Ejemplo de ello son *N. luteum* o *N. parvum* quienes provocaron lesiones en la madera de tamaño considerable cuando fueron inoculadas en vid, manzano y

olivo (Úrbez-Torrez et al, 2009; Delgado et al, 2016; Olmos et al, 2016). Por otra parte, no se ha estudiado en profundidad en qué medida estas cepas son capaces de mantener o incluso incrementar esa agresividad en otros huéspedes diferentes del cual fueron aisladas.

Manejo de Botryosphaeriaceae en cultivos frutales

Una vez que la madera de las plantas es infectada y colonizada por Botryosphaeriaceae, no es posible curarlas (Gramaje et al, 2018). Es por esta razón que el manejo de la enfermedad se basa en implementar medidas preventivas y en la remoción de las plantas o sus partes enfermas mediante poda.

Se sabe que las heridas de poda son la principal vía de entrada de estos patógenos y, por otra parte, se ha demostrado que la mayor producción de inóculo ocurre en periodos de lluvias (Úrbez-Torres et al, 2011). Por tanto, minimizar las heridas de poda y evitar podar en épocas lluviosas son algunas de las medidas recomendadas. Evitar o disminuir el estrés que sufren las plantas, también contribuiría sustancialmente a disminuir el impacto que causan los miembros de Botryosphaeriaceae en los cultivos frutales. Es así como, por ejemplo, mantener las plantas con niveles de riego adecuados (evitando excesos y déficits), fertilización equilibrada y utilizar sistemas de conducción y poda que minimicen la generación de heridas, aportaría sustancialmente a este fin.

Cuando se observa la presencia de síntomas de canchros en las ramas principales o secundarias, la medida que se recomienda es la eliminación de la zona afectada mediante la poda de la rama o tronco afectado hasta llegar a tejido sano (Alaniz et al, 2012), lo que también se conoce como poda de rejuvenecimiento o erradicación. Esta medida se implementa rutinariamente en los cultivos comerciales de manzano, vid y olivo producidos en Uruguay. Sin embargo, en ocasiones se ha visto que, a pesar de eliminar el tejido enfermo, un tiempo después, la enfermedad se vuelve a manifestar a partir del corte de poda. Dos razones podrían explicar este fenómeno, una que el patógeno vuelva a ingresar por este nuevo corte de poda y la otra es que durante la poda realizada no se haya eliminado totalmente al patógeno. Es sabido que la colonización del tejido por parte del patógeno va por delante de la zona con síntomas visibles (Obrador et al, 2020), pero no hay estudios que demuestren cuanto puede ser esta distancia. Por lo tanto y para eliminar con certeza el patógeno de la madera, es

necesario conocer primero cuanto es capaz de avanzar el patógeno en el tejido aparentemente sano desde el límite del síntoma visible.

Debido a que la poda es indispensable para el manejo del monte, la protección con fungicidas de las heridas de poda es una de las estrategias que ha sido evaluada y que es recomendada para disminuir los daños causados por hongos de la familia *Botryosphaeriaceae*. En otras regiones del mundo, se han llevado a cabo numerosos estudios *in vitro* y en condiciones de campo, para evaluar la eficacia de diversos fungicidas aplicados sobre heridas de poda en el control de estos patógenos en diversos cultivos con resultados variables. A modo de ejemplo, los fungicidas pertenecientes a los grupos químicos Inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE) (Bester et al, 2007; Pitt et al, 2012; Latorre et al, 2013; Twizeyimana et al, 2013; Olmo et al, 2017; Tennakoon et al, 2018; Antony et al, 2024), benzimidazoles (Li et al, 1995; Pitt et al, 2012; Twizeyimana et al, 2013; Olmo et al, 2017; Tennakoon et al, 2018; Sosa et al, 2022), estrobilurinas (Rolshausen et al, 2010; Pitt et al, 2012; Latorre et al, 2013; Twizeyimana et al, 2013; Olmo et al, 2017) o algunos ditiocarbamatos (Amponsah et al, 2012; Olmo et al, 2017; Tennakoon et al, 2018), en general, mostraron un buen comportamiento en el control de estos hongos.

En base a estos antecedentes, en esta tesis de doctorado se planteó determinar que especies de la familia *Botryosphaeriaceae* están causando canchros en ramas y podredumbre de frutos en el cultivo del olivo en Uruguay y estudiar las principales características de las cepas aisladas de este cultivo. Posteriormente trabajando con estas cepas y otras existentes en la colección del Laboratorio de Fitopatología, determinar su capacidad para infectar otros frutales diferentes del que fueron aisladas. Esto permitirá verificar si estos patógenos son polífagos afectando indistintamente a las especies en estudio o si, por el contrario, existe cierta especificidad de los aislados por un huésped determinado. También determinar si son capaces de comportarse con igual agresividad en sus diferentes hospederos. Se pretende también conocer su capacidad de colonizar el tejido asintomático desde el borde de la lesión o cancro visible, lo que permitirá ajustar la distancia mínima de poda para asegurar la eliminación completa del patógeno. Finalmente se evaluará la sensibilidad de las cepas a diversos fungicidas con el fin de conocer aquellos con potencial para proteger los cortes de poda.

1. Existen diferentes especies de la familia Botryosphaeriaceae capaces de causar canchros en ramas y podredumbres en frutos en el cultivo del olivo, siendo algunas de éstas también patógenas de otros frutales.
2. Las especies de hongos de la familia Botryosphaeriaceae tienen baja especificidad por su huésped pudiendo infectar con la misma agresividad a diferentes especies frutales.
3. El micelio de los hongos de la Botryosphaeriaceae causantes de canchros en la madera de árboles frutales es capaz de ir colonizando el tejido sano en forma asintomática por delante del borde de la lesión o cancro.
4. Existen algunos fungicidas capaces de inhibir el desarrollo de las especies de Botryosphaeriaceae que afectan los frutales en nuestro país, que podrían ser utilizados para proteger los cortes de poda.

General

Ampliar los conocimientos sobre la etiología y características epidemiológicas de hongos de la familia Botryosphaeriaceae asociados a los cultivos de manzano, olivo y vid y evaluar medidas de control para el diseño e implementación de sistemas de manejo sostenible en estos cultivos.

Específicos

1. Generar una colección de aislados de la familia Botryosphaeriaceae causantes de canchros en ramas y podredumbres de frutos de olivo, e identificarlos mediante caracterización fenotípica, molecular y patogénica.
2. Conocer el rango de huéspedes y agresividad de una colección de aislados de las especies de Botryosphaeriaceae obtenidos de manzanos, olivos y vides, mediante inoculaciones cruzadas en plantas sanas del cultivo del que fueron aisladas y de otros dos cultivos frutales.
3. Determinar la magnitud de avance de las hifas de Botryosphaeriaceae en el tejido asintomático desde el borde del cancro visible en ramas de manzanos, olivos y vides.
4. Evaluar la sensibilidad in vitro de aislados de las diferentes especies de Botryosphaeriaceae obtenidas de manzanos, olivos y vides a fungicidas de diferentes grupos químicos.

DIVERSITY OF BOTRYOSPHERIACEAE SPECIES CAUSING
STEM CANKER AND FRUIT ROT IN OLIVE TREES IN
URUGUAY

CAPÍTULO 1

Olive production (*Olea europaea* subsp. *europaea* L) in Uruguay dates to the beginning of the last century, but a strong expansion has been observed in the last twenty years. Currently, commercial olive production involves more than 7,000 hectares planted with European cultivars in an intensive rainfed system (285–400 trees/ha), positioning this crop as the second most important after citrus (MGAP-DIEA, 2020). The main destination of this crop is olive oil production to the local and foreign markets (Conde et al, 2019). Olives are produced throughout the country with a higher concentration in the south-eastern region (MGAP-DIEA, 2020). Uruguayan climate is characterized by persistent relatively high humidity and frequent rainfalls of around 1.100 mm per year (Conde et al, 2019) favoring fungal disease development.

Botryosphaeriaceae fungi have been reported as endophytes, latent, opportunistic, and primary pathogens in numerous fruits, forestry, and ornamental woody plants worldwide (Slippers & Wingfield, 2007; Silppers et al, 2013; Batista et al, 2021). On olive trees, these fungi have been isolated from stem cankers, die-back, fruit rot or leaf lesions in the Mediterranean regions such as Greece (Phillips et al, 2005), Italy (Lazzizera et al, 2008; Carlucci et al, 2013), Spain (Romero et al, 2007; Moral et al, 2010; 2019) and Tunisia (Chattaoui et al, 2011; 2012), and also from other non-traditional olive regions such as New Zealand (Taylor et al, 2001), Australia (Sergeeva et al, 2009), United States (Moral et al, 2010; Úrbez-Torres et al, 2013), Croatia (Kaliterna et al, 2012), Montenegro (Latinovic et al, 2013), Turkey (Korukmez et al, 2020) and South Africa (Spies et al, 2020). Also, numerous species of this family have been found associated with olive, especially those belonging to the genus *Neofusicoccum*, but also from the genera *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella* and *Lasiodiplodia* (Lazzizera et al, 2008; Moral et al, 2010; Carlucci et al, 2013; Torres et al, 2013; Moral et al, 2019b).

In Uruguay, Botryosphaeriaceae species were found in healthy and symptomatic tissue of eucalyptus and native myrtaceae (Pérez et al, 2009; 2010), grapevine (Abreo et al, 2013), apple (Delgado et al, 2016; Sessa et al, 2016), pear, peach (Sessa et al, 2016) and blueberry (Sessa et al, 2018), but species residing in this family have not been reported associated with olive so far. Nevertheless, stem canker and fruit rot symptoms similar to those caused by Botryosphaeriaceae have been observed in Uruguayan olive orchards.

Furthermore, transmission of these pathogens among hosts that overlap in geographical distribution is widely recognized (Úrbez-Torres et al, 2013; Sesa et al, 2016; Moral et al, 2019b).

In Uruguay, olive is cultivated nearby other Botryosphaeriaceae hosts like apple, blueberry, grapevine, pear, or peach, sometimes in the same farm and in proximity to eucalyptus (Delgado et al, 2016; Sessa et al, 2016). In addition, some species such as *B. dothidea*, *D. seriata* or *N. parvum*, have been found affecting most of these hosts (Pérez et al, 2009; 2010; Abreo et al, 2013; Delgado et al, 2016; Sessa et al, 2016; 2018). As a results, olive trees could serve as a potential inoculum source of these pathogens to the other hosts and vice versa, which hinder disease management.

Determining the Botryosphaeriaceae species that are affecting olive trees in Uruguay is crucial due to the ability of these fungi to infect multiple hosts cultivated in close proximity to each other. Also, having a precise identification of these pathogens, will facilitate future investigations such as biology behaviour, cultivar resistant programs, fungicide susceptibility evaluations or control strategy development. Thus, the goals of this study were i) to identify Botryosphaeriaceae species obtained from symptomatic olive wood and fruit in Uruguay using sequence analysis and phenotypical characteristics and ii) to evaluate the pathogenicity of the different Botryosphaeriaceae species identified on olive branches of Arbequina cultivar, under laboratory-controlled conditions.

MATERIAL AND METHODS

Field sampling and fungal isolates

From 2015 to 2019 sampling on olive-producing farms was carried out in the south (Canelones and Montevideo), south-eastern (Maldonado and Rocha) and north (Salto) regions of Uruguay. A total of 14 orchards of the cultivars Arbequina, Barnea, Frantoio, Leccino, Manzanilla and Picual were sampled (Table 1). In each olive orchard, 1 to 5 samples with stem canker or fruit rot symptoms apparently caused by Botryosphaeriaceae, were collected from different trees. The samples were individually placed in plastic bags, taken to the laboratory, and processed within five days.

In the laboratory, stem pieces from stem canker were surface-desinfected by soaking in 95% ethanol for one sec and immediately flaming. Small pieces (2 x 5 mm) of wood were aseptically taken from the internal margin of the necrotic lesions with a scalpel and placed onto potato dextrose agar (PDA) (Oxoid Ltd., Hampshire, England) in 90 mm petri plates supplemented

with 0.4 g.L⁻¹ of streptomycin sulphate (Sigma-Aldrich, China). Small fruit sections were cut from the internal area of the rot and plated in the same way. Plates were incubated for 5 days at 25°C in the dark. The developed colonies resembling Botryosphaeriaceae (fast-growing mycelium, white and cottony on the first days and turning to grey or grey-green few days later) (Delgado et al, 2016) were selected and transferred onto fresh PDA medium.

The isolates were grown in sterilized filter papers, dried with silica-gel and stored at -20°C. Then they were deposited in the fungal culture collection at the Plant Protection Department, Faculty of Agronomy, University of the Republic, Uruguay.

Table 1. Botryosphaeriaceae isolates identified in this study

Species	Isolate	Affected organ	Cultivar	Department, Locality	Genbank Accession No.	
					ITS	TEF1- α
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	O25	wood	Leccino	Canelones, Villa Nueva	OK127599	OK127636
	O26	wood	Leccino	Canelones, Villa Nueva	OK127600	OK127637
	O28	wood	Arbequina	Rocha, 19 de Abril	OK127601	OK127639
	O30	wood	Manzanilla	Canelones, Las Brujas	OK127602	OK127638
<i>B. wangensis</i>	O7	wood	Leccino	Maldonado, Garzón	OK127603	OK127640
	O8	wood	Leccino	Maldonado, Garzón	OK127604	OK127641
	O9	wood	Manzanilla	Maldonado, Garzón	OK127605	OK127642
	O13	wood	Manzanilla	Canelones, Las Brujas	OK127606	OK127646
	O16	wood	no data	Salto, Colonia Riale	OK127607	OK127643
	O17	wood	Arbequina	Maldonado, Garzón	OK127608	OK127647
	O22	wood	Arbequina	Montevideo, Melilla	OK127609	OK127648
	O37	fruit	Arbequina	Cuchilla P./Montevideo	OK127610	OK127644
	O38	fruit	Arbequina	Rocha, 19 de Abril	OK127611	OK127649
	O39	fruit	Picual	Rocha, 19 de Abril	OK127612	OK127650
	O42	fruit	Arbequina	Salto, Colonia Riale	OK127613	OK127645
<i>Diplodia mutila</i>	O36	wood	Arbequina	Melilla/Montevideo	OK127614	OK127651
<i>D. seriata</i>	O14	wood	Arbequina	Canelones, San Jacinto	OK127615	OK127652
	O19	wood	Arbequina	Montevideo, Melilla	OK127616	OK127653
<i>Neofusicoccum australe</i>	O35	wood	Arbequina	Montevideo, Melilla	OK127617	OK127654
<i>N. cryptoaustrale</i>	O5	fruit	Leccino	Maldonado, Garzón	OK127618	OK127655
	O6	wood	Leccino	Maldonado, Garzón	OK127619	OK127656
	O15	wood	Barnea	n/d	OK127620	OK127657
	O21	wood	Arbequina	Montevideo, Melilla	OK127621	OK127658
	O23	wood	Leccino	Canelones, Villa Nueva	OK127622	OK127659

<i>N. luteum</i>	O24	wood	Leccino	Canelones, Villa Nueva	OK127623	OK127660
	O33	wood	Arbequina	Montevideo, Melilla	OK127624	OK127661
	O34	wood	Arbequina	Montevideo, Melilla	OK127625	OK127662
	O40	wood	Picual	Rocha, 19 de Abril	OK127626	OK127663
	O10	wood	Arbequina	Maldonado, Garzón	OK127627	OK127664
	O11	wood	Arbequina	Maldonado, Garzón	OK127628	OK127665
	O18	wood	Arbequina	Montevideo, Melilla	OK127629	OK127666
	O20	wood	Arbequina	Montevideo, Melilla	OK127630	OK127667
	O27	wood	Picual	Canelones, Villa Nueva	OK127631	OK127668
	O31	wood	Arbequina	Montevideo, Melilla	OK127632	OK127669
<i>N. occulatum</i>	O32	wood	Arbequina	Montevideo, Melilla	OK127633	OK127670
	O12	wood	Arbequina	Maldonado, Garzón	OK127634	OK127671
	O29	wood	Frantoio	Rocha, 19 de Abril	OK127635	OK127672

Phenotypical characteristics

To induce the production of reproductive structures, the isolates were cultivated in water agar with sterilized pine needles on the surface and incubated under UV-light with a 12-h photoperiod at 25°C. When the pycnidia formed, the colour, shape, and presence of septa on the conidia were registered. In addition, the length and width of 30 conidia per isolate were documented using a digital camera DinoCapture 2.0 image (Dino-Eye AM4023X) incorporated into a microscope (Olympus CX41).

Growth rates at the temperatures of 10, 15, 20, 25, 30 and 35°C were determined on PDA. For this, mycelial plugs 4 mm in diameter were taken from actively growing margins of 7-day-old cultures and transferred to the centre of fresh PDA plates. For each isolate and temperature three replicates were performed. After 5 days of incubation in the dark, the colony diameter was measured along two perpendicular axes, the two measures were averaged, and data were converted to radial growth in millimetres per day.

Phylogenetic analysis

Mycelium and reproductive structures from isolates growing on PDA for one week at 25°C in the dark, were used to extract total DNA. The commercial kit ADN Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, USA) was used according to the manufacturer instructions.

The ITS regions and part of the translation elongation factor 1-alpha (TEF-1 α) were amplified using the primer pair ITS1/ITS4 (White et al, 1990) and or EF-728F and EF-986R (Carbone & Kohn, 1999), respectively. Each PCR reaction contained 1x PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM of each dNTP, 0.4 μ M of each primer, 0.5 U of DNA polymerase (Bioron, Germany) and 1 μ L of template DNA. The PCR reaction was adjusted to a final volume of 20 μ L with MQ water. The amplifications were performed on a MultiGene™ Mini thermal cycler (Labnet International, Inc., USA). The amplification program consisted of an initial step of 94°C for 5 min followed by 34 cycles of denaturation at 94°C for 45 sec, annealing at 57 °C for the ITS region and 55°C for the TEF-1 α gene for 30 sec, and elongation at 72°C for 45 sec. A final extension was performed at 72°C for 10 min. PCR products were visualized on a 1.5% agarose gel stained with GelRed™ in a transilluminator under UV light, using GeneRuler 100-bp DNA ladder plus as a molecular weight marker (Thermo, Lithuania). PCR products were purified and sequenced in Macrogen Inc., Seoul, Korea.

To identify the Botryosphaeriaceae genera and to obtain an approximation to species level of the isolates, the sequences were compared with those deposited in GenBank using the BLAST search tool (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Then, phylogenetic analyses were performed separately for each genus identified. The alignments were constructed using Muscle program, available within MEGA 10.01.8 program (<https://www.megasoftware.net/>) and were manually edited when necessary. Related sequences and sequences of the phylogenetically closest species obtained from the GenBank, were incorporated to the alignments including ex-type isolates (Table 2).

Phylogenetic analyses were performed separately for each gene region as well as for the multi-locus alignment. Phylogenetic trees were constructed using Bayesian inference (BI) and Maximum likelihood (ML) methods. BI and ML analyses were inferred with MrBayes 3.2.7 and RAxML 8.2.12 programs, respectively, implemented in CIPRES Science Gateway v 3.3 (<http://www.phylo.org/>). For BI phylogenetic analysis, the best-fit model of each gene region in each genus was selected according to the corrected Akaike information criteria (cAIC) in MEGA 10.01.8 program. Jukes Cantor (JC) resulted as the best model for both gene regions (ITS and TEF-1 α) in the three Botryosphaeriaceae genera. Four Marko Chain Monte Carlo (MCMC) chains were run simultaneously starting from a random tree to 10 million of generations. Trees were sampled every 1000 generations, and the first 2500 were discarded as the burn-in phase of each analysis. Posterior probabilities were determined from a majority-rule consensus tree generated with the remaining 7500 trees. For the ML analysis, generalized

time-reversible with gamma correction (GTR + GAMMA) nucleotide substitution model and 1000 bootstrap iterations were indicated. The other parameters were used as default settings.

The sequences generated in this study were deposited in GenBank database (Table 1) and the alignment files and phylogenetic trees in TreeBase (www.treebase.org) under the accession number S28780.

Table 2. GenBank sequences of the isolates incorporated in this study for the phylogenetic analysis

Species	Strain	Host	Genbank Accession No.	
			ITS	tef1-1 α
<i>Botrysphaeria auasmontanum</i>	CBS 121769	<i>Acacia mellifera</i>	EU101303	EU101348
<i>B. corticis</i>	CBS 119047	<i>Vaccinium corymbosum</i>	DQ299245	EU017539
	CBS 119048	<i>Vaccinium corymbosum</i>	DQ299246	EU017540
<i>B. dothidea</i>	CBS 115476	<i>Prunus</i> sp.	AY236949	AY236898
	CBS 110302	<i>Vitis vinifera</i>	AY259092	AY573218
	CAA773	<i>Vaccinium corymbosum</i>	MK932748	MK932754
<i>B. fabicerniana</i>	CMW 27094	<i>Eucalyptus</i> sp.	HQ332197	HQ332213
	CMW 27108	<i>Eucalyptus</i> sp.	HQ332200	HQ332216
<i>B. fusispora</i>	MFLUCC 10-0098	<i>Entada</i> sp.	JX646789	JX646854
<i>B. guttulata</i>	GZCC 19.0202	no data	MT327839	MT331606
	GZCC 19.0186	no data	MT327832	MT331600
<i>B. kuwatsukai</i>	CBS 135219	<i>Malus domestica</i>	KJ433388	KJ433410
	LSP 5	<i>Pyrus</i> sp.	KJ433395	KJ433417
<i>B. minutispermata</i>	GZCC 160013	Dead wood	KX447675	KX447678
	GZCC 160014	Dead wood	KX447676	KX447679
<i>B. pseudoramosa</i>	CGMCC 3.18739	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i>	KX277989	KX278094
	CGMCC 3.18740	<i>Melastoma sanguineum</i>	KX277997	KX278102
<i>B. qingyuanensis</i>	CGMCC 3.18743	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i>	KX278001	KX278106
	CGMCC 3.18742	<i>Eucalyptus</i> hybrid	KX278000	KX278105
<i>B. ramosa</i>	CBS 122069	<i>E. camaldulensis</i>	EU144055	EU144070
<i>B. rosaceae</i>	CGMCC 3.18007	<i>Malus</i> sp.	KX197074	KX197094
	CGMCC 3.18008	<i>Amygdalus</i> sp.	KX197075	KX197095
<i>B. scharifii</i>	CBS 124703	<i>Mangifera indica</i>	JQ772020	JQ772057
	CBS 124702	<i>Mangifera indica</i>	JQ772019	JQ772056
<i>B. sinensia</i>	CGMCC 3.17723	<i>Morus</i> sp.	KT343254	KU221233

	CGMCC 3.17724	<i>Juglans regia</i>	KT343256	KU221234
<i>B. tenuispora</i>	MUCC 237	<i>Leucothoe fontanesiana</i>	LC585278	LC585150
	MUCC 2900	gall on <i>Aucuba japonica</i>	LC585276	LC585148
<i>B. wangensis</i>	CGMCC 3.18745	<i>Cedrus deodara</i>	KX278003	KX278108
	CGMCC 3.18744	<i>Cedrus deodara</i>	KX278002	KX278107
<i>Diplodia africana</i>	CBS 120835	<i>Prunus persica</i>	AY236949	AY236898
	CBS 121104	<i>Prunus persica</i>	EF445343	EF445382
<i>D. bulgarica</i>	CBS 124254	<i>Malus sylvestris</i>	EF445344	EF445383
	IRAN1532C	<i>Malus domestica</i>	GQ923853	GQ923821
<i>D. corticola</i>	CBS 112547	<i>Quercus ilex</i>	JX152583	JX152579
	CBS 112549	<i>Quercus suber</i>	AY259110	DQ458872
<i>D. cupressi</i>	CBS168.87	<i>Cupressus sempervirens</i>	AY259100	AY573227
	CBS2 61.85	<i>Cupressus sempervirens</i>	DQ458893	DQ458878
<i>D. intermedia</i>	CBS 124462	<i>Malus sylvestris</i>	DQ458894	DQ458879
	CBS 124134	<i>Cydonia</i> sp.	GQ923858	GQ923826
<i>D. malorum</i>	CBS 124130	<i>Malus sylvestris</i>	GQ923860	GQ923828
	CAP272	<i>Malus sylvestris</i>	GQ923865	GQ923833
<i>D. mutila</i>	CBS 112553	<i>Vitis vinifera</i>	GQ923872	GQ923840
	CBS 230.30	<i>Phoenix dactyfera</i>	AY259093	AY573219
<i>D. olivarum</i>	CAP257	<i>Olea europaea</i>	DQ458886	DQ458869
	CBS 121887	<i>Olea europaea</i>	GQ923874	GQ923842
<i>D. pinea</i>	CBS 109725	<i>Pinus patula</i>	EU392302	EU392279
	CBS 393.84	<i>Pinus nigra</i>	DQ458896	DQ458881
	CBS109727	<i>Pinus radiata</i>	EU392286	EU392263
	CBS109943	<i>Pinus patula</i>	DQ458897	DQ458882
<i>D. pseudoseriata</i>	UY788	<i>Blepharocalyx x salicifolius</i>	DQ458898	DQ458883
	UY1263	<i>Myrciaria tenella</i>	EU080927	EU863181
<i>D. rosulata</i>	CBS 116470	<i>Prunus africana</i>	EU080933	EU863182
	CBS 116472	<i>Prunus africana</i>	EU430265	EU430267
<i>D. scrobiculata</i>	CBS 109944	<i>Pinus greggii</i>	EU430266	EU430268
	CBS 113423	<i>Pinus greggii</i>	DQ458899	DQ458884
	CMW 189	<i>Pinus banksiana</i>	EU392283	EU392260
<i>D. seriata</i>	CBS 112555	<i>Quercus</i> sp.	AY253292	AY624253
	CBS 124137	<i>Prunus domestica</i>	GQ923877	GQ923845
	CBS 124139	<i>Vitis vinifera</i>	GQ923880	GQ923848
	CBS 121885	<i>Olea europaea</i>	EU392289	EU392266
	CBS 119049	<i>Vitis vinifera</i>	DQ458889	DQ458874
<i>D. tsugae</i>	CBS 418.64	<i>Tsuga heterophylla</i>	DQ458888	DQ458873
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CBS 164.96	Fruit along coral reef coast	AY640255	AY640258
	CBS 124.13	Unknown	DQ458890	DQ458875

<i>Neofusicoccum australe</i>	CMW 6837	<i>Acacia</i> sp.	AY339262	AY339270
	CMW 6853	<i>Sequoiadendron giganteum</i>	AY339263	AY339271
	CAA768	<i>Vaccinium corymbosum</i>	MK932752	MK932755
	CAA838	<i>Vaccinium corymbosum</i>	MK932725	MK932759
<i>N. cryptoaustrale</i>	CMW 23785	<i>Eucalyptus</i> sp.	FJ752742	FJ752713
	CMW 20738	<i>Eucalyptus citriodora</i>	FJ752740	FJ752710
<i>N. eucalypticola</i>	CBS 115679	<i>Eucalyptus grandis</i>	AY615141	AY615133
	CBS 115766	<i>Eucalyptus rossi</i>	AY615143	AY615135
<i>N. eucalyptorum</i>	CBS 115791	<i>Eucalyptus grandis</i>	AF283686	AY236891
	CMW 10126	<i>Eucalyptus grandis</i>	AF 283687	AY236892
<i>N. hongkongense</i>	CGMCC 3.18747	<i>Araucaria cunninghamii</i>	KX278050	KX278155
	CGMCC 3.18748	<i>Araucaria cunninghamii</i>	KX278051	KX278156
<i>N. illicii</i>	CGMCC 3.18313	<i>Illicium verum</i>	KY350152	KY8 17758
	CGMCC 3.18311	<i>Illicium verum</i>	KY350150	KY817756
<i>N. italicum</i>	MFLUCC 15.0900	<i>Vitis vinifera</i>	KY856755	KY856754
<i>N. kwambonambiense</i>	CBS 123639	<i>Syzygium cordatum</i>	EU821900	EU821870
	CBS 123641	<i>Syzygium cordatum</i>	EU821919	EU821889
<i>N. luteum</i>	CBS 110299	<i>Vitis vinifera</i>	AY259091	AY573217
	CBS 110497	<i>Vitis vinifera</i>	EU673311	EU673277
<i>N. mangroviorum</i>	CMW 41365	<i>Avicennia marina</i>	KP860859	KP860702
	CMW 42481	<i>Avicennia marina</i>	KP860848	KP860692
<i>N. mangiferae</i>	CBS 118531	<i>Magnifera indica</i>	AY615185	DQ093221
	CBS 118532	<i>Magnifera indica</i>	AY615186	DQ093220
<i>N. microconidium</i>	CGMCC 3.18750	<i>Eucalyptus urophylla</i> × <i>Eucalyptus grandis</i>	KX278053	KX278158
	CGMCC 3.18751	<i>Eucalyptus urophylla</i> × <i>Eucalyptus grandis</i>	KX278054	KX278159
<i>N. occulatum</i>	CBS 128008	<i>Eucalyptus grandis</i> hybrid	EU301030	EU339509
	MUCC286	<i>Eucalyptus pellita</i>	EU736947	EU339511
<i>N. parvum</i>	CMW 9081	<i>Populus nigra</i>	AY236943	AY236888
	CBS 110301	<i>Vitis vinifera</i>	AY259098	AY573221
	CAA858	<i>Vaccinium corymbosum</i>	MK932746	MK932768
<i>N. ribis</i>	CBS 115475	<i>Ribes</i> sp.	AY236935	AY236877
	CBS 121.26	<i>Ribes</i> sp.	AF241177	AY236879
<i>N. stellenboschiana</i>	CBS 110864	<i>Vitis vinifera</i>	AY343407	AY343348

Note: Ex-type strains are indicated in bold

Pathogenicity test

One isolate representative of each Botryosphaeriaceae species identified was selected for pathogenicity testing namely *B. dothidea* (O28), *B. wangensis* (O7), *N. australe* (O35), *N. cryptoaustrale* (O6), *N. luteum* (O10), *N. occulatum* (O12), *D. mutila* (O36) and *D. seriata* (O19). The isolates were grown on PDA in the dark for one week and inoculated in one-year-old olive branches of Arbequina, the most important cultivar produced in Uruguay.

A few hours before inoculation, apparently healthy branches of approximately 30 cm in length were cut from olive trees and were immediately placed in glass bottles of 300 cc containing autoclaved wet sand. A region between two nodes of each branch was surface-desinfected with cotton soaked in 70% ethanol. Immediately, a wound of 3 mm in diameter was made using a sterile scalpel removing the bark and exposing the cambium. Mycelial plugs of four-millimetre were cut from the margins of the colonies and were placed onto the wound with the mycelial surface facing the cambium. Cotton soaked in sterile water was attached to the inoculated wound and wrapped with laboratory film (Parafilm M, Pechiney Plastic Packing, USA). Each isolate was inoculated on eight branches. Plugs of sterile PDA were inoculated on eight branches and used as control. Inoculated olive branches were maintained at 25°C with a 12-hr photoperiod. After one month of incubation, the bark was removed, and the necrotic lesion lengths measured. To complete Koch's postulates, the Botryosphaeriaceae isolates were re-isolated from the internal necrotic lesion margin of inoculated branches. Cultural and conidial characteristics identical to Botryosphaeriaceae were confirmed on PDA and water agar with pine needles as described previously.

The lesion length measurements were subjected to analysis of variance and mean values were separated according to Tukey test with a P value ≤ 0.05 . Statistical analysis was performed in InfoStat version 2020 (www.infostat.com.ar).

Field sampling and fungal isolates

Stem canker and fruit rot were the symptoms frequently observed and collected in the commercial olive orchards sampled. The stem cankers were found affecting mainly secondary and terminal branches and rarely the main trunks (Figure 1a-b). Also, the stem cankers were commonly associated with the damage caused by wood boring insects (Figure 1c-d). The fruit rot was mostly observed during the ripening stage and was characterized by a brown to black colour affecting the entire fruit. Also, pycnidia containing conidia resembling those of the *Botryosphaeriaceae* fungi were usually present (Figure 1e).

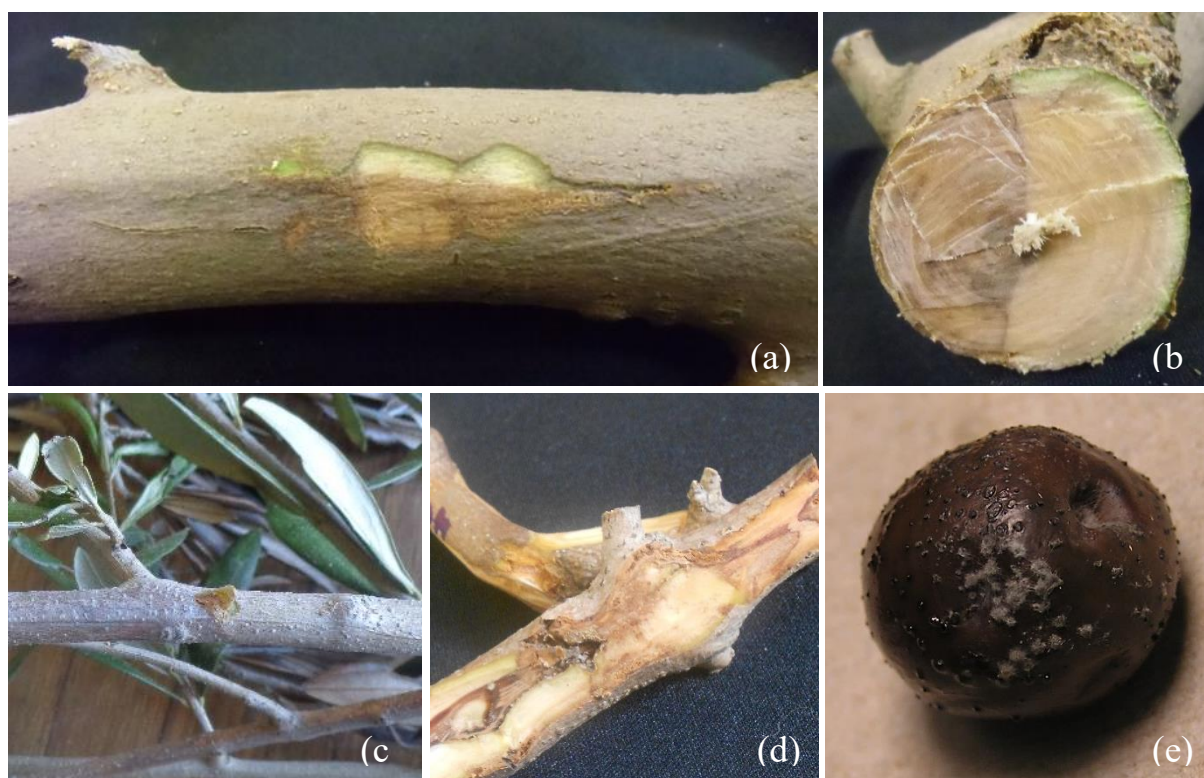


Figure 1. Symtoms observed in stems and fruits of olive trees. View of stem canker in (a) longitudinal and (b) transversal section, (c) external and (d) internal detail of a canker asociated to wood boring insects damage (black arrow) and (e) fruit rot symptom with picnidia.

Primary selection based on colony appearance, generated a collection of 37 *Botryosphaeriaceae*-like isolates, all obtained from symptomatic olive organs, 86 % from stem canker and 14 % from fruit rot (Table 1).

Phenotypical characteristics

Macroscopic observations indicated that the 37 isolates presented typical characteristics of Botryosphaeriaceae species including fast-growing, white and cottony mycelium at the beginning, turning to grey or grey-green a few days later. Thirty-four isolates produced hyaline, aseptate and fusiform conidia in accordance with characteristics of species of genera as *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum*. The remaining three fungal isolates had dark, aseptate and oblong to rounded apex conidia, in agreement with the characteristics of species of the genus *Diplodia* (Delgado et al, 2016). The mean conidia size ranged between 20.8 to 30.2 μm in length and 7.2 to 15.4 μm in width. All isolates grew at all temperatures evaluated between 10 and 30°C, but the maximum mycelial growth rate was recorded at 25°C. The mean size of conidia and the mean daily growth rate at different temperatures registered for each species are presented in Table 3.

Phylogenetic analysis

The preliminary identification based on ITS and TEF-1 α gene region BLAST search, placed all Uruguayan olive isolates within the genera *Botryosphaeria* (n=15), *Neofusicoccum* (n=19) and *Diplodia* (n=3).

The sequence data sets for each genus did not show significant conflicts in tree topology indicating that the two genes can be combined. The *Botryosphaeria* data set contained 46 taxa (15 from this study) and 782 characters including gaps (ITS: 501, TEF-1 α : 281) on which 46 were parsimony informative. The *Neofusicoccum* dataset consisted of 53 taxa (19 generated in this study) and 689 characters including gaps (ITS: 465, TEF-1 α : 224) of which 86 were parsimony informative. Finally, the *Diplodia* dataset contained 38 taxa (three from this study) and 686 characters including gaps (ITS: 486, TEF-1 α : 200) of which 105 were parsimony informative. In the three Botryosphaeriaceae genera, the tree topologies inferred from BI and ML analyses were consistent with each other. Thus, BI trees are presented with the support node value of both phylogenetic methods utilized.

Table 3. Phenotypical characteristics used to characterize the Botryosphaeriaceae isolates

Species	Conidia characteristics			Colony daily growth rate (mm)						
	Colour	Lenght (um)	Width (um)	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	
<i>B. dothidea</i> (n=4)	hialine	(24.2)25.3(26.8)	(6.9)7.2(7.6)	(0.6)0.8(1.0)	(1.9)2.4(2.6)	(4.2)5.5(6.6)	(5.6)10.3(12.3)	(4.8)7.4(8.9)	(1.2)1.5(1.8)	
<i>B. wangensis</i> (n=11)	hialine	(22.5)25.4(27.6)	(6.5)7.5(8.6)	(0.0)0.4(0.7)	(2.0)2.8(4.1)	(2.8)5.4(7.5)	(7.2)9.4(14.0)	(3.3)8.1(10.5)	(0.6)2.1(5.0)	
<i>D. seriata</i> (n=2)	brown	(26.3)27.9(29.5)	(11.4)11.7(11.9)	(1.2)1.8(2.4)	(5.9)6.0(6.1)	(10.3)10.4(10.5)	(13.6)13.8(14.0)	(5.0)7.7(10.5)	(1.3)1.3(1.4)	
<i>D. mutila</i> (n=1)	brown	30.2	15.4	1.5	6.0	10.5	14.0	3.1	0.0	
<i>N. australe</i> (n=1)	hialine	23.2	7.4	0.6	4.4	10.5	12.5	2.5	0.1	
<i>N. cryptoaustrale</i> (n=9)	hialine	(17.7)22.1(24.6)	(5.1)7.1(8.3)	(0.7)1.0(1.9)	(2.9)3.3(4.4)	(5.2)7.0(9.9)	(8.5)10.5(12.1)	(2.0)4.7(8.6)	(0.0)0.1(0.4)	
<i>N. luteum</i> (n=7)	hialine	(21.9)23.9(27.5)	(7.7)8.3(9.5)	(0.8)1.1(1.4)	(3.4)4.1(4.9)	(8.5)9.6(10.2)	(11.7)12.8(14.0)	(10.5)5.8(3.3)	(0.0)0.1(0.3)	
<i>N. occulatum</i> (n=2)	hialine	(20)20.8(21.6)	(7.4)7.8(8.3)	(0.3)0.7(1.0)	(3.1)3.5(3.9)	(7.6)7.9(8.3)	(12.2)12.5(12.9)	(1.9)4.3(6.8)	(0.0)0.0(0.1)	

Note: Mean values with minimum and maximum in parenthesis

The *Botryosphaeria* phylogenetic analysis allowed us to identify two species among the 15 olive Uruguayan isolates of this genus, 11 of them grouped with *B. wangensis* and four with *B. dothidea* (Figure 2). The *Neofusicoccum* phylogenetic analysis was useful to identify four species among the 19 Uruguayan olive isolates of this genus, nine of them grouped with *N. cryptoaustrale*, seven with *N. luteum*, two with *N. occulatum* (O12 and O29) and one with *N. australe* (O35) (Figure 3). Finally, the *Diplodia* phylogenetic analysis allowed the identification of two species among the three olive strains of this genus, two isolates grouped with *D. seriata* (O14 and O19) and isolate O36 with *D. mutila* (Figure 4). The clades where the Uruguayan olive isolates were placed, included the sequences of the ex-type strains of the eight identified species and exhibited strong node support values with at least one of the two phylogenetic methods applied.

Pathogenicity tests

The eight Botryosphaeriaceae isolates evaluated belonging to the genera *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum* and *Diplodia*, were pathogenic on olive cultivar Arbequina under controlled conditions. Necrotic brown to black lesions were visible in all olive branches inoculated and cicatrized wounds with no signs of necrosis developed in the branches used as controls. Also, significant statistical differences in branch lesion length ($P = 0.0001$) among the inoculated isolates were found.

The necrotic lesions caused by the inoculated Botryosphaeriaceae species, ranged between 1.9 to 15.5 cm in length (Figure 5). *Neofusicoccum* species were the most aggressive, particularly *N. cryptoaustrale*, *N. luteum* and *N. occulatum*. Lesion lengths caused by the *Neofusicoccum* species ranged between 9.5 to 15.5 cm. Contrarily, *Diplodia* species were less aggressive, *D. mutila* and *D. seriata* caused the smallest necrotic lesions of 1.9 and 3.9 cm in length, respectively. Finally, branches inoculated with both *Botryosphaeria* species, *B. dothidea* and *B. wangensis*, developed intermediate lesion lengths of 5.3 and 6.0 cm, respectively.

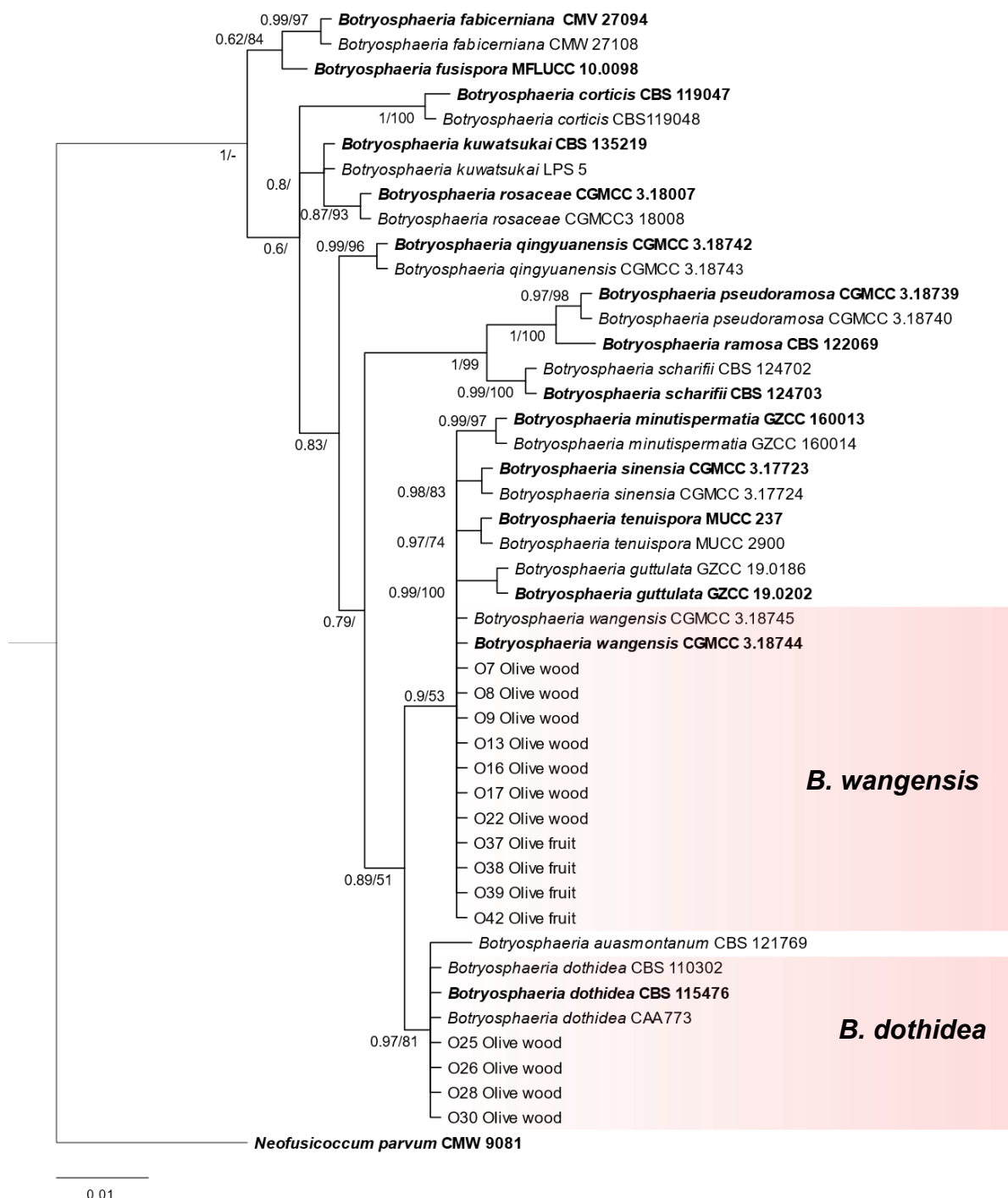


Figure 2. Bayesian inference phylogenetic tree built with the concatenated sequences of the ITS and TEF-1 α genomic regions of 15 Uruguayan *Botryosphaeria* and sequences obtained from GenBank (Ex-type indicated in bold). *Neofusicoccum parvum* CMW 9081 was used as outgroup. Bootstrap support values of posterior probability and maximum likelihood higher than 0.50 and 50 %, are shown at the nodes before and after the bar, respectively. The scripts indicate that the nodes do not exist in the maximum likelihood tree. Double hash marks indicate branch lengths shortened at least 2-fold to facilitate visualization. Scale bar represents the estimated number of substitutions per site.

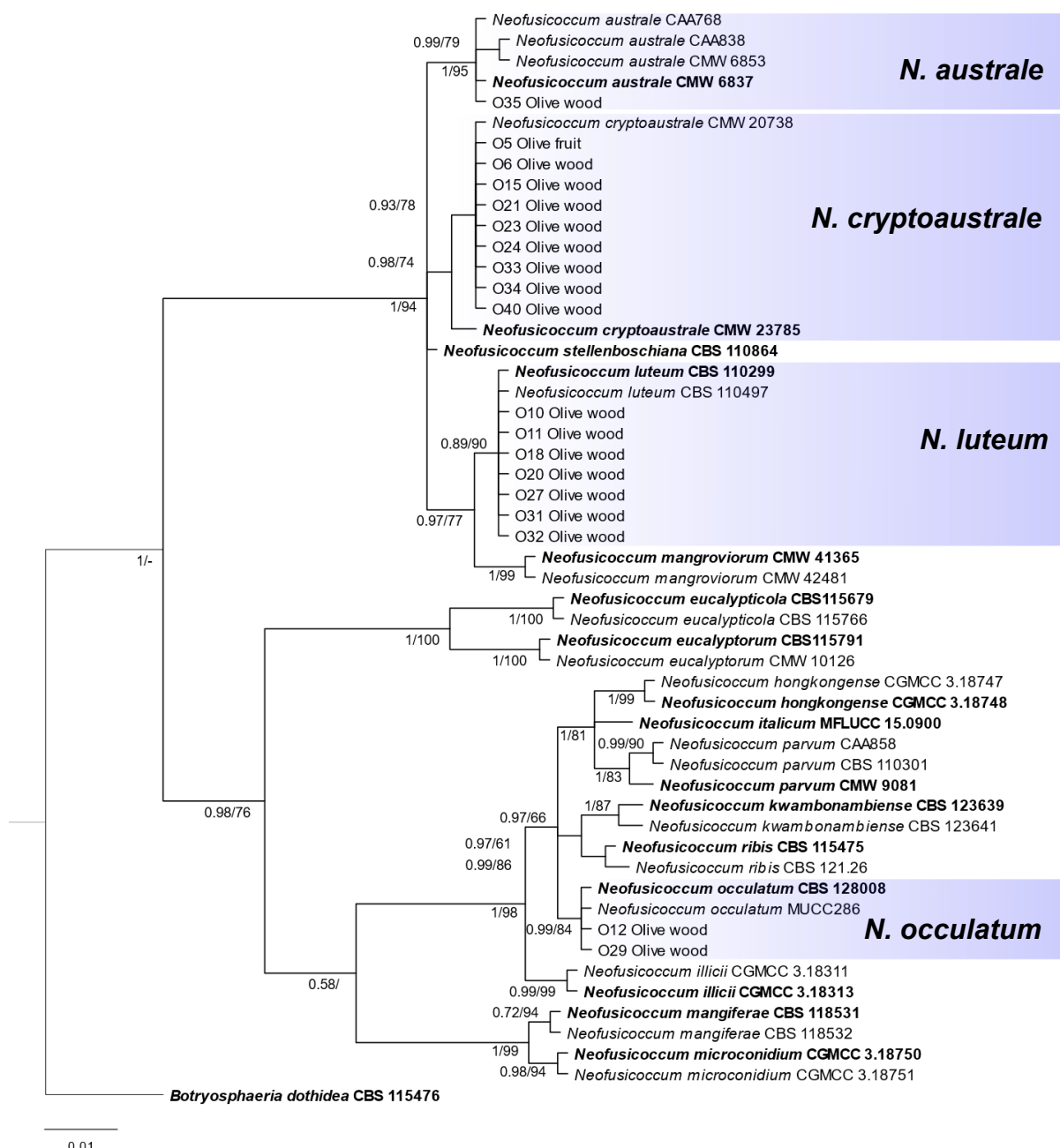


Figure 3. Bayesian inference phylogenetic tree built using the concatenated sequences of the ITS and TEF-1 α genomic regions of 19 Uruguayan *Neofusicoccum* and sequences obtained from GenBank (ex-type indicated in bold). *Botryosphaeria dothidea* CBS 115476 was used as outgroup. Bootstrap support values of posterior probability and maximum likelihood higher than 0.50 and 50 %, are shown at the nodes before and after the bar, respectively. The scripts indicate that the nodes do not exist in the maximum likelihood tree. Double hash marks indicate branch lengths shortened at least 2-fold to facilitate visualization. Scale bar represents the estimated number of substitutions per site.

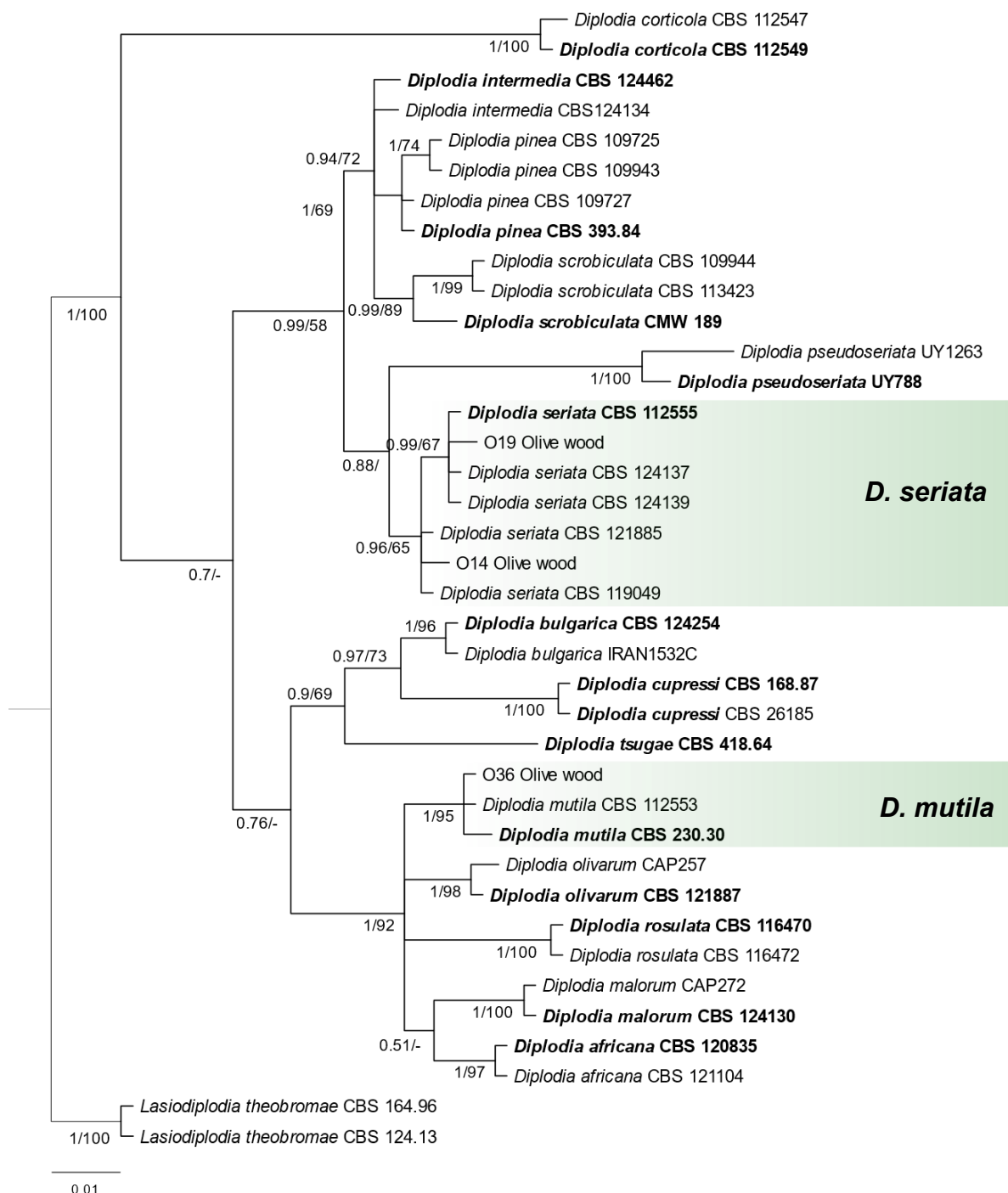


Figure 4. Bayesian inference phylogenetic tree built using the concatenated sequences of the ITS and TEF-1 α genomic regions of 3 Uruguayan *Diplodia* and sequences obtained from GenBank (ex-type indicated in bold). *Lasiodiplodia theobromae* CBS 164.96 and *L. theobromae* 124.13 CMW 9081 were used as outgroup. Bootstrap support values of posterior probability and maximum likelihood higher than 0.50 and 50 %, are shown at the nodes before and after the bar, respectively. The scripts indicate that the nodes do not exist in the maximum likelihood tree. Double hash marks indicate branch lengths shortened at least 2-fold to facilitate visualization. Scale bar represents the estimated number of substitutions per site.

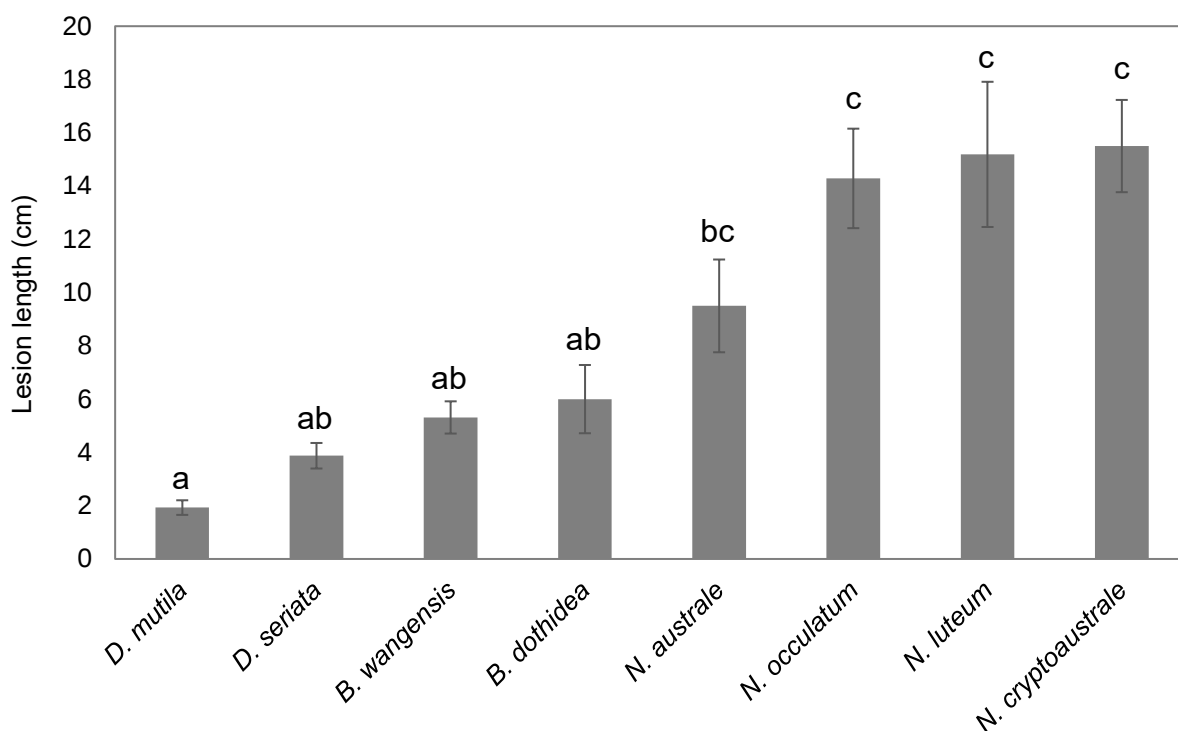


Figure 5. Mean necrotic lesion lengths developed in detached branches of olive Arbequina cultivar, one month after inoculation with selected Botryosphaeriaceae isolates. Cicatrized wounds were observed in control treatments thus, they were not included in the analysis. Mean values followed by different letters indicate significant differences according to Tukey test ($P \leq 0.05$). Vertical bars are the standard error of the means.

DISCUSSION

In this study we investigated Botryosphaeriaceae fungi that affect olive trees in Uruguay, and we present the identity, diversity, and pathogenicity of eight species identified under this family. Botryosphaeriaceae species belonging to the genera *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum* and *Diplodia* were found affecting the wood and less frequently the fruit of olive trees. Based on phylogenetic analyses, the species identified were *B. dothidea*, *B. wangensis*, *N. australe*, *N. cryptoaustrale*, *N. luteum*, *N. occulatum*, *D. mutila* and *D. seriata*.

In the commercial orchards surveyed, the cankers were found affecting predominately the secondary and terminal branches of olive trees and rarely the main trunk. This contrasts with observations made in other Botryosphaeriaceae hosts in Uruguay, such as apple, in which the cankers appear in branches of all sizes (Delgado et al, 2016). Interestingly, an association

between canker symptoms and wood boring insects was observed. Even though *Botryosphaeriaceae* fungi can develop as primary pathogens, these fungi require a wound or natural opening to start infection (Slipper & Wingfield, 2007; Moral et al, 2019b). In addition to pruning, frost, or other mechanical injuries (Delgado et al, 2016), the wounds generated by these insects created an additional stem entryway for *Botryosphaeriaceae* in olive. In Uruguay, the terminal branches of olive trees are usually attacked by the wood boring insects *Hylesinus oleiperda* and *Phloeotribus scarabaeoides* (Leoni et al, 2013). Therefore, the findings of this study emphasize the importance of controlling these insects. Another symptom present in olive was fruit rot, although its incidence was substantially lower compared to stem canker. Nevertheless, the pycnidia developed on the rotten fruit contribute to an increase the *Botryosphaeriaceae* inoculum available in the field, thus this symptom should be considered for further management program strategies.

Among the species identified in this study, those belonging to *Botryosphaeria* (41%) and *Neofusicoccum* (51%) genera were the most frequently associated with affected olive trees, while those of the *Diplodia* genus were represented in a lower proportion (8%). In the *Botryosphaeria* genus, *B. dothidea* (4 isolates) and *B. wangensis* (11 isolates) were identified. *Botryosphaeria dothidea* is one of the most widespread *Botryosphaeria* species worldwide. This species has been found associated with numerous fruit, forestry, and ornamental trees (Marsberg et al, 2017), and it was also reported in olive in Greece (Philips et al, 2005), Italy (Lazzizzera et al, 2008), Spain (Moral et al, 2010), United States (Moral et al, 2010; Úrbez-Torres et al, 2013), Tunisia (Chattaoui et al, 2011), Montenegro (Latinovic et al, 2013) and Turkey (Korukmez et al, 2020). In Uruguay, this species was isolated from eucalyptus and other *Myrtaceae* (Pérez et al, 2010), grapevine (Abreo et al, 2013), apple (Delgado et al, 2016; Sessa et al, 2016) and blueberry trees (Sessa et al, 2018). Conversely, *B. wangensis*, the most frequently isolated species in this study, is a new record for olive crops. *Botryosphaeria wangensis* was recently described in China affecting *Cedrus deodara* (Li et al, 2018) and then was found affecting nature reserves in Guizhou province (Chen et al, 2020).

Regarding the *Neofusicoccum* genus, the species *N. luteum* (7 isolates) and *N. cryptoaustrale* (9 isolates) were the most abundant followed by *N. australe* (1 isolate) and *N. occulatum* (2 isolates). *Neofusicoccum luteum* was previously reported affecting olive in New Zealand (Taylor et al, 2001), Australia (Sergeeva et al, 2009) and United States (Úrbez-Torres et al, 2013). In Uruguay it was isolated from grapevine (Abreo et al, 2013) and apple (Delgado et al, 2016). *Neofusicoccum cryptoaustrale* was described in South Africa affecting eucalyptus (Crous et al, 2013) and then associated with four different mangrove species of this country (Osorio et al,

2017) and *Pistacia lentiscus* in Italy (Linaldeddu et al, 2016). In South Africa, strains isolated from adult (Spies et al, 2020) and nursery plants of olive (van Dyk et al, 2021), could not be distinguished among *Neofusococcum cryptoaustrale* and *N. stellenboschiana* using ITS, TEF-1 α and B-tubulin2 phylogenetic analyses. However, in our study a well-supported clade (Bayesian posterior probability 0.98/ maximum likelihood bootstrap 74) grouped nine Uruguayan isolates together with the ex-type of *N. cryptoaustrale*, while the *N. stellenboschiana* ex-type was excluded from this group. Regarding *N. australe*, this species was found in Italy (Lazzizzera et al, 2008), Tunisia (Triki et al, 2015) and South Africa (Spies et al, 2020) infecting olive, and in Uruguay has been isolated from apple (Delgado et al, 2016; Sessa et al, 2016) and grapevine (Sessa et al, 2018). Finally, *N. oculatum*, which is a new record for olive, was described in Australia affecting eucalyptus and *Wollemia nobilis* (Sakalidis et al, 2011a), and there after found in blueberry (Scarlett et al, 2019). Surprisingly, *N. parvum*, one of the *Neofusicocum* species isolated from woody hosts in Uruguay in previous studies (Abreo et al, 2013; Delgado et al, 2016; Sessa et al, 2016; 2018), was not found in this study.

The genus *Diplodia* was represented by only three strains identified as *D. seriata* (2 isolates) and *D. mutila* (1 isolate). *Diplodia seriata* was associated with olive in Tunisia (Chattaoui et al, 2012) and Croatia (Kaliterna et al, 2012), and in Uruguay was isolated from grapevine (Abreo et al, 2013), apple (Delgado et al, 2016) and peach (Sessa et al, 2016). Finally, *D. mutila* is a new record for olive in Uruguay. Previously, this species was isolated only from pear (Sessa et al, 2016).

Phylogenetic approach is crucial to identify the strains to species level, however, the phenotypical characteristics were useful to tentatively identify the Botryosphaeriaceae isolates to genus level. For example, strains with hyaline and fusiform conidia allow as us to speculate that they resembled genera such as *Botryosphaeria* or *Neofusicocum*, while those with dark, aseptate and oblong to rounded apex conidia presumably belonged to the *Diplodia* genus. Therefore, these characteristics are useful to reduce the species range to which these isolates can belong.

Although all Botryosphaeriaceae strains identified were pathogenic on olive branches, the *Neofusicocum* isolates were considerably more aggressive than *Botryosphaeria* and *Diplodia* isolates, in accordance with other studies. In this regard, Moral et al, (2017) found that *N. mediterraneum* caused longer necrotic lesions in olive branches than *B. dothidea*. Úrbez-Torres et al, (2013) obtained similar conclusions, isolates of *N. mediterraneum*, *N. vitifusiforme* and *N. luteum* were more aggressive than other Botryosphaeriaceae species including *B. dothidea*

and *D. seriata*, although in that study the olive necrotic lesions caused by *D. mutila* were similar to those of *Neofusicoccum* species. Also, the same occurred in Botryosphaeriace pathogenicity test in apples, peaches and pears conducted in Uruguay. Species of *Neofusicoccum* generated longer necrotic lesions in comparison with species of *Botryosphaeria* and *Diplodia* (Pérez et al, 2010; Delgado et al, 2016; Sessa et al, 2016). *N. cryptoaustrale*, that is a new record to olive, was one of the more virulent and the second most frequent found in this study, thus, special attention should be posted on this species in future investigations.

Finally, from the eight Botryosphaeriaceae species found infecting olive trees in this study, *B. dothidea*, *N. australe*, *N. luteum*, *D. seriata*, *D. mutila* have been previously isolated from other economically important crops in Uruguay as eucalyptus, grapevine, apple, pear, peach, and blueberry (Pérez et al, 2010; Abreo et al, 2013; Delgado et al, 2016; Sessa et al, 2016; 2018). Probably, each host is acting as Botryosphaeriaceae inoculum source to the other hosts and vice versa. Thus, further epidemiologic studies and management strategies should be developed, taking into consideration all Botryosphaeriaceae hosts cultivated in close proximity to each other. For example, more isolates of each species should be subjected to cross-pathogenicity tests on olive and the other Botryosphaeriaceae hosts, to examine the pathogenicity and virulence variation among species and hosts.

RANGO DE HUÉSPEDES Y AGRESIVIDAD DE AISLADOS DE
LA FAMILIA BOTRYOSPHERACEAE OBTENIDOS DE
MANZANOS, OLIVOS Y VIDES.

CAPÍTULO 2

La familia Botryosphaeriaceae se constituye por 18 géneros dentro de los cuales numerosas especies han sido descritas (De Wet et al, 2008; Yang et al, 2016; Zhang et al, 2021). No obstante, un grupo bastante reducido de ellas han sido asociadas con enfermedades que afectan a una gran diversidad de huéspedes leñosos tales como cultivos frutales (Damm et al, 2007; Phillips et al, 2012; Scarlett et al, 2019; Guarnaccia et al, 2022) plantas de importancia forestal u ornamental (Slippers et al, 2009; Alves et al, 2013; Mehl et al, 2017; Jami et al, 2022) y plantas nativas de Uruguay (Pérez et al, 2010) causando canchros y podredumbre de frutos. Entre estas especies, *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum* y *N. luteum* han sido las más frecuentemente encontradas afectando al cultivo del manzano (Delgado et al, 2016; Sessa et al, 2016), olivo (Hernández-Rodríguez et al, 2022) y vid (Abreo et al, 2013) en Uruguay.

La alternancia en el espacio de un cultivo susceptible a un patógeno con otros no susceptibles oficia de freno para el desarrollo epidémico. Esto se debe a que el inóculo generado en un cultivo huésped no encuentra condiciones para desarrollarse en los cultivos linderos. Sin embargo, cuando se trata de patógenos tan polífagos como algunos representantes de la familia Botryosphaeriaceae, éstos suelen encontrar condiciones propicias para su desarrollo epidémico en los cultivos próximos, aunque se trate de especies bien diferentes (Crous & Wingfield, 2018). Como prueba de ello, análisis genéticos de poblaciones de especies de Botryosphaeriaceae han corroborado la ocurrencia de flujo génico entre diferentes huéspedes. Por ejemplo, Mehl et al, (2017) encontraron que una población de cepas de *N. parvum* se constituía por tres sub-poblaciones, cada una de las cuales incluía aislamientos provenientes de diferentes huéspedes.

Particularmente en Uruguay, la fruticultura se concentra mayoritariamente en la zona centro-sur del país, conviviendo en un espacio reducido cultivos de hoja caduca tanto de carozo como de pepita, vides, cítricos y olivos (Linari et al, 2022; MGAP-DIEA, 2021b). En este contexto productivo, existe alta probabilidad de que los patógenos de la familia Botryosphaeriaceae infecten y colonicen indistintamente frutales tan diferentes como el manzano, el olivo o la vid (Adesemoye et al, 2014).

Por otra parte, especies del género *Neofusicoccum* en general manifiestan un comportamiento más agresivo que especies de otros géneros como *Botryosphaeria* o *Diplodia*, cuando son inoculadas en plantas de la misma especie de las que fueron aisladas. Por ejemplo, aislados de

las especies *N. luteum* y *N. parvum* provocaron lesiones en la madera de mayor tamaño cuando fueron inoculadas en vid (Úrbez-Torrez et al, 2011), manzano (Delgado et al, 2016) almendro (Olmos et al, 2016) y en el caso de eucalipto solamente fueron superadas por especies del género *Lasiodiplodia* (Pérez et al, 2010). Sin embargo, se desconoce si estas cepas son capaces de mantener esta mayor agresividad cuando son inoculadas en huéspedes diferentes del cual fueron aisladas.

Para confirmar la capacidad de los miembros de la familia Botryosphaeriaceae de infectar y colonizar indistintamente diversos hospederos y determinar si pueden mantener su comportamiento agresivo en todos ellos, este trabajo tuvo como objetivo comparar la patogenicidad y agresividad de aislados seleccionados de diez especies de Botryosphaeriaceae pertenecientes a los géneros *Botryosphaeria*, *Diplodia* y *Neofusicoccum*. Estos aislados fueron obtenidos de manzano, olivo y vid, y se realizaron inoculaciones en el cultivo del que fueron aislados, así como inoculaciones cruzadas en los otros dos frutales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal utilizado consistió en ramas desprendidas de manzano, olivo y vid. Se eligieron ramas lignificadas, aparentemente sanas, de 30 cm de largo por 1 cm de diámetro aproximadamente, las que fueron colectadas en plantaciones comerciales de manzana, olivo y vid, de las variedades Red Delicious, Arbequina y Marcelland, respectivamente. Inmediatamente de colectadas, las ramas fueron trasladadas al laboratorio y acondicionadas en frascos de vidrio de 200 ml conteniendo arena estéril humedecida hasta un tercio de su capacidad.

Material fúngico utilizado

Se utilizaron aislados de la familia Botryosphaeriaceae obtenidos de manzanos, existentes en la colección del laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía y previamente

identificados (Delgado et al, 2016). A estos se agregó dos nuevas colecciones de aislados obtenidos de olivos y vides. El proceso de aislamiento e identificación de estos aislados se realizó en el marco de esta tesis, a partir de materiales con síntomas de cancro de plantas de olivo (descrito en el Capítulo 1 de esta tesis) y vid. Para obtener aislados de plantas de vides, se realizaron colectas de materiales sintomáticos en viñedos comerciales localizados en el Departamento de Canelones (sur de Uruguay), principal región productora de vid. Las muestras consistieron en brazos o troncos principales de plantas con síntomas de decaimiento de las variedades *Cabernet sauvignon*, *Chardonay*, *Marceland*, *Souvignon blanc*, *Tannat* y *Ugni blanc*. El proceso de aislamiento e identificación se realizó siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 1 de esta tesis. Se obtuvieron un total de 26 aislados de las especies *B. dothidia* (n=13), *D. seriata* (n=6), *D. pseudoseriata* (n=1) y *N. parvum* (n=6).

Para efectuar las inoculaciones se seleccionaron hasta tres aislados de las especies encontradas en cada frutal. La selección incluyó un total de 40 aislados correspondientes a once especies de los géneros *Botryosphaeria*, *Diplodia* y *Neofusicoccum* (Tabla 1). Los aislados seleccionados se sembraron en medio PDA y se incubaron durante 7 días a 24°C en oscuridad.

Tabla 1. Aislados de Botryosphaeriaceae provenientes de manzana, olivo y vid utilizados en las inoculaciones

Especie	Frutal		
	Manzano	Olivo	Vid
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	M14, M49, M108	O28	V2, V13, V22
<i>B. wangensis</i>		O7, O22	
<i>Diplodia intermedia</i>	M5, M118, M144		
<i>D. mutila</i>		O36	
<i>D. pseudoseriata</i>			V 14
<i>D. seriata</i>	M27, M69, M157	O14, O19	V1, V5, V23
<i>Neofusicoccum australe</i>	M112		
<i>N. cryptoaustrale</i>		O6, O21, O24	
<i>N. luteum</i>	M55, M107, M129	O10, O20, O27	
<i>N. occulatum</i>		O12, O29	
<i>N. parvum</i>	M60, M146, M168		V4, V28, V35

Proceso de inoculación y evaluación

Las inoculaciones se realizaron siguiendo la metodología indicada en Delgado et al, (2016), con modificaciones. En primer lugar, la zona del entrenudo de la parte media de cada rama se desinfectó superficialmente con algodón embebido con alcohol 70°. Posteriormente y con ayuda de un bisturí, se retiró la epidermis hasta alcanzar la zona del cambium generándose una herida de aproximadamente 5 mm de diámetro. Sobre la herida se colocó un disco de 5mm de diámetro de micelio creciendo sobre medio PDA de manera que el micelio entrase en contacto con el cambium. Inmediatamente, la zona inoculada se cubrió con un algodón humedecido con agua destilada estéril con el fin de asegurar la presencia de humedad y se envolvió cuidadosamente con parafilm® M (USA). Para cada especie frutal inoculada se realizaron ocho repeticiones por aislado, mientras que como testigo se inocularon ocho ramas con discos de PDA estéril. Las ramas inoculadas se mantuvieron a 24°C con fotoperíodo de 12 horas. Transcurridas cinco semanas se destapó la zona inoculada, se removió la corteza y se evaluaron los síntomas midiendo el largo de la lesión utilizando un calibre digital (Kamasa, Estados Unidos).

Análisis estadístico

Los datos de longitud de lesión fueron analizados ajustando modelos lineales generalizados asumiendo una distribución gamma de la variable, mientras que la función nexos fue el logaritmo natural. Se utilizó el procedimiento GLIMMIX en el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 9.4, SAS Institute Inc, Cary, NC, EE. UU.). Los factores considerados en el modelo fueron: origen del aislado, especie dentro de origen y aislado según especie y origen. Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey-Kramer con un valor de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Los 40 aislados fueron capaces de infectar las ramas desprendidas de los tres frutales (manzano, olivo y vid) inoculados, causando lesiones necróticas que se extendían hacia la parte superior e inferior de la rama desde el punto de inoculación (Figura 1). En las ramas utilizadas como testigo no se desarrollaron lesiones necróticas de ningún tipo, solo se observó la cicatrización de la lesión provocada. El análisis estadístico indicó que hubo efecto origen del aislado, especie dentro de origen y aislado dentro de especie y origen, en el largo de las lesiones necróticas con valores de P menores a 0,0001 en todos los casos (Tabla 2).

Las lesiones necróticas de mayor tamaño ocurrieron en ramas de manzano inoculadas. En este frutal el largo de las lesiones varió en un rango de entre 1,3 y 29,4 cm. En el caso de las ramas de olivo los tamaños de las lesiones variaron entre 2,1 y 19,6 cm mientras que en vid fueron de entre 2,4 y 20,3 cm (Figura 2).

Salvo algunas excepciones, los aislados pertenecientes a las especies *N. luteum*, *N. parvum* y *N. occulatum* independientemente de su origen, se comportaron como los más agresivos cuando fueron inoculados en ramas de manzano y olivo. Estos aislados fueron O10, O20, O27, M55, M107, M129 de *N. luteum*, V4, V28, V35, M60, M146 y M168 de *N. parvum* y O29, O12 de *N. occulatum*. Las lesiones necróticas provocadas por la mayoría de estos aislados alcanzaron tamaños por encima de los 15 cm de largo en manzano y por encima de 10 cm de largo en olivo. En el caso de vid los resultados fueron más erráticos, solo algunos de estos aislados se comportaron de forma más agresiva en comparación con el resto, generando lesiones por encima de los 10 cm de largo como, por ejemplo, M55, M107, M129, M168, O10, O12 y V35.

Tabla 2. Análisis GLIMMIX para los efectos origen del aislado, especie dentro de origen y aislado dentro de especie y origen, en el largo de las lesiones desarrolladas en ramas desprendidas de manzano, olivo y vid inoculadas con 40 aislados de ocho especies de Botryosphaeriaceae obtenidas de estos tres frutales

Efecto	Manzano	Olivo	Vid
	p-valor	p-valor	p-valor
Origen del aislado	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Especie (Origen)	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Aislado (Especie y Origen)	<0.0001	<0.0001	<0.0001

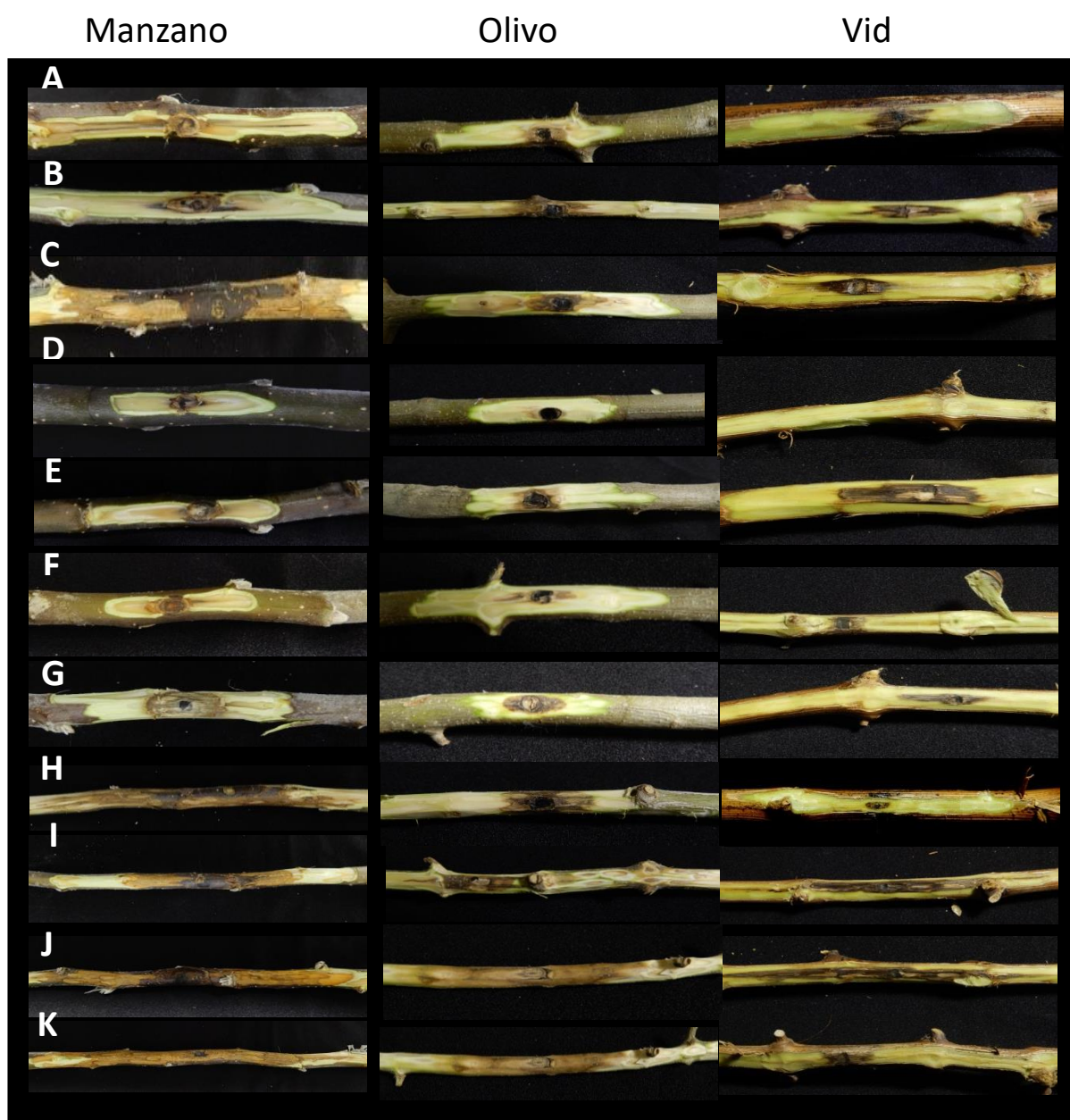


Figura 1. Lesiones necróticas desarrolladas en ramas desprendidas de manzano, olivo y vid, cinco semanas post inoculación con cepas de A) *B. dothidea* (M14), B) *B. wangensis* (O22), C) *D. intermedia* (M5), D) *D. mutila* (O36), E) *D. pseudoseriata* (V14), F) *D. seriata* (O19), G) *N. australe* (M112), H) *N. cryptoaustrale* (O6), I) *N. luteum* (M107), J) *N. parvum* (V18) y K) *N. occulatum* (O12).

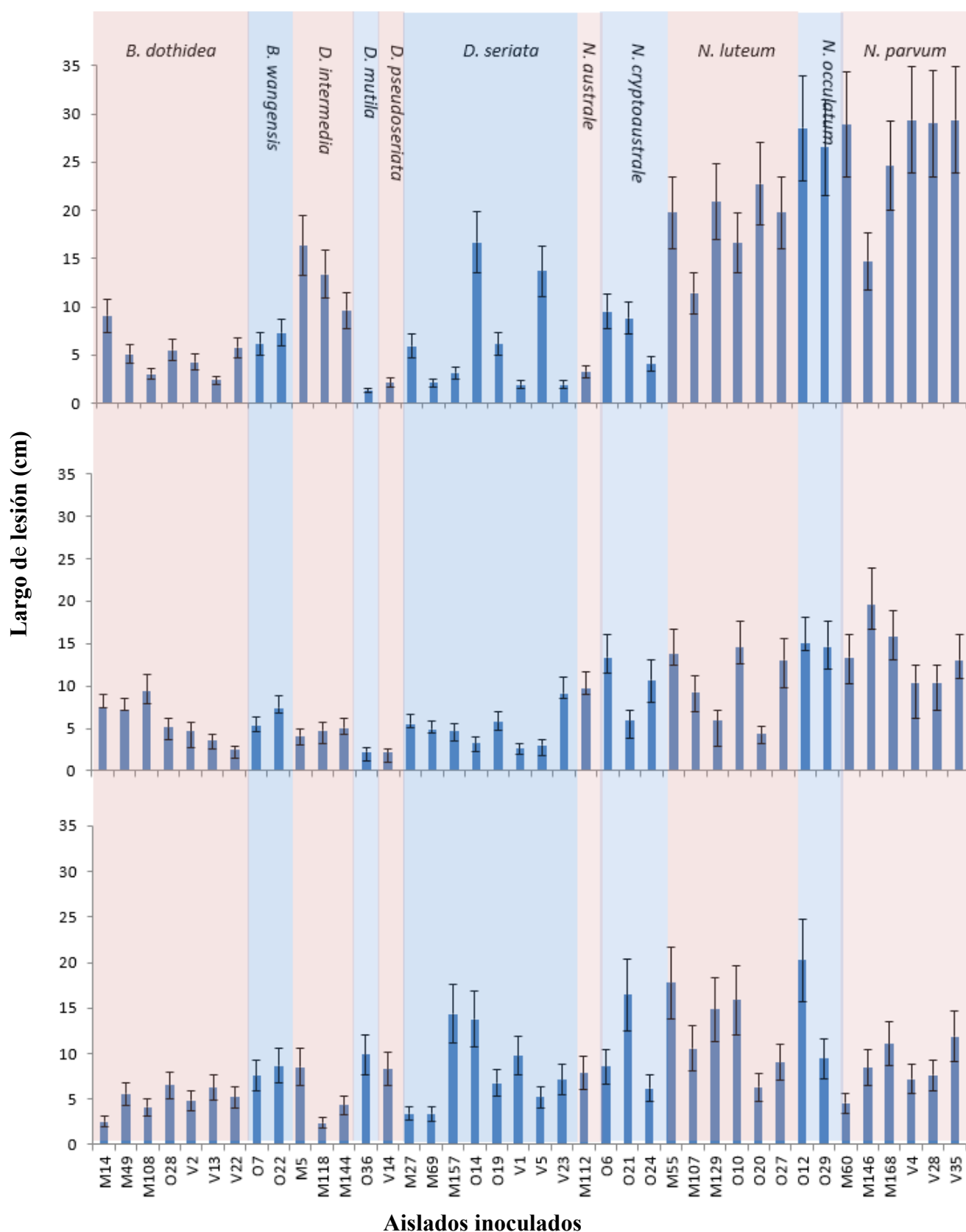


Figura 2. Representación gráfica de la media de la lesión (cm) por aislado en rama desprendida de manzano (arriba) olivo (centro) y vid (abajo) inoculados. Las barras indican el error estandar de la media. M, aislados de manzana, O, aislados de Olivo, V, aislados de vid.

Por otra parte, los restantes aislados incluyendo los pertenecientes a las cuatro especies dentro del género *Diplodia* (*D. intermedia*, *D. mutila*, *D. pseudoseriata* y *D. seriata*), las dos especies dentro del género *Botryosphaeria* (*B. dothidea*, *B. wangensis*) y las especies *N. australe* y *N. cryptoaustrale*, salvo alguna excepción, tuvieron comportamiento entre medio y bajo en cuanto agresividad. Los tamaños de lesión causados por estos aislados se ubicaron mayoritariamente por debajo de los 10 cm de largo en los tres frutales inoculados. Dentro de las excepciones se destaca, por ejemplo, el aislado O14 de *D. seriata* que generó una lesión en torno a 18 cm de largo tanto en manzano como en vid.

DISCUSIÓN

En este trabajo se presenta el primer abordaje exhaustivo realizado en Uruguay estudiando el potencial que poseen los aislados de la familia Botryosphaeriaceae de infectar indistintamente a diferentes huéspedes frutales (tanto al huésped del que fueron aislados como a otros). El modelo utilizado incluyó tres de los cultivos frutales de mayor importancia económica en nuestro país como lo son el manzano, el olivo y la vid. La susceptibilidad de estos frutales a hongos de la familia Botryosphaeriaceae está ampliamente documentada a nivel mundial (Moral et al, 2010; Úrbez-Torres et al, 2013; Guarnaccia et al, 2022) y en nuestro país (Abreo et al, 2013; Delgado et al, 2016; Sessa et al, 2016; Hernández et al, 2022) por ser susceptibles a estos hongos patógenos.

Los resultados de este trabajo reafirman que los miembros de esta familia tienen un amplio rango de huéspedes. Los 40 aislados representantes de 11 especies y tres géneros de esta familia fueron capaces de causar enfermedad en ramas desprendidas de los tres frutales, generando el típico síntoma de cancro. Aunque es sabido que algunas de las especies de la familia Botryosphaeriaceae como por ejemplo *B. dothidea*, *D. seriata*, *N. parvum* y *N. luteum*, son comúnmente aisladas de una gran diversidad huéspedes (Slippers et al, 2007; Mehl et al, 2017; Ramabulana et al, 2022), este estudio demuestra que no existe una relación de preferencia o especialización entre cepa-huésped.

Zlatković et al, (2018) también realizaron inoculaciones de cepas de unas 10 especies de esta familia en una amplia diversidad de árboles y arbustos forestales y ornamentales. Como resultado encontraron que, la mayoría de estos hongos pudieron infectar huéspedes distintos

de aquellos de los que se aislaron. Esto afirma que usualmente estas especies tienen amplios rangos de hospedadores por lo que pueden potencialmente causar enfermedades en una amplia variedad de especies leñosas.

Este resultado tiene implicancias prácticas muy relevantes debido a que, en Uruguay, gran parte de la producción de frutales se realiza en una región geográfica relativamente concentrada incluyendo no solo los frutales utilizados como modelo, sino también a otros frutales huéspedes de esta familia como lo son el peral, el duraznero (Sessa et al, 2016; Dini et al, 2021) o los arándanos (Rebellato, 2011; Sessa et al, 2018). Esta situación obliga a repensar las estrategias de manejo para estos patógenos, donde se deberá considerar también los cultivos establecidos en los alrededores.

Por otra parte, si bien el análisis estadístico indicó que hubo efecto significativo especie, origen de las especies y aislado dentro de cada especie, se observó que los aislados del género *Neofusicoccum*, en particular *N. parvum*, *N. luteum* y *N. occulatum* en su mayoría se comportaron como los más agresivos independientemente de su origen. Estos resultados fueron muy contundentes en manzano, donde los tamaños de las lesiones desarrolladas fueron notoriamente superiores a las causadas por el resto de los aislados, seguido por el olivo y finalmente por la vid, aunque en este último los resultados fueron más erráticos.

Estos datos confirman las afirmaciones de varios autores de que las especies del grupo de *N. parvum-ribis* junto con *N. luteum* son las más agresivas (Urbes-Torres et al, 2009; Perez et al, 2010; Delgado et al, 2016; Tennakoon et al, 2017). Se verificó además que esta mayor agresividad de las cepas de *N. parvum*, *N. luteum* y *N. occulatum* es independiente del origen del aislado confirmándose la hipótesis de que las cepas de estas especies son capaces de mantener su mayor agresividad en sus diferentes hospederos.

En este sentido, Belair et al, (2023) partiendo de la hipótesis de que la habilidad para causar enfermedades depende de la producción de enzimas que degradan la pared celular, metabolitos secundarios y peptidasas, realizaron un análisis comparativo de más de 40 genomas de seis géneros de Botryosphaeriaceae. El objetivo era comprender mejor las características genéticas relacionadas con la patogenicidad y la virulencia. Los resultados indicaron que si bien *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum* y *Lasiodiplodia* presentaron un alto número de genes que codifican enzimas involucradas en la degradación de los componentes de la pared celular vegetal, a nivel de cepa fue una de *N. parvum* quien se destacó entre todos los genomas de Botryosphaeriaceae. En este mismo estudio se encontró que los genomas del género *Diplodia*

presentaban menores cantidades de estos genes, lo que concuerda con nuestros resultados ya que los aislados de este género presentaron una baja agresividad en cualquiera de los tres frutales.

Contrastando con nuestros resultados, en las inoculaciones realizadas por Sessa et al, (2016) en manzano, peral y duraznero, se observó a *D. mutila* como una de las especies más agresivas, con valores similares a las producidos por *N. parvum*. Un similar resultado registró Urbez-Torrez et al, (2013) en investigaciones realizadas con olivos producidos en California. Sin embargo, en nuestro trabajo la cepa hallada de *D. mutila* se comportó con poca agresividad en los tres frutales. De todas formas, cabe destacar que en todos estos estudios se trabajó con una sola cepa, lo que podría estar enmascarando la variabilidad intraespecífica.

Botryosphaeria dothidea, la especie con mayor prevalencia en los tres cultivos es bien conocida por su capacidad endofítica y por ser tratada como un patógeno débil (Slippers & Wingfield 2007). De hecho, Pérez et al, (2010) no registraron infección por esta especie cuando fue inoculada en Mirtaceas. Un resultado similar fue presentado por Sessa et al, (2016) quienes no pudieron probar su patogenicidad cuando inocularon ramas desprendidas de duraznero, manzano y peral de un aislado representante de esta especie. En este trabajo si se verifico su patogenicidad, aunque presentó baja agresividad. Este resultado coincide con lo publicado por Delgado et al, (2016) quienes también verificaron su patogenicidad en ramas y frutos de manzano, pero también con escasa agresividad. Probablemente la capacidad de *B. dothidea* para colonizar los tejidos está muy influenciada por el estado de la planta, manifestándose mayormente ante situaciones de estrés y permaneciendo como endófito mientras esto no ocurre. Por otra parte, es posible que la característica de permanecer usualmente como endófito, sea la que le ha facilitado su distribución a nivel mundial, tanto en ambientes modificados como naturales, pasando indetectable en controles cuarentenarios (Marsberg et al, 2017).

En resumen, en esta investigación se demostró que las cepas de las especies de la familia Botryosphaeriaceae son inespecíficas y que la alta agresividad de algunas de ellas se mantiene independiente del origen del aislado o cultivo inoculado. Esto obliga a prestar especial atención en el diseño de las estrategias de manejo de estos patógenos en las zonas de producción donde conviven diversos huéspedes, como es el caso de la producción de frutales en la región centro-sur del Uruguay.

CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN DE LOS HONGOS DE LA
FAMILIA BOTRYOSPHERACEAE EN TEJIDO LEÑOSO
ASINTOMÁTICO Y POTENCIALES FUNGICIDAS PARA LA
PROTECCIÓN DE HERIDAS DE PODA

CAPÍTULO 3

El desarrollo de canchros es el principal daño que generan los patógenos de la familia Botryosphaeriaceae en todos sus hospederos, incluidos los cultivos frutales. Estos hongos ingresan a la madera a través de heridas, cortes de poda o aberturas naturales provocando lesiones necróticas tanto en el tronco principal como en ramas secundarias (Delgado et al, 2016; Olmo et al, 2016; Sessa et al, 2016). Los canchros debilitan y causan la muerte de ramas y árboles de cualquier edad, aun en plantaciones con excelente desarrollo. En Uruguay, dentro de los principales cultivos frutales afectados por estos patógenos se encuentra el manzano (Delgado et al, 2016; Sessa et al, 2016), la vid (Abreo et al, 2013; Carbone et al, 2022) y el olivo (Conde et al, 2013; Hernández et al, 2022). Particularmente en el cultivo del manzano, Delgado et al, (2016) estimaron una incidencia de hasta 30% de árboles afectados por canchros en plantaciones comerciales de Uruguay.

La principal estrategia para el manejo de los canchros es la preventiva, por lo que minimizar la ocurrencia de heridas es fundamental. Si a pesar de ello el patógeno logra ingresar, lo que se recomienda es eliminar la rama o tronco infectado, lo que también se conoce como poda de rejuvenecimiento o erradicación. Alaniz et al, (2012) recomiendan que esta poda debe realizarse a no menos de diez centímetros por debajo del límite o borde de la lesión necrótica. Esta eliminación de la madera afectada por cancro se implementa rutinariamente en los cultivos frutales en Uruguay, sin embargo, en ocasiones se ha observado que, tiempo después la enfermedad vuelve a manifestarse a partir del corte de poda. Dos razones podrían explicar este fenómeno, el reingreso o reinfección del patógeno a través del corte de poda o la eliminación incompleta de la madera infectada. Para eliminar con certeza el patógeno del tronco o la rama afectada, es necesario conocer cuanto pueden avanzar las hifas de Botryosphaeriaceae en el tejido asintomático desde el borde del síntoma visible. De esta manera se podría estimar con mayor certeza la distancia mínima de poda necesaria para la eliminación completa del patógeno.

Asimismo, y para evitar el ingreso de Botryosphaeriaceae a la madera, las heridas de poda se suelen proteger con fungicidas. Numerosos estudios, tanto in vitro como en condiciones de campo, se han realizado para evaluar la eficacia de diversos fungicidas en el control de estos patógenos en diferentes regiones (Moral et al, 2019a). Particularmente, el género *Neofusicoccum* (Bester et al, 2007; Amponsah et al, 2012; Pitt et al, 2012; Latorre et al, 2013; Olmo et al, 2017; Tennakoon et al, 2018), junto con *Diplodia* (Amponsah et al, 2012; Pitt et al,

2012; Olmo et al, 2017; Sosa et al, 2022; Antony et al, 2024) y *Botryosphaeria* (Denman et al, 2004; Pitt et al, 2012; Song et al, 2018) ha sido los más evaluado en los ensayos de eficacia de fungicidas. En Uruguay no existen antecedentes de evaluación de la efectividad de fungicidas en el control de cepas locales de Botryosphaeriaceae.

Fungicidas penetrantes pertenecientes al grupo de los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBEs) han mostrado un comportamiento satisfactorio en el control de estos patógenos, tanto in vitro como en ensayos de campo (Bester et al, 2007; Pitt et al, 2012; Latorre et al, 2013; Twizeyimana et al, 2013; Olmo et al, 2017; Tennakoon et al, 2018; Antony et al, 2024). De forma similar, fungicidas del grupo de los benzimidazoles también han mostrado buen comportamiento, tanto en ensayos de laboratorio, como cuando se han aplicado sobre heridas de poda (Li et al, 1995; Pitt et al, 2012; Twizeyimana et al, 2013; Olmo et al, 2017; Tennakoon et al, 2018; Sosa et al, 2022). Con relación al grupo químico de las estrobilurinas, diferentes principios activos han mostrado resultados variables, en algunos casos fueron poco satisfactorios (Latorre et al, 2013), mientras que en otros lograron un control aceptable (Rolshausen et al, 2010; Pitt et al, 2012; Twizeyimana et al, 2013; Olmo et al, 2017). Respecto a los productos de contacto, dentro del grupo de los ditiocarbamatos, el mancozeb ha sido uno de los fungicidas más evaluados con un aceptable comportamiento in vitro (Amponsah et al, 2012; Tennakoon et al, 2018) e in vivo protegiendo las heridas (Olmo et al, 2017).

Con base en estos antecedentes, y con el fin de generar información local para desarrollar estrategias de manejo eficientes y racionales en el control de los canchros causados por Botryosphaeriaceae en cultivos frutales, en este capítulo nos planteamos dos objetivos, i) estudiar la capacidad de avance en tejido asintomático de las hifas de las principales especies de Botryosphaeriaceae patógenas de manzano, olivo y vid en ramas desprendidas de estos mismos frutales; ii) evaluar la sensibilidad in vitro de cepas locales de las principales especies de Botryosphaeriaceae patógenas de manzano olivo y vid a fungicidas de diferentes grupos químicos.

Material fúngico utilizado

Para determinar la capacidad de colonización asintomática del tejido leñoso por parte de las hifas de especies pertenecientes a Botryosphaeriaceae, así como, para conocer su sensibilidad a diferentes fungicidas, se seleccionaron y utilizaron hasta tres aislados de las especies más frecuentes afectando los cultivos de manzano, olivo y vid en Uruguay (Abreo et al, 2013; Delgado et al, 2016; Sessa et al, 2016; 2018, Carbone et al, 2022; Hernández et al, 2022). Se procuró priorizar aquellas cepas que se comportaron como las más agresivas en los ensayos de inoculación previos (capítulo 1 y 2 de esta tesis, Delgado et al, 2016). La selección incluyó 12 cepas correspondientes a siete especies de los géneros *Botryosphaeria*, *Diplodia* y *Neofusicoccum* (Tabla 1). Los aislados seleccionados se sembraron en medio de cultivo PDA y se incubaron durante 7 días a 24°C en oscuridad.

Tabla 1. Aislados de Botryosphaeriaceae originarios de manzano, olivo y vid seleccionados para estimar la capacidad de avance de las hifas de estos patógenos en tejido leñoso asintomático y su sensibilidad a fungicidas

Especie	Aislados
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	M14, V22
<i>B. wangensis</i>	O7
<i>Diplodia seriata</i>	M157, O14*, V1*
<i>Neofusicoccum crytoaustrale</i>	O21
<i>N. luteum</i>	M129, O10
<i>N. occulatum</i>	O12
<i>N. parvum</i>	M168, V35

Las cepas O14* y V1* no fueron incluidas en los ensayos de evaluación de fungicidas

Estimación de la colonización por Botryosphaereaceae del tejido leñoso asintomático

Se colectaron ramas lignificadas y aparentemente sanas, de aproximadamente 50 cm de largo por 1 cm de diámetro, de plantaciones comerciales de manzano, olivo y vid, pertenecientes a las variedades Red Delicious, Arbequina y Marselan, respectivamente, ubicadas en Canelones y Montevideo. Inmediatamente de colectadas, las ramas fueron trasladadas al laboratorio y acondicionadas en frascos de vidrio de 200 ml conteniendo arena estéril humedecida hasta un tercio de su capacidad.

Posteriormente, cada rama fue inoculada en la zona media del entrenudo superior siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 2 de esta tesis. De cada especie frutal se inocularon cinco ramas (repeticiones) por aislado, mientras que otras cinco ramas (testigos) fueron inoculadas con discos de PDA estéril. Las ramas inoculadas se mantuvieron a 24°C con fotoperíodo de 12 horas y se monitorearon semanalmente hasta verificar la presencia de necrosis del tejido vegetal a partir de la zona inoculada (evidencia de desarrollo de cancro).

Una vez que se confirmó la presencia del cancro en todas las ramas inoculadas (entre cuatro y cinco semanas posteriores a la inoculación) y con el fin de verificar la presencia del patógeno inoculado, se retiró la corteza y se realizaron aislamientos desde el límite inferior de la lesión necrótica y a los 10, 20 y 30 cm de distancia. Para ello, se cortaron cinco discos de 1-2 mm de grosor (cortes transversales) en cada una de las cuatro distancias establecidos y se sembraron en medio de cultivo PDA. Al cabo de 7-10 días de incubación a 25°C en oscuridad, se registró el crecimiento de colonias de Botryophaeiaceae a partir de cada uno de los discos sembrados. Finalmente, se registró la proporción de ramas con re-aislamientos positivos del total de ramas inoculadas para cada combinación frutal-aislado, en cada uno de los cuatro puntos establecidos (se consideró infectado cuando al menos uno de los cinco discos sembrados de cada punto, dio lugar al crecimiento de una colonia de Botryosphaereaceae).

Evaluación de fungicidas in vitro

Para estudiar la sensibilidad de las cepas de Botryophaeiaceae a diferentes fungicidas, se seleccionaron ocho principios activos pertenecientes cinco grupos químicos, tres penetrantes: inhibidores de la biosíntesis del ergosterol, benzimidazoles y estrobilurinas, dos de contacto: ditiocarbamatos y ftalimidas (Tabla 2). La selección de estos fungicidas se realizó en base a los antecedentes de buen comportamiento encontrados en la bibliografía, además de incluir otros que se usan rutinariamente en la fruticultura para el control de otros patógenos. La evaluación se realizó mediante la determinación de las concentraciones efectivas 50 (CE₅₀) de cada fungicida, en la inhibición del crecimiento micelial.

Concentraciones crecientes de cada fungicida se adicionaron a medio de cultivo PDA hasta alcanzar concentraciones finales de 0; 0,1; 1; 10 y 100 ppm de principio activo. Posteriormente, en el centro de cada placa se sembró un disco de micelio de 5mm de diámetro de las cepas seleccionadas, completando un total de tres repeticiones para cada combinación de aislado, fungicida y concentración.

Al cabo de 3 días de incubación a 25°C en oscuridad, se midieron dos diámetros perpendiculares a cada colonia utilizando un calibre digital (Kamasa®, USA). Con estos datos se calculó la tasa de crecimiento diario para cada aislado, principio activo y concentración en mm día⁻¹. Posteriormente, se estimó el porcentaje de crecimiento diario respecto al control utilizando la siguiente formula: $100(x/y)$, donde x = valor medio de la tasa de crecimiento diaria de las tres repeticiones por cada aislado, principio activo y concentración, e y = valor medio de la tasa de crecimiento diaria de las tres colonias control (sin fungicida).

Seguidamente, a cada dato de porcentaje de crecimiento diario de cada combinación aislado, principio activo y concentración, se aplicó la transformación Probit, mientras que a las concentraciones de los principios activos utilizadas se les aplicó la transformación logaritmo decimal. Con estos datos se construyeron rectas de regresión lineal para cada fungicida y se estimó concentración de cada principio activo que inhibe el 50% del crecimiento micelial (valor CE₅₀).

Tabla 2. Características de los fungicidas seleccionados para evaluar su efecto in vitro en la inhibición del crecimiento micelial de 12 cepas de Botryosphaeriaceae aisladas de manzano, olivo y vid

Grupo químico	Principio activo	Nombre comercial	Fabricante	Formulación
IBE	Difenoconazol	Escozate	Tafirel	250 g L ⁻¹
	Tebuconazol	Calypso 430	Saudu	430g L ⁻¹
Benzimidazol	Metiltiofanato	Ziltop M70	Tomai	70%
Estrobilurina	Azoxistrobin	Quadris	Syngenta	250 g L ⁻¹
	Pyraclostrobin	Tapyr	Proquimur	250 g L ⁻¹
Ditiocarbamato	Mancozeb	Mancozate	Tafirel	80%
	Ziram	Ziram	Tafirel	80%
Ftalamida	Captan	Captan 80	Agroregional	80%

IBE: inhibidor de la biosíntesis del ergosterol

RESULTADOS

Estimación de la colonización por Botryosphaereaceae del tejido leñoso asintomático

En todas las ramas desprendidas de manzano, olivo y vid inoculadas con las cepas de Botryosphaeriaceae, se observó la típica lesión necrótica que se extendió hacia arriba y hacia

abajo desde la zona de inoculación. Asimismo, en todas las ramas inoculadas, se re-aislaron consistentemente cepas de Botryosphaeriaceae desde la zona de avance de la lesión necrótica. Estos aislados presentaron las mismas características morfológicas que la correspondiente cepa inoculada (Tabla 3).

Respecto a los re-aislamientos efectuados a 10 cm de distancia del borde visible de avance del cancro, se registraon algunos crecimientos como fue el caso de la cepa V35 de la especie *N. parvum* quien fue recuperada en una proporción de 1/5 en las ramas de manzano y de vid, y de 3/5 en ramas de olivo. También la cepa M157 de *D. seriata*, quien se re-aisló de ramas de olivo en una proporción de 1/5. Con relación a los re-aislamientos efectuados a los 20 y 30 cm de distancia del borde de la lesión, ninguna cepa pudo ser recuperada. Finalmente, a partir de las ramas utilizadas como testigos, no se registró crecimiento de colonias de Botryosphaeriaceae a partir los discos sembrados del borde de la cicatrización de la herida generada ni de las tres distancias establecidas (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia de re-aislamiento de cepas de Botryosphaeriaceae a partir de tejido vegetal ubicado en el límite de la lesión y a 10, 20 y 30 cm de distancia, en ramas desprendidas de manzano, olivo y vid inoculadas con doce cepas de siete especies de Botryosphaeriaceae.

Especie	Cepa	Manzano				Olivo				Vid			
		0 cm	10m	20m	30cm	0cm	10cm	20cm	30cm	0cm	10cm	20cm	30cm
<i>B. dothidea</i>	M14	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	V22	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
<i>B. wangensis</i>	O7	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
<i>D. seriata</i>	M157	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	1/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	O14	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	V1	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
<i>N. cryptoaust.</i>	O21	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
<i>N. luteum</i>	M129	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	O10	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
<i>N. occulatum</i>	O12	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
<i>N. parvum</i>	M168	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	V35	5/5	1/5	0/5	0/5	5/5	3/5	0/5	0/5	5/5	1/5	0/5	0/5
	Test.	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Evaluación de fungicidas in vitro

La evaluación de la inhibición del crecimiento micelial reveló diferencias en la sensibilidad de las cepas de las especies de la familia Botryosphaeriaceae evaluados, a los ocho principios activos (Tabla 4).

Dentro de los fungicidas penetrantes, los pertenecientes al grupo de los IBEs presentaron alta eficacia inhibiendo el crecimiento micelial de todos los aislados. En el caso de difenoconazol, los valores de CE_{50} variaron de $<0,1$ a $0,3 \text{ mgL}^{-1}$ de principio activo, mientras que para tebuconazol de $<0,1$ a $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ de principio activo. Respecto a metiltiofanato, fungicida perteneciente al grupo de los benzimidazoles, los valores de CE_{50} variaron entre 5 y 12 mgL^{-1} de principio activo.

Con relación a los fungicidas pertenecientes al grupo de las estrobilurinas, los principios activos evaluados presentaron alta variabilidad. En el caso de pyraclostrobin las CE_{50} variaron de $<0,1$ a $7,0 \text{ mgL}^{-1}$ de principio activo. Por otra parte, en el caso de azoxystrobin las CE_{50} variaron entre 0,5 y $4,1 \text{ mgL}^{-1}$ de principio activo sin considerar la cepa M168 de *N. parvum* quien se destacó por presentar un valor de $CE_{50} >100 \text{ mgL}^{-1}$, es decir por encima de la máxima concentración de azoxystrobin evaluada. A su vez y en ambos principios activos, las dos cepas de *N. luteum* (M129 y O10) y la cepa V35 de *N. parvum* fueron las que arrojaron los valores de CE_{50} más altos dentro del rango.

Dentro de los fungicidas de contacto, mancozeb fue el que logro la mayor inhibición del crecimiento micelial con valores de CE_{50} en un rango de 12 a 75 mgL^{-1} de principio activo, con excepción de las dos cepas de *N. luteum* (M129 y O10), cuyos valores de CE_{50} se ubicaron por encima de la máxima concentración evaluada ($>100 \text{ mg/L}$). Finalmente, los fungicidas ziram y captan, mostraron muy baja eficacia ya que, excepto la cepa M168 de *M. parvum* a captan, todos los aislados mostraron sensibilidad reducida con $CE_{50} >100 \text{ mgL}^{-1}$.

Tabla 4. Sensibilidad in vitro de 10 cepas pertenecientes a siete especies de Botryosphaeriaceae aisladas de manzano, olivo y vid a ocho fungicidas pertenecientes a cinco grupos químicos

Especie	Cepa	CE ₅₀ (mgL ⁻¹)							
		Benzimid.	IBEs		Estrobilurinas		Ditiocarbamatos		Ftalamida
		Metiltiof.	Difecon.	Tebucon.	Azoxyst.	Pyraclost.	Mancozeb	Ziram	Captan
<i>B. dothidea</i>	M14	9	<0,1	0,4	0,7	0,2	39	>100	>100
	V22	8	<0,1	<0,1	0,9	0,1	22	>100	>100
<i>B. wangensis</i>	O7	8	<0,1	0,17	0,9	0,4	28	>100	>100
<i>D. seriata</i>	M157	4	0,3	0,2	0,8	0,9	26	>100	>100
<i>N. cryptoaust.</i>	O21	3	<0,1	<0,1	0,5	<0,1	12	>100	39
<i>N. luteum</i>	M129	12	<0,1	<0,1	4,1	4,7	>100	>100	>100
	O10	12	<0,1	<0,1	4,1	3,6	>100	>100	>100
<i>N. occulatum</i>	O12	5	<0,1	<0,1	1,0	0,1	75	>100	>100
<i>N. parvum</i>	M168	6	<0,1	<0,1	>100	0,2	24	>100	34
	V35	5	<0,1	<0,1	3,3	7,0	43	>100	>100

DISCUSIÓN

Una vez que los patógenos de la familia Botryosphaeriaceae ingresan al tejido leñoso, el desarrollo del cancro es inminente. Dependiendo de la ubicación del cancro, las consecuencias son la muerte de ramas o de la planta entera, incluso dentro del mismo ciclo productivo (Moral et al, 2010; Úrbez-Torres et al, 2013; Delgado et al, 2016). Es por esta razón que, tan pronto se visualizan síntomas de cancro, se debe eliminar rápidamente la rama afectada para erradicar al patógeno evitando así que continúe colonizando tejido sano. De lo contrario, se vería muy comprometida la estructura de la planta, su productividad y longevidad.

La hasta ahora vigente recomendación en Uruguay, es la de eliminar madera enferma podando la rama afectada 10 cm por debajo de la zona de avance de la lesión necrótica (Alaniz et al, 2012). Sin embargo, no existe total certeza de que ese margen de seguridad sea suficiente debido a que la poda de erradicación debe asegurar la eliminación completa del patógeno. Un importante resultado de este trabajo es la comprobación de que el margen actualmente utilizado no siempre asegura la eliminación completa del patógeno. De las 12 cepas de Botryosphaeriaceae inoculadas en ramas desprendidas de manzano, olivo y vid, dos (16%) fueron recuperadas a los 10 cm del borde de la lesión necrótica en al menos uno de los tres frutales. Este hecho confirma que, en ocasiones, la colonización de los tejidos por las hifas de Botryosphaeriaceae avanza a una distancia igual o mayor de 10 cm del borde del síntoma

visible. Asimismo, este resultado confirma la hipótesis de que la reactivación de la enfermedad a partir del corte de poda de erradicación que se observa en las plantaciones comerciales (Alaniz et al, 2012), podría deberse a que no se ha logrado la eliminación completa del patógeno.

Por otra parte, no es sorprendente que la cepa recuperada a los 10 cm del borde de la lesión y a partir de los tres frutales correspondiese a la especie *N. parvum*, considerada una de las más agresivas dentro de esta familia (Úrbez-Torrez et al, 2011; Delgado et al, 2016; Olmo et al, 2016, Capítulo 2 de esta Tesis). Es posible que las hifas de esta especie posean la capacidad de colonizar el tejido asintomático a una mayor velocidad en comparación con las hifas de otras especies de esta familia. Asimismo, el hecho de no haber recuperado cepas a 20 y 30 cm del borde de la lesión garantiza que extender la recomendación de eliminar la madera aparentemente sana hasta 20 cm del borde de la lesión necrótica, sería eficiente para eliminar completamente a estos patógenos.

Dado que tanto las podas de conducción de rutina como las podas de erradicación de los canchales generan numerosas heridas que son potenciales vías de entrada para los miembros de Botryosphaeriaceae, proteger dichas heridas es crucial para el manejo de estos patógenos. Es así como, una de las medidas más evaluada a nivel experimental ha sido cubrir los cortes de poda con fungicidas (Bester et al, 2007; Pitt et al, 2012; Twizeyimana et al, 2013; Song et al, 2018; Moral et al, 2019a; Sosa et al, 2022; Antony et al, 2024). A nivel nacional éste representa el primer trabajo donde se evalúa la eficiencia de fungicidas químicos para inhibir el desarrollo de cepas locales de esta familia. Los resultados revelaron que seis de los ocho fungicidas testados in vitro, mostraron un buen potencial para el control de cepas de las especies de Botryosphaeriaceae más frecuentes en la fruticultura nacional.

Los fungicidas difenoconazol y tebuconazol, del grupo de los IBEs, lograron inhibir satisfactoriamente el crecimiento micelial de todas las cepas evaluadas con valores de CE_{50} de $<0,1$ a $0,4 \text{ mgL}^{-1}$. De estos dos principios activos, el tebuconazol ha sido el más estudiado por otros investigadores con resultados similares a los nuestros. Por ejemplo, Bester et al, (2007) y Pitt et al, (2012) obtuvieron valores de CE_{50} de $0,07$ a $0,14 \text{ mgL}^{-1}$ y de $0,02$ a $0,16 \text{ mgL}^{-1}$, respectivamente, en la inhibición del crecimiento micelial de cepas de *B. dothidea*, *N. parvum*, *N. australe* y *D. seriata* aisladas de vid en Sudáfrica y Australia, respectivamente. Twizeyimana et al, (2013) registraron valores de CE_{50} de $0,09$ a $0,028 \text{ mgL}^{-1}$ para cepas de tres especies de *Neofusicoccum* obtenidas de palta en California. Olmo et al, (2017) indican valores de CE_{50} de $0,09$ a $0,25 \text{ mgL}^{-1}$ en cepas de *N. parvum*, *N. luteum* y *D. seriata* provenientes de almendro en

España. Latorre et al, (2013) y Tennakoon et al, (2018) publicaron valores de CE_{50} de 0,26 a 0,33 mgL^{-1} y de 0,01 a 0,13 mgL^{-1} , respectivamente, en cepas de tres especies de *Neofusicoccum* aisladas de arándano en Chile y Nueva Zelanda, respectivamente. Antony et al, (2024) indicaron que las CE_{50} de este fungicida se ubicaron de 0,004 a 0,028 mgL^{-1} cuando lo evaluaron frente a cepas de *D. seriata* y *N. parvum* aisladas de nogal. Respecto al difenoconazol, Liu y colaboradores (2013) lo evaluaron frente a cepas de *B. dothidea* obtenidas de manzano en China y registraron valores promedio de CE_{50} de 0,2 mgL^{-1} en la inhibición del crecimiento micelial de este hongo.

Por otra parte, debido a que los IBEs son fungicidas de sitio de acción específico, existen altos riesgos de que las poblaciones de patógenos se vuelvan resistentes ante un uso reiterado de estos principios activos (Brent et al, 1995; Dos Santos 2019). De hecho, hace unos pocos años Fan y colaboradores (2016) presentaron indicios claros de la pérdida de sensibilidad de las poblaciones de *B. dothidea* colectadas de manzanos en China frente a tebuconazol. Estos investigadores obtuvieron valores de CE_{50} en los rangos de 0,011 a 0,918, 0,040 a 1,621 y 0,052 a 1,925 mgL^{-1} cuando este fungicida fue evaluado frente a cepas de *B. dothidea* colectadas en los años 2006, 2010 y 2014, respectivamente. A pesar de ello, la aplicación de tebuconazole continuó siendo la primera opción de los productores en China para el control de los canchros en manzano causados por *B. dothidea* (Fan et al, 2016).

Respecto al metiltiofanato, del grupo de los benzimidazoles, este fungicida no cumplió nuestras expectativas. Los valores de CE_{50} de este fungicida (3 y 12 mgL^{-1}) se ubicaron al menos dos a tres veces por encima de los publicado por otros investigadores. Por ejemplo, Amponsah et al, (2012) obtuvieron valores de CE_{50} de 0,5 a 1,2 mgL^{-1} frente a cepas de *N. australe*, *N. luteum* y *D. mutila* provenientes de vides de Nueva Zelanda. Twizeyimana et al, (2013) registraron valores de CE_{50} de 0,8 a 2,1 mgL^{-1} en cepas de *Dothiorella iberica*, *N. australe*, *N. luteum* y *N. parvum* aisladas de palta en California. Mientras que Olmo et al, (2017) registraron valores de CE_{50} de 0,7 a 0,8 mgL^{-1} frente a cepas de *N. parvum*, *N. mediterraneum* y *D. seriata* de almendro en España; aunque en este mismo trabajo, la CE_{50} de este fungicida frente a una cepa de *N. luteum* fue de 8,3 mgL^{-1} . Dado que los benzimidazoles también son conocidos por tener alto riesgo de que las poblaciones de patógenos se vuelvan resistentes ante su uso retirado por ser uni-sitio de acción (Santos et al, 2019), es posible que esta cepa haya generado resistencia frente a este fungicida. Para confirmar esta hipótesis, deberíamos conocer la sensibilidad de base a este fungicida, así como la historia de uso del metiltiofanato en la parcela donde fue aislada.

Con relación a las estrobilurinas, se encontraron indicios claros de aislados con sensibilidad reducida o pérdida de sensibilidad a ambos principios activos evaluados. En el caso de azoxystrobin, la CE_{50} de los aislados se ubicó entre 0,5 a 4,1 mgL^{-1} con un aislado (M168 de *N. parvum*) que incluso superó los 100 mgL^{-1} de principio activo. Este resultado tampoco fue sorprendente dado que estos fungicidas también tienen alto riesgo de que las poblaciones de patógenos se vuelvan resistentes ante su uso reiterado (Sierotzki et al, 2000; Vincelli 2002; FRAC) y posiblemente, esta debe ser la explicación dado que azoxystrobin ha sido muy utilizado en la fruticultura nacional. En el caso de pyraclostrobin quien tiene una menor historia de uso debido a su aparición más reciente en el mercado, también se detectaron aislados con sensibilidad reducida o pérdida de sensibilidad (CE_{50} de <0,1 a 4,7 mg/L^{-1}). De hecho, los resultados de eficiencia de las estrobilurinas en la inhibición del crecimiento micelial de cepas de Botryosphaeriaceae en nuestro estudio, supera lo encontrado por Pitt et al, (2012), quienes presentaron valores de CE_{50} entre 0,4 y 1,1 mgL^{-1} cuando evaluaron pyraclostrobin frente a cepas de *B. dothidea*, *N. parvum* y *N. australe* obtenidas de vid en Australia. Los resultados de CE_{50} obtenidos por Twizeyimana et al, (2013) con este mismo principio activo fueron de 0,006 a 0,008 mg/L frente a cepas de *N. australe*, *N. luteum* y *N. parvum* aisladas de palta en California. Otro ejemplo es lo publicado por Olmo et al, (2017), quienes obtuvieron valores de CE_{50} en un rango de 0,05 a 0,99 mg/L^{-1} en cepas de *D. seriata*, *N. luteum*, *N. parvum* de almendro en España.

Con relación a los productos de contacto, mancozeb del grupo de los ditiocarbamatos, manifestó un comportamiento medianamente aceptable en nuestro trabajo con valores de CE_{50} entre 12 y 75 mgL^{-1} frente a la mayoría de las cepas evaluadas. De hecho, los resultados obtenidos por Amponsah et al, (2012) fueron más alentadores quienes obtuvieron valores de CE_{50} de 2,7 a 5,6 mgL^{-1} con cepas de *N. australe*, *N. luteum* y *D. mutila* aisladas de vides en Nueva Zelanda. A su vez, Tennakoon et al, (2018) evaluaron cepas de cuatro especies de *Neofusicoccum* obtenidas de arándano de ese mismo país, y obtuvieron un valor de CE_{50} promedio de 14,5 mg/L . Por otra parte, las CE_{50} de mancozeb registrado en nuestras dos cepas de *N. luteum* (M129 y O10), estuvieron por encima de la máxima dosis evaluada (>100 mgL^{-1}) mostrando insensibilidad a este fungicida. Sin embargo, Amponsah et al, (2012) en Nueva Zelandia evaluaron la sensibilidad a mancozeb de una cepa local de *N. luteum* y obtuvieron una CE_{50} de 5,7 mgL^{-1} . Esta diferencia en los resultados enfatiza la importancia de evaluar la sensibilidad a fungicidas en cada región frente a las cepas locales para esclarecer con certeza la capacidad inhibitoria de los fungicidas.

Finalmente, respecto al otro ditiocarbamato, ziram, y la ftalimida, captan, nuestros aislados se mostraron poco sensibles a estos fungicidas con valores de CE_{50} por encima de 100 mgL^{-1} en la mayoría de las cepas. Estos resultados estarían descartando el uso de estos dos fungicidas para proteger los cortes de poda como forma de manejo de los canchros por Botryosphaeriaceae. En el caso de captan, nuestro resultado difiere de lo obtenido por Cheng Shijie et al, (2017) quienes indicaron valores de CE_{50} de 1,7 a $38,5 \text{ mgL}^{-1}$ de este fungicida frente a cepas de *B. dothidea* de China. Sin embargo, en mayor coincidencia con nuestros resultados, Smith (2009) evaluó estos dos fungicidas en ensayos de campo protegiendo heridas en el cultivo de arándano y no obtuvo resultados satisfactorios con ninguno de los dos principios activos.

En resumen y tomando como base los resultados obtenidos en este trabajo, la poda de erradicación debería realizarse a los 20 cm del borde de avance de la lesión necrótica en la madera, para asegurar la eliminación completa del patógeno que está ocasionando el cancro. Posteriormente la herida generada en este corte de poda debería protegerse con fungicidas para evitar que sea colonizada por estos patógenos. Nuestros resultados muestran que debe evitarse el uso de ziram y captan por haberse mostrado poco efectivos. El resto de los principios activos, deberán ser evaluados en condiciones locales de campo para conocer con certeza su efectividad para proteger las heridas de poda de infecciones por Botryosphaeriaceae, antes de ser recomendados. Varios de ellos ya han dado evidencias claras de buen comportamiento aplicados en heridas de poda. Ejemplo de ello son los IBEs (Pitt et al, 2012; Latorre et al, 2013; Tennakoon et al, 2018; Antony et al, 2024), las estrobilurinas (Moral et al, 2019a; Antony et al, 2024) y el mancozeb (Olmo et al, 2017). Esto permitirá generar recomendaciones locales sobre que fungicidas utilizar contribuyendo así a la prevención de infecciones ocasionadas por estos patógenos.

Por último, dadas las restricciones y prohibiciones que están tendiendo los fungicidas para su utilización en la agricultura, es primordial incluir en los estudios futuros la evaluación de productos más amigables, como lo son los controladores biológicos u otros productos de origen natural (MGAP-DIGEGRA, 2014; Moral et al, 2019a; Torres et al, 2022). La incorporación de este tipo de productos en una estrategia de manejo de los hongos de la familia Botryosphaeriaceae en los cultivos frutales, aportará sustancialmente a la sostenibilidad ambiental, así como, al cuidado de los trabajadores y consumidores.

Esta tesis de Doctorado tuvo como primer objetivo, identificar y caracterizar las especies de la familia Botryosphaeriaceae asociadas al cultivo del olivo, debido a la falta de antecedentes de investigación nacional en este frutal. Los resultados mostraron que existen al menos ocho especies distribuidas en tres géneros causando canchros en ramas y podredumbre en frutos en el olivo. Ellas son, *B. wangensis*, *B. dothidea*, *N. cryptoaustrale*, *N. luteum*, *N. occulatum*, *N. australe*, *D. seriata* y *D. mutila*. A su vez, varias de ellas como por ejemplo *B. dothidea*, *D. seriata*, *N. luteum*, *N. parvum* ya habían sido encontradas afectando a los cultivos de manzano y/o vid. Este hallazgo confirma la hipótesis uno de esta tesis que, al igual que en los otros frutales, existen especies poco específicas afectando el cultivo del olivo. Además, *B. wangensis*, *N. cryptoaustrale*, *N. occulatum* y *D. mutila* representan nuevos hallazgos para olivo a nivel mundial. Se confirmó además que, si bien cepas de las ocho especies asociadas a olivo fueron capaces de causar canchros en ramas de olivo inoculadas artificialmente, aquellas pertenecientes al género *Neofusicoccum* fueron significativamente más agresivas.

En segundo lugar, se procuró demostrar con evidencias la capacidad de las especies de Botryosphaeriaceae de infectar indistintamente diversos frutales. En todos los casos e independientemente del origen de la cepa y del frutal inoculado, ocurrió infección y se desarrollaron lesiones necróticas en las ramas inoculadas de manzano, olivo y vid. Además, se observó que los aislados del género *Neofusicoccum*, en particular *N. parvum*, *N. luteum* y *N. occulatum* se comportaron, como los más agresivos independientemente de su origen. Este resultado permitió comprobar la segunda hipótesis de esta tesis, de que las especies de Botryosphaeriaceae tienen baja especificidad por su huésped y que las cepas que suelen comportarse de forma más agresiva mantienen este comportamiento en todos los huéspedes. Esta confirmación obliga a prestar especial atención en el diseño de las estrategias de manejo de estos patógenos en las zonas de producción donde conviven diversos huéspedes, como es el caso de la producción de frutales en la región centro-sur del Uruguay. Es decir, las estrategias de manejo deben ser transversales para todos los frutales producidos en una misma región.

El tercer objetivo de este trabajo fue el de determinar la capacidad de avance de las hifas de Botryosphaeriaceae en tejido asintomático a partir del borde de avance de los canchros. Este objetivo permitió aportar información útil para el manejo de esta enfermedad, estableciéndose la distancia mínima de poda de las ramas y troncos afectados a partir de zona de avance de la enfermedad, para asegurar la eliminación completa del patógeno. En todas las

ramas inoculadas se re-aislaron consistentemente las cepas inoculadas desde el borde de la lesión, mientras que a 10 cm de distancia dos cepas fueron recuperadas en al menos uno de los tres frutales. Este resultado dejó en evidencia que la actual recomendación de eliminar la rama afectada haciendo el corte con un margen de seguridad de 10 cm por debajo del borde de la lesión, no siempre es efectiva. Por otra parte, en ningún caso las cepas inoculadas se recuperaron a los 20 y 30 cm de distancia del borde de la lesión. Estos resultados comprueban la hipótesis tres de que los hongos de la familia Botryosphaeriaceae son capaces de ir colonizando el tejido sano en forma asintomática por delante del borde de la lesión o cancro. Además, quedó demostrado que esta distancia puede, eventualmente, superar los 10 cm de distancia.

El último objetivo consistió en la evaluación de la sensibilidad de cepas de las especies predominantes, a fungicidas de diferentes grupos químicos mediante inhibición de crecimiento micelial. Se pretendió determinar aquellos que potencialmente podrían ser utilizados para proteger las heridas de poda. Esta evaluación es especialmente relevante dado que está demostrado que las heridas de podas son una de las vías de mayor ingreso de estos patógenos a los cultivos frutales. Concretamente se encontró que los fungicidas pertenecientes al grupo de los IBEs, tebuconazole y difenoconazol, inhibieron significativamente el crecimiento micelial de las 10 cepas. Las estrobilurinas, azoxystrobin y pyraclostrobin, también se mostraron eficaces, aunque se evidenciaron indicios de aparición de resistencia en algunas de las cepas. En cuanto al fungicida metiltiofanato (benzimidazol) presentó un comportamiento intermedio y similar al del mancozeb (ditiocarbamato). Finalmente, tanto ziram (ditiocarbamato) como captan (ftalamida) fueron ineficientes inhibiendo el crecimiento micelial. Con estos resultados se comprueba la hipótesis cuatro de esta tesis que indica que existen fungicidas capaces de inhibir el desarrollo de las especies de Botryosphaereaceae que afectan los frutales en nuestro país. Sin embargo y antes de ser recomendados para su uso en la producción comercial, estos fungicidas deberán ser evaluados en condiciones de campo aplicados sobre cortes de poda para verificar su capacidad para proteger las heridas del ingreso de estos patógenos.

Abreo E, Martínez S, Bettucci L & Lupo S. 2013. Characterization of Botryosphaeriaceae species associated with grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology*, 42: 241-249. <https://doi.org/10.1007/s13313-013-0200-8>

Adamson K, Klavina D, Drenkhan R, Gaitnieks T & Hanso M. 2015. *Diplodia sapinea* is colonizing the native Scots pine (*Pinus sylvestris*) in the northern Baltics. *European Journal of Plant Pathology*, 143: 343-350. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0686-8>.

Adesemoye AO, Mayorquin JS, Wang DH, Twizeyimana M, Lync SC & Eskalen A. 2014. Identification of species of Botryosphaeriaceae causing bot gummosis in citrus in California. *Plant Diseases*, 98: 55-61. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0492-RE>

Alaniz S, Delgado L, Leoni C & Mondino P. 2012. Situación actual de los canchros de manzano: distribución, descripción de síntomas agentes causales, pautas de manejo. Seminario de actualización técnica en frutales de pepita. Serie de Actividades de Difusión de INIA, 687: 29-34 ISSN: 1688-9258

Alaniz S, Delgado L, Hernández L, Leoni C & Mondino P. 2016. Determinación de los agentes causales de la podredumbre amarga y podredumbres por Botryosphaeriaceae en Uruguay. Serie Actividades de Difusión de INIA, 739: 37-41. ISSN:1688-9258

Alves A, Barradas C, Phillips AJL & Correia A. 2013. Diversity of Botryosphaeriaceae species associated with conifers in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, 135: 791-804. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0122-2>

Amponsah NT, Jones EE, Ridgway HJ & Jaspers MV. 2012. Evaluation of fungicides for the management of Botryosphaeria dieback diseases of grapevines. *Pest Management Science*, 68: 676-683. <https://doi.org/10.1002/ps.2309>.

Antony S, Steel CC, Stodart B, Billones-Baaijens R & Savocchia S. 2024. Evaluation of fungicides for management of Botryosphaeriaceae associated with dieback in Australian walnut orchards. *Phytopathologia Mediterranea*, 63(1): 119-134. <https://doi.org/10.36253/phyto-14957>

Barradas C, Pinto G, Correia B, Castro BB, Phillips, AJL & Alves A. 2018. Drought disease interaction in *Eucalyptus globulus* under *Neofusicoccum eucalyptorum* infection. *Plant Pathology*, 67(1): 87-96. <https://doi.org/10.1111/ppa.12703>

Batista E, Lopes A & Alves A. 2021. What do we know about Botryosphaeriaceae? An overview of a worldwide cured dataset. *Forest*, 12(3): 313-330. <https://doi.org/10.3390/f12030313>

Belair M, Restrepo-Leal JD, Praz C, Fontaine F, Rémond C, Fernandez O & Besaury L. 2023. Botryosphaeriaceae gene machinery: Correlation between diversity and virulence. *Fungal Biology*, 127(5): 1010-1031. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.03.004>

Berraf-Tebbal A, Guereiro MA & Phillips AJL. 2014. Phylogeny of *Neofusicoccum* species associated with grapevine trunk diseases in Algeria, with description of *Neofusicoccum algeriense* sp. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(3): 416-427 [https://doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-14385](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14385)

Bester W, Crous PW & Fourie PH. 2007. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wounds protectants against Botryosphaeria species. *Australasian Plant Pathology*, 36: 73-77. <https://doi.org/10.1071/AP06086>

Brent KJ & Hollomon DW. 1995. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-1.pdf> (consultado 31 de julio, 2024).

Burgess TI, Tan YP, Garnas J, Edwards J, Scarlett KA, Lucas A, Shuttleworth LA, Daniel R, Dann EK, Parkinson LE, Dinh Q, Shivas RG & Jami F. 2018. Current status of the Botryosphaeriaceae in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 48: 35-44. <https://doi.org/10.1007/s13313-018-0577-5>

Cabrera D & Rodríguez P. 2006. Evaluación de distancias de plantación, sistemas de conducción y portainjertos en manzana Pink Lady TM Cripps Pink. INIA. Serie actividades de difusión N° 460. 10p. <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807114729.pdf>

Carbone I & Kohn LM. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553-6. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>

Carbone MJ, Gelabert M, Moreira V, Mondino P & Alaniz S. 2022. Grapevine nursery propagation material as source of fungal trunk disease pathogens in Uruguay. *Frontiers in Fungal Biology*, 3: 958466. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.958466>

Carlucci A, Raimondo ML, Cibelli F & Phillips, AJL. 2013. *Pleurostomophora richardsiae*, *Neofusicoccum parvum* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with a decline of olives in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 52: 517-527. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-13526

Carlucci A, Cibelli F, Lops F & Raimondo ML. 2015. Characterization of Botryosphaeriaceae species as causal agents of trunk diseases on grapevines. *Plant Disease*, 99: 1678-1688. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0286-RE>

Chattaoui M, Rhouma A, Krid S, Triki MA, Moral J, Msallem M & Trapero A. 2011. First Report of Fruit Rot of Olives Caused by *Botryosphaeria dothidea* in Tunisia. *Plant Disease*, 95: 770. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-10-0827>

Chattaoui M, Rhouma A, Msallem M, Pérez M, Moral J & Trapero A. 2012. First Report of *Botryosphaeria obtusa* as causal agent of olive tree branch dieback in Tunisia. *Plant Disease*, 96: 905. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-12-0026-PDN>

Cheng ShiJie CS, Fan Kun FK, Zhang BinBin ZB, Zhang KaiLun ZK, Fu Li FL & Xia XiaoMing XX. 2017. The sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* to thiophanate-methyl, captan and metiram. *Journal of Fruit Science*, 34 (12): 1590-1598. <https://doi.org/10.13925/j.cnki.gsxb.20170115>

Chen Y, Dissanayak AJ, Liu Z & Liu J. 2020. Additions to Karst Fungi 4: *Botryosphaeria* spp. associated with woody hosts in Guizhou province, China including *B. guttulata* sp. nov. *Phytotaxa*, 454: 186-202. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.454.3.2>

Conde P, Arias M, Villamil JJ, Bruzzone J, Bernaschina Y, Ferrari V, Zoppolo R, Villamil J & Leoni C. 2019. It is feasible to produce olive oil in temperate humid climate regions. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1544. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01544>

Conde P, Montelongo MJ & Leoni C. 2013. Enfermedades del Olivo. In: Grompone MA, Villamil J, (Coord.). Aceites de oliva: de la planta al consumidor. Montevideo, UY: Hemisferio Sur/INIA 1: 183-213 Volumen 1 de dos volúmenes.

Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Philips AJL, Alves A, Burgess T, Barber P & Groenewald JZ. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55: 235-253. <https://doi.org/10.3114/sim.55.1.235>

Crous PW, Wingfield MJ, Guarro J et al. 2013 *Neofusicoccum ursorum* sp. nov. and *Neofusicoccum cryptoaustrale* sp. nov. Fungal Planet description sheets, 154-213. Persoonia, 31: 188-296. <https://doi.org/10.3767/003158513X675925>

Crous PW, Slippers B, Groenewald JZ & Wingfield MJ. 2017. Botryosphaeriaceae: Systematics, pathology, and genetics. Fungal Biology, 121: 305-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2017.01.003>

Crous PW & Wingfield MJ. 2018. Fungi infecting Woody plants: emerging frontiers. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 40: i–iii. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.40.00>

Damm U, Crous, PW & Fourie PH. 2007. Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. Mycologia, 99: 664-680. <https://doi.org/10.1080/15572536.2007.11832531>

Delgado-Cerrone L, Mondino-Hintz P & Alaniz-Ferro S. 2016. Botryosphariaceae species associated with stem canker, die-back and fruit rot on apple in Uruguay. European Journal of Plant Pathology, 146: 637-655. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0949-z>

Denman S, Crous PW, Sadie A & Wingfield MJ. 2004. Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria protearum* on *Protea magnifica* in the Western Cape province of South Africa. Australasian Plant Pathology, 33: 97-102. <https://doi.org/10.1071/AP03080>

De Wet J, Slippers B, Preisig O, Wingfield BD & Wingfield MJ. 2008. Phylogeny of the Botryosphaeriaceae reveals patterns of host association. Molecular Phylogenetic and Evolution, 46: 116-126. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.08.016>

Dini M, Raseira M D C B, Valentini G H & Zoppolo R. 2021. Duraznero: situación actual en Uruguay, Brasil y Argentina. Agrociencia Uruguay, 25: (NSPE1) Article 394. <https://doi.org/10.31285/AGRO.25.394>

Dong XL, Cheng ZZ, Leng WF, Li BH, Xu XM, Lian S & Wang CX. 2021. Progression of symptoms caused by *Botryosphaeria dothidea* on apple branches. Phytopathology, 111(9): 1551-1559. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-20-0551-R>

Dos Santos, KM, Tsuji, SS & Câmara MPS, Michereff SJ & Lopes UP. 2019. Sensibilidad a los fungicidas de carbamato de metilbencimidazol de especies de Botryosphaeriaceae de huertos de mango en el nordeste de Brasil. European Journal of Plant Pathology, 153: 209-222. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1556-y>

Fabre B, Piou D, Desprez-Loustau M & Marcais B. 2011. Can the emergence of pine *Diplodia* shoot blight in France be explained by changes in pathogen pressure linked to climate change? *Global Change Biology*, 17: 3218-3227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02428.x>

Fan K, Wang J, Fu L, Li X, Zhang Y, Zhang X, Zhai H & Qu J. 2016. Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* from apple to tebuconazole in China. *Crop Protection*, 87: 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.04.018>

Feng X, Liu L, Jin Y, Yan X, Zhongzhu P, Wang G, Qiu Ch & Wu H. 2023. First Report of Trunk Canker Caused by *Botryosphaeria dothidea* on *Cinnamomum camphora* in China *Plant Disease*, 107(12): 4030. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-23-1353-PDN>

FRAC. Fungicide Resistance Action Committee Quinone 'Outside' Inhibitor (QoI) Working Group Meeting. Available online: <https://www.frac.info/frac-teams/working-groups/qoi-fungicides/recommendations-for-qoi> (consultado 31 de julio, 2024).

Garibaldi A, Bertetti D, Poli A & Gullino ML. 2012. First report of fruit rot in pear caused by *Botryosphaeria dothidea* in Italy. *Plant Disease*, 96(6): 910-910. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0130-PDN>

González-Domínguez E, Alves A, León M & Armengol J. 2017. Characterization of Botryosphaeriaceae species associated with diseased loquat (*Eriobotrya japonica*) in Spain. *Plant pathology*, 66(1): 77-89. <https://doi.org/10.1111/ppa.12556>

Guarnaccia V, Kraus C, Markakis E, Alves A, Armengol J, Eichmeier A, Compant S & Gramaje D. 2022. Fungal trunk diseases of fruit trees in Europe: pathogens, spread and future directions. *Phytopathologia Mediterranea*, 61(3): 563-599. <https://doi.org/10.36253/phyto-14167>

Hernández-Rodríguez L, Mondino-Hintz P & Alaniz-Ferro S. 2022. Diversity of Botryosphaeriaceae species causing stem canker and fruit rot in olive trees in Uruguay. *Journal of Phytopathology*, 00: 1-14. <https://doi.org/10.1111/jph.13078>

Jami F, Slippers B, Wingfield MJ & Gryzenhout M. 2014. Botryosphaeriaceae species overlap on four unrelated, native South African hosts. *Fungal Biology*, 118: 168-179. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.11.007>

Jami F, Marincowitz S, Durán A, Slippers B, Abad, JI, Chen S & Wingfield MJ. 2022. Botryosphaeriaceae diversity on Eucalyptus clones in different climate zones of Indonesia. *Forest Pathology*, 52(2): e12737. <https://doi.org/10.1111/efp.12737>

Kaliterna J, Milicevic T, Ivic D, Bencic D & Mesic A. 2012. First report of *Diplodia seriata* as causal agent of olive dieback in Croatia. Plant Disease, 96: 290. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-11-0628>

Kenfaoui J, Lahlali R, Mennani M, Radouane N, Goura K, El Hamss H, El Ghadraoui L, Fontaine F, Tahiri A, Barka EA & Amiri S. 2022. Botryosphaeria Dieback (*Lasiodiplodia viticola*): An Imminent Emerging Threat to the Moroccan Vineyards. Plants, 11: 2167. <https://doi.org/10.3390/plants11162167>

Korukmez N, Yildiz F, Yayla S, Gencer R & Akpinar O. 2020. First report of fruit rot caused by *Botryosphaeria dothidea* on olive in Turkey. Journal of Plant Pathology, 102: 537. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00429-w>

Latinovic J, Mazzaglia A, Latinovic N, Ivanovic M & Gleason M. 2013. Resistance of olive cultivars to *Botryosphaeria dothidea*, causal agent of olive fruit rot in Montenegro. Crop Protection, 48: 35-40. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.004>

Latorre BA, Torres R, Silva & Tand Elfar K. 2013. Evaluation of the use of wound-protectant fungicides and biological control agents against stem canker (*Neofusicoccum parvum*) of blueberry. Ciencia e Investigación Agraria, 40: 537-545. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202013000300007>.

Lazzizzera C, Frisullo S, Alves A & Phillips AJL. 2008. Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species associated with drupe rot of olives in southern Italy. Plant Pathology, 57: 948-956. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01842.x>

Leal C, Trotel-Aziz P, Gramaje D, Armengol J & Fontaine F. 2024. Exploring Factors Conditioning the Expression of Botryosphaeria Dieback in Grapevine for Integrated Management of the Disease. Phytopathology, 114(1): 21-34. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-23-0136-RVW>

Leoni C, Conde P, Paullier J, Montelongo M J & Mondino P. 2013. Manual para la identificación de las principales enfermedades y plagas del olivo. Boletín de divulgación N° 102. INIA Canelones. 49 p. ISBN: 978-9974-38-358-6. www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/1009/1/18429280114124520.pdf

Li GQ, Liu FF, Li JQ, Liu QL & Chen SF. 2018. Botryosphaeriaceae from *Eucalyptus* plantations and adjacent plants in China. Persoonia, 40: 63-95. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.40.03>

Li HY, Cao RB & Mu YT. 1995. In vitro inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach trees in Zhejiang Province, China. *Crop Protection*, 14 (3): 187-191. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(95\)00011-A](https://doi.org/10.1016/0261-2194(95)00011-A).

Linaldeddu BT, Maddau L, Franceschini A, Alves A & Phillips AJL. 2016. *Botryosphaeriaceae* species associated with lentisk dieback in Italy and description of *Diplodia insularis* sp. nov. *Mycosphere*, 7: 962-977. <http://doi.org/10.5943/mycosphere/si/1b/8>

Linari G, Gazzano I & Achkar M. 2022. Potencialidad para la diversificación geográfica de la fruticultura de hoja caduca en Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 26: (NE3) e956. <https://doi:10.31285/AGRO.26.956>.

Liu BY, Zhang W, Luan BH, Wang PS & Wang YZ. 2013. Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* to difenoconazole and flusilazole and cross resistance of different fungicides. *Acta Phytopathologica Sinica*, 43(5): 541-548.

Liu JK, Phookamsak R, Doilom M, Wikee S, Li YM, Ariyawansha H, Boonmee S, Chomnunti P, Dai DQ, Bhat JD, Romero AI, Zhuang WY, Monkai J, Jones EBG, Chukeatirote E, Ko Ko TW, Zhao YC, Wang Y & Hyde KD. 2012. Towards a natural classification of *Botryosphaeriales*. *Fungal Diversity*, 57: 149-210. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0207-4>

Ma Z, Morgan DP & Michailides TJ. 2001. Effects of water stress on *Botryosphaeria* blight of pistachio caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease*, 85:745-74. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.7.745>

Marsberg A, Kemler M, Jami F, Nagel JH, Postma-Smidt A, Naidoo S & Slippers B. 2017. *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. *Molecular Plant Pathology*, 18: 477-488. <https://doi.org/10.1111/mpp.12495>

Mehl JWM, Slippers B, Roux J & Wingfield MJ. 2017. Overlap of latent pathogens in the *Botryosphaeriaceae* on a native and agricultural host. *Fungal Biology*, 121: 405-419. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.015>

MGAP-DIEA, 2020. Resultados del primer censo de productores de olivos. Available at: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/diea-presenta-resultados-del-primer-censo-productores-olivos>

MGAP-DIEA, 2021a. Anuario estadístico Agropecuario. Disponible en: <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2021/LIBRO%20ANUARIO%202021%20Web.pdf> Consultado Julio 2023

MGAP-DIEA, 2021b. Resultado de la encuesta a productores de olivos. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/diea-presenta-resultados-encuesta-productores-olivos-2021>

MGAP-DIGEGRA, 2014. "Guía de buenas prácticas agrícolas para la producción de frutas y hortalizas frescas en Uruguay." Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/guia-buenas-practicas-agricolas-para-produccion-frutas-hortalizas>

Moral J, Muñoz-Díez C, González N, Trapero A & Michailides TJ. 2010. Characterization and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species collected from olive and other host in Spain and California. *Phytopathology*, 100: 1340-1351. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-09-0343>

Moral J, Agustí-Brisach C, Pérez-Rodríguez M, Xavier C, Raya M, Rhouma A & Trapero T. 2017. Identification of fungal species associated with branch dieback of olive and resistance of table cultivars to *Neofusicoccum mediterraneum* and *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease*, 101: 306-316. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0806-RE>

Moral J, Morgan D, & Michailides TJ. 2019a. Management of *Botryosphaeria* canker and blight diseases of temperate zone nut crops. *Crop Protection*, 126: 104927. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104927>

Moral J, Morgan D, Trapero A & Michailides TJ. 2019b. Ecology and epidemiology of nut crops and olive diseases caused by *Botryosphaeriaceae* fungi in California and Spain. *Plant Disease*, 103: 1809-1827. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0622-FE>

Obrador-Sánchez JA & Hernandez-Martinez R. 2020. Microscope observations of *Botryosphaeriaceae* spp. in the presence of grapevine wood. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(1): 119-129. <https://doi.org/10.36253/phyto-11040>

Olmo D, Armengol J, León M & Gramaje D. 2016. Characterization and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species isolated from Almond trees on the Island of Mallorca (Spain). *Plant Disease*, 100: 2483-2491. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0676-RE>

Olmo D, Gramaje D & Armengol J. 2017. Evaluation of fungicides to protect pruning wounds from Botryosphaeriaceae species infections on almond trees. *Phytopathologia Mediterranea*, 56: 77-86. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-19428

Osorio JA, Crous CJ, de Beer W, Wingfield M, & Rou J. 2017. Endophytic Botryosphaeriaceae, including five new species, associated with mangrove trees in South Africa. *Fungal Biology*, 121: 361-393. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.09.004>

Pavlic D, Wingfield MJ, Barber P, Slippers B, Hardy GEST J & Burgess TI. 2008. Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. *Mycologia*, 100: 851-866. <https://doi.org/10.3852/08-020>

Pérez CA, Wingfield MJ, Slippers B, Altier NA & Blanchette RA. 2010. Endophytic and canker-associated Botryosphaeriaceae occurring on non-native *Eucalyptus* and native Myrtaceae trees in Uruguay. *Fungal Diversity*, 41: 53-69. <https://doi.org/10.1007/s13225-009-0014-8>

Pérez CA, Wingfield MJ, Slippers B, Altier NA, & Blanchette RA. 2009. *Neofusicoccum eucaliptorum*, a Eucalyptus pathogen, on native Myrtaceae in Uruguay. *Plant Pathology*, 58: 964-970. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02116.x>

Phillips AJL. 2002. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopatología Mediterranea*, 41: 3-18. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1655

Phillips AJL, Hyde KD, Alves A, & Liu JK. 2019. Families in Botryosphaeriales: a phylogenetic, morphological and evolutionary perspective. *Fungal Diversity*, 94(1): 1-22. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0416-6>

Phillips AJL, Rumbosm IC, Alves A & Correia A. 2005. Morphology and phylogeny of *Botryosphaeria dothidea* causing fruit rot of olives. *Mycopathologia*, 159: 433-439. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0256-2>

Phillips AJL, Lopes J, Abdollahzadeh J, Bobev S & Alves A. 2012. Resolving the *Diplodia* complex on apple and other Rosaceae hosts. *Persoonia*, 29: 29-38. <https://doi.org/10.3767/003158512X658899>

Phillips A, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers, B Wingfield, M Groenewald, J & Crus P. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76: 51-167. <https://doi.org/10.3114/sim0021>

Pitt WM, Sosnowski, MR, Huang R, Qiu Y, Steel CC & Savocchia S. 2012. Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* canker of grapevines. *Plant Disease*, 96(9): 1303-1308. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-11-0998-RE>

Ramabulana E, Kunjeku E, Slippers B & Coetzee MP. 2022. Diversity of Endophytes in the *Botryosphaeriaceae* Differs on *Anacardiaceae* in Disturbed and Undisturbed Ecosystems in South Africa. *Forests*, 13(2): 341. <https://doi.org/10.3390/f13020341>

Rebellato Urtizberea MJ. 2011. Prospección de enfermedades en el cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en la zona norte y sur del Uruguay y su relación con variables meteorológicas. Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Agronomía. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/9689>

Romero MA, Sánchez ME & Trapero A. 2007. First Report of *Botryosphaeria ribis* as a branch dieback pathogen of olive trees in Spain. *Plant Disease*, 82: 208. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0208A>

Rolshausen PE, Úrbez-Torres JR, Rooney-Latham S, Eskalen A, Smith RJ & Gubler WD. 2010. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(1): 113-119. <https://doi.org/10.5344/ajev.2010.61.1.113>

Sakalidis ML, Hardy GE & Burgess TI. 2011a. Use of the genealogical sorting index (GSI) to delineate species boundaries in the *Neofusicoccum parvum*-*Neofusicoccum ribis* species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60: 333-344. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.04.026>

Sakalidis ML, Ray JD, Lanoiselet V, Hardy GE & Burgess TI. 2011b. Pathogenic *Botryosphaeriaceae* associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 130: 379-391. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9760-z>

Santos KM, Tsuji SS, Câmara MPS, Michereff SJ & Lopes UP. 2019. Sensitivity to methyl benzimidazole carbamate fungicides of *Botryosphaeriaceae* species from mango orchards in the Northeast of Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 153: 209-222. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1556-y>

Sergeeva V, Alvez A & Phillips A. 2009. *Neofusicoccum luteum* associated with leaf necrosis and fruit rot of olives in New South Wales, Australia. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 294-298. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-2790

Scarlett KA, Shuttleworth LA, Collins D, Rothwell, CT, Guest DI & Daniel R. 2019. Botryosphaeriales associated with stem blight and dieback of blueberry (*Vaccinium* spp.) in New South Wales and Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 48: 45-57. <https://doi.org/10.1007/s13313-018-0584-6>

Sessa L, Abreo E, Bettucci L & Lupo S. 2016. Botryosphaeriaceae species associated with wood diseases of stone and pome fruits trees: symptoms and virulence across different hosts in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, 146: 519-530. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0936-4>

Sessa L, Abreo E & Lupo S. 2018. Diversity of fungal latent pathogens and true endophytes associated with fruit trees in Uruguay. *Journal of Phytopathology*, 166: 633-647. <https://doi.org/10.1111/jph.12726>

Sessa L, Abreo E & Lupo S. 2021 *Pseudofusicoccum* sp. causing shoot canker in peach in Uruguay. *Australasian Plant Disease, Notes* 16, 5. <https://doi.org/10.1007/s13314-021-00416-0>

Sierotzki H, Parisi S, Steinfeld U, Tenzer I, Poirey S & Gisi U. 2000. Mode of Resistance to Respiration Inhibitors at the Cytochrome Bc1 Enzyme Complex of *Mycosphaerella fijiensis* Field Isolates. *Pest Management Science*, 56: 833-841. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200010\)56:10<833::AID-PS200>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200010)56:10<833::AID-PS200>3.0.CO;2-Q)

Silva-Valderrama I, Urbez-Torres JR & Davies TJ. 2024. From host to host: The taxonomic and geographic expansion of Botryosphaeriaceae. *Fungal Biology Reviews*, 48: 100352. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2023.100352>

Slippers B, Boissin E, Phillips AJL, Groenewald JZ, Lombard L, Wingfield MJ, & Crous PW. 2013. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriales: A systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology*, 76: 31-49. <https://doi.org/10.3114/sim0020>

Slippers B, Smit WA, Crous PW, Coutinho TA, Wingfield BD & Wingfield MJ. 2007. Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Plant Pathology*, 56: 128-139. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01486.x>

Slippers B, Burgess T, Pavlic D, Ahumada R, Maleme H, Mohali S, Rodas C & Wingfield MJ. 2009. A diverse assemblage of Botryosphaeriaceae infect Eucalyptus in native and non-native environments. Southern Forests: a Journal of Forest Science, 71: 101-110. <https://doi.org/10.2989/SF.2009.71.2.3.818>

Slippers B, Crous PW, Jami F, Zacharias, Groenewald JZ & Wingfield MJ. 2017. Diversity in the Botryosphaeriales: Looking back, looking forward. Fungal Biology, 121: 307-321. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.02.002>

Slippers B & Wingfield MJ. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. Fungal Biology Reviews, 21: 90-106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>

Song Y, Li L, Li C, Lu Z, Men X & Chen F. 2018. Evaluating the sensitivity and efficacy of fungicides with different modes of action against *Botryosphaeria dothidea*. Plant Disease, 102(9): 1785-1793. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0118-RE>

Sosa MC, Lutz MC, Lódolo X & Basso CN. 2022. In vitro and in vivo activity of chemical fungicides and a biofungicide for the control of wood diseases caused by botryosphaeriales fungi in apple and pear. International Journal of Pest Management, 68(4): 328-338. <https://doi.org/10.1080/09670874.2022.2116660>

Spetik M, Tekielska DA, Berraf-Tebbal A, Pecenka J, Stuskova K, Mahamedi & AE, Eichmeier A. 2023. Diversity of Botryosphaeriaceae Species Associated with Grapevine Trunk Diseases in the Czech Republic. Diversity, 15: 800. <https://doi.org/10.3390/d15070800>

Spies CFJ, Mostert L, Carlucci A, Moyo P, van Jaarsveld WJ, du Plessis IL, van Dyk M & Halleen F. 2020. Dieback and decline pathogens of olive trees in South Africa. Persoonia, 45: 196-220. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2020.45.08>

Taylor R, Hale C & Hattill W. 2001. A stem canker disease of olive (*Olea europaea*) in New Zealand. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 29: 219-228. <https://doi.org/10.1080/01140671.2001.9514181>

Tennakoon KMS, Jaspers MV, Ridgway HJ & Jones EE. 2017. Botryosphaeriaceae species associated with blueberry dieback and sources of primary inoculum in propagation nurseries in New Zealand. European Journal of Plant Pathology, 150: 363-374. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1283-9>

Tennakoon KMS, Ridgway HJ, Jaspers MV, Langford G, & Eirian Jones E, 2018. Evaluation of fungicide efficacy against *Neofusicoccum* species causing dieback disease of blueberries in New Zealand. Australasian Plant Pathology, 48: 75-84. <https://doi.org/10.1007/s13313-018-0565-9>

Torres R, Casals C, Usall J, Teixidó N, 2022. Estrategias alternativas a los fungicidas de síntesis para el control de las enfermedades de postcosecha de fruta dulce. Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal: Nº 341. ISSN 1131-8988.

Triki MA, Krid HadjTaieb S, Cheffi M, Gharbi Y, & Rhouma A. 2015. First report of dieback of olive trees caused by *Neofusicoccum australe* in Tunisia. Journal of Plant Pathology, 97: 209-220. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V97I1.043>

Twizeyimana M, Mcdonald V, Mayorquin JS, Wang DH, Na F, & Eskalen A. 2013. Effect of Fungicide Application on the Management of Avocado Branch Canker (Formerly Dothiorella Canker) in California. Plant Disease, 97: 897-902. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-12-0518-RE>

Úrbez-Torres JR, Voegel TM & Gubler WD. 2006. Identification and Distribution of Botryosphaeria spp. Associated with Grapevine Cankers in California. Plant Disease, 90: 1490-1503. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1490>

Úrbez-Torres JR & Gubler WD. 2009. Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. Plant Disease, 93: 584-592. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0584>

Úrbez-Torres JR. 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. Phytopathologia Mediterranea 50: S5–S45. https://doi.org/10.14601/Fitopatología_Mediterr-9316

Úrbez-Torres JR, Peduto F, Vossen PM, Krueger WH & Gubler WD. 2013. Olive Twig and Branch Dieback: Etiology, Incidence, and Distribution in California. Plant Disease, 97: 231-244. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0390-RE>

Van Dyk M, Spies CFJ, Mostert L, & Halleen F. 2021. Survey of trunk pathogens in South African olive nurseries. Plant Disease, 105: 1630-1639. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-20-0798-RE>

Vincelli P. 2002. QoI (strobilurin) fungicides: benefits and risks. The Plant Health Instructor, 63-65. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:88130929> <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2002-0809-02>

Wang F, Zhao L, Li G, Huang J, & Hsiang T. 2011. Identification and characterization of *Botryosphaeria* spp. causing gummosis of peach trees in Hubei Province, central China. *Plant Disease*, 95:1378-1384. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-10-0893>

White TJ, Bruns T, Lee S & Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. Pages 315-322 in: Innis AM, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego. California: 315-322.

Xue DS, Liu J, Li BH, Xu X, Liu, N, Lian S. Dong X, & Wang CX. 2021. Effect of rainfall and temperature on perithecium production of *Botryosphaeria dothidea* on cankered apple branches. *Phytopathology*, 111(6): 982-989. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-20-0262-R>

Yan JY, Xie Y, Zhang W, Wang Y, Liu JK, Hyde KD, Seem RC, Zhang GZ, Wang ZY, Yao SW, Bai XJ, Dissanayake AJ, Peng YL & Li XH. 2013. Species of *Botryosphaeriaceae* involved in grapevine dieback in China. *Fungal Diversity*, 61: 221-236. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0251-8>

Yang T, Cheewangkoon R, Jami F, Abdollahzadeh J, Lombard L, 2017. Families, genera, and species of *Botryosphaeriales*. *Fungal Biology*, 121: 322-346. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.11.001>

Zhai L, Zhang M, Lv G, Chen X, Jia N, Hong N, & Wang G, 2014. Biological and molecular characterization of four *Botryosphaeria* species isolated from pear plants showing stem wart and stem canker in China. *Plant Disease*, 98:716-726. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1060-RE>

Zhang W, Groenewald JZ, Lombard L, Schumacher RK, Phillips AJL, Crous PW. 2021. Evaluating species in *Botryosphaeriales*. *Persoonia*, 46: 63-115. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2021.46.03>.

Zlatković M, Keča N, Wingfield M, Jami F, Slippers B, 2016. *Botryosphaeriaceae* associated with the die-back of ornamental trees in the Western Balkans. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109: 543-564. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0659-8>

Zlatković M, Wingfield MJ, Jami F, Slippers B, 2018. Host specificity of co-infecting *Botryosphaeriaceae* on ornamental and forest trees in the Western Balkans. *Forest Pathology*, 48: e12410. <https://doi.org/10.1111/efp.12410>.