



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMIA**

**Descripción de *Diplodia mutila* asociada a la muerte regresiva de brazos en nogales
(*Juglans regia*) cv. Chandler**

MEMORIA DE TITULO

FRANCISCO FELIPE BRAVO BARRAZA

**TALCA-CHILE,
2018**

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2020

Aprobación:



Profesor Guía: Ing. Agr. Mg. Cs. Dr. Gonzalo Díaz U.

Profesor Asistente

Escuela de Agronomía

Facultad de Ciencias Agrarias



Profesor informante: Ing. Agr. MS. PhD. Mauricio Lolas C.

Profesor Asociado

Escuela de Agronomía

Facultad de Ciencias Agrarias

Fecha de presentación de Memoria de Título de 9 de Abril de 2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres Samuel y Jimena por entregarme valores, apoyarme incondicional en las decisiones que tomé durante mi vida universitaria, entregarme esa palabra de aliento y ayudarme a ser una mejor persona.

Agradezco a mi polola Katherina por su apoyo fundamental, para poder realizar mis actividades universitarias y extra universitarias, su cariño y su amor que cada día lo fortalecemos más.

Agradezco a todo el equipo del laboratorio de patología frutal de la Universidad de Talca, por tener siempre la buena voluntad para ayudar en cualquier momento y ante cualquier duda.

Finalmente, agradezco a mi profesor guía Gonzalo Diaz, por tener confianza y creer en mí, entregarme su conocimiento y apoyo para poder realizar esta investigación

RESUMEN

En la actualidad, Chile se ha posicionado en el primer lugar del hemisferio sur en la exportación de nueces, con una superficie cultivada de 37.788 ha, donde la principal zona de plantación es la Región Metropolitana con 14.120 hectáreas, seguida de la Región de Valparaíso, con 6.786 hectáreas, y las regiones de O'Higgins y Maule, con 6.474 y 5.012 hectáreas, respectivamente. Sin embargo la presencia de enfermedades que afectan directamente al rendimiento del frutal como a la calidad de la fruta exportada, son cada vez más recurrentes. En los últimos años las plantaciones de nogales se han visto afectados por la muerte de brazos y ramillas. El objetivo del presente estudio es la caracterización morfológica, molecular y patogenicidad de aislados de *Diplodia mutila* asociado a la muerte regresiva de brazos de nogal cv. Chandler en la Región del Maule. Para la realización del objetivo se identificó morfológicamente por medio de conidias y una identificación molecular utilizando los genes de la región internal transcribed spacer (ITS) y gen parcial de la beta tubulina (BT). Para la prueba de patogenicidad se utilizaron aislados de *Diplodia mutila*, *Neofusicoccum parvum* y control (testigo negativo) que fueron inoculados sobre plantas de 2 años de cv. Chandler. Las plantas inoculadas con *D. mutila* mostraron síntomas como poca ramificaciones, caída prematura de hojas y muerte regresiva del eje central de la planta. El re-aislamiento fue 100% positivo solo en las plantas inoculadas con aislados de *D. mutila*. Este trabajo representa la primera identificación de *Diplodia mutila* causando muerte regresiva de ramillas y brazos en nogal cv. Chandler en la Región del Maule.

ABSTRACT

Currently, Chile has positioned in the first place in the southern hemisphere in the export of nuts, with a cultivated area of 37,788 ha, where the main plantation area is the Metropolitan Region with 14,120 hectares, followed by the Valparaíso Region, with 6,786 hectares, and the regions of O'Higgins and Maule, with 6,474 and 5,012 hectares, respectively. However, the presence of diseases that directly affect the performance of the fruit as well as the quality of the fruit exported, are increasingly recurrent. In recent years walnut plantations have been affected by the twig and arm dieback. The objective of the present study was the characterization of *Diplodia mutila* isolates associated with twig and arm dieback cv. Chandler in the Maule Region. The identification of the causal agent was determined morphologically by means of conidia and a molecular identification using the genes of the internal transcribed spacer (ITS) and the partial gene of beta tubulin (BT). For the pathogenicity test, isolates of *Diplodia mutila*, *Neofusicoccum parvum* and control (negative treatment) were inoculated on 2-year-old plants of cv. Chandler. The plants inoculated with *D. mutila* showed symptoms such as little ramifications, premature leaf fall and dieback of the central axis of the plant. The re-isolation was 100% positive only in plants inoculated with *D. mutila* isolates. This work represents the first identification of *Diplodia mutila* causing twig and branch dieback in walnut cv. Chandler in the Maule Region, Chile.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis	3
1.2. Objetivo general	4
1.3. Objetivos específicos	4
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	5
2.1. Importancia del nogal en Chile	5
2.1.1. Superficie de nogal	5
2.1.2. Producción y exportación de nueces	7
2.2. Cultivo del nogal	8
2.2.1. Requerimeintos edafoclimáticos	9
2.3. Enfermedades del nogal	10
2.3.1. Muerte regresiva de brazos en nogal	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Ubicación del ensayo	13
3.2. Muestras, síntomas y aislamiento fungoso	13
3.3. Identificación morfológica	13
3.4. Identificación molecular	13
3.5. Patogenicidad en plantas de nogal cv. Chandler	14
3.6. Diseño de experimento	14
IV. RESULTADOS	16
4.1. Aislamientos e Identificación morfológica de aislados de <i>D. mutila</i>	16
4.2. Identificación molecular de aislados de <i>D. mutila</i>	17
4.3. Patogenicidad en plantas de nogal cv. Chandler de 2 años.	18
4.4. Re aislamiento del hongo	21
V. DISCUSIÓN	22
VI. CONCLUSIÓN	24
VI. BIBLIOGRAFÍA	25

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Superficie nacional y distribución geográfica de plantaciones de nogal en hectáreas.
.....7

Cuadro 4.1. Secuencias de aislados chilenos de *Diplodia mutila* depositados en el GenBank para los genes ITS y BT.17

Cuadro 4.2. Prueba de patogenicidad que muestra el avance de lesión plantas de nogal cv. Chandler de dos años inoculados con aislados de *Diplodia mutila* y *Neofusicoccum parvum*. ...20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Participación de variedades de nogal en la superficie nacional.	6
Figura 2.2. Necrosis de la madera de ramilla de nogal después de la poda.	12
Figura 4.1. Características culturales y morfológicas de aislados chilenos de <i>D. mutila</i> obtenidos desde brazos con muerte regresiva. A , Conidia unicelular, aseptada con pared delgada del hongo <i>D. mutila</i> capturadas con el programa MOTIC IMAGE PLUS 2.0 ^{ML} con objetivo de 40X. B , Colonia gris-olivacea en medio de cultivo APD después de 10 días a 20°C de incubación.	16
Figura 4.2. Análisis de máxima parsimonia de la región Internal transcribed spacer (ITS) + porción de beta tubulina (BT) de aislados de <i>Diplodia</i> , comparado con otras especies de hongos causantes de enfermedades en nogales en el GenBank. El árbol se enraizó con secuencia de la especie <i>Botrytis cinerea</i> (no. acceso GenBank EF216714B5).....	18
Figura 4.3. Patogenicidad de plantas de nogal cv. Chandler inoculadas con aislados de <i>D. mutila</i> que muestran muerte regresiva del eje central. A la izquierda se indica la planta testigo (tratamiento control) sin síntomas de muerte regresiva, es decir con brotación y crecimiento de los brotes.....	19
Figura 4.4. Patogenicidad de plantas de nogal inoculadas con aislados DMnog1 y DMnog4 que muestran la necrosis de la madera. Solo las plantas inoculadas fueron positivas a los reaislamiento de <i>D. mutila</i>	19
Figura 4.5. Re aislamiento a partir de ramas de nogales y crecimiento de hongos de <i>D. mutila</i> y <i>N. parvum</i>	18

I. INTRODUCCIÓN

El aumento de los recursos agrícolas puede tener efectos positivos en los suministros alimentarios, el empleo, los ingresos, y posibilita el consumo de dietas adecuadas en los países en desarrollo (FAO, 2002).

La agricultura chilena del siglo XXI es un sector de alto dinamismo que está enfrentando continuamente cambios, competencia y mejoramiento de los procesos productivos y comerciales. Los desafíos que implicó la apertura comercial del país, con una amplia gama de acuerdos comerciales con diferentes países y continentes, han sido enfrentados de manera exitosa por los sectores privado y público, permitiendo la expansión de la agricultura y la producción de alimentos, tanto para los mercados mundiales como para el mercado interno (ODEPA, 2016).

La creciente demanda por alimentos y provisión de servicios de los sectores agrícola, ganadero y forestal, aumenta la presión sobre los recursos naturales renovables, lo que, en un escenario de cambios ambientales globales, determina la necesidad de impulsar medidas que fomenten y regulen el uso racional de los componentes del medio ambiente por parte del sector silvoagropecuario (ODEPA, 2016).

La industria chilena de frutos secos, incluyendo en ella a sus tres principales especies: nueces, almendras y avellanas, ha experimentado un dinámico desarrollo basado en la presencia de una serie de características que se traducen en ventajas comparativas y competitivas con respecto a los mayores productores mundiales. La industria chilena de frutos secos, por su parte, conformada principalmente por las tres especies citadas, ha tenido un desarrollo notable a partir de la segunda parte de la década pasada, basado especialmente en sus ventajas comparativas y competitivas. Estas ventajas se manifiestan en el buen clima del país, con otoños en general secos, apropiados para la cosecha, y terrenos planos que permiten mecanizar parte del proceso productivo y facilitan la utilización de riego en los predios (Bravo, 2012).

El nogal (*Juglans regia* L.) es nativo de la región que incluye Turquía, Irán, Iraq, Afganistán, Sur de Rusia y Este de India. Se han encontrado en Europa restos que datan de la Edad del Hierro, lo que demuestra que sirvió de alimento en la época de las cavernas. De Persia pasó a Grecia, donde se le conoció como nuez persa o real dado que fueron los reyes los que la introdujeron al Imperio, de Grecia pasó hasta China y al resto de Europa comenzando por Italia, Francia, España y Portugal. A Chile llegó con los españoles, quienes cultivaban la llamada nuez

portuguesa, árbol de brotación temprana, productiva, de nuez redonda o acorazonada, sabrosa y de cáscara dura (Lemus, 2004).

El cultivo de frutales de nuez, si bien ha sido tradicional en Chile desde los tiempos de la Colonia, ha tomado especial impulso en la última década. Diversos estudios científicos realizados en años recientes han revelado las ventajas existentes para la salud humana del consumo de frutas secas. Su alto contenido de antioxidantes, flavonoides, compuestos fenólicos y fibra, trae beneficios para la prevención del envejecimiento y las enfermedades cardiovasculares. El cambio de las pautas de consumo hacia alimentos nutritivos ha impulsado el consumo creciente de este tipo de frutas (Reyes, 2008).

La producción de frutos secos en Chile ha estado orientada principalmente al mercado internacional, por lo mismo, se ha visto enfrentada a una creciente exigencia externa en materia de avances en sustentabilidad. Adicionalmente, el sector enfrenta el desafío de diferenciar y agregar valor a su producción, por lo que el sumar atributos de sustentabilidad puede ser clave para la competitividad sectorial. Por otro lado, el sector se encuentra organizado bajo la modalidad de asociaciones gremiales y organizaciones de pequeños productores, que han manifestado su interés por avanzar en esta temática (Acuña, 2017).

La producción mundial de nueces de nogal se estima que alcanzará para la temporada 2017/18 un volumen de 2,1 millones de toneladas, donde los principales productores son: China, que superará el millón de toneladas con 1,06 millones y Estados Unidos con 590.000 toneladas aproximadamente. La Unión Europea con 115.000 toneladas, Ucrania con 113.000 toneladas, Chile con 100.000 toneladas aproximadas y Turquía con unas 63.000 toneladas (USDA, 2017).

Los principales países importadores de nueces de nogal, en la temporada 2015/16 la Unión Europea en su conjunto importó 214 mil toneladas de nueces y se espera que esta temporada llegue a 220 mil toneladas lo que representa el 32,3% de las importaciones mundiales. Dentro de ella destacan Alemania 10% del total del mundo, Italia 8%, España 6%, Francia 3% y el Reino Unido 3%. Turquía que es el mayor consumidor de nueces por habitante, con un promedio anual de 2 kg per cápita año que la convierte en el principal mercado de destino de las exportaciones mundiales de nueces. En la temporada pasada Turquía importó 89.500 toneladas base con cáscara y se espera que esta temporada finalice con una importación de 105 mil toneladas, lo que representaría el 15,4% del mercado mundial de nueces. China tiene un consumo per cápita de 0,8 kg de nueces al año. Además de ser el mayor productor también es el mayor consumidor global de nueces. Su demanda proyectada para esta temporada es de 1.137.000 toneladas (55% del consumo mundial de nueces). Se espera que, incluyendo Hong Kong, importe en esta

temporada unas 96.000 toneladas de nueces base con cáscara, 14,1% de las disponibles en el mercado (Muñoz, 2017).

Los principales países exportadores de nueces de nogal a nivel mundial son, Estados Unidos el segundo mayor productor, fue y sigue siendo el principal exportador mundial de nueces, convirtiéndose en el referente comercial para este producto. Dado que solo tiene un consumo per cápita de 0,5 kilos al año, quedan disponibles para el mercado mundial cerca de 460 mil toneladas de la producción estadounidense. En la temporada pasada a nivel mundial se exportaron 674.728 toneladas base nuez con cáscara, de las cuales Estados Unidos aportó 441.428 toneladas, el 65,4% del total. Para esta temporada se espera que se exporten 703 mil toneladas, de las cuales este país mantendría su participación con una exportación de 460 mil toneladas. Chile ostenta el segundo lugar como exportador de nueces 12% de las exportaciones mundiales en la temporada 2015/16. En el tercer lugar Ucrania con 11% del total de las exportaciones (Muñoz, 2017).

Entre las enfermedades que afectan al nogal en Chile se destaca la peste negra del nogal o tizón bacteriano causado por la bacteria *Xantomonas arboricola* pv. *juglandis*, la cual puede producir pérdidas que dependiendo de la temporada comprometen más del 50% de la producción (Lemus, 2004; FIA, 2010). Además una de las principales enfermedades fungosas que afectan al nogal es la muerte de raíces y corona de asociadas a especies de *Phytophthora*. Es más, recientemente se ha reportado a *Phytophthora cinnamomi* causando una incidencia de 15,7% de pudrición de raíces y corona en la zona central de Chile (Guajardo et al., 2017).

Una enfermedad que ha ido aumentando en su presencia es la muerte regresiva de brazos en nogal asociada a especies de *Botryosphaeria* (Chen et al., 2014; Zhang et al., 2017). Es más, en California, se han descrito varias especies de la familia *Botryosphaeriaceae* causando cancrrosis y muerte de brazos en nogales (Chen et al., 2014).

En Chile, durante los últimos años se ha hecho cada vez más frecuente observar en plantaciones comerciales de nogales la presencia de plantas con brazos muertos, por lo tanto se hace necesario determinar quién o quiénes son los agentes causales de la muerte regresiva de brazos.

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

1.1. Hipótesis.

Los aislados fungosos obtenidos desde brazos de nogales (*Juglans regia*) cv. Chandler con muerte regresiva pertenecen a la familia *Botryosphaeriaceae*

1.2. Objetivo general.

Determinar la etiología de la enfermedad muerte de brazos y ramillas en nogales cv. Chandler

1.3. Objetivos específicos:

- Identificar cultural, morfológica y molecularmente aislados de Botryosphaeriaceae obtenidos desde brazos de nogal con muerte regresiva.
- Determinar la patogenicidad en plantas de nogales inoculados con aislados de Botryosphaeriaceae obtenidos desde brazos de nogal con muerte regresiva.

II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1. Importancia del nogal en Chile

El nogal (*Juglans regia* L.) es un frutal de antigua data en el mundo que se originó a partir de los Romanos, quienes llamaron al fruto del nogal 'la bellota de Jupiter'. Llego a Chile con los españoles, quienes cultivaban la llamada nuez portuguesa, que se diferenciaba de la francesa conocida como nuez de Carpatos. La nuez portuguesa, hasta hoy se le conoce como "nuez Aconcagua" o "nuez chilena". Esta comenzó a enviarse a California alrededor del año 1770, junto con otros productos agrícolas que Chile vendía en la época de la fiebre del oro en California. Y durante la segunda mitad del siglo XIX, según registros de la Sociedad nacional de agricultura, Chile exportaba nueces a Perú, Estados Unidos, Uruguay, Argentina, Brasil, Ecuador, Colombia e incluso a Europa (FIA, 2010).

El cultivo del nogal ha sufrido un profundo cambio tecnológico en Chile, en las últimas dos décadas. Esta especie, al inicio del gran auge frutícola de mediados de los años 70 fue marginal en su desarrollo, pero hoy día constituye una importante alternativa para los productores, tanto de grandes superficies, como de aquellos con poca superficie que, asociados, puedan desarrollar tanto el cultivo como los procesos de post-cosecha que conlleva este rubro (Lemus, 2004).

En Chile se registra un aumento del 270% en la superficie plantada con nogales en los últimos 10 años, siendo el principal exportador del hemisferio sur. El éxito que ha tenido Chile en las exportaciones de frutas en el mercado mundial se debe a las buenas relaciones comerciales que mantiene con los actuales países importadores del producto, y por la reciente apertura de mercados importantes como China e India (ODEPA, 2016).

2.1.1. Superficie de nogal

El nogal en Chile hoy es la segunda especie en importancia con 37.788 hectáreas plantadas y que hasta hace tres años ocupaba el cuarto lugar con 28.474 hectáreas, esto debido a un crecimiento de poco más de 3.200 hectáreas anuales (ODEPA, 2017).

Las variedades Chandler y Serr siguen siendo las principales variedades plantadas. De acuerdo a las estimaciones realizadas a partir del catastro frutícola, el 70,4% de la superficie en 2016 corresponde a la variedad Chandler y el 24% a la variedad Serr (Figura 2.1). El 98,5% de la superficie plantada en los últimos cinco años corresponde a estas dos variedades (Muñoz, 2017).

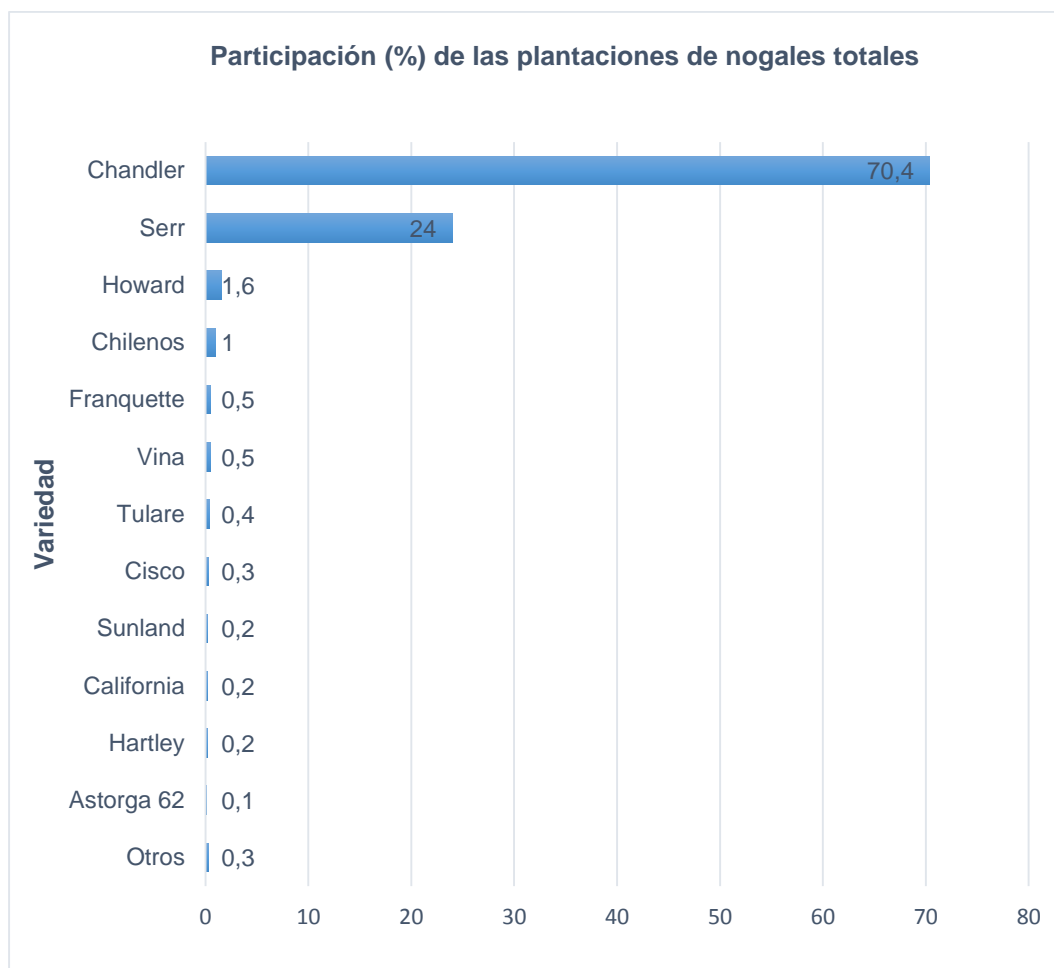


Figura 2.1. Participación de variedades de nogal en la superficie nacional.

De acuerdo a la estimación realizada por Odepa a partir de los catastros frutícolas regionales, la superficie comercial es decir, toda aquella explotación mayor a 0,5 hectáreas plantada con nogales habría llegado a 37.568 hectáreas en el año 2016 (Cuadro 2.1). y se estima que en 2017 podría alcanzar más de 40.000 hectáreas. La Región Metropolitana continúa siendo la principal zona de plantación de este frutal, con 14.120 hectáreas en 2016, y es también la de mayor crecimiento anual, con más de 1.000 hectáreas anuales plantadas, aportando un 34% del crecimiento promedio anual que ha tenido el país en los últimos tres años, que alcanza algo más de 3.000 hectáreas anuales. La sigue en importancia la Región de Valparaíso, con 6.786 hectáreas estimadas en 2016 y un aporte al crecimiento total de, 14%, mientras que las regiones de O'Higgins y Maule, con 6.474 y 5.012 hectáreas, cada una, han aportado 18% y 20% al crecimiento total del rubro (Muñoz, 2017).

Cuadro 2.1. Superficie nacional y distribución geográfica de plantaciones de nogal en hectáreas.

Regiones	Superficie (Ha)
III de Atacama	7
IV de Coquimbo	2.923
V de Valparaíso	6.786
Metropolitana	14.120
VI del Libertador General Bernardo O'higgins	6.474
VII del Maule	5.012
VIII del Bío Bío	2.043
IX de la Araucanía	298
XIV de los Ríos	11
XI Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo	0.01
TOTAL	37.568

2.1.2. Producción y exportación de nueces

En el país existen 3 categorías diferentes de productores. Los grandes productores, con huertos de más de 70 hectáreas cuyo nivel tecnológico es alto. Un segundo grupo, con productores cuyos huertos fluctúan entre 20 y 70 ha., en el cual predominan los huertos de buena calidad y con buen manejo. Finalmente, existe un grupo de productores (mayoritario en número) con huertos de menor tamaño y donde más de la mitad presentaría serios problemas de producción en lo relativo a calidad y condición sanitaria. Siendo huertos antiguos, no injertados y cuyo manejo tecnológico suele ser deficiente (Chilenut, 2009).

Según la ficha técnica económica del nogal de la Región Metropolitana, para la variedad Chandler con tipo de producción nuez con cascara, riego tecnificado orientado al mercado nacional y exportación, el rendimiento esperado sería entre 4.500 a 5.500 kg por hectárea, para la variedad Serr con tipo de producción nuez con cascara, riego tecnificado, destino de mercado exportación, el rendimiento esperado es de 3.150 a 3.850 kg/ha (ODEPA, 2013).

De la producción nacional de nueces de nogal, se exporta alrededor de un 90% y el 10% restante se destina al mercado interno. En el país no existe un gran desarrollo de este mercado, debido a que el hábito de consumir nueces diariamente aún no se ha instaurado (FIA, 2017).

La temporada 2015 se exportaron 51.410 toneladas por USD 358 millones. En la temporada 2016 se exportaron 49.410 toneladas por USD 213,5 millones. El valor de las exportaciones ha

sido menor por un menor precio y se exportaron más nueces con cáscara, las que subieron de 32 mil toneladas en la temporada 2015, a 34 mil toneladas, en desmedro de las nueces sin cáscara que bajaron de 19 mil a 15 mil toneladas (ODEPA, 2016).

Las exportaciones de este frutal siguen el crecimiento dado por el aumento en la superficie y la entrada en producción de estos huertos, en el período enero-agosto de 2017 se exportaron 84.765 toneladas de nueces, base nuez con cáscara, lo que corresponde a un incremento de 57% respecto a las 54 mil toneladas, base nuez con cáscara, exportadas el mismo período de 2016 y cuyo principal destino fue Turquía con 43% del volumen exportado (ODEPA, 2017).

2.2. Cultivo del nogal

El nogal es un árbol grande de hoja caduca, con médula en el centro del tronco, hojas compuestas de folíolos impares (Lemus, 2004). Es una planta monoica autofértil y de fecundación anemogama que presenta dicogamia o época de maduración diferente para cada sexo, este problema se soluciona con huertos injertados ya que el injerto con yema adulta puede producir flores masculinas al año de injertado (Barriga, 1991). Para manejar el concepto de cultivares polinizantes, se determina un porcentaje de al menos 2,5% a 5% de plantas en el huerto de un cultivar con capacidad de emitir polen en el momento que el estigma de la flor del cultivar comercial esté receptivo (FIA, 2010; Lemus, 2004).

La variedad Chandler es un cultivar altamente productivo, con cerca de 90% de las flores femeninas en yemas laterales. Es una planta moderadamente vigoroso y semierecto. Las nuez es de buen tamaño, se obtiene un 97% de nueces de calibre superior a 32 mm, redondas, suaves, con cascara algo blanda, por lo que no son buenas para la venta con cascara, aunque, al parecer, este defecto tiende a desaparecer a medida que el árbol se hace adulto. La nuez se parte con facilidad, y algunos autores describen que resiste mejor el almacenamiento que otros cultivares. El porcentaje de llenado de la nuez es del 49% (Valenzuela et al., 2001), su polinizador habitual en California era 'Franquette', posteriormente seleccionaron un polinizador específico, 'Cisco', sin embargo la excesiva susceptibilidad a bacteriosis de este último aconseja la utilización de 'Fernette' (FIA, 2002).

El cultivo comercial del nogal corresponde a una inversión a largo plazo ya que los árboles de esta especie pueden mantenerse productivos entre 30 a 60 años. En comparación con otras especies frutales, la entrada a plena producción es más lenta ya que los primeros frutos comienzan a aparecer entre el tercer y cuarto año, alcanzando el árbol su plena producción entre

el séptimo y octavo año con una producción promedio de huerto de 5.000 kilos por ha (Chilenut, 2009).

2.2.1. Requerimientos edafoclimáticos

El ciclo vegetativo del nogal se estima entre 230 a 250 días aproximadamente, dependiendo de la variedad. La especie resulta medianamente sensible a las heladas y la etapa fenológica mas sensible es la floración, en la cual una temperatura de -2°C , ocasiona daño y muerte a las flores, tiene una temperatura mínima de crecimiento de 10°C , una óptima de 21 a 28°C y una máxima de 38°C , sobre la cual se producen pérdidas de producción. La suma de temperaturas acumuladas entre yema hinchada y madurez de cosecha es de 1.300 a 1.700 grados-días, base 10°C . Grados-días son las temperaturas que se van acumulando día a día, restando a la temperatura media diaria 10°C como temperatura base, entre septiembre y abril (Villaseca, 2007).

El agua posee un rol fundamental en el funcionamiento de las plantas, ya que es el medio de transporte de nutrientes y sustancias de crecimiento, y regula la temperatura de los tejidos. El nogal es una especie que demanda una alta cantidad de agua, por lo que elegir el sistema de riego adecuado es fundamental para que la planta alcance su máximo potencial productivo (CIREN, 2016).

Es muy sensible a la sequía, por lo que no es apropiado para ser cultivado en las tierras de secano y de naturaleza seca. Para que su cultivo sea posible necesita de precipitaciones mínimas de 700 mm, siendo de 1.000-1.200 mm para explotaciones intensivas. Si la pluviometría es insuficiente o está irregularmente repartida, habrá que recurrir al riego para conseguir un desarrollo normal de los árboles y una buena producción de nuez (Lemus, 2004).

El nogal es una planta de día neutro, es decir su fotoperíodo o requerimiento de horas-luz, se encuentra entre 10 y 14 horas (Villaseca, 2007). La cantidad de frio que requiere un frutal para liberar a una yema del letargo, inducir la brotación y así dar comienzo a un nuevo ciclo de desarrollo, corresponde a lo que llamamos necesidad de "horas frio" o "unidades de frio". Sin embargo, hay numerosos factores que también se ven involucrados en la salida del receso invernal tales como: clima de la estación anterior (altas temperaturas, lluvias y radiación solar), reservas de nutrientes y nivel de exposición de las yemas dentro de la planta. Si bien, estos factores tienen relación a la salida del receso, la cuantificación del frio invernal es la forma más utilizada para estimarlo (Sepulveda et al., 2011), en el caso del nogal y como frutal de hoja caduca, requiere de 700 a 1.000 horas de frio para romper la latencia invernal y comenzar su

brotación y floración. Las horas de frío son todas aquellas horas con temperaturas iguales o menores a 7°C que se van acumulando día a día entre mayo y agosto (Villaseca, 2007).

Las raíces de los árboles adultos penetran el suelo hasta una profundidad de 3 metros y las de nuevas variedades compactas, hasta 1,5 metros, extraen el agua principalmente de los primeros 90 cm del suelo, por lo que no tienen limitaciones en su desarrollo radicular con drenaje bueno a moderado, es decir, cuando no existe un nivel freático. Si el nivel freático está a 110 cm de profundidad y el drenaje es imperfecto, el nogal tendrá leves limitaciones de crecimiento de sus raíces. No prospera con niveles freáticos a 50 cm o menores, con drenaje pobre o muy pobre. La profundidad de suelo óptima es más de 100 cm. Si el subsuelo es suelto y está constituido por piedras con matriz franco arenosa, la profundidad mínima tolerable es de 40 cm. Si el subsuelo es compacto por tener una tosca, roca o estrato de arcilla compactada, la profundidad debe superar los 120 cm; lo mínimo es 75 cm. El pH óptimo va de 5,4 a 8,4; el mínimo tolerado es 4 y el máximo 9,5. En cuanto a salinidad, el valor tolerado de conductividad eléctrica es de 1,8 dS/m y el valor crítico de 4,8 dS/m (Villaseca, 2007).

2.3. Enfermedades del nogal

Según el compendio de bacterias y hongos frutales y vides de Chile del 2010 el grupo de enfermedades que se han descrito afectando al nogal son enfermedades bacterianas como Agallas del cuello causado por *Agrobacterium tumefaciens* y la peste negra del nogal causada por *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y enfermedades fungosas como armilaria o pudrición de raíces asociada a *Armillaria mellea*, cancro gomoso causado por *Botryosphaeria dohidea*, cancrisis por *Cytospora* sp y *Fusicoccum* sp. entre otras. Pero la pudrición de raíces y del cuello por el género fungoso *Phytophthora* son una de las más importantes que afectan a este frutal junto con la peste negra en Chile (Acuña, 2010; Latorre, 2004).

El nogal es sensible a la enfermedad conocida como bacteriosis del nogal o peste negra, causada por la bacteria *X. arboricola* pv. *juglandis* (Pierce). Esta enfermedad puede producir pérdidas que dependiendo de la temporada puede comprometer sobre el 50% de la producción (INIA, 2016). Los síntomas son necrosamiento parcial o total de los amentos y lesiones necróticas se producen en las inflorescencias femeninas, las que generalmente aparecen en los foliolos, afectando levemente la forma y el crecimiento de las hojas, dando una apariencia de tejidos ennegrecidos (tejidos necróticos) (Latorre, 2004). La bacteria causa el atizonamiento y ennegrecimiento de frutos en desarrollo, que pueden caer en su totalidad. Si el ataque ocurre

más tarde o antes del endurecimiento de la cascara, los frutos enfermos permanecerán en el árbol (INIA, 2016).

La pudrición de las raíces y del cuello es una de las principales enfermedades de los nogales en Chile, siendo los organismos causales un conjunto de especies de hongos pertenecientes al género *Phytophthora*. Las especies del género que afectan al nogal son: *P. cinnamomi*, *P. citrophthora* y *P. cactorum* (Acuña, 2010; FIA, 2010; Latorre, 2004). Los árboles enfermos presentan un escaso crecimiento estacional, pobre vigor y una clorosis generalizada. Follaje ralo con hojas pequeñas y cloróticas, las que caen anticipadamente en el verano, presencia de canchales en el cuello y pudrición parcial o total de las raíces (Latorre, 2004). La pudrición del cuello se ve favorecida por el exceso de humedad en la base del tronco. Al ser un habitante del suelo persistente, puede mantenerse por largos periodos incluso en ausencia de plantas hospederas. La dispersión intrapredial ocurre en otoño cuando el terreno está húmedo y la temperatura fría y la dispersión extrapredial ocurre a través del agua de riego o suelo transportado por herramientas de cultivo y la comercialización de plantas infectadas de vivero (INIA, 2016). Recientemente se ha reportado una incidencia de 15.7% de pudrición de raíces y cuello asociado a *Phytophthora cinamomi* en la zona central de Chile (Guajardo et al., 2017).

2.3.1. Muerte regresiva de brazos en nogal

La muerte regresiva de ramillas y brazos de nogales asociado a miembros de la familia Botryosphaeriaceae han sido descritos en California, China y Corea del Sur (Chen et al., 2014; Cheon et al., 2013; Trouillas et al., 2010; Zhang et al., 2017). En el trabajo de Trouillas et al. (2010) se identificó a *Neofusicoccum parvum* desde muestras de ramillas y brazos con muerte regresiva. Posteriormente, el trabajo de Chen et al. (2014), donde muestreo 13 condados de California describieron 10 especies de Botryosphaeriaceae entre las que se incluye *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia mutila*, *D. seriata*, *Dothiorella iberica*, *Lasiodiplodia citricola*, *Neofusicoccum mediterraneum*, *N. nonquaesitum*, *N. parvum*, *N. vitifusiforme* y *Neoscytalidium dimidiatum*. Sin embargo, también describió a dos especies de la familia Diaporthaceae, *Diaporthe neotheicola* y *D. rhusicola*.

En mayo de 2012, se detectó la enfermedad muerte regresiva de brazos en nogal (*Juglans sinensis*) en dos huertos en Andong, Región de Kyoungbuk, Corea del Sur, cada uno con una incidencia del 25 al 30%. Los síntomas de la enfermedad incluyeron tizón y marchitez de los tallos, resina que fluye, deterioro oscuro dentro de la corteza de ramitas muertas y defoliación. La muerte regresiva de brazos se asoció a la especie *Neofusicoccum parvum* (Cheon et al., 2013).

Recientemente en China, en un huerto comercial de Puyang, provincia de Henan, determinaron una incidencia de muerte regresiva de ramillas de un 33%. La especie identificada fue *D. seriata* (Zhang et al., 2017).

En Chile no existen trabajos asociados a la muerte de brazos en nogal



Figura 2.2. Necrosis de la madera de ramilla de nogal después de la poda.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del ensayo

El estudio se realizó en el Laboratorio de Patología Frutal, adjunto a la Facultad de Ciencias Agrarias, ubicado en el Campus Talca de la Universidad de Talca. Chile.

3.2. Muestras, síntomas y aislamiento fungoso

Cuatro muestras de brazos de plantas de 10 años de edad provenientes de Parral (36°09' S; 71° 50' O) fueron obtenidas, mostrando síntomas de múltiples ramillas muertas junto con una muerte regresiva de brazos. Al realizar un corte transversal de los brazos sintomáticos, se observó en forma consistente un cancro en forma de V de color café oscuro en el interior. Las muestras de brazos fueron superficialmente desinfectadas usando etanol al 96% durante 3 segundos, para luego flamearlas. Después se cortaron los trozos expuestos al fuego (eliminados) y se obtuvieron pequeños trozos de madera de 3-5 mm entre tejido sano y tejido enfermo, los que se colocaron en placas de Petri (88-mm) en medio Agar-Papa-Dextrosa (APD) más Igepal CO-630 al 0.1% (Díaz y Latorre, 2014). Las placas de cultivos se incubaron por 5 días a una temperatura de 20°C.

3.3. Identificación morfológica

La identificación morfológica se realizó caracterizando el crecimiento de la colonia en medio de cultivo Agar-papa-Dextrosa (2%)-APD, donde se observaron y midieron características microscópicas como conidias y macroscópicas de picnidios con el fin de identificar el agente causal, basado en el trabajos de Úrbez-Torres et al. (2006) y Alves et al. (2004). Las dimensiones de las conidias se realizaron con un microscopio óptico (Epson), y cámara incorporada utilizando el programa MOTIC IMAGE PLUS 2.0 objetivo de 40x.

3.4. Identificación molecular

Para la identificación molecular se utilizaron cultivos de 5 días de edad en medio APD a 20°C de los aislados de *Diploda mutila* DMnog 1 y DMnog4 a los cuales se realizó extracción de ADN a partir del micelio del hongo, utilizando la metodología propuesta por Espinoza (2016) tanto en la obtención de ADN ribosomal desde micelio utilizando el kit de extracción (Wizard® Genomic DNA Purification Kit – Promega), como de las condiciones de amplificación del gen ITS (White et

al., 1990) y gen BT (Carbone and Kohn 1999). El producto PCR se envió para su purificación y secuenciación a Macrogen (www.macrogen.com, Corea del Sur). Las secuencias de los 4 aislados de *Diplodia*, se limpiaron eliminando las colas de nucleótidos fuera de los partidores y editando las secuencias con el programa Bioedit (v. 7.1.3.0; Tom Hall, Isis Pharmaceutical Inc. E.E.U.U), obteniendo cuatro secuencias de consenso para cada gen. Las cuatro secuencias de los genes ITS y BT de consenso se compararon con secuencias depositadas en el GenBank mediante el alineamiento básico de secuencias (Blastn) del NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine). Se consideró la identidad a nivel de especie cuando se obtuvo >97% de similitud con las especies depositadas de referencias en la base de datos del GenBank.

A las secuencias editadas del gen ITS y BT, se les realizó un análisis filogenético de máxima parsimonia con el programa MEGA 5 'Molecular Evolutionary Genetics Analysis software' (Tamura *et al.*, 2011). Brechas en secuencias fueron consideradas como un quinto carácter de robustez. Se utilizó la prueba de máxima parsimonia (MP) para todos los análisis, con opción de búsqueda heurística y 1000 repeticiones de secuencias como soporte de calidad. La especie *Botrytis cinerea* no. acceso GenBank EF216714B5, se utilizó como una secuencia de fuera de grupo (outgroup).

3.5. Patogenicidad en plantas de nogal cv. Chandler

Para la prueba de patogenicidad se utilizaron dos aislados de *D. mutila* DMnog1 y DMnog4, los cuales se emplearon trozos de agar de 5 mm de diámetro de crecimiento activo de 5 días de edad a 20°C en medio APD, los que se colocaron en forma invertida sobre una herida en bisel realizada al eje central de plantas nogal cv. Chandler de dos años de edad en maceta durante el receso (junio). Un igual número de plantas (n=6) fueron inoculadas con agar estéril de 5 mm que sirvieron como testigo negativo. Se agregó la inoculación de igual manera señalada arriba con el aislado Neonog 1 de *Neofusicoccum parvum*, el cual sirvió como un testigo positivo. Las plantas se dejaron en condiciones de invernadero abierto durante 16 meses, hasta su examinación.

3.6. Diseño de experimento

Se utilizó un diseño completamente al azar, donde la unidad experimental correspondió a una planta de nogal y se utilizaron seis repeticiones. Los promedios de las lesiones de cada hongo fueron comparadas mediante un análisis de varianza (ANDEVA) ($P < 0,05$). Cuando se detectaron

diferencias significativas, los promedios se sometieron a una prueba de rango múltiple de Tukey (5%). Se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.1

IV. RESULTADOS

4.1. Aislamientos e Identificación morfológica de aislados de *D. mutila*

Desde los aislamientos de los trozos de madera de brazos con muerte regresiva se logró obtener a cuatro aislados DMnog1, DMnog2, DMnog3 y DMnog4. Los aislados se caracterizaron por presentar en medio de cultivo APD, colonias blancas que se tornan a grises de rápido crecimiento, con abundante micelio aéreo, después de 7 días a 20°C. Estos aislados se caracterizan por tener un reverso de la placa de Petri de color negro después de 15 días y después de 20 días se observan abundantes picnidios agregados en el medio de cultivo. .

Desde los cultivos puros de los cuatro aislados de al menos 20 a 30 días de incubación a 20-22°C, se observaron picnidios negros maduros que en su interior contenían conidias. Las conidias observadas fueron hialinas, unicelulares, elipsoidal a cilíndrica de dimensiones (26,3-) $24,0 \pm 1,4$ (-22,1) X (15,3-) $12,9 \pm 1,0$ (-11,5) μm con 1,9 de relación de largo/ancho.

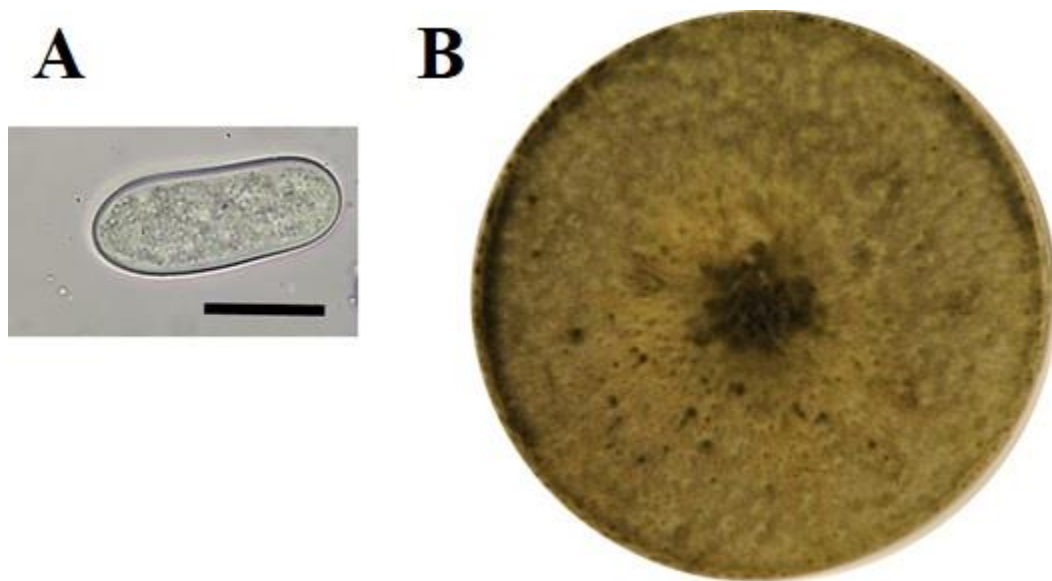


Figura 4.1. Características culturales y morfológicas de aislados chilenos de *D. mutila* obtenidos desde brazos con muerte regresiva. **A**, Conidia unicelular, aseptada con pared delgada del hongo *D. mutila* capturadas con el programa MOTIC IMAGE PLUS 2.0 ^{ML} con objetivo de 40X. **B**, Colonia gris-olivacea en medio de cultivo APD después de 10 días a 20°C de incubación.

4.2. Identificación molecular de aislados de *D. mutila*

Las secuencias de los cuatro aislados para el gen ITS, se compararon mediante análisis de Blast obteniendo una similitud del 99% con la especie ex-type de *D. mutila*. Las secuencias de los cuatro aislados para el gen BT se obtuvieron similitudes del 98% con la especie ex-type de *D. mutila*.

El análisis filogenético concatenado (ITS + BT), se realizó con 4 secuencias de ADN de aislados de *D. mutila* amplificadas con los partidores ITS1 y ITS4 de la región ITS y partidores Bt2a y Bt2b de la porción del gen BT. El alineamiento incluyó 19 secuencias: 6 de *D. mutila*, 3 de *D. seriata*, 3 de *N. mediterraneum*, 3 de *N. parvum*, 3 de *B. dothidea* y una de *Botrytis cinerea*. Se agregaron aislados fúngicos de diferentes especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae asociadas a enfermedades en nogales depositadas en el GenBank (Cuadro 4.1). La especie *Botrytis cinerea* se utilizó como outgroup para enraizar el filograma. Las secuencias de los 6 aislados se agruparon en un solo clado con un 99% de soporte, junto con la secuencia de referencia de *D. mutila* ex-type CBS 112553. La especie *D. seriata* se agruparon en el clado II con un 99% de soporte, siendo más cercano evolutivamente a *D. mutila*. Las especies *N. mediterraneum* y *N. parvum* se agruparon en dos clusters cercanos evolutivamente, clado III y clado IV con un soporte de 98%, respectivamente, en el clado V se encuentra *B. dothidea*.

Cuadro 4.1. Secuencias de aislados chilenos de *Diplodia mutila* depositados en el GenBank para los genes ITS y BT.

Aislados	No. de Acceso del GenBank		Hospedero
	Gen ITS	Gen BT	
DMnog1	MG386821	MG418832	<i>Junglans regia</i>
DMnog2	MG386822	MG418833	<i>Junglans regia</i>
DMnog3	MG386823	MG418834	<i>Junglans regia</i>
DMnog4	MG386824	MG418835	<i>Junglans regia</i>

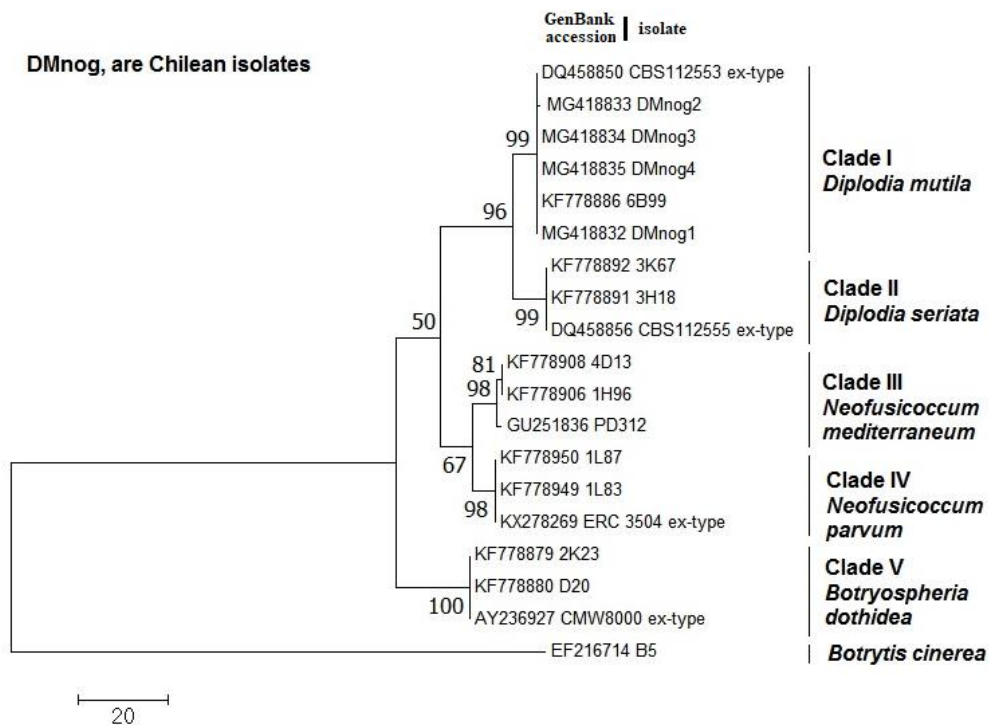


Figura 4.2. Análisis concatenado de los genes ITS + BT con máxima parsimonia de aislados de *Diplodia*, comparado con otras especies de Botryosphaeriaceae causantes de enfermedades en nogales depositadas en el GenBank. El árbol se enraizó con secuencia de la especie *Botrytis cinerea* (no. acceso GenBank EF216714B5).

4.3. Patogenicidad en plantas de nogal cv. Chandler de 2 años.

Las plantas de nogal cv. Chandler inoculadas con los aislados DMnog1 y DMnog4 de *D. mutila*, desarrollaron síntomas que incluyen pocas ramificaciones, caída prematura de hojas y muerte regresiva del eje central de las plantas de nogales (Figura 4.3). Al realizar un corte longitudinal de la zona inoculada del eje central se observó en forma consistente la necrosis de la madera, en donde se tomaron mediciones de avance de lesiones en milímetros (Cuadro 4.2). En las plantas testigos no se observaron síntomas de necrosis de la madera como de síntomas externos, es decir estaban sanas. Las plantas inoculadas con *N. parvum* desarrollaron síntomas de similares a lo descrito para *D. mutila*, desarrollando lesiones de 76 mm (Cuadro 4.2).

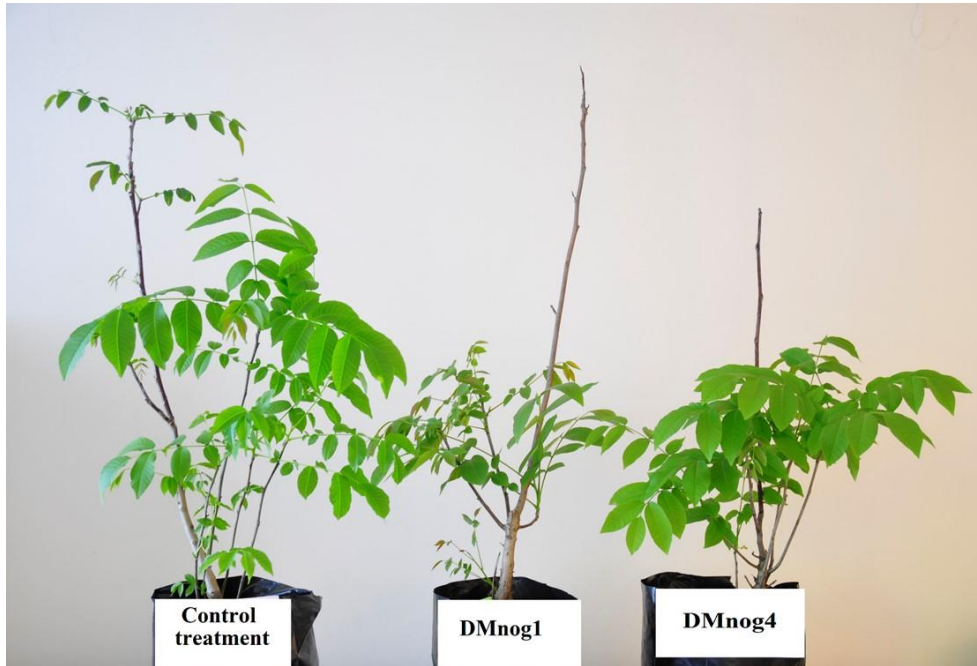


Figura 4.3. Patogenicidad de plantas de nogal cv. Chandler inoculadas con aislados de *D. mutila* que muestran muerte regresiva del eje central. A la izquierda se indica la planta testigo (tratamiento control) sin síntomas de muerte regresiva, es decir con brotación y crecimiento de los brotes.



Control treatment Isolate DMnog1 Isolate DMnog4

Figura 4.4. Patogenicidad de plantas de nogal inoculadas con aislados DMnog1 y DMnog4 que muestran la necrosis de la madera. Solo las plantas inoculadas fueron positivas a los reaislamiento de *D. mutila*.

Cuadro 4.2. Prueba de patogenicidad que muestra el avance de lesión en plantas de nogal cv. Chandler de dos años inoculados con aislados de *Diplodia mutila* y *Neofusicoccum parvum*.

Aislados fungosos	Repetición	Avance lesión (mm)*
Testigo negativo	1	0,0
	2	2,5
	3	1,1
	4	2,5
	5	5,6
	6	1,6
Promedio ± Des. Est.		2,2 ± 1,9 a
Neofusicoccum parvum aislado Neonog1	1	85,6
	2	79,3
	3	89,0
	4	50,2
	5	92,6
	6	62,3
Promedio ± Des. Est.		76,5 ± 16,7 b
D. mutila aislado DMnog1	1	56,3
	2	72,2
	3	32,3
	4	50,2
	5	49,0
	6	77,6
Promedio ± Des. Est		56,3 ± 16,6 b
D. mutila aislado DMnog4	1	53,2
	2	89,5
	3	52,3
	4	55,6
	5	63,3
	6	50,3
Promedio ± Des. Est		60,7 ± 14,8 b

*Promedios seguidos con letras distintas en columnas indican diferencia significativa según prueba de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.4. Re aislamiento del hongo.

El re-aislamiento del hongo *D. mutila* fue del 100% positivas en las plantas inoculadas con los aislados DMnog1 y DMnog4 en placas con medio de cultivo APD. El reaislamiento también fue de un 100% en aquellas plantas inoculadas con *N. parvum* (testigo positivo). En las plantas controles (testigo negativo) no se logró aislar a ningún hongo fitopatógenos desde la zona de la herida, siendo negativas (Figura 4.5).

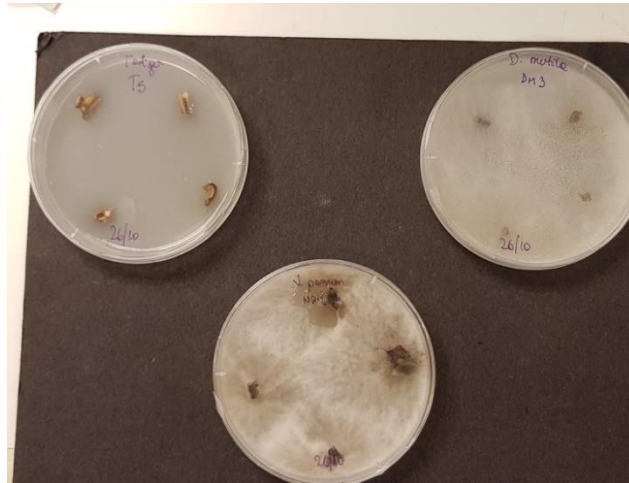


Figura 4.5. Reaislamiento desde plantas de nogal inoculadas con *D. mutila* y *N. parvum* en placas de Petri con medio de cultivo APD después de 3 días a 20°C.

V. DISCUSIÓN

Este estudio constituye el primer trabajo nacional que determina e identifica a aislados del hongo *Diplodia mutila* pertenecientes a la familia de las Botryosphaeriaceae, causando la muerte regresiva de brazos en plantas de nogal cv. Chandler en la Región del Maule. Por lo tanto este trabajo constituye el primer reporte de *D. mutila* causando muerte regresiva de brazos de nogal en Chile.

En Chile, previamente la especie *D. mutila* ha sido reportada asociada a la muerte de brazos en *Vitis vinifera* y causando canchros en *Araucaria araucana* (Morales et al., 2012; Besoain et al., 2017). En este sentido las plantas de nogales se constituye como otro hospedero para el hongo fitopatógeno *D. mutila* en Chile.

El presente estudio ratifica lo determinado por Cheng et al. (2014), quienes reportaron y caracterizaron a 10 especies de Botryosphaeriaceae entre lo que se encuentra *D. mutila* asociados a canchrosis y muerte de ramillas de nogales en California.

Los trabajos realizados en China por Zhang et al. (2017), Corea del Sur por Cheon et al. (2013) y California por Chen et al. (2014) y Trouillas et al. (2010) demostraron que los nogales afectados con canchros, muerte de ramillas y muerte regresiva de brazos es causada por especies de la familia Botryosphaeriaceae. Aunque, en la investigación de Chen et al. (2014) describen también a dos especies de Diaporthe, *D. neotheicola* y *D. rhusicola*, asociadas a la enfermedad, es decir en un complejo fungoso donde los hongos más predominantes son las especies de Botryosphaeriaceae. Tal situación podría ser similar en Chile por la presencia cada vez más notoria de brazos y ramillas muertas a nivel comercial en plantaciones de nogales, por tal razón la presente descripción corresponde solo a la visión de solo un huerto comercial.

La identificación cultural y morfológica de los aislados de *D. mutila* coinciden con la descripción propuesta por Alves et al. (2004), quienes describen a la especie *D. mutila*, proporcionando a la especie modelo o ex-type de la especie *D. mutila*.

La identificación molecular obtenida con los aislados chilenos de *D. mutila*, coinciden y concuerdan con los trabajos de Alves et al. (2004) y Chen et al. (2014) en donde utilizando los genes ITS y BT identifican en forma clara a *D. mutila*, los cuales se agruparon junto con la especie ex-type de *D. mutila*, utilizando un análisis filogenético y separándola de otras especies de Botryosphaeria cercanas como *D. seriata*. Sin embargo, en el trabajo de Alves et al. (2004) solo utilizaron el gen ITS y en el trabajo de Chen solo realizó un análisis filogenéticos individuales de

los genes ITS y BT. Aunque este último trabajo también incorporó el gen del factor de elongación (1- α), obteniendo un estudio filogenético con tres genes, a diferencia del presente trabajo que solo utilizó ITS y BT. Es importante indicar que actualmente las especies de *Botryosphaeria* deben ser identificadas molecularmente utilizando al menos los genes ITS y BT, sugiriendo la utilización de hasta 5 genes para tener una identificación robusta (Slippers et al., 2013).

Las especies de la familia Botryosphaeriaceae son patógenos comunes que causan la pudrición de la fruta y la muerte regresiva de muchas plantas leñosas, donde los síntomas son canchales en ramas y tallos (Moral et al., 2010). En California, se han reportado hongos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae, en donde causan enfermedades en varios árboles frutales y de frutos secos importantes como el nogal (*Juglans regia*), almendras (*Prunus dulcis*), palto (*Persea americana*), vid (*Vitis vinifera*), olivo (*Olea europaea*) y pistacho (*Pistacia vera*). Los síntomas de la enfermedad causados por los hongos Botryosphaeriaceae en árboles frutales y de nueces en California incluyen; cancro de tallo y rama, tizón y marchitez de la fruta, tizón de los brotes y marchitez de la rama, tizón de la hoja (Chen et al., 2014), muerte regresiva de ramillas y ramas (Úrbez-Torres et al., 2013), algunos de estos síntomas coinciden con los que se presentan en Chile donde la familia de los hongos Botryosphaeriaceae son las responsables y que se ha reportado en huertos de la Región del Maule la muerte regresiva de brazos en nogales causada por la especie *Diplodia mutila* (Díaz et al., 2017).

Finalmente es importante indicar que el presente estudio complementa los trabajos realizados en California, China y Corea del Sur en determinar la etiología de la muerte regresiva de brazos en nogales y por ende es necesario profundizar la actual investigación para conocer el real estado sanitario de las plantaciones de nogales para poder implementar medidas de manejo y mitigación de la enfermedad.

VI. CONCLUSIÓN

En base al estudio realizado se concluye que:

- Los aislados fungosos obtenidos desde brazos de nogal con muerte regresiva en la Region del Maule se caracterizaron morfológicamente, molecularmente y patogénicamente como *Diplodia mutila*.
- La especie *D. mutila* es una de las especies causantes de la muerte regresiva de brazos en nogal en Chile.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Acuña, R. 2010. Compendio de bacterias y hongos de frutales y vides de Chile. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Santiago, Chile. 150p.

Acuña, D. 2017. Sustentabilidad en el sector frutos secos: avances y desafíos. Disponible en <http://www.odepa.gob.cl/articulo/sustentabilidad-en-el-sector-frutos-secos-avances-y-desafios-enero-de-2017/>. Consultado el: 12 de agosto de 2017.

Alves, A., Correia, A., Luque, J., and Phillips, A. J. L. 2004. *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. *Mycologia* 96: 598-613.

Asociación de Productores y Exportadores de nueces de Chile (Chilenut). 2009. Comercialización y actualidad. Recuperado en: <http://www.chilenut.cl/archivos/Estudio-Demanda-Interna.pdf> Consultado 21 de Octubre de 2017.

Barriga, C. 1991. Nueces y Almendras situación actual y perspectivas Corporación de Fomento de la Producción (CORFO). Santiago, Chile. 112p.

Besoain, X., Guajardo, J., Camps, R. 2017. First Report of *Diplodia mutila* Causing Gummy Canker in *Araucaria araucana* in Chile. *Plant Dis.* 101(7): 1328-1328.

Bravo, J. 2012. Industria de frutos secos, evolución destacada y amplio potencial. Disponible en <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/6788.pdf> Consultado el: 12 de agosto de 2017.

Carbone, I., and Kohn, L. M. 1999. A method for designing primers sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553-556.

Centro de Información de Recursos Naturales (CIREN). 2016. Manual técnico productivo y económico Nogal, pub n°194. Recuperado en: <http://bibliotecadigital.ciren.cl/handle/123456789/26088> Consultado 23 de Octubre de 2017.

Chen, S. F., Morgan, D. P., Hasey, J. K., Anderson, K., and Michailides, T. J. 2014. Phylogeny, morphology, distribution, and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* from English walnut in California. *Plant Dis.* 98:636-652.

Cheon, W., Kim, Y., Lee, S., Jeon, Y., Chun, I. 2013. First Report of Branch Dieback of Walnut Caused by *Neofusicoccum parvum* in Korea. *Plant Dis.* 97(8):1114-1114.

Fundacion para la Innovacion Agraria (FIA). 2002. Frutales de nuez mercado y tecnología. Recuperado en: <http://bibliotecadigital.fia.cl/handle/20.500.11944/145473?show=full&locale-attribute=en_US>. Consultado el: 23 de Noviembre de 2017.

Fundacion para la Innovación Agraria (FIA). 2010. Producción de nueces de nogal. Manuales FIA de apoyo a la formación de Recursos Humanos para la Innovación Agraria. Santiago, Chile. 100p.

Fundacion para la Innovacion Agraria (FIA). 2017. Frutales de Nuez Rubro Nogales. Recuperado en:
<<http://bibliotecadigital.fia.cl/bitstream/handle/20.500.11944/145878/Agenda%20frutales%20de%20nuez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Consultado el: 23 de Noviembre de 2017.

Guajardo, J., Saa, S., Camps, R., and Besoain, X. 2017. Outbreak of crown and root rot of walnut caused by *Phytophthora cinnamomi* in Chile. *Plant Dis.* 101:636-636.

Latorre, B. 2004. Enfermedades de las plantas cultivadas. Sexta edición. Ediciones Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 638 p.

Lemus, G. 2004. Cultivo del Nogal (INIA). Recuperado en:
<<https://es.scribd.com/doc/137692111/Cultivo-Del-Nogal-INIA>>. Consultado el: 23 de Mayo de 2017.

Morales, A., Besoain, X., and Piontelli, E. 2007. Estudio etiológico de *Botryosphaeria* en diferentes frutales y evaluación de su virulencia en palto y sarmientos de vid. *Fitopatología* 42(3):88.

Morales, A., Latorre, B., Piontelli, E., and Besoain, X. 2012. *Botryosphaeriaceae* species affecting table grape vineyards in Chile and cultivar susceptibility. *Cien. Inv. Agr.* 39(3): 445-458.

Moral, J., Muñoz-Díez, C., González, N., Trapero, A., and Michailides, T. 2010. Characterization and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species collected from olive and other hosts in Spain and California. *Phytopathology* 100:1340-1351.

Muñoz, M. 2017. Nueces: Chile la mayor tasa de crecimiento productivo medio anual. Disponible en <http://www.odepa.cl/wp-content/uploads/2017/11/Nueces.pdf>. Consultado el: 28 de noviembre de 2017.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2013. Ficha tecnica economica del nogal variedad Chandler de la Region Metropolitana. Recuperado en: http://www.odepa.cl/wp-content/uploads/2013/09/Ficha_costo_nogal_chandler_metropolitana_2013.pdf. Consultado el: 25 de mayo de 2017.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2013. Ficha tecnica economica del nogal variedad Serr de la Region Metropolitana. Recuperado en: http://www.odepa.cl/wp-content/uploads/2013/09/Ficha_costo_nogal_serr_metropolitana_2013.pdf. Consultado el: 25 de mayo de 2017.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2016. Panorama de la Agricultura Chilena 2015. Recuperado en: http://www.odepa.gob.cl/documentos_informes/panorama-de-la-agricultura-chilena-2015/ >. Consultado el: 25 de mayo de 2017.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2016. Boletín Frutícola. Recuperado en: <http://www.odepa.cl/boletin/boletin-fruticola-con-informacion-a-octubre-de-2016/>>. Consultado el: 27 de mayo de 2017.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2017. Panorama de la Agricultura Chilena 2015. [En línea] Recuperado en: http://www.odepa.gob.cl/documentos_informes/panorama-de-la-agricultura-chilena-2015/> Consultado el: 25 de mayo de 2017.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2017. Boletín de Fruta Fresca. Recuperado en: <http://www.odepa.cl/boletin/boletin-de-fruta-fresca-septiembre-de-2017/>>. Consultado el: 15 de octubre de 2017.

Reyes, M. 2008. Situación y perspectivas de los cultivos de nogal y almendro en Chile (ODEPA). Recuperado en: <http://www.odepa.cl/odepaweb/publicaciones/doc/2095.pdf>>. Consultado el: 21 de Abril de 2017.

Sepúlveda, Á., Lepe, V., y Yuri, J. 2011. Requerimiento de frutales en frío. Centro de pomáceas, Universidad de Talca. Recuperado en: <http://pomaceas.otalca.cl/html/Docs/pdf/BoletinJulio2011.pdf>> Consultado 20 de Octubre de 2017.

Slippers, B., Boissin, E., Phillips, A. J. L., Groenewald, J. Z., Lombard, L., Wingfield M. J., Postma, A., Burgess, T., and Crous P. W. 2013. Phylogenetic lineages in the Botryosphaerales: a systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology* 76: 31-49.

Tamura, K., Petersen, D., Petersen, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.

Trouillas, F., Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., and Gubler, W. 2010. First Report of Twig and Branch Dieback of English Walnut (*Juglans regia*) Caused by *Neofusicoccum mediterraneum* in California. *Plant Dis.* 94(10):1267-1267.

Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G.M., Voegel, T.M., and Gubler, W.D. 2006. Identification and distribution of Botryosphaeria spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Dis.*90:1490-1503.

Úrbez-Torres, J., Peduto, F., Vossen, P., Krueger, W., and Gubler, W. 2013. Olive twig and branch dieback: Etiology, incidence, and distribution in California. *Plant Dis.* 97:231-244.

United States Department of Agriculture (USDA). 2017. Foreign Agricultural Service Office of Global Analysis. Tree Nuts: World Markets and Trade. Recuperado en: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/TreeNuts.pdf>> Consultado el: 20 de Octubre del 2017.

Valenzuela, J., Lobato, A., y Lemus, G. 2001. El nogal en Chile. INIA. Santiago, Chile. 224p.

Villaseca, S. 2007. El nogal, una especie exigente en suelo y clima. INIA Tierra Adentro Recuperado en: <<http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR34252.pdf>> Consultado 20 de Octubre de 2017.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: PCR, A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Snisky, and T. J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA, USA.

Zhang, M., Zhang, Y. K., Geng, Y. H., Zang, R., and Wu, H. Y. 2017. First report of *Diplodia seriata* causing twig dieback of English walnut in China.

