



UNIVERSIDAD DE TALCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE AGRONOMÍA

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD BIOCONTROLADORA DE AISLADOS DE
TRICHODERMA SPP. SOBRE *NEOFABRAEA VAGABUNDA* CAUSANTE DE LA
ENFERMEDAD “OJO DE BUEY” EN MANZANA (*MALUS X DOMESTICA*) CV. CRIPP’S
PINK**

MEMORIA DE TÍTULO

BÁRBARA BELÉN RÍOS ZAMORANO

TALCA-CHILE

2021

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.

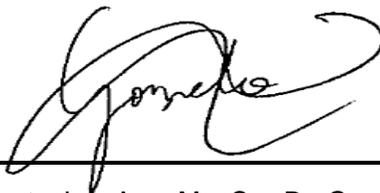


Talca, 2021

APROBACIÓN:



Profesor Guía: Ing. Agr., M.S., Ph.D. Mauricio Lolas Caneo
Profesor de la Escuela de Agronomía
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad de Talca



Profesor Informante: Ing. Agr., Mg. Cs., Dr. Gonzalo A. Díaz
Profesor de la Escuela de Agronomía
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad de Talca

Fecha de presentación de Memoria de Título: 10 de mayo 2021

APROBACIÓN

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer a mi madre Gladys Zamorano Contreras que en todo momento de mi vida y en especial en los años de la carrera no me ha dejado nunca ningún momento sola, gracias por cuidarme, por tu cariño incondicional, por ser un ejemplo de mujer luchadora, por recordarme que tengo las condiciones y capacidades para lograr todo lo que me proponga a pesar de las dificultades que se presenten. Gracias mamita por estar y escucharme en aquellos momentos que me sentía devastada y cansada. Muy agradecida y orgullosa de ser tu hija. Te amo.

Agradezco también a mi padre Eduardo Ríos Olivares, que siempre se preocupó de decirme al subir al bus “¡Estudia barbarita, tú puedes! y mucho ánimo para empezar y mejorar en esta nueva semana”. Nunca perdiste la fe de que lograría la gran y esperada meta. Muchas gracias por ser atento, cariñoso y alegre; elevaste mi ánimo cuando más lo necesitaba. También mantengo siempre presente todo el sacrificio, esfuerzo y dedicación que tienes en tu arduo trabajo, eres un gran ejemplo de constancia, paciencia y fuerza mental. Gracias por todos aquellos momentos y por muchos otros, agradecida de corazón. Te amo.

Gracias a esta bella etapa, encontré buenas amigas y compañeras; Fran Adriazola, Marcela Catrileo, Catalina Rojas, Sofia Rossi, Cote Castro y María Elena Cornejo. Estas bellas mujeres estuvieron presentes en momentos tristes y alegres donde nos apoyamos compartiendo experiencias y consejos para darnos fuerzas. Fueron y serán siempre parte de mi vida. Gracias por compartir muchas horas de estudio y momentos de diversión.

Además, agradezco a todos los compañer@s que entregaron su buena onda y energía positiva en el transcurso de los años de universidad.

En este último tiempo he recibido apoyo emocional y cariño de mi pololo Ernes Soto Carreño y de mi mejor amiga Barbara Aburto Retamal. Gracias infinitas. Los amo.

Gracias a la profesora Claudia Moggia por su apoyo y orientación en el análisis estadístico; es una excelente profesional, con vocación y apasionada en lo que ejerce.

Por último, agradecer al equipo del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca a Marcela Cáceres, a los profesores Mauricio Lolos y Gonzalo Díaz por su disposición y tiempo requerido en este trabajo. En especial a la señora Cecilia Saavedra por su apoyo emocional y cariño. Al profesor Cristian Muñoz por su buena voluntad y entrega de conocimiento.

RESUMEN

La enfermedad Ojo de Buey, causada por el hongo fitopatógeno *Neofabraea vagabunda*, se caracteriza por provocar una o numerosas lesiones con halos concéntricos sobre lenticelas o daños mecánicos ocasionados en la piel, progresando hacia una pudrición de la pulpa lo que disminuye significativamente la calidad y cualidad de la fruta. La infección de las lenticelas ocurriría mayoritariamente cerca de la cosecha de las manzanas, favoreciéndose con lluvias que ocurren en ese período. La expresión de la pudrición ocurre durante el almacenaje de las manzanas y muchas veces en los mercados de destino. Aplicaciones de fungicidas autorizados antes de la cosecha tendrían actividad en disminuir el número de infecciones, sin embargo, esta alternativa no puede ser usada en manzanas bajo producción orgánica. Es por esto, que se evaluó la capacidad biocontroladora *in vitro* de siete aislados de *Trichoderma* spp. colectados de diferentes zonas geográficas para luego enfrentarlos a diez aislados de *N. vagabunda* de diferentes huertos de manzanas Cripp's Pink. Para esto se realizaron pruebas de enfrentamiento usando técnica de cultivo dual en placas Petri. Se empleó siembras seriadas, separadas por 0, 20 y 30 días, de manera de permitir el crecimiento y establecimiento del patógeno para luego confrontarlos con su respectivo antagonista. Posteriormente, las placas duales y los controles fueron incubados a 22 ± 1 °C, siendo la unidad experimental una placa Petri, y utilizándose cinco repeticiones. Se analizó el porcentaje de crecimiento radial (ICR %) y se evaluó la velocidad de crecimiento de *Trichoderma* spp. midiendo el área de crecimiento con el programa Imagen J. Los resultados de ICR (%) se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) o de Kruskal Wallis ($p \leq 0.05$), dependiendo de la homogeneidad de las varianzas obtenidas. Los resultados indicaron que la mayor capacidad biocontroladora de *Trichoderma* spp. se logró cuando el patógeno se encuentra con cero días de crecimiento, destacando las nuevas cepas de *Trichoderma* spp. en estudio presentando altos ICR (%) y con un comportamiento similar a la capacidad antagónica de las formulaciones comerciales Tiffi® y Mamull®. A medida que el patógeno aumentó su crecimiento durante 20 días, el ICR (%) no presentó diferencias significativas, demostrando un crecimiento antagónico homogéneo, el cual se mantuvo en 8 aislados de *N. vagabunda*. Sin embargo se diferenció por su crecimiento lento y capacidad antagónica con (16 y 23%) el *Trichoderma* spp. Nancagua. Por consiguiente, si solo se compara *Trichoderma* spp. comerciales, el comportamiento es esperado ya que su efectividad y alto espectro de control se refleja en el tratamiento de Tiffi a los 30 días de crecido el patógeno. Además de los anteriores resultados, se obtuvo un resultado asertivo según el coeficiente de correlación entre las dos formas de medir la capacidad de control, es decir que existe relación entre variable Área (mm²) y ICE (%) de los tratamientos. Se puede concluir que el efectivo control se logra cuando existe optimización en la aplicación de la formula del agente control, para esto se debe conocer: biología del patógeno, epidemiología de la enfermedad, ecología del biocontrolador, la interacción entre

microorganismos, conocer la planta hospedera, microbioma de la filósfera y factores ambientales. Con todos estos conocimientos previos se puede generar un sistema adaptado a una producción masiva logrando eficiencia y eficacia en el manejo de control biológico.

Palabras clave: Control biológico, *Trichoderma* spp., mecanismos de acción, competencia y ICR (%) (Porcentaje de inhibición del crecimiento radial), fitopatógeno y *N. vagabunda*.

ABSTRACT

The Bull's Eye Rot disease, caused by the phytopathogenic fungus *Neofabraea vagabunda*, is characterized by causing one or numerous lesions with concentric halos on lenticels or mechanical damage caused to the skin, progressing towards rotting of the pulp which significantly decreases the quality of the fruit. The infection of the lenticels would occur mainly near the apple harvest, favored by the rains that occur in that period. The expression of rot occurs during the storage of the apples and many times in the destination markets. Applications of authorized fungicides before harvest would have activity in reducing the number of infections, however, this alternative cannot be used on apples under organic production. For this reason, the in vitro biocontroller capacity of seven isolates of *Trichoderma* spp. collected from different geographical areas and then confronted with ten isolates of *N. vagabunda* from different Cripp's Pink apple orchards. For this, confrontation tests were carried out using dual culture technique in Petri dishes. Serial sowings were used, separated by 0, 20 and 30 days, in order to allow the growth and establishment of the pathogen and then confront them with their respective antagonist. Subsequently, the dual plates and the controls were incubated at 22 +1 °C, the experimental unit being a Petri dish, and using five repetitions. The percentage of radial growth (ICR%) was analyzed and the growth rate of *Trichoderma* spp. measuring the growth area with the Image J program. The ICR results (%) were subjected to analysis of variance (ANOVA) or Kruskal Wallis ($p \leq 0.05$), depending on the homogeneity of the variances obtained. The results indicated that the greater biocontrolling capacity of *Trichoderma* spp. it was achieved when the pathogen is with zero days of growth, highlighting the new strains of *Trichoderma* spp. under study showing high ICR (%) and with a behavior similar to the antagonistic capacity of the commercial formulations Tiffi® and Mamull®. As the pathogen increased its growth for 20 days, the ICR (%) did not show significant differences, demonstrating a homogeneous antagonistic growth, which was maintained in 8 isolates of *N. vagabunda*. It was differentiated by its slow growth and antagonistic capacity with (16 and 23%) *Trichoderma* spp. Nancagua. Therefore, if only *Trichoderma* spp. commercial behavior is expected since its effectiveness and high control spectrum is reflected in the Tiffi treatment 30 days after the pathogen has grown. In addition to the previous results, an assertive result was obtained according to the correlation coefficient between the two ways of measuring the control capacity, that is, there is a relationship between the variable Area (mm²) and ICE (%) of the treatments. It can be concluded that effective control is achieved when there is optimization in the application of the control agent formula, for this it is necessary to know: biology of the pathogen, epidemiology of the disease, ecology of the biocontroller, the interaction between microorganisms, knowing the host plant, microbiome of the philosopher and environmental

factors. With all this prior knowledge, a system adapted to mass production can be generated, achieving efficiency and effectiveness in the management of biological control.

Key words: Biological control, *Trichoderma spp.*, Mechanisms of action, competition and ICR (%) (Percentage of inhibition of radial growth), phytopathogen and *N. vagabunda*.

ÍNDICE

	Página
1.INTRODUCCIÓN	12
1.1 Hipótesis del estudio	13
1.2 Objetivo general	14
2.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Importancia del manzano	15
2.2 Producción nacional.....	16
2.3 Morfología y Fenología.....	17
2.4 Variedades Club.....	18
2.4.1 Cripp's Pink	18
2.4.2 Almacenaje.....	19
2.5 Enfermedades en postcosecha.....	19
2.5.1 Enfermedad "Ojo de Buey".....	20
2.6 Control Biológico	25
2.6.1 <i>Trichoderma</i> spp.	26
2.6.2 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp.	27
2.6.2.1 Competencia	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
5. CONCLUSIONES	47
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1. Exportaciones de fruta fresca de Chile al 2021 (ton) (Fuente: ODEPA, 2021).	16
Figura 2.2 Triángulo de la enfermedad “Ojo de Buey”.	20
Figura 2.3 Tamaño lenticelar de manzanas Cripp’s Pink en Huerto (Lolas, 2018).....	21
Figura 2.4 Ciclo reproductivo del hongo Ascomycetes (Fuente: Micología Médica Básica Segunda edición, 2000. Alexandro Bonifaz).....	22
Figura 2.5 Expresión de síntomas en postcosecha después de 3 a 4 meses en almacenaje (Lolas, 2018).....	23
Figura 2.6 Lesión esporulada con formación de acérvulos luego de ser almacenada (Lolas, 2018).	23
Figura 2.7 Evolución del diámetro de la pudrición “Ojo de Buey” en manzanas Cripp’s Pink (Lolas, 2018).....	24
Figura 2.8 Evolución desde síntoma (lesión) a signo (esporulación) (Lolas, 2019)	25
Figura 3.1 <i>Trichoderma</i> spp. Nativos y Comerciales en Evaluación.	29
Figura 3.2 Diagrama de enfrentamiento del <i>Trichoderma</i> spp. Mamull con el aislado 34 de <i>N. vagabunda</i> y sus 5 repeticiones.....	30
Figura 4.1 Inhibición del crecimiento radial (ICR; %) <i>in vitro</i> de 10 aislados del hongo fitopatógeno <i>N. vagabunda</i> por siete aislados del hongo biocontrolador <i>Trichoderma</i> spp. cuando fueron enfrentados al mismo tiempo (0 días). Con 6 días de incubación a 22°C.....	33
Figura 4.2 Inhibición del crecimiento radial (ICR; %) <i>in vitro</i> de 10 aislados del hongo fitopatógeno <i>N. vagabunda</i> por siete aislados del hongo biocontrolador <i>Trichoderma</i> spp. cuando fueron enfrentados a los 20 días de crecimiento del patógeno. Con 6 días de incubación a 22°C.....	36
Figura 4.3 Inhibición del crecimiento radial (ICR; %) <i>in vitro</i> de 10 aislados del hongo fitopatógeno <i>N. vagabunda</i> por siete aislados del hongo biocontrolador <i>Trichoderma</i> spp. cuando fueron enfrentados a los 30 días de crecimiento del patógeno. Con 6 días de incubación a 22°C.....	39
Figura 4.4 Crecimiento <i>Trichoderma</i> spp. en área (mm ²) enfrentados a 0 días.....	42
Figura 4.5 Crecimiento <i>Trichoderma</i> spp. en área (mm ²) enfrentados a 20 días.....	43
Figura 4.6 Crecimiento <i>Trichoderma</i> spp. en área (mm ²) enfrentados a 30 días.	44

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 3.1 Escala utilizada por Ezziyyani et al. (2004a) para la evaluación de la capacidad antagónica de los biocontroladores.....	31
Cuadro 4.1 Tablas de Medias para ICR (%) a 0 días. Aislado de <i>N. vagabunda</i> vs <i>Trichoderma</i> spp. con intervalos de confianza del 95,0% ($p<0,05$).....	34
Cuadro 4.2 Tablas de Medias para ICR (%) a 20 días. Aislado de <i>N. vagabunda</i> vs <i>Trichoderma</i> spp. con intervalos de confianza del 95,0% ($p<0,05$).....	37
Cuadro 4.3 Tablas de Medias para ICR (%) a 30 días. Aislado de <i>N. vagabunda</i> vs <i>Trichoderma</i> spp. con intervalos de confianza del 95,0%	40
Cuadro 4.4 Coeficiente de Correlación ÁREA (mm ²) vs ICR (%).....	46

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de manzanas frescas en Chile se estima entre los 7-9 kg / per cápita / año, cifra muy inferior a lo que se consume en Europa, con alrededor de 20 kg/per cápita / año (Palomo *et al.*,2010). La manzana es infaltable en la dieta de las personas, siendo preferida por sus propiedades nutricionales. Como alto consumo de fruta fresca con piel se ve impulsado por el efecto benéfico en la salud humana, el desafío está en bajar la carga de agroquímicos como residuo sobre la piel, aumentando así el valor agregado de la manzana, consiguiente a contribuir y convertir a Chile en potencia agroalimentaria.

La industria de la manzana chilena se ha posicionado internacionalmente, logrando estabilidad en la actividad económica en diversos mercados de destino (Red Agrícola, 2017). Durante la temporada 2021, los mercados de destinos con mayor tonelaje de manzana fresca fueron Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú (ODEPA, 2021). Así, Chile se destaca por ser el principal exportador del hemisferio sur, despachando además fruta fresca en contra estación, hecho que constituye una importancia estratégica para la industria de la manzana. También ha logrado abastecer y proporcionar con fruta a nivel mundial, posicionándose como segundo mayor exportador, con envíos principalmente a Estados Unidos, Colombia y Arabia Saudita (ODEPA, 2020). La oportunidad que tiene Chile de poseer una extensa cantidad de superficie destinada a esta industria permite alcanzar y mantener los niveles de producción de fruta fresca de manzana.

Según CIREN (2020), la superficie nacional de manzanas es de 32.313,7 hectáreas entre variedades rojas y verdes, concentrándose principalmente en las Regiones del Maule y O'Higgins, con 19.637 y 7.734,4 hectáreas respectivamente. Dentro del grupo de manzanas rojas que más se cultivan en Chile se encuentran variedades como Fuji y Pink Lady que son variedades de cosecha tardía (Hernández *et al.*, 2010).

Dentro de la producción de fruta, hay problemas de desórdenes fisiológicos y enfermedades que disminuyen el rendimiento y calidad de los productos durante cosecha y postcosecha (Latorre, 2004). Una de las enfermedades que afecta a la industria de manzanas chilena es "Ojo de Buey", causada por el hongo *Neofabraea vagabunda* (= *N. alba*) (Henríquez, 2005; Soto-Alvear *et al.*, 2013). El "Ojo de Buey" es una enfermedad que se expresa en postcosecha y de no ser controlada genera importantes pérdidas económicas en manzanas (Lolas y Diaz, 2016; Soto-Alvear *et al.*, 2013). La enfermedad permanece latente desde la infección en precosecha sin manifestar síntomas detectables. La acción del patógeno *N. vagabunda* se puede presentar en todo el proceso de producción observando los primeros

síntomas después de dos a tres meses de almacenaje (Soto-Alvear *et al.*, 2013). Los síntomas corresponden a lesiones con halos de crecimiento concéntrico con intervalos de tejidos de color pardo oscuros y pardo claro, causando una pudrición blanda de la pulpa.

Epidemiológicamente, según Lolas (2005) un factor relevante para iniciar la enfermedad “Ojo de Buey” son las precipitaciones (agua libre), especialmente las que ocurren durante los meses de marzo-abril, periodo cercano a la cosecha de cultivares tardíos en Chile. En esta época cercana a la cosecha, las condiciones de lluvias y temperaturas adecuadas (20-25°C) crean el ambiente propicio para el hongo; liberando conidias que infectan los frutos en etapa de madurez a nivel de las lenticelas; transcurrido de 3 a 4 meses en almacenaje refrigerado a 0°C (Spott, 1990) la lenticela infectada desarrolla pudrición (Lolas, 2005; Soto-Alvear *et al.*, 2012).

El control de esta enfermedad apunta a medidas durante la pre y postcosecha, de manera que disminuya la incidencia de pudriciones. La eliminación de fuentes de inóculo sumado a la aplicación de fungicidas en pre y postcosecha han resultado ser eficaces (Soto-Alvear *et al.*, 2012). Sin embargo, debido a la preferencia de los consumidores por nuevas tendencias de seguridad alimentaria y del medio ambiente, se han desarrollado nuevas alternativas de control, entre las cuales se ha utilizado el control biológico a través de *Trichoderma* spp., permitiendo evitar los niveles de residuos químicos en el fruto (Torres *et al.*, 2002). No se han evaluado estas alternativas en nuestras condiciones para el control preventivo de “Ojo de Buey”.

Las nuevas alternativas que busquen reducir las importantes pérdidas de producción y económicas serán posicionadas como un gran avance dentro de la agricultura. Manejar esta problemática a nivel predial es un desafío ya que es una enfermedad silenciosa, que con un adecuado control se reduciría la incidencia de la enfermedad en almacenamiento, logrando que el producto mantenga su calidad.

A continuación, se plantea la hipótesis y objetivo del presente trabajo.

1.1 Hipótesis del estudio

Las distintas especies del hongo biocontrolador *Trichoderma* presente en formulaciones comerciales autorizadas por el SAG para el control de distintas enfermedades en cultivos, en conjunto con nuevas especies aisladas desde tejido vegetal serían eficaces en inhibir el crecimiento *in vitro* de aislados de *N. vagabunda*.

1.2 Objetivo general

Determinar la capacidad antagónica *in vitro* de nuevos aislados nativos y aislados comerciales de *Trichoderma* spp. sobre aislados de diferente procedencia de *N. vagabunda*.

1.3 Objetivos específicos

Evaluar y comparar la capacidad antagónica de los hongos *Trichoderma* spp., componentes de las formulaciones comerciales de Mamull (*Bionecria ochroleuca cepa Mitique*; *Trichoderma gamsii cepa Volqui*; *Hypocrea virens cepa Ñire*) y Tiffi (*Trichoderma atroviride cepa MUCL45632**), y también de aislados nativos de *Trichoderma* spp. sobre el hongo *N. vagabunda*.

Evaluar y comparar la respuesta de 10 aislados de *N. vagabunda* a la acción de la formulación comercial Mamull (*Bionecria ochroleuca cepa Mitique*; *Trichoderma gamsii cepa Volqui*; *Hypocrea virens cepa Ñire*) y Tiffi (*Trichoderma atroviride cepa MUCL45632**) y de nuevos aislados nativos de *Trichoderma* spp.

Evaluar la fuerza y sentido que hay entre las dos variables de estudio (ICR (%) y Área(mm²) empleando el coeficiente de correlación de Pearson.

2.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importancia del manzano

El manzano (*Malus domestica*) es el árbol más cultivado a nivel mundial. Procede de Asia Media, desde donde fue propagado a todos los continentes. Este árbol posee la capacidad de adaptarse a diversos climas, proporcionándole características organolépticas especiales al fruto, por lo que se encuentra ampliamente difundido en el mundo (CIREN, 2017).

La manzana tiene un valor alimenticio importante, siendo reconocida y ampliamente demandada por el mercado. Su composición la convierte en una de las frutas más completas desde el punto de vista de la nutrición. Contiene una elevada cantidad de pectinas, fibras y ácido málico, que proporcionan beneficios en el organismo humano, mejorando el funcionamiento intestinal y otras enfermedades. Además, como posee una alta cantidad de flavonoides, se puede decir que es una fruta antioxidante (Uriarte, 2019). Debido a lo anterior, la manzana sigue teniendo mayor aceptación y consumo en las culturas de todo el mundo. En la actualidad, los mercados disponen de fruta fresca de manzana durante cualquier época del año, estrategia que logra mantener la preferencia del consumidor durante todo el año (Martín, 2005).

La idea es alcanzar un alto grado de satisfacción del consumidor como también una producción eficiente. Es por esto, que la creación de variedades adaptadas a condiciones de stress es cada vez más necesaria. La resistencia a diferentes condiciones ambientales determinará las características organolépticas diferenciadoras unas de otras (Díaz, 2015).

El recambio varietal es una opción que se está implementado en varios huertos, para solucionar la baja producción debido al cambio climático, el incremento en los niveles de CO₂ y el efecto invernadero. Otras causas que promueven a optar por el recambio varietal son el déficit hídrico, altos niveles de salinidad, ajuste de horas frío acumuladas para el cultivo, entre otros. Esto a impulsando a los fruticultores a escoger variedades de mayor productividad, de fácil manejo, mejor postcosecha, calidad, aporte nutritivo y mayores calibres (Quiroz, 2017).

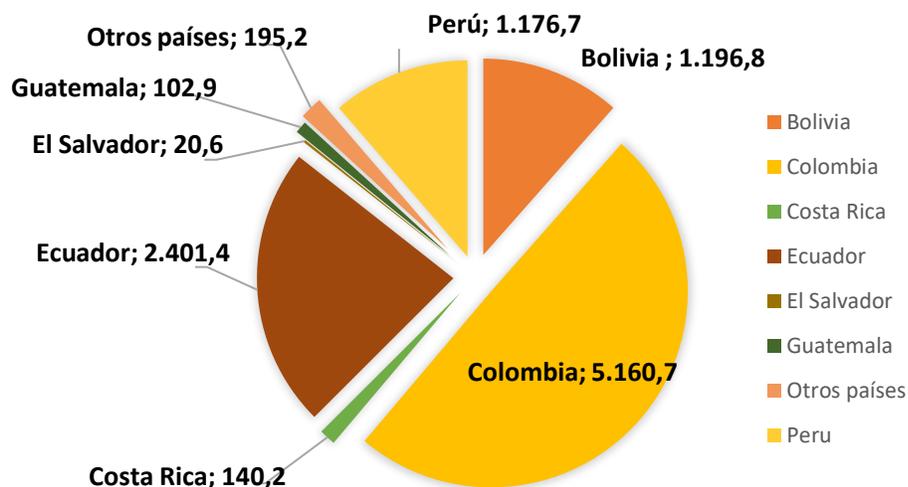


Figura 2.1. Exportaciones de fruta fresca de Chile al 2021 (ton) (Fuente: ODEPA, 2021).

2.2 Producción nacional

Según ODEPA (2021), Chile exportó 10.394 toneladas de fruta fresca de manzana en la temporada 2021. En comparación con el año anterior, se presentó una disminución en la exportación anual debido a una sobre oferta global y la dificultad de generar un negocio atractivo por parte del producto, afectándose por la caída de precios a nivel mundial en las variedades commodity.

En la actualidad, la zona central presenta la mayor superficie de plantación de manzanos rojos y verdes a nivel nacional. La región de O'Higgins posee 7.734,4 ha y Maule 19.637 ha. Sin embargo, esta zona ha aumentado considerablemente sus temperaturas y, con ello, la radiación solar, afectando al cultivo en su desarrollo y, al mismo tiempo, desencadenando desórdenes fisiológicos en la fruta. Los fruticultores, para enfrentar la problemática del cambio climático, han determinado con visión futurista nuevas oportunidades de producción al sur de Chile, considerando que en esta zona dispondrán de los recursos (agua, temperatura, radiación) demandados por la planta (CIREN, 2020).

Otro aspecto importante es la constatación de los efectos del cambio climático, que trae graves problemas de suministro de recursos hídricos. El agua es decisiva para la agricultura y para la vida, por lo que Chile desafía a generar conciencia de innovación agraria, con el propósito de implementar estrategias que aseguren la disponibilidad de recursos. En ciertas zonas más

vulnerables existen amplias opciones de producción donde los proyectos de riego garantizan un óptimo aprovechamiento del agua (FIA, 2015).

La superficie de la región del Maule se ha adaptado a las nuevas tecnologías usando métodos eficientes de riego, dentro de estos se encuentra goteo y aspersión con 5.454,2 ha y 8.096,9 ha. Sin embargo, aún falta mejorar la eficiencia de huertos de manzanos que son regados por surco y tendido con 5.048,9 ha y 1.021,7 ha respectivamente (ODEPA, 2021).

2.3 Morfología y Fenología

El manzano es un árbol caducifolio, de copa globosa que puede alcanzar una altura de 10 m de forma silvestre. Esta altura desfavorece a la hora de realizar las labores como poda, cosecha y fertilización. Al determinar un sistema de conducción, se limita el crecimiento, por lo que el árbol alcanza una altura de 2,5 metros, facilitando las labores en campo. El tronco es recto, de corteza grisácea y escamoso. En cambio, las ramas son de color ceniza con matices verdosos y con lenticelas que permiten el intercambio gaseoso con la atmósfera. Las flores son hermafroditas, de color rosado pálido y a veces blancas; en número de 3-6 unidades en corimbo (Merlet *et al.*, 2016). Las flores son sensibles a las heladas tardías de primavera. La polinización es cruzada, por lo que las condiciones climáticas deben ser favorables para la actividad de los polinizadores, ya que si hay vientos fríos y con bajas temperaturas éstos no salen.

La duración del receso invernal del manzano varía según la zona, pero requiere de 800 a 1700 horas de frío (temperaturas menores a 7°C) para completar el periodo de dormancia. El proceso biológico inicial de brotación hasta inicios de floración requiere un número determinado de UT (unidades térmicas) según la variedad, de manera que las bajas temperaturas retardan el suceso de plena flor (Ramírez *et al.*, 2008). Por ejemplo, si ocurriesen heladas y éstas alcanzan -10°C la pérdida de yemas florales es altísima (FAO, 2010). Cuando la temperatura comienza a aumentar es decisiva para llegar al estadio de cuaja, tanto así que determina la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos, logrando así que ocurra la polinización y fecundación de los óvulos. En este periodo se pueden presentar heladas de -2°C que afectan las células debilitando su crecimiento. Luego el manzano debe alcanzar una suma térmica de 900 y 1200 GDA entre el periodo de yemas hinchadas y la cosecha, siendo la oscilación de temperatura óptima de crecimiento entre 18°C-24°C, con límite de crecimiento máximo de 35°C (Uriarte, 2019).

2.4 Variedades Club

La innovación varietal ha mejorado las características, potencialidades y atributos de las variedades de manzana con el objetivo de obtener un espacio productivo y comercial en el mercado. Algunas de las nuevas variedades son libres para ser plantadas, pero también hay variedades patentadas, que deben pertenecer a un selecto club (Galdames y Mesa, 2013). La modalidad del club beneficia a todos los actores implicados y optimiza la cadena de valor desde el obtentor, viverista, productor, empresa comercializadora y el consumidor (Iglesias, 2016).

Existe una tendencia positiva de productores y empresas que se han arriesgado y han optado por cultivar nuevas variedades cuyos genes han sido mejorados, proyectando un cambio a nivel de la planta y fruto con una alta tolerancia a condiciones climáticas, tolerancia o resistencia a enfermedades y plagas, floración tardía, parámetros de calidad superiores, distribución de calibre y coloración. Debido a estos cambios el productor reduce considerablemente los costos de producción, requiere un menor uso de mano de obra, utiliza menos insumos agrícolas. Se trata entonces de una producción más segura (Bertolazzi, 2019).

2.4.1 Cripp's Pink

La variedad Cripp's Pink es de origen australiano, proviene del cruzamiento entre Lady Williams y Golden Delicious. Fue seleccionada del programa Horticultural Research Station of Stoneville de Australia Occidental, en 1979 (Cripp's *et al.*, 1993). Es un cultivar de cosecha tardía, madurando a fines de abril (Reginato *et al.*, 2002a). Alcanza altos estándares de calidad, por lo que es comercializada bajo la marca registrada Pink Lady. Para que llegue al consumidor en excelentes condiciones de calidad, la manipulación debe ser impecable y cuidadosa en pre y postcosecha, ya que es considerada una fruta delicada (Cabrera, 2006).

Las exigencias del mercado son el color de fondo, intensidad de color y tamaño de la fruta. Cripp's Pink posee un característico color rosado brillante sobre fondo verde que cambia a amarillo cuando alcanza su madurez comercial. El tamaño es de 70-75 mm, el sabor es entre dulce-ácido y se percibe como una manzana crocante y crujiente con pulpa de color blanca, densa, firme y jugosa (Fresno *et al.*, 2014).

2.4.2 Almacenaje

El cultivar Cripp's Pink se conserva bien en almacenaje prolongado, presentando una baja susceptibilidad a escaldado. Sin embargo, las variedades tardías tienen un potencial mayor de incidencia de pardeamiento interno, desorden fisiológico ocasionado por un mal manejo de la temperatura (daño por frío) y por el estado fisiológico de los frutos al momento de la recolección (FDF, 2015).

Se recomienda frío convencional (FC) como temperatura óptima de 1°C, logrando satisfactoriamente almacenar por más de 4 meses. Por otro lado, la atmósfera controlada (AM) extiende la conservación de 8 a 9 meses y se recomienda niveles de gases de 1% O₂ y 3% CO₂, lo que evitaría la incidencia de pardeamiento interno y al mismo tiempo mantendría una buena calidad post guarda. Otra recomendación es enfriar la fruta en forma progresiva en FC, manteniéndola a 2 °C los primeros 30 días, luego 1 °C por los próximos 30 y 0 °C hasta el final del almacenaje (Moggia y Pereira, 2003).

Con respecto al estado fisiológico, es importante cosechar idealmente con índice de degradación de almidón en torno a 3,5 permitiendo aumentar el periodo de guarda y la vez mantener la calidad organoléptica (Moggia y Pereira, 2003).

Durante el almacenaje es posible observar problemas de desorden fisiológico, daño por frío (0°C) y también enfermedades fungosas que proliferan a bajas temperaturas (Latorre, 2018).

2.5 Enfermedades en postcosecha

Es fundamental para el productor mantener las características organolépticas, calidad e inocuidad de la fruta. Es por esto, que las condiciones de almacenaje deben ser las óptimas. Sin embargo, muchas infecciones fungosas se inician en el huerto y al emplear guarda prolongada es muy probable que se presenten síntomas y signos de la enfermedad que son observables luego de varios meses, los cuales alteran y contaminan frutas sanas.

Dentro de los agentes fitopatógenos responsables de ocasionar importantes pérdidas económicas en postcosecha son: *Botrytis cinerea* causante de la enfermedad Moho gris; *Alternaria alternata* responsable de Corazón Mohoso; *Penicillium expansum* causa Moho azul y *Neofabraea vagabunda* (= *N. alba*) desarrolla la Pudrición "Ojo de Buey" (Acuña, 2010; Álvarez *et al.*, 2004; Henríquez, 2005; Latorre, 2004; Soto-Alvear *et al.*, 2013).

2.5.1 Enfermedad “Ojo de Buey”

A nivel mundial se han detectado tres especies de *Neofabraea* spp. causando canchales, muerte regresiva y pudrición “Ojo de Buey”; en Chile fue detectado durante la temporada 2003/04 y se identificó morfológicamente como el hongo fitopatógeno *N. alba* (Henríquez, 2004). El patógeno es causal de la enfermedad “Ojo de Buey”, afectando a todas las pomáceas, siendo las variedades de manzana de cosecha tardía, Fuji y Pink Lady, las más afectadas por la alta susceptibilidad a la infección en huerto, ya que se pueden exponer a periodos lluviosos antes de cosecha (Lolas, 2005; Spotts, 2009; Braun y Pelletier, 2003; Soto-Alvear *et al.*, 2012).

A continuación, se presenta un esquema teórico (Figura 2.2) que explica cómo se producen las enfermedades, específicamente “Ojo de Buey”. Se considera las condiciones predisponentes, de igual relevancia las cuales son interdependientes entre sí.

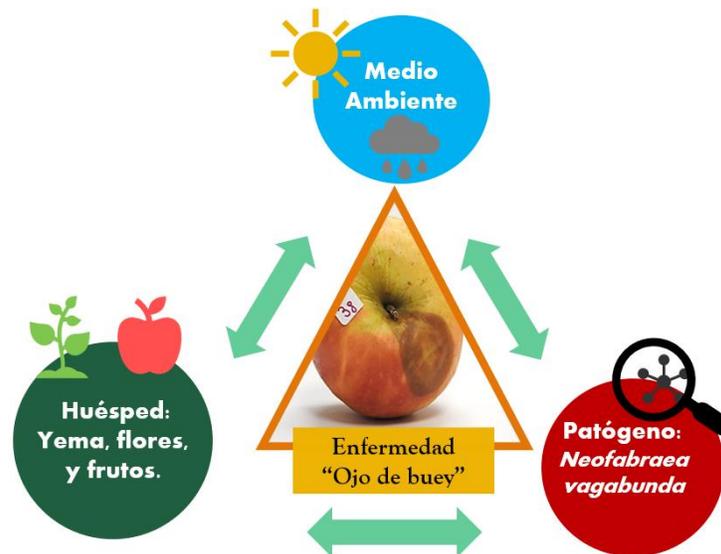


Figura 2.2 Triángulo de la enfermedad “Ojo de Buey”.

Cada uno de los tres factores a la vez, poseen características que modificarían la enfermedad. Por ejemplo, para que se desarrolle y se manifieste la enfermedad, debe existir la combinación de inóculo de *N. vagabunda*, un hospedero susceptible como las manzanas de cosecha tardía (Cripp’s Pink) y las condiciones predisponentes de temperatura, humedad relativa del aire y agua libre.

Considerando las condiciones ambientales predisponentes de agua libre y temperatura entre 20°C-25°C previo a cosecha, las conidias son diseminadas por gotas de lluvia y/o viento hacia los frutos. Las conidias ingresan a través de la lenticela abierta o por herida en la zona calicinal, infectando en cualquier estado de desarrollo del fruto que va entre caída de pétalos y cosecha. En las zonas susceptibles de la manzana, se inician las llamadas infecciones latentes, manifestándose a los 3 o 4 meses de almacenamiento refrigerado a 0°C, donde crece lentamente (Soto-Alvear *et al.*, 2013; Lolas, 2005; Fernández, 2013; Spott *et al.*, 2009).

Las lenticelas representan una estructura definida y sobresaliente en la epidermis, debido a que poseen células de mayor tamaño dispuestas relativamente separadas y en gran cantidad, además estas pueden o no estar suberizadas (Fahn, 1974; Yuri, 1995). Estudios afirman que el número de lenticelas abiertas depende del factor época de cosecha, es decir, mientras más tarde es la cosecha el número de lenticelas abiertas aumenta (Acevedo, 2004). Por ende, las variedades de cosecha tardía como Cripp's Pink, son afectadas por el factor época quedando expuesta a la infección, ocasionando lesiones en tejidos subcuticulares estando en guarda. En consecuencia, lesiones agravadas a pudriciones lenticelares, difíciles de detener con un biocontrolador.

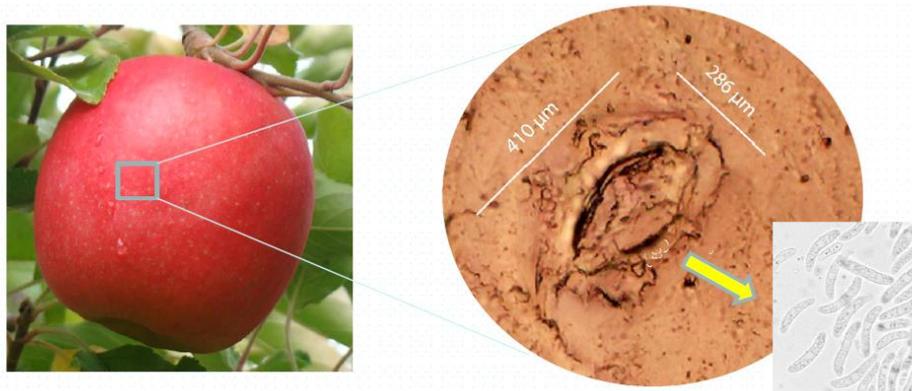


Figura 2.3 Tamaño lenticelar de manzanas Cripp's Pink en Huerto (Lolas, 2018).

N. vagabunda en su fase asexual, crea en la superficie de frutos infectados acérvulos blanquecinos de tamaño $1 \pm 0,5$ mm de diámetro, los cuales desarrollan y liberan macroconidias curvas, unicelulares, hialinas, fusiformes, con extremos redondeados, de $18,3 \pm 1,6$ μ m de largo y ancho $2,5 \pm 0,5$ μ m promedio (Verkley, 1999). La obtención de colonias en medios de cultivo APD se caracteriza con micelio septado, hialino y compacto. Lo cual forman colonias circulares, planas, inicialmente de color blanco y luego pardo rosada (Soto-Alvear *et al.*, 2012).

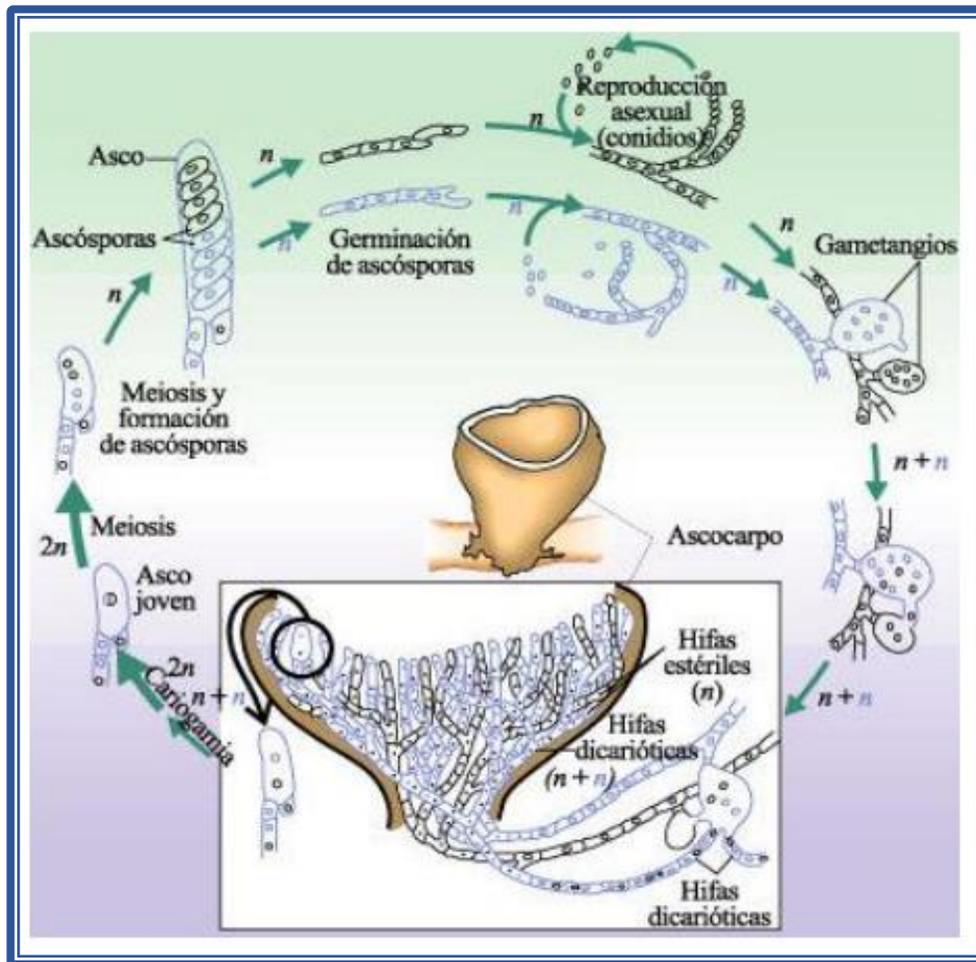


Figura 2.4 Ciclo reproductivo del hongo Ascomycetes (Fuente: Micología Médica Básica Segunda edición, 2000. Alexandro Bonifaz).

Con respecto a los daños ocasionados por “Ojo de Buey”, éste desencadena síntomas en la superficie de la fruta. Se exhiben lesiones con halos de crecimiento concéntrico con intervalos de tejidos de color pardo oscuros y pardo claro, causando una pudrición blanda de la pulpa (Sutton *et al.*, 2014). Además, sobre las lesiones avanzadas desarrollan acérvulos, estos son, fructificaciones blanquecinas ubicadas concéntricamente en la zona central de la lesión. Encontrándose dentro de los acérvulos grupos de conidios que se unen directamente al micelio subyacente, logrando romper la epidermis; a la espera de humedad o agua libre del ambiente para luego ser liberados, consiguiendo aún más la dispersión de la infección (Spotts, 1990; Grove, 1990; Viñas *et al.*, 2013; Lolas, 2005).



Figura 2.5 Expresión de síntomas en postcosecha después de 3 a 4 meses en almacenaje (Lolas, 2018).



Figura 2.6 Lesión esporulada con formación de acérvulos luego de ser almacenada (Lolas, 2018).

Se han realizados estudios con inoculación artificial, donde el micelio del patógeno es insertado en la fruta y queda en observación. La fruta almacenada desencadena una pudrición, y a ésta miden el diámetro de crecimiento (mm). Como se expresa en el gráfico (Figura 2.7) la curva de crecimiento de la pudrición tiende a ser creciente a través del tiempo. Es por esto, que mientras mayor tiempo esté la fruta en almacenamiento acarreará elevadas pérdidas de fruta y dinero.

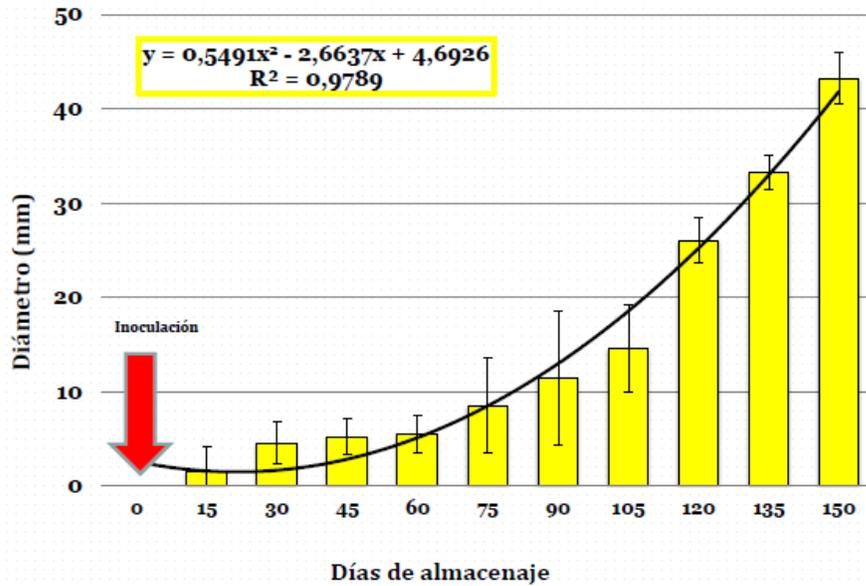


Figura 2.7 Evolución del diámetro de la pudrición “Ojo de Buey” en manzanas Cripp's Pink (Lolas, 2018).

Para las empresas frutícolas las pudriciones son de importancia económica. Se recomienda un manejo integrado donde los productores implementen estrategias de control preventivo, opten por agroquímicos eficaces y que empleen medidas culturales de control, garantizando limpieza en el huerto, disminuyendo así la susceptibilidad de la enfermedad.

En cuanto a la aplicación de fungicidas sintéticos en precosecha, los productos a base de cobre como hidróxido de cobre y el fosfito de potasio son efectivos en controlar de forma eficiente la enfermedad. Se ha demostrado la reducción de la infección lenticelar ya que la aplicación preventiva permite proteger el árbol en sí, y a la vez reducir el inóculo del huerto, con la finalidad de disminuir la expresión del patógeno en cámaras de conservación (Pinilla *et al.*, 2005). No obstante, esta alternativa de control deja residuos químicos en la cadena alimentaria como también problemas ambientales que preocupan tanto al consumidor como al productor (Feliziani *et al.*, 2013).

Según como se desencadene la enfermedad es conveniente seguir la logística de control empleando fungicidas sintéticos en post cosecha, además de recurrir a los productos que posea en la composición Fludioxinilo como ingrediente activo, el cual es utilizado para el control de patógenos Ascomycetos, Basidiomycetos y Deuteromycetos (Abella, 2011). Sin embargo, a pesar de prevenir con fungicidas la incidencia en almacenaje, ésta es de un 35 %, o sea sigue siendo alta (Lolas *et al.*, 2016). Es por esto, que aplicaciones preventivas de fungicidas en pre y

postcosecha es una estrategia clave, no obstante, es muy importante estudiar con detalle los factores involucrados que desencadenan la infección latente en campo, hasta la activación del patógeno en almacenaje. Esto con el objetivo de no abusar del empleo de fungicidas, evitando así que se favorezca el desarrollo de patógenos resistentes a fungicidas, ya que, si el organismo a controlar recibe constantemente la misma sustancia química para un efecto en específico, aumentaría la probabilidad a que no ocurriera ningún cambio genético en la población (Tjamos *et al.*, 1992).

Referente a la alta incidencia en almacenaje se han implementado varios métodos de aplicación, los más usados son, el sistema de ducha o *drenching*, inmersión y termonebulización (Xeda internacional, 2003). La termonebulización es un método de aplicación de producto durante la postcosecha de la fruta en almacenaje. Este procedimiento transforma el líquido en partículas muy pequeñas conformando una nube dentro de la cámara. Dependiendo del producto, la solución debe ser calentada a 170° o más e inyectada al paso del aire del equipo; de esta manera las partículas serán depositadas en la superficie de la fruta. Pero se exhibe un inconveniente en la cámara de almacenamiento, la aplicación es desuniforme por la disposición que poseen las cajas, evitando que sea efectivo y eficiente (Soto-Alvear, 2013).



Figura 2.8 Evolución desde síntoma (lesión) a signo (esporulación) (Lolas, 2019).

2.6 Control Biológico.

Es una estrategia útil para combatir microorganismos, entendida como “La reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, lograda de manera natural o a través de manipulación del ambiente, del hospedero o de antagonistas del patógeno o plaga que se requiera controlar” (Chincholkar y Mukerji, 2007). Es una alternativa de manejo que ha tomado importancia en los últimos años, ciertamente por la selección de organismos procedentes del suelo, por poseer propiedades

antagónicas sobre fitopatógenos y simultáneamente porque aportan a la nutrición y resistencia de las plantas (Fravel, 2005).

El control biológico mediante el uso de controladores naturales beneficia al ecosistema anulando y disminuyendo la incidencia de plagas y enfermedades. Impactando positivamente a la reducción del uso indiscriminado de sustancias químicas (Nico *et al.*, 2005; Cundom *et al.*, 2002). Por lo general no tiene efectos colaterales, y se alcanzan los mismos rendimientos que con las sustancias químicas a un menor costo. Es una estrategia clave que garantiza la sustentabilidad de los sistemas productivos y rentabilidad (Pérez, 2018).

Vale decir que los agentes de control empleados son generalmente saprofitos, en virtud de su facilidad de adaptación al medio, a su alta capacidad de competencia por nutrientes en hostilidad, por su volubilidad y fácil manejo (Herman, 2000; Howell, 2006). Entre estos destaca el género *Trichoderma* spp., al que se les atribuye un diverso potencial metabólico y su agresiva competencia natural (Samuels, 2006).

2.6.1 *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* comprende un gran número de cepas de hongos que actúan como agentes de control biológico. Este género fue identificado en 1871, describiéndolo como un hongo anaerobio facultativo. Las cepas distribuidas a nivel mundial son alrededor de 30 especies que se encuentran distribuidas en zonas y hábitat diferentes. Se encuentran de manera natural en suelos sin intervención, en suelos de uso agrícola, en la materia orgánica y en descomposición (FIA, 2008).

Es un agente biocontrolador, de rápido crecimiento, productor de una alta cantidad de enzimas degradativas inducidas por la presencia de hongos fitopatógenos. Esto se debe a que se alimenta de la extracción de nutrientes y otros materiales orgánicos. Se comporta como saprofito en la rizosfera, y la competencia por el sustrato y espacio lo hace ser un gran antagonista. Entonces, el mecanismo de acción del biocontrolador es envolver al hongo fitopatógeno, penetrar en sus células, causar daños en la pared celular, degradar e inhibir la germinación de esporas (FIA, 2008).

Trichoderma spp. desarrolla tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios; son eficaces contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo, desde esporulación hasta germinación. La estructura como tal es compleja y ramificada está compuesta por conidióforos que dan origen a fiálides fusiformes del cual se desprenden esporas circulares hialinas. El

crecimiento de estas estructuras produce colonias muy características, de micelio blanco algodonoso, que posteriormente pasa a ser de color verde oscuro o verde limón (Fernández-Larrea, 2001).

Finalmente *Trichoderma* spp. como organismo vivo depende de las condiciones ambientales fisicoquímicas de donde se encuentre. Al estar sometido a condiciones diferentes, la actividad de crecimiento y mecanismo de acción será diversa, ocasionando una resistencia genética al ambiente de origen, logrando que la colonización sea exitosa en su hábitat inicial (Howell, 2003). Además, como presenta tolerancia a condiciones ambientales extremas, puede sobrevivir en presencia de pesticidas y otros químicos (FIA, 2008).

2.6.2 Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.

Trichoderma dispone de propiedades antagonicas que se basan en la activación de múltiples mecanismos que pueden actuar de manera coordinada en el proceso, pero depende del antagonista (cepa de *Trichoderma*), de la planta, del ambiente, disponibilidad de nutrientes, pH, temperatura y la concentración de hierro para asegurar la capacidad antagonica de la cepa. Así pues, el mecanismo de acción indirecto del antagonista se basa en la competencia por nutrientes y espacios, modificación de las condiciones ambientales, procura el crecimiento y defensa de la planta y por último la antibiosis. Simultáneamente posee mecanismo de acción directo como el micoparasitismo que implica contacto físico y síntesis de enzimas hidrolíticas, compuestos tóxicos y / o antibióticos que actúan sinérgicamente con las enzimas (Benítez *et al.*, 2004). Es por estas razones que el *Trichoderma* como biocontrolador es impredecible, por lo que es necesario contar con estudios previos para determinar eficiencia y especificidad frente a un fitopatógeno (Howell, 2003).

Hay que tener en cuenta que los mecanismos de acción se activan debido a la producción de compuestos y metabolitos específicos que impiden la germinación de esporas (fungistasis), dan muerte celular (antibiosis) o modifican la rizosfera (acidificación del suelo) creando un lugar inhóspito para el patógeno (Romero-Cortes *et al.*, 2016).

2.6.2.1 Competencia

La competencia es un mecanismo clásico de control del *Trichoderma* spp. (Harman, 2000). La capacidad biocontroladora desencadena un efecto fungistático del suelo debido a la presencia de otros organismos. También posee la capacidad de competir por espacio y nutrientes, incluso cuando está sometido a condiciones extremas, éste sobrevive (Benítez *et al.*, 2004). La velocidad de crecimiento del *Trichoderma* spp. es alta, ya que es resistente a sustancias tóxicas y plaguicidas. Esta resistencia se asocia a la presencia de transportadores de membranas dependientes de energía (ATP) (ABC, ATP-Binding Cassette) (Benítez *et al.*, 2004). Estos transportadores son bombas exportadoras que protegen de compuestos tóxicos al *Trichoderma* spp. (Álvarez y Pulido, 2008). La facilidad de obtención ATP en *Trichoderma* spp. se debe a la gran capacidad de movilizar y tomar nutrientes del suelo. Utiliza eficientemente los nutrientes disponibles, siendo obtenidos a partir de metabolitos de diferentes azúcares (derivados de polímeros): celulosa, glucano, quitina, etc. (Benítez *et al.*, 2004).

El proceso de competencia es crucial para generar alta eficiencia del sistema de metabolitos de glucosa. Es por esto que algunas cepas dependen de un transportador de glucosa de alta afinidad (GTT1), ya que la expresión ineficiente de GTT1 se debe a los bajos nutrientes presentes en el ambiente y a la baja concentración de glucosa (Delgado-Jarana *et al.*, 2003). Es decir, la resistencia que puede llegar adquirir del ambiente, de la absorción de nutrientes del suelo, es crucial al momento de competir contra al fitopatógeno, ya que el sistema metabólico se encuentra reforzado.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Selección de los aislados

Se utilizó como antagonistas, aislados de distintas especies de *Trichoderma* presentes en formulaciones comerciales autorizadas por el SAG: Mamull (*Bionecria ochroleuca cepa Mitique*; *Trichoderma gamsii cepa Volqui*; *Hypocrea virens cepa Ñire*) y Tiffi (*Trichoderma atroviride cepa MUCL45632**). Además, se usaron aislados nativos de *Trichoderma* spp.: la cepa Sherwood de *T. virens* (patentada U Talca); Nancagua Qr2 P.B., La Merced QR7 P.B 7.1.; Lourdes QR4 P.D y Molina 500. Éstos fueron obtenidos en el Laboratorio de Patología Frutal, caracterizados molecularmente.

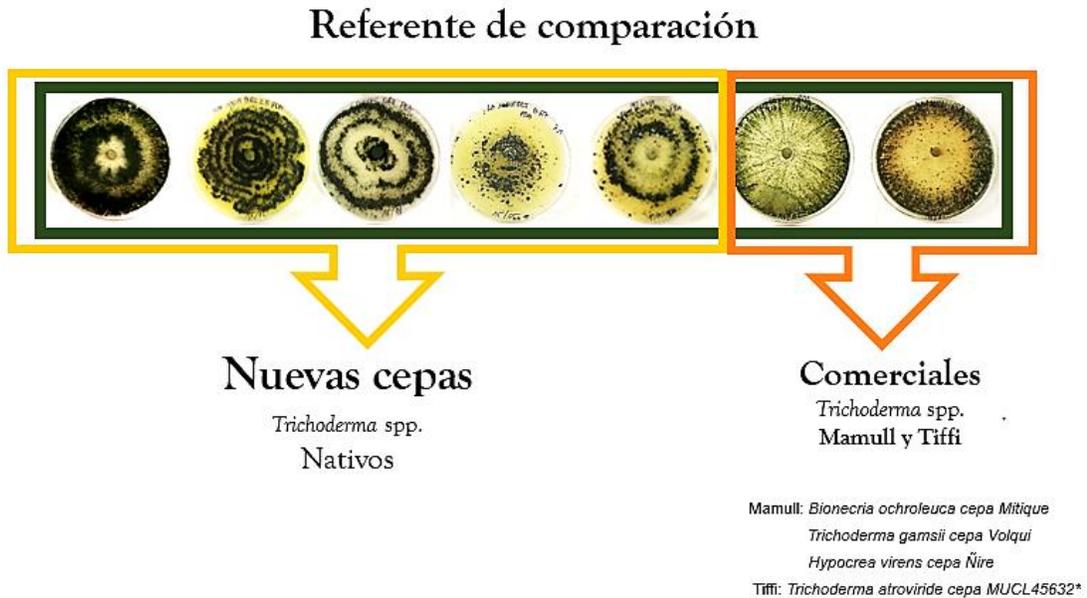


Figura 3.1 *Trichoderma* spp. Nativos y Comerciales en Evaluación.

3.2 Selección del patógeno

Se emplearon 10 aislados chilenos de *Neofabraea vagabunda*, obtenidos desde frutos de manzano con calidad comercial, en almacenamiento en frío convencional (0°C, \geq 90%HR) de diferentes localidades. Ambos, patógeno y antagonistas fueron mantenidos por separado en placas Petri con APD a temperatura ambiente (\pm 22°C).

3.3 Control biológico *in vitro* (cultivos duales)

Las pruebas de enfrentamiento se realizaron empleando la técnica de cultivo dual en placas Petri de 96 mm de diámetro, conteniendo 20 ml de Agar Papa Dextrosa (APD) acidulado con Ácido Láctico estéril a pH 5,5. Se dispuso en un extremo de la placa Petri un disco de agar de 4 mm de diámetro con micelio activo del patógeno (*N. vagabunda*) a 5 cm aproximadamente con el respectivo antagonista. Debido al lento crecimiento de *N. vagabunda*, se utilizaron siembras seriadas, separadas por 10 días cada una, de manera de permitir su crecimiento y su establecimiento para luego confrontarlos con su respectivo antagonista. Se utilizaron como controles, placas con APDa similares, donde se sembró tanto el patógeno como el antagonista en forma individual. Posteriormente, las placas duales y los controles fueron incubados a 22 ± 1 °C, 12 hrs continuas de luz, seguido de 12 hrs de oscuridad. La unidad experimental fue una placa Petri, con 5 repeticiones por aislado (10) x antagonista (7) x crecimiento de *N. vagabunda* (5)

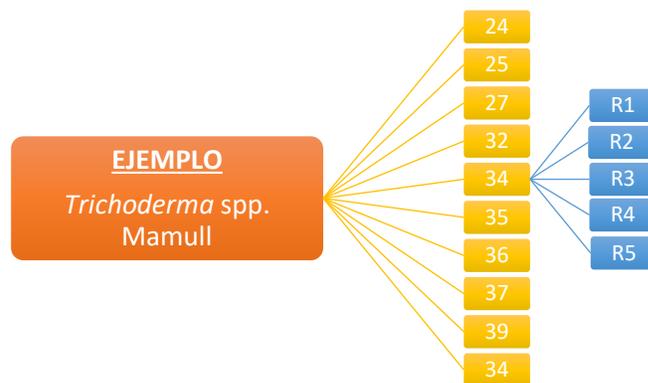


Figura 3.2 Diagrama de enfrentamiento del *Trichoderma* spp. Mamull con el aislado 34 de *N. vagabunda* y sus 5 repeticiones.

3.4 Evaluaciones

El antagonismo de *Trichoderma* se evaluó estudiando las variables:

- Radio de Crecimiento Antagonista (RCA)
- Radio de Crecimiento del Patógeno (RCP) y
- Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR)

A. El porcentaje de inhibición de crecimiento radial (ICR %), se obtuvo con la fórmula de Eizzyani et al. (2004), $ICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$, donde R1 es el radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento.



Grado	Capacidad antagonica	Potencial biocontrolador
0	Ninguna invasión de la superficie de la cepa patógena	Muy malo
1	¼ Invasión de la superficie de la cepa patógena	Malo
2	½ invasión de la superficie de la cea patógena	Deficiente
3	Total invasión de la superficie de la cepa patógena	Bueno
4	Total invasión de la superficie de la cepa patógena esporulación sobre ella	Muy bueno

Cuadro 3.1 Escala utilizada por Ezziyani *et al.*, (2004a) para la evaluación de la capacidad antagonica de los biocontroladores.

B. La competencia por nutrientes y espacio se evaluó con el área de cubrimiento del *Trichoderma* spp. frente a cada aislado de *N. vagabunda*, usando el programa Imagen J. debido a que el crecimiento del *Trichoderma* spp. es heterogéneo y no radial.



Enfrentamiento

3.5 Análisis Estadístico

Se empleó un diseño experimental completamente al azar. El número de repeticiones por tratamiento en todas las pruebas fue de 5 y la unidad experimental fue la placa Petri. Todos los estudios se llevaron a cabo utilizando análisis de varianzas (ANOVA) simples. Se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianza entre tratamiento. Aquellos resultados de la prueba de Levene que arrojaron valores $P > 0,05$ indicaron homocedasticidad de varianza, se realizó directamente la comparación de medias con la prueba HSD Tukey ($P < 0,05$). Los datos que no consiguieron una distribución normal se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Kruskal Wallis para datos no paramétricos y a su vez sus medianas se compararon mediante la prueba de HSD Tukey ($P < 0,05$) expresando diferencias significativas entre los tratamientos con nivel de confianza del 95% ($P < 0,05$). Si en esta prueba las medias de la misma columna comienzan con la misma letra "a", se determina que entre los tratamientos no existen diferencias significativas.

En las pruebas de enfrentamiento de *N. vagabunda* con cepas nuevas y comerciales de *Trichoderma*, fueron evaluados los radios de crecimiento del patógeno para determinar la variable porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR %). Se realizaron mini ensayos para cada uno de los aislados de *N. vagabunda*, de este modo se probó la capacidad de control de cada uno de los *Trichoderma* spp. con la variable ICR (%).

También se evaluó el área de crecimiento de los *Trichoderma* spp. para determinar la capacidad de invasión, competencia y cubrimiento frente al patógeno. Además, se evaluó el coeficiente de correlación que hay entre los dos métodos utilizados en este ensayo para determinar la capacidad biocontroladora. Para todos los análisis se utilizó el programa Statgraphics.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto del enfrentamiento *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre el patógeno *N. vagabunda* a partir de 0 días de incubación.

La Figura 4.1 presenta el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) de los 10 aislados de *N. vagabunda* a los 0 días de incubación, cuando fueron enfrentados a cada cepa biocontroladora. Los gráficos de cajas expresan de forma representativa la dispersión y variabilidad en los datos obtenidos de los cultivos duales luego de 6 días de incubación a 22°C. Los *Trichoderma* U Talca, Nancagua, Tiffi y Mamull presentaron el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial, cercano al 50% como promedio.

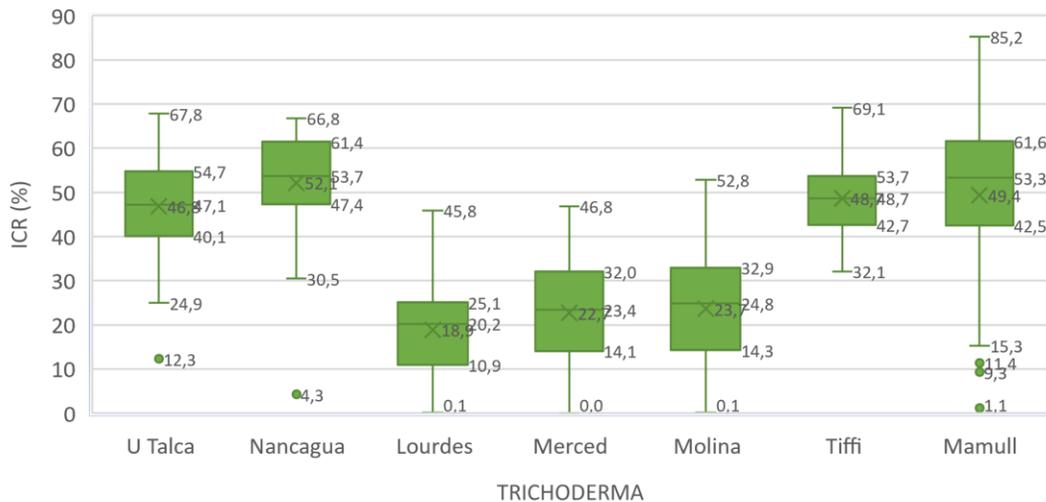


Figura 4.1 Inhibición del crecimiento radial (ICR; %) *in vitro* de 10 aislados del hongo fitopatógeno *N. vagabunda* por siete aislados del hongo biocontrolador *Trichoderma* spp. cuando fueron enfrentados al mismo tiempo (0 días). Con 6 días de incubación a 22°C.

Debido a la alta variabilidad demostrada en el gráfico de caja, las tablas de a continuación dan a conocer los resultados del análisis estadístico del enfrentamiento. Especificando la mayor

capacidad biocontroladora de los *Trichoderma* spp. sobre cada aislado de *N. vagabunda*. En todos los aislados del patógeno se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos. Los tratamientos que tienen medias ICR (%) en color rojo destacan de los demás tratamientos, ya que son los que obtuvieron mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno. Se destaca la cepa nativa del *Trichoderma* spp. Nancagua en ocho aislados con un promedio de inhibición de 56,6 %. También la otra cepa nativa destacada fue U Talca en los aislados 24, 32, 35 y 37 con un promedio de 53 % de inhibición. Por último el promedio ICR (%) entre *Trichoderma* spp. Mamull y Tiffi fue de 55,5 % de capacidad antagónica. Esto quiere decir que las cepas nativas destacadas se comportaron de igual forma que las cepas de *Trichoderma* spp. comerciales, ya que poseen la misma letra, determinando igualdad entre tratamientos.

Cuadro 4.1 Tablas de Medias para ICR (%) a 0 días. Aislado de *N. vagabunda* vs *Trichoderma* spp. con intervalos de confianza del 95,0% ($p < 0,05$).

Tabla N°1: Aislado 24		Tabla N°2: Aislado 25		Tabla N°3: Aislado 27	
Tratamiento	Medias ICR (%)	Tratamiento	Medias ICR (%)	Tratamiento	Medias ICR (%)
U Talca	55,2 b	U Talca	47,1 bc	U Talca	38,6 b
Nancagua	55,1 b	Nancagua	29,1 ab	Nancagua	59,6 c
Lourdes	16,2 a	Lourdes	13,2 a	Lourdes	14,3 a
Merced	21,2 a	Merced	11,3 a	Merced	21,4 a
Molina	36,1 ab	Molina	23,9 a	Molina	16,0 a
Tiffi	50,3 b	Tiffi	47,4 bc	Tiffi	43,6 bc
Mamull	36,3 ab	Mamull	60,7 c	Mamull	48,1 bc
Valor p: 0,0000 Kruskal W. Valor-p: 0,0005		Valor-p: 0,0000		Valor-p: 0,0000	

Tabla N°4: Aislado 32		Tabla N°5: Aislado 34		Tabla N°6: Aislado 35	
Tratamiento	Medias ICR (%)	Tratamiento	Medias ICR (%)	Tratamiento	Medias ICR (%)
U Talca	54,7 d	U Talca	41,8 ab	U Talca	48,9 b
Nancagua	58,6 d	Nancagua	51,0 b	Nancagua	58,9 b
Lourdes	23,5 ab	Lourdes	18,5 a	Lourdes	15,8 a
Merced	37,2 bc	Merced	26,9 ab	Merced	23,8 a
Molina	18,1 a	Molina	28,7 ab	Molina	28,4 a
Tiffi	47,9 cd	Tiffi	47,3 ab	Tiffi	53,2 b
Mamull	55,2 d	Mamull	57,8 b	Mamull	48,7 b
Valor-p: 0,0000		Valor-p: 0,0040 Kruskal W. Valor-p: 0,0100		Valor-p: 0,0000 Kruskal W. Valor-p: 0,0001	

Tabla N°7: Aislado 36	
Tratamiento	Medias ICR (%)
U Talca	50,5 bc
Nancagua	52,2 c
Lourdes	20,2 a
Merced	20,5 a
Molina	31,5 ab
Tiffi	59,8 c
Mamull	49,3 bc
Valor-p: 0,0000	

Tabla N°8: Aislado 37	
Tratamiento	Medias ICR (%)
U Talca	53,2 d
Nancagua	42,2 bcd
Lourdes	23,8 ab
Merced	29,3 abc
Molina	11,8 a
Tiffi	46,0 cd
Mamull	61,9 d
Valor-p: 0,0000	
Kruskal W. Valor-p: 0,003	

Tabla N°9: Aislado 39	
Tratamiento	Medias ICR (%)
U Talca	36,9 ab
Nancagua	62,4 b
Lourdes	24,4 a
Merced	22,6 a
Molina	15,9 a
Tiffi	42,4 ab
Mamull	29,2 a
Valor-p: 0,0020	
Kruskal W. Valor-p: 0,0154	

Tabla N°10: Aislado 40	
Tratamiento	Medias ICR (%)
U Talca	41,2 bcd
Nancagua	54,7 d
Lourdes	17,0 ab
Merced	13,4 a
Molina	23,8 abc
Tiffi	48,6 cd
Mamull	52,4 d
Valor p: 0,0000	

4.2 Efecto del enfrentamiento *in vitro* de *Trichoderma spp.* sobre el patógeno *N. vagabunda* a partir de 20 días de incubación.

La Figura 4.2 representa el ICR (%) de los tratamientos cuando el patógeno se dejó crecer 20 días antes de enfrentarlo con las cepas biocontroladoras de *Trichoderma spp.* Los tratamientos presentaron una baja capacidad antagónica y baja variabilidad reflejado en los gráficos de cajas. En las imágenes se puede observar que la competencia por el espacio y nutrientes fue similar en todos los tratamientos. En este enfrentamiento el patógeno crea resistencia a su defensa, pero debido a su crecimiento lento (Verkley, 1999), la inhibición ejercida por las cepas biocontroladoras de *Trichoderma spp.* crecieron rápidamente (Fernández-Larrea, 2001), logrando detener el crecimiento del fitopatógeno. La competencia reflejada en el enfrentamiento constituye a un mecanismo de acción indirecto muy importante del *Trichoderma spp.* Este comportamiento es desigual ante un mismo requerimiento en este caso el sustrato APDa y el espacio, los cuales se

reducen por el crecimiento anticipado del patógeno. Sin embargo, *Trichoderma* crece de todas formas ya que es favorecido por sus características antagónicas; por tener plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por ser tolerantes a factores externos como tipo de sustrato, pH, temperatura, humedad, entre otros (Ahmad y Baker, 1987; Hjeljord y Tronsmo, 1998). Además, se observó durante el ensayo que la placa testigo del antagonista se completó antes de que el *Trichoderma* spp. enfrentado pudiese colonizar, demostrando así la velocidad de crecimiento cuando se encuentra con disponibilidad de recursos.

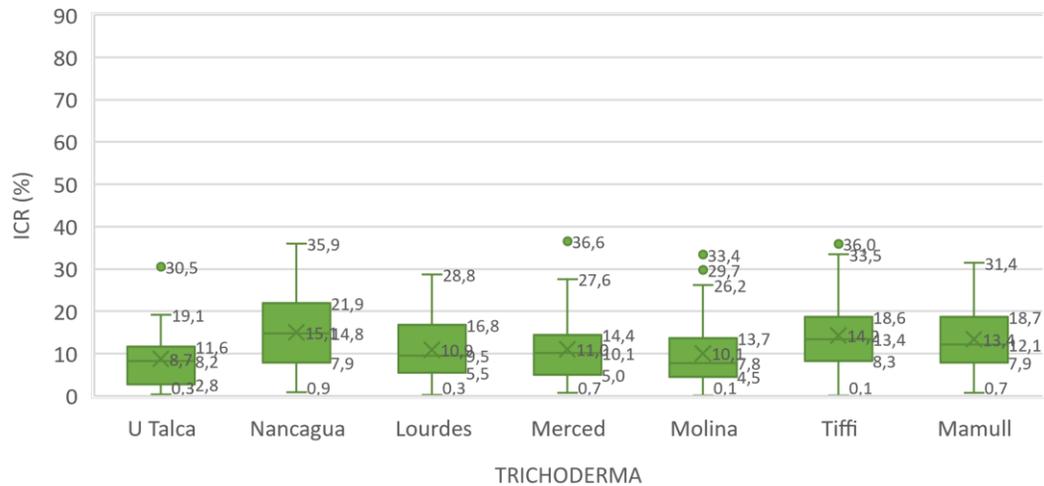


Figura 4.2 Inhibición del crecimiento radial (ICR; %) *in vitro* de 10 aislados del hongo fitopatógeno *N. vagabunda* por siete aislados del hongo biocontrolador *Trichoderma* spp. cuando fueron enfrentados a los 20 días de crecimiento del patógeno. Con 6 días de incubación a 22°C.

Con respecto a la baja variabilidad del enfrentamiento *in vitro*, el análisis estadístico empleado puede especificar con precisión en cual de todos los aislados del patógeno, los tratamientos con *Trichoderma* spp. tuvieron algún efecto inhibitorio en el crecimiento. En las siguientes tablas, los *Trichoderma* spp. se comportaron de forma similar en ocho aislados de *N. vagabunda*. La separación de medias (prueba de Tukey) arrojó letras iguales en la comparación entre tratamientos, determinando así que no existe diferencias significativas. Exceptuando el tratamiento con el *Trichoderma* spp. Nancagua que se destacó por su capacidad biocontroladora en los aislados 24 y 36 con medias ICR (%) de 16,5 y 23,3 respectivamente frente al patógeno.

Cuadro 4.2 Tablas de Medias para ICR (%) a 20 días. Aislado de *N. vagabunda* vs *Trichoderma* spp. con intervalos de confianza del 95,0% ($p < 0,05$).

Tabla N°1: Aislado 24		Tabla N°2: Aislado 25		Tabla N°3: Aislado 27	
Tratamiento	Medias ICR (%)	Tratamiento	Medias ICR (%)	Tratamiento	Medias ICR (%)
U Talca	7,1 abc	U Talca	9,4 a	U Talca	6,9 a
Nancagua	16,5 c	Nancagua	23,2 a	Nancagua	6,6 a
Lourdes	10 abc	Lourdes	15,3 a	Lourdes	10,8 a
Merced	4,1 a	Merced	10,2 a	Merced	13,6 a
Molina	4,5 ab	Molina	9,5 a	Molina	9 a
Tiffi	15,4 bc	Tiffi	20,6 a	Tiffi	8,1 a
Mamull	14,3 abc	Mamull	10,9 a	Mamull	9 a
Valor-p: 0,0031		Valor p: 0,0231 Kruskal W. valor-p: 0,0606		Valor-p: 0,8293	

Tabla N°4: Aislado 32		Tabla N°5: Aislado 34		Tabla N°6: Aislado 35	
Tratamiento	Medias ICR (%)	Tratamiento	Medias ICR (%)	Tratamiento	Medias ICR (%)
U Talca	8,1 a	U Talca	8,1 a	U Talca	9,8 a
Nancagua	16,1 a	Nancagua	16,8 a	Nancagua	11,4 a
Lourdes	3,7 a	Lourdes	7,9 a	Lourdes	11,7 a
Merced	13,3 a	Merced	9,8 a	Merced	13,4 a
Molina	16,1 a	Molina	6,1 a	Molina	7,2 a
Tiffi	20,6 a	Tiffi	7,6 a	Tiffi	12,6 a
Mamull	7,6 a	Mamull	13,4 a	Mamull	16 a
Valor-p: 0,1242		Valor-p: 0,1521		Valor-p: 0,6503	

Tabla N°7: Aislado 36		Tabla N°8: Aislado 37		Tabla N°9: Aislado 39	
Tratamiento	Medias ICR (%)	Tratamiento	Medias ICR (%)	Tratamiento	Medias ICR (%)
U Talca	5,2 a	U Talca	11,1 a	U Talca	11,6 a
Nancagua	23,3 b	Nancagua	13,3 a	Nancagua	12,4 a
Lourdes	10,2 ab	Lourdes	11,9 a	Lourdes	13,2 a
Merced	10,6 ab	Merced	11,3 a	Merced	14,9 a
Molina	18,2 ab	Molina	3,5 a	Molina	17 a
Tiffi	10,6 ab	Tiffi	9,2 a	Tiffi	19,2 a
Mamull	17,2 ab	Mamull	8,4 a	Mamull	22,6 a
Valor-p: 0,0115 Kruskal W. valor-p: 0,0281		Valor-p: 0,1222 Kruskal W. valor-p: 0,1423		Valor-p: 0,7375	

Tabla N°10: Aislado 40	
Tratamiento	Medias ICR (%)
U Talca	9,7 a
Nancagua	14,6 a
Lourdes	11,2 a
Merced	8,6 a
Molina	9,5 a
Tiffi	19,7 a
Mamull	14,8 a

Valor p: 0,4300

4.3 Efecto del enfrentamiento *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre el patógeno *N. vagabunda* a partir de 30 días de incubación.

El efecto biocontrolador de los *Trichoderma* spp. a los 30 días de crecimiento del hongo fitopatógeno, nuevamente fue bajo, destacando solamente el biocontrolador Tiffi, que mostró un ICR (%) promedio de 60% (Figura 4.3). A pesar de la variabilidad y dispersión de los datos del enfrentamiento se pudo distinguir el grado de la capacidad antagónica según la escala utilizada por Ezziyani et al. (2004). El *Trichoderma* spp. Tiffi (*Trichoderma* spp. atroviride) invadió la superficie de la cepa patógena cubriendo y esporulando sobre ella, determinándolo como un muy buen potencial antagónico de grado 4. Según estudios realizados con enfrentamientos de *Trichoderma* spp. atroviride sobre *Fusarium oxysporum*, se observó que el aislamiento nativo de *Trichoderma* spp. atroviride tuvo un 66,51% de Inhibición en la germinación de conidios del fitopatógeno (Guevara, 2013). Estos resultados concuerdan con Cardona (2006), quien observó este mismo enfrentamiento indicando que a los tres días de estar expuestos la inhibición fue de un 37% y que al séptimo día fue de un 70 %, presentando una capacidad de tipo hiperparasítica dado que *Trichoderma* spp. atroviride colonizó y esporuló la superficie del patógeno. Además se puede explicar la habilidad de control y efectividad que posee el *Trichoderma* spp. atroviride con las conclusiones de Siwek, Scoot y Harris (1997) quienes afirman que se debe a la combinación de micoparasitismo (liberación de enzimas hidrolíticas) y la producción de antibióticos los responsables de la degradación de la pared celular e inhibición *in vitro* del patógeno

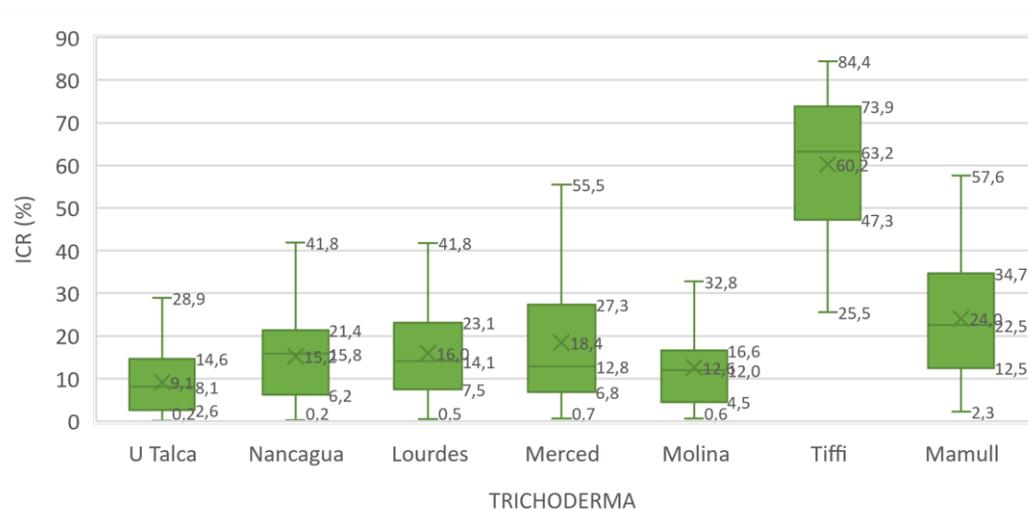


Figura 4.3 Inhibición del crecimiento radial (ICR; %) *in vitro* de 10 aislados del hongo fitopatógeno *N. vagabunda* por siete aislados del hongo biocontrolador *Trichoderma* spp. cuando fueron enfrentados a los 30 días de crecimiento del patógeno. Con 6 días de incubación a 22°C.

En este caso el fitopatógeno se fortaleció a medida que crecía en solitario y sin interrupción durante 30 días. Se alimentó de todo nutriente que hubiese en la placa, desarrollándose completamente con lentitud. La inserción del *Trichoderma* spp. detiene rápidamente el crecimiento del fitopatógeno, incluso estando desfavorecido por el reducido espacio y la baja cantidad de sustrato en placa. Es por esto que el objetivo principal del *Trichoderma* spp. es inhibir y sobrevivir. Por esta razón, se desencadenan diversos mecanismos de acción, los cuales son potenciados por las características antagónicas de cada *Trichoderma* spp. (Fernández-Larrea, 2001). A continuación se ve reflejado en las tablas, donde el *Trichoderma* spp. Tiffi se destacó por su gran efectividad inhibición en el 90% de los aislados de *N. vagabunda* y el otro 10% fue controlado por Mamull. Se logro mayor ICR (%) en el aislado 25 con 74,3 % con el tratamiento *Trichoderma* spp. Tiffi. Sin duda estos *Trichoderma* spp. poseen un mecanismo de acción superior, altamente desarrollado y resistente a condiciones inhóspitas.

Cuadro 4.3 Tablas de Medias para ICR (%) a 30 días. Aislado de *N. vagabunda* vs *Trichoderma* spp. con intervalos de confianza del 95,0%

Tabla N°1: Aislado 24		Tabla N°2: Aislado 25		Tabla N°3: Aislado 27	
Tratamiento	Medias ICR (%)	Tratamiento	Medias ICR (%)	Tratamiento	Medias ICR (%)
U Talca	8,0 a	U Talca	8,8 a	U Talca	2,3 a
Nancagua	17,7 a	Nancagua	12,0 a	Nancagua	13,3 a
Lourdes	15,9 a	Lourdes	17,4 a	Lourdes	14,1 a
Merced	23,9 a	Merced	24,7 a	Merced	9,7 a
Molina	12,2 a	Molina	14,5 a	Molina	7,7 a
Tiffi	57,7 b	Tiffi	74,3 b	Tiffi	47,2 b
Mamull	11,2 a	Mamull	13,1 a	Mamull	15,0 a
Valor-p: 0,0000 Kruskal W. valor-p:0,0343		Valor-p: 0,0000		Valor-p: 0,0001 Kruskal W. valor-p:0,0081	

Tabla N°4: Aislado 32		Tabla N°5: Aislado 34		Tabla N°6: Aislado 35	
Tratamiento	Medias ICR (%)	Tratamiento	Medias ICR (%)	Tratamiento	Medias ICR (%)
U Talca	10,1 a	U Talca	20,6 a	U Talca	8,0 a
Nancagua	13,4 a	Nancagua	21,4 a	Nancagua	24,0 ab
Lourdes	14,6 a	Lourdes	11,1 a	Lourdes	18,6 ab
Merced	13,3 a	Merced	26,4 a	Merced	14,9 ab
Molina	13,9 a	Molina	17,7 a	Molina	19,0 ab
Tiffi	68,6 b	Tiffi	68,2 b	Tiffi	51,9 c
Mamull	17,2 a	Mamull	24,0 a	Mamull	27,8 b
Valor-p: 0,0000		Valor p: 0,0000		Valor-p: 0,0000	

Tabla N°7: Aislado 36		Tabla N°8: Aislado 37		Tabla N°9: Aislado 39	
Tratamiento	Medias ICR (%)	Tratamiento	Medias ICR (%)	Tratamiento	Medias ICR (%)
U Talca	2,6 a	U Talca	14,2 a	U Talca	10,7 a
Nancagua	5,9 a	Nancagua	15,9 a	Nancagua	16,2 ab
Lourdes	15,9 a	Lourdes	11,5 a	Lourdes	25,6 abc
Merced	7,5 a	Merced	14,2 a	Merced	39,6 bc
Molina	6,2 a	Molina	14,8 a	Molina	5,0 a
Tiffi	68,3 b	Tiffi	68,9 b	Tiffi	37,3 bc
Mamull	20,2 a	Mamull	32,3 a	Mamull	48,4 c
Valor-p: 0,000 Kruskal W. Valor-p: 0,0062		Valor-p: 0,0000 Kruskal W. Valor-p: 0,0034		Valor-p: 0,0000 Kruskal W. Valor-p: 0,0018	

Tabla N°10: Aislado 40	
Tratamiento	Medias ICR (%)
U Talca	12,6 a
Nancagua	18,7 ab
Lourdes	23,6 ab
Merced	16,1 a
Molina	24,7 ab
Tiffi	49,4 c
Mamull	37,1 bc

Valor-p: 0,0001

Para complementar un poco más lo analizado, se graficó el Área de crecimiento de los diferentes *Trichoderma* spp. evidenciados a los 0, 20 y 30 días de crecimiento del patógeno.

En el siguiente gráfico (Figura 4.4) se puede observar una homogeneidad en el área de crecimiento de los *Trichoderma* spp. en general con todos los aislados del patógeno. Donde Tiffi, Molina y Mamull, en comparación con los demás tratamientos, tienen un mayor crecimiento al ser enfrentado a la mayoría de los aislados de *N. vagabunda* exceptuando los aislados 37 y 39 donde el área decae. Se puede deducir que el patógeno es mucho más sólido y resistente en estos aislados. El tratamiento con Mamull, alcanzó una elevada Área de crecimiento en el aislado 37 con 7.184mm². Este crecimiento se debe a que es un *Trichoderma* spp. que posee una fusión de varias especies, que potencian su mecanismo de acción, actuando por efecto de competencia, inhibición, parasitismo y micoparasitismo, características que lo hacen ser un biocontrolador muy eficaz. Además, se caracteriza por tener una amplia aplicabilidad sobre plantas, presenta acción cicatrizante y curativa sobre daños causados por fitopatógenos (SAG, 2020). Otro *Trichoderma* spp. que se encuentra con alta eficiencia a la hora de un enfrentamiento por competencia es Tiffi, al contener genes adquiridos por la resistencia a diferentes ambientes y a un extenso estudio de esta cepa, se ha potenciado evidentemente, logrando resultados esperados contra fitopatógenos. Con respecto a las nuevas cepas nativas, Molina destacó por alcanzar mayor área colonizada con 6.678 mm² en el aislado 36 de *N. vagabunda*. Crecimiento que no es menor ya que se comportó relativamente parecido a los *Trichoderma* spp. de formulaciones comerciales, indicio bastante bueno para comenzar un análisis más exhaustivo con esta cepa.

Los *Trichoderma* spp. como agente de control deben actuar rápidamente para evitar que el patógeno logre afectar el cultivo, pues una vez que ya haya producido daño, será demasiado tarde para que el biocontrolador lo detenga. Por esta razón la resistencia adquirida es un mecanismo muy importante de la actividad biocontroladora, ya que puede actuar o enfrentar a varios tipos de patógenos (Cortes *et al.*, 2018).

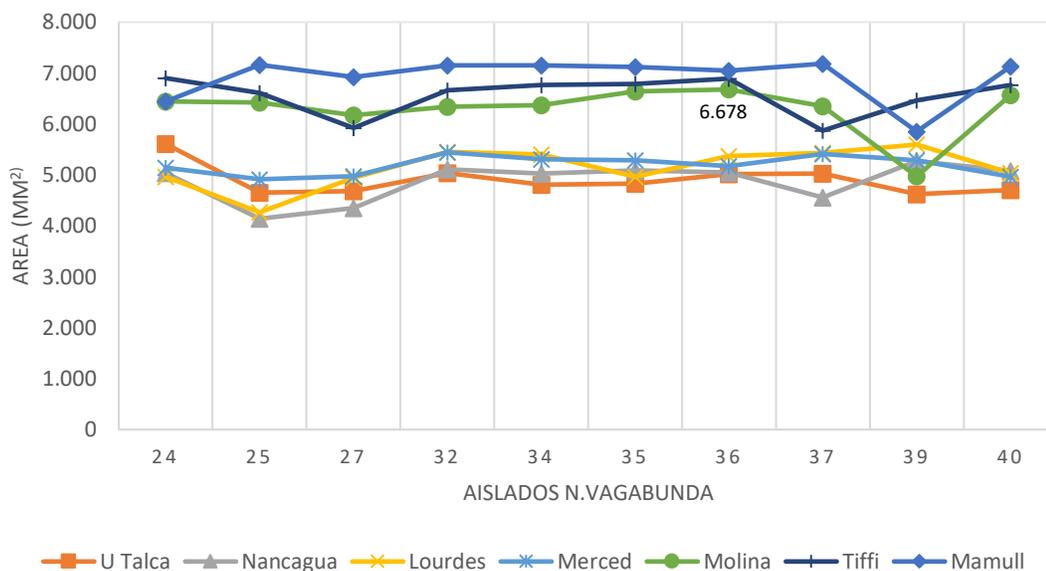


Figura 4.4 Crecimiento *Trichoderma* spp. en área (mm²) enfrentados a 0 días.

En el próximo gráfico (Figura 4.5) se presenta una disimilitud muy variada en el área de crecimiento según el aislado de *N. vagabunda* enfrentado. Este comportamiento se ve reflejado en las cepas nativas de U Talca, Nancagua, Lourdes y Merced. El área decrecimiento de Nancagua y Lourdes a los 20 días de incubación del patógeno se expresó de manera similar a los *Trichoderma* spp. Tiffi, Mamull y Molina. Estos últimos presentaron un grado de uniformidad en el área de crecimiento en la mayoría de los aislados del fitopatógeno con 4.884 mm² en promedio. El *Trichoderma* spp. Nancagua se destaca por alcanzar valores cercanos a Tiffi en los aislado 24, 34, 36 y 37. El efecto fungistático de Tiffi prevalece genéticamente logrando una capacidad biocontroladora eficiente al momento de competir por nutrientes y espacio en condiciones extremas, en este caso a pesar de estar enfrentados en medios de cultivo APD con espacio muy limitado, *Trichoderma* spp. detuvo por competencia el crecimiento del patógeno *N. vagabunda*.

La característica de supervivencia es determinante para seleccionar biocontroladores potenciales dado que las condiciones medioambientales tienden a cambiar durante el desarrollo del cultivo y el curso de la enfermedad. Sobrevivir se torna necesario cuando el microorganismo biocontrolador requiere un periodo activo extenso en función del periodo activo del patógeno y de las condiciones del tejido vegetal susceptible. Por este motivo se deben desarrollar tecnologías que le otorguen tolerancia al biocontrolador frente a condiciones extremas como cambios en la temperatura, niveles de humedad, radiación solar, sequía, presencia de iones tóxicos y productos químicos (Cortes et al., 2018).

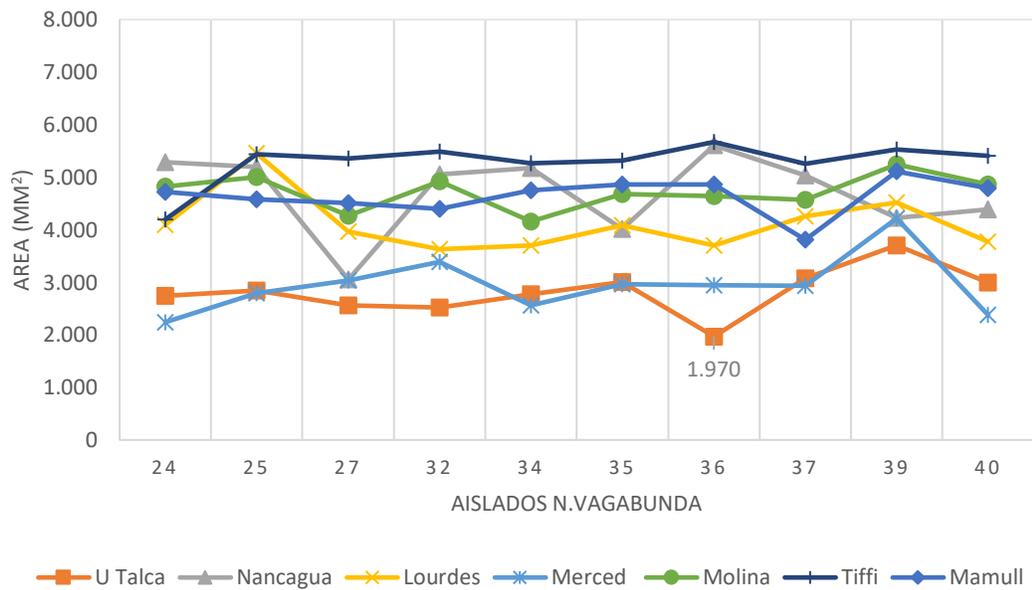


Figura 4.5 Crecimiento *Trichoderma* spp. en área (mm²) enfrentados a 20 días.

Por último, los *Trichoderma* spp. son enfrentados al patógeno con crecimiento de 30 días (Figura 4.6), donde se observa claramente la diferencia en el área de crecimiento entre los *Trichoderma* spp. de formulaciones comerciales y las nuevas cepas nativas. Además, se puede apreciar que las cepas nativas se comportan desiguales dependiendo del aislado de *N. vagabunda*. El *Trichoderma* spp. U Talca arrojó un área de crecimiento alto de 4.693 mm² en el aislado 37 y 4.589 mm² en el aislado 34. El antagonista nativo “Nancagua” presentó similitud a U Talca en el control de varios aislados del fitopatógeno, pero también presentó el área más baja con 1.168 mm² en el aislado 36. Además se puede observar que el área de crecimiento de Lourdes y Molina se comportan parecidos en el enfrentamiento de la mayoría de los aislados de *N. vagabunda*. Los *Trichoderma* spp. Tiffi y Mamull destacaron en promedio con un área de crecimiento de 5.892 mm². Esto se debe a que el fungicida biológico Tiffi es a base de conidióforos, clamidosporas y micelio viable de la cepa MUCL45632 del hongo *Trichoderma* spp. atroviride. La capacidad de colonizar la rizosfera y las raíces lo hace ser un antagonista de acción directa sobre el patógeno de suelo y aéreos. Es por esto, que en la condición *in vitro* posee una alta capacidad biocontroladora frente al patógeno *N. vagabunda*, ya que la resistencia adquirida y la producción de metabolitos secundarios lo potencian aún más promoviendo un efecto bioestimulante en el cultivo aumentando el rendimiento (SAG, 2020).

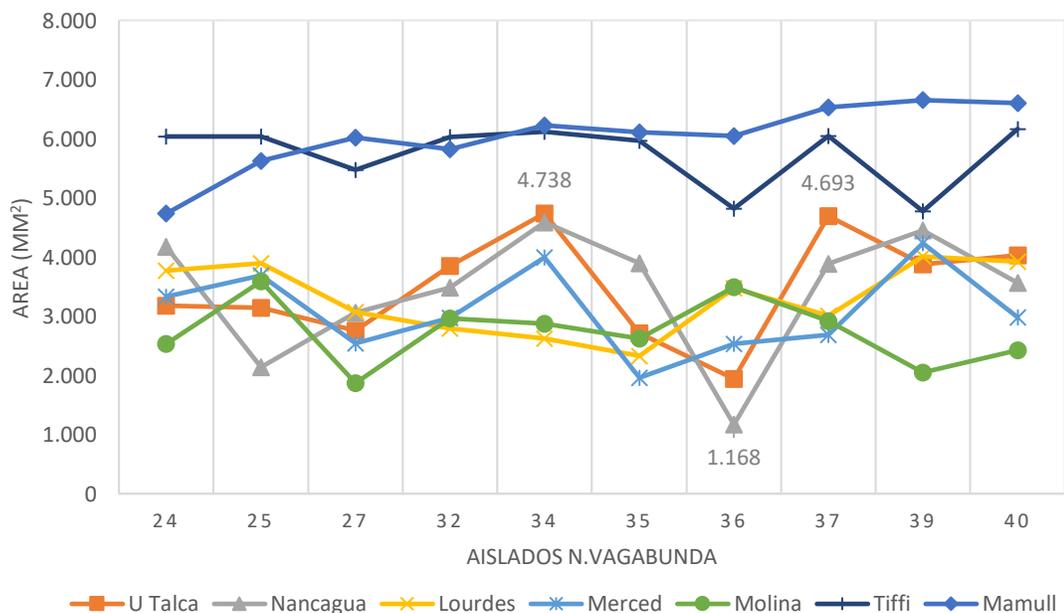


Figura 4.6 Crecimiento *Trichoderma* spp. en área (mm²) enfrentados a 30 días.

El otro *Trichoderma* spp. que obtuvo mayor área de crecimiento es Mamull, compuesto por micelio y conideas de cepas nativas *Bionectria ochroleuca*, *Trichoderma gamsii* e *Hypocrea virens* este producto presenta acción fungicida, con efecto de competencia, inhibición y parasitismo (SAG, 2020). Como se puede observar en el gráfico, es un producto que posee un efecto eficaz debido a su potente fórmula.

Cabe destacar que los *Trichoderma* spp. son biocontroladores eficientes, capaces de mantener su viabilidad, patogenicidad, virulencia y habilidad de reiniciar el crecimiento en el suelo. Puesto que la aplicación en campo podría presentar mayor efecto si éstas son aisladas y evaluadas en la misma zona de origen donde ya están adaptadas a las condiciones ambientales (Blakeman y Flokkms, 1982).

La búsqueda e implementación de alternativas de control se convirtió en una necesidad, ya que la sobre utilización de plaguicidas desencadena resistencia a estos productos, impidiendo lograr un control efectivo (Brent y Hollomon, 2007). Es por esto que reducir el impacto sobre el medio ambiente y limitar los residuos en los productos cosechados garantiza una producción amigable en la salud humana y en el medio ambiente (Fenner *et al.*, 2013; Verger y Boobis, 2013).

A continuación, se expondrán valores del coeficiente de correlación lineal de dos variables: Área (mm²) y ICR (%). Como se expuso anteriormente se usó la fórmula de Ezziyani para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno. Por otra parte, se empleó un método para determinar la capacidad biocontroladora según el crecimiento del *Trichoderma* spp. usando el programa Imagen J., el cual consiste en delimitar el área radial del crecimiento del antagonista enfrentado a diferentes días de incubación del patógeno.

El coeficiente de correlación de Pearson permite medir la fuerza y sentido de la relación lineal de dos variables. Determinar si ambos métodos tienen un grado de similitud o diferencia al ser comparados sus datos es fundamental ya que la eficiencia y precisión que se debe tener en este tipo de estudios es importante debido a que una pequeña variación puede marcar la diferencia.

El siguiente cuadro 4.4, da a conocer, la interpretación de los coeficientes según la relación que tienen los métodos de estudio en determinar la capacidad biocontroladora de los *Trichoderma* spp. Para la interpretación del coeficiente, es necesario tener en cuenta que un valor cercano a "0" indica que hay poca relación, pero cuando es cercano a "1" indica alta correlación (Fonseca *et al.*, 2017).

COEFICIENTES DE CORRELACIÓN			
<i>Trichoderma</i> spp.	Incubación del patógeno (días)		
	0	20	30
U Talca	0,80	0,95	0,95
	Fuerte		
Nancagua	0,99	0,89	0,97
	Perfecto	Fuerte	Perfecto
Lourdes	0,88	0,85	0,91
	Fuerte		
Merced	0,91	0,85	0,94
	Fuerte		
Molina	0,66	0,92	0,91
	Moderado	Fuerte	
Tiffi	0,83	0,62	0,81
	Significativo	Moderado	Significativo
Mamull	0,93	0,83	0,83
	Fuerte	Significativo	

Cuadro 4.4 Coeficiente de Correlación ÁREA (mm²) vs ICR (%).

En el cuadro 4.4, se observa que las correlaciones obtenidas tienen posición lineal positiva, donde todos los coeficientes mantienen un grado de similitud en su tendencia. Esto quiere decir que ambas formas de medir la capacidad de control son asertivas en su resultado, encontrándose un grado de correlación “Perfecta” en los tratamientos de Nancagua a los 0 y 30 días con 0,99 y 0,97. El siguiente nivel se interpreta como “Fuerte”, ya que está en el rango de 0,85 a 0,95, reflejándose en la interacción entre variable Área (mm²) y ICR (%) de los tratamientos: U Talca, Lourdes y Merced a los 0, 20 y 30 días de crecido el patógeno. El tratamiento Molina a los 20 y 30 días también arrojó un grado de correlación “Fuerte” entre variables como también en el tratamiento Mamull a los 0 días y Nancagua a los 20 días. Los tratamientos que fueron significativos, rango entre 0,70 y 0,84, son Tiffi a los 0 y 30 días, y Mamull a los 20 y 30 días. Por último, la correlación entre Área (mm²) y ICR (%) en el tratamiento Tiffi a los 20 días es moderada con el grado de coeficiente 0,62. Lo expuesto anteriormente permite concluir que los resultados del presente estudio confirman que existe una relación entre las variables de medición.

5. CONCLUSIONES

- ❖ El mayor ICR (%) de los *Trichoderma* spp. nativos se presentó 0 días de incubación del patógeno: Nancagua, U Talca.
- ❖ El mayor ICR (%) de los *Trichoderma* spp. comerciales se presentó a los 30 días de incubación del patógeno: Tiffi y Mamull.
- ❖ Los *Trichoderma* spp. nativos si bien presentaron alto ICR (%) sobre el patógeno, no fueron eficaces como se esperaba que fuesen al ser comparados con *Trichoderma* spp. comerciales.
- ❖ Los *Trichoderma* spp. nativos podrían seguir siendo estudiados y potenciados entre si con el objetivo de lograr eficacia y eficiencia en la capacidad biocontroladora en futuras aplicaciones preventivas en precosecha sobre la enfermedad “Ojo de buey” en Manzanas Cripp's Pink.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abella, F. 2011. Fungicidas. Mecanismo de Acción de los Fungicidas. Revista Ventana al campo. Capítulo 11. Disponible en: <https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/19031/64405_64953.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Consultado el: 19 de 01 de 2021.
2. Acevedo, M. 2004. Desarrollo de lenticelosis en manzanas cv. Royal Gala. Universidad de Talca, Agronomía. Disponible en: <<http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/1087/3/MCAcevedo.pdf>> Consultado el: 12 de enero de 2021.
3. Acuña, R. 2010. Compendio de bacterias y hongos de frutales y vides de Chile. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Santiago, Chile. 150p.
4. Álvarez, M., Pinilla, B., y Herrera, G. 2004. Enfermedades del manzano. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA-La Platina). Santiago, Chile. 71p.
5. Benítez, T., Rincón, A., Limón, M. y Codón, A. 2004. Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7:249-260.
6. Bertolazzi, M. 2019. Los programas de mejora genética en Italia y en Europa. Aspectos generales. Universidad de Talca. Talca. Boletín Técnico Pomáceas. N°106. Disponible en: <<http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2019/08/106.-Manejo-varietal-en-Europa-e-Italia.-M.-Bertolazzi.-Mayo-2019.pdf>> Consultado el: 3 de septiembre de 2019.
7. Blakeman J. y Fokkema, N. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the Phylloplane. *Annual Review of Phytopathology*. 1982; 23: 337-353.
8. Braun, P. y Pelletier, J. 2003 Postharvest handling of pome fruits, sofá fruits, and grapes-Apple Diseases.
9. Brent, K. y Hollomon, D. 2007. Fungicide resistance: the assessment of risk. FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), Brussels, Belgium. Disponible en: <<https://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-2.pdf>> Consultado el: 15 de marzo del 2021.
10. Cabrera, D. 2006. Evaluación de prácticas de manejo en manzana variedad Pink Lady Cripp's Pink. Instituto de investigaciones Agropecuarias. Disponible en: <<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/847/1/111219220807170004.pdf>> Consultado el: 27 de marzo de 2020.

11. Cardona, R. y Rodríguez, H. 2006. Efecto del hongo *Trichoderma Harzianum* sobre la incidencia de la enfermedad pudrición carbonosa en ajonjolí. Rev. Fav. Agron. LUZ. España. 23 (18): 44-50.
12. CIREN (Centro de Información de Recursos Naturales), Chile. 2017. Manzano. Información avance de proyecto. Disponible en: <https://www.ciren.cl/wp-content/uploads/2017/12/Manzana.pdf?fbclid=IwAR3SrJeHViv4g54-1pi_wQ7xJEx0TPTwUCq1AN7GjI6NnE8pb0Nq-eA0YwY> Consultado el: 24 de octubre de 2019.
13. CIREN (Centro de Innovación de Recursos Naturales), Chile. 2020. Catastro Frutícola, Región Valparaíso principales resultados. Resumen Nacional de la Superficie Frutícola. Disponible en: <<https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/70428/catastroFruticolaValpo2020.pdf>> Consultado el: 7 de abril de 2021.
14. Chincholkar, S. y Mukerji, K. 2007. Biological control of plant diseases. Haworth Press, New York, NY.
15. Cripps, J., Richards, L. y Mairata, A. 1993. 'Pink Lady' apple. HortScience 28:1057. Disponible en: <<https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/28/10/article-p1057.xml>> Consultado el: 13 de abril de 2021.
16. Cortes, A., Zapata, Y., Beltran, C., Kobayashi, S., Uribe y L. Elad, Y. 2018. Agente de control Biológico. Principales patógenos foliares, insectos y ácaros. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA.
17. Cundom, M., Mazza de Gaiad, S., Mazzati de Castañon, M., Gutiérrez de Arriola, S. y Coutinho, M. 2002. Actividad antagónica *in vitro* de hongos Saprófitos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. En: <<https://www.yumpu.com/es/document/read/21227700/actividad-antagonica-in-vitro-de-hongos-saprofitos-sobre-sclerotinia->> Consultado el: 31 de enero de 2021.
18. Díaz, F. 2015. Caracterización físico-química de variedades de manzana resistente al moteado (*Venturiainaequalis* (CKe.) Winter) y valorización sensorial. Trabajo final de carrera, UPC. Disponible en: <<https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/26078/memoria.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Consultado el: 25 de septiembre de 2020.
19. Fahn, A. 1974. Anatomía Vegetal. Editorial H. Blume, Madrid, Pág. 243-249.
20. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), 2010. El daño producido por las heladas: Fisiología y Temperaturas críticas. Cap 4. Disponible en: <<http://www.fao.org/3/y7223s/y7223s05.pdf>> Consultado el: 27 de marzo de 2020.

21. Fenner, K., Canonica, S., Wackett, L. P., y Elsner, M. 2013. Evaluating pesticide degradation in the environment: Blind spots and emerging opportunities. *Science*, 341(6147), 752-758. <https://doi.org/10.1126/science.1236281>
22. Feliziani, E., Santini, M., Landi, L., y Romanazzi, G. 2013. Pre-and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweet cherry. *Postharvest Biol Technol* 78, 133-138.
23. Fernández-Larrea O. 2001. Microorganismos para el control fitosanitario; Manejo Integrado de Plagas. 62: 96-100. Costa Rica.
24. Fernández, X. 2013. Radiografía a la pudrición 'Ojo de Buey' en Pink Lady. *El mercurio, campo*. Recuperado en: <<https://www.elmercurio.com/Campo/Noticias/Noticias/2013/06/19/Radiografia-a-la-pudricion-Ojo-de-Buey-en-Pink-Lady.aspx>> Consultado el: 13 de abril de 2021.
25. FIA (Fundación para la Innovación Agraria), 2008. Biocontrol de enfermedades fungosas con *Trichoderma spp*, Región de O'Higgins y Maule. Disponible en: https://www.opia.cl/static/website/601/articles-75579_archivo_01.pdf> Consultado el: 26 de octubre de 2019.
26. FIA (Fundación para la Innovación Agraria), 2015. Eficiencia Hídrica. Innovaciones para hacer frente al principal desafío que impone el cambio climático. *Innova + agro*. 2. Disponible en: <<http://www.fia.cl/wp-content/uploads/2018/03/N-2-Revista-Diciembre-2015.pdf>> Consultado el: 30 de octubre de 2019.
27. Fonseca, T., Salcedo, L. y Rocha, A. 2017. Estilos, estrategias de aprendizaje, relación desempeño académico, resultados pruebas saber 11° en ciencias naturales, Colombia. *Revista Espacios*. Disponible en: <https://www.revistaespacios.com/a18v39n10/a18v39n10p09.pdf> Consultado el: 6 de febrero de 2021.
28. Fravel, D. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43(2), 337-359.
29. Fresno, A., Lepe, V. Hernández, O. y Torres, C. 2014. Cripp's Pink (Pink Lady) consideraciones técnicas. Centro de Pomáceas. Universidad de Talca. Talca. Boletín técnico Pomáceas. Volumen:14. n°2 Disponible en: <http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/Boletin_N14_2.pdf > Consultado el: 27 de marzo de 2020.
30. FDF (Fundación para el desarrollo de fruta), 2015. Mejoramiento de los manejos agronómicos y de postcosecha para disminuir la incidencia de pardeamiento interno en Cripp's Pink. Disponible en: <http://www.fdf.cl/biblioteca/publicaciones/2015/archivos/Boletin_Cripps_Pink.pdf> Consultado el: 27 de marzo de 2020.

31. Galdames, R., Mesa, F. 2013. Nuevas variedades de manzanos en Chile-Situación Actual Revista Frutícola COPEFRUT S.A. Especial Manzanas. Disponible en: <https://www.copefrut.com/wp-content/themes/copefrut/img/revistas/2013_N1.pdf> Consultado el: 13 de abril de 2021.
32. Grove, G. 1990. Anthracnose and perennial canker. Pages 36-38 in: Compendium of Apple and Pear diseases. A. L. Jones and H. S. Aldwinckle, eds. American *Phytopathological* Society, St. Paul, MN.
33. Henríquez, J. 2005. First report of apple rot caused by *Neofabraea alba* in Chile. Plant Disease 89: 1360.
34. Henríquez, J. 2004. Primer reporte de *Neofabraea* (Pezizula) *alba* (Guthrie) causando pudrición lenticelar de manzanas en Chile. Plant Disease. 88:1134, 2004.
35. Hernández, O., Fuentes, M., Sepúlveda, A., Torres, C. y Yuri, J. 2010. Análisis de postcosecha temporada 2009/2010. Boletín técnico, volumen 10. Centro de pomáceas. Universidad de Talca, Talca Chile: N°6. Disponible en: <http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/Boletin_N10_6.pdf> Consultado el: 9 de abril de 2021.
36. Herman, G. 2000. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. Plant. Dis. 84(4),377-393.
37. Howell, R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* spp. in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Dis 87:4-10.
38. Howell, R. 2006. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. Phytopathology. 96(2), 178-180.
39. Iglesias, I. 2016. Innovación varietal en manzanos y perales. Boletín técnico Pomáceas Volumen 16. N°3. Universidad de Talca. Talca. Disponible en: <http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/Boletin_N16_3_Innovacion_varietal.pdf> Consultado el: 27 de marzo de 2020.
40. Latorre, B. 2018. Compendio de las enfermedades de las plantas. Ediciones Universidad Católica de Chile. Primera edición. Santiago, Chile.733p.
41. Latorre, B. 2004. Enfermedades de las plantas cultivadas. Sexta edición. Ediciones Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 638 p.
42. Lolas, M. 2005. Enfermedades de verano en manzanas Pink Lady. Centro de pomáceas Universidad de Talca. Boletín técnico 5(2):4. Disponible en: <<http://pomáceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/enfermedades-pre-y-pos-cosecha.pdf>> Consultado el: 28 de octubre de 2019.

43. Lolas, M., Díaz, G., Méndez, R., Cáceres, M. y Neubauer, L. 2016. Evaluation of the efficacy of fungicide fludioxonil in the postharvest control of bull's eye rot (*Neofabraea alba*) in Chile. *Acta Horticulturae*, 461–464.
44. Lolas, M y Díaz, G. 2016. Enfermedades de pre y postcosecha en manzanos. Centro de Pomáceas Universidad de Talca. Talca. Boletín Técnico Pomáceas. Volumen;16, N°5 Disponible en: <<http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/enfermedades-pre-y-pos-cosecha.pdf>> Consultado el: 27 de marzo de 2020.
45. Martín, V., 2005. Consumo de frutas frescas en España. Distribución y Consumo (41). Disponible en: <<https://www.mapa.gob.es/es/sistema/includes/errores/404.aspx>> Consultado el: 20 diciembre de 2020.
46. Merlet, H., Navarro, A., y Rosales, C. 2016. Manual técnico productivo y económico manzana. CIREN. Disponible en: <<http://bibliotecadigital.ciren.cl/handle/123456789/26085>> Consultado el: 28 de septiembre de 2019.
47. Moggia, C y Pereira, M. 2003. Manzanas Pink Lady. Boletín técnico Pomáceas. Volumen;3, N°4. Centro de pomáceas Universidad de Talca. Talca. Disponible en: <http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/Boletin_N14_2.pdf> Consultado el: 27 de marzo de 2020.
48. ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias), Chile. 2021. Boletín de fruta fresca. Publicación de ODEPA Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Disponible en: <<https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletines/boletin-de-fruta-febrero-2021>> Consultado el: 8 de abril de 2021.
49. ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias), Chile. 2020. Boletín de fruta fresca. Publicación de ODEPA Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Disponible en:<<https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletines/boletin-de-fruta-octubre-2020>> Consultado el: 8 de abril de 2021.
50. Palomo, I., Yuri, J., Moore-Carrasco, R., Quilodrán, Á. y Neira, A. 2010. El consumo de manzanas contribuye a prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer: Antecedentes epidemiológicos y mecanismos de acción. *Revista Chilena de nutrición*, 37(3) 377-385 Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/262703215_El_consumo_de_manzanas_contribuye_a_prevenir_el_desarrollo_de_enfermedades_cardiovasculares_y_cancer_antecedentes_epidemiologicos_y_mecanismos_de_accion>.
51. Pérez, L. 2018. Control biológico, una estrategia tan sostenible como rentable. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA). Disponible en: <http://ria.inta.gob.ar/sites/default/files/actualidadimasd/nota_control_biologico_ria-vol44-n2-agosto-2018.pdf> Consultado el: 31 de marzo de 2020.

52. Pinilla, B., Lolas, M., Soto, S. 2005. "Ojo de Buey": Aspectos relevantes de la pudrición que afecta a las manzanas en Chile. *Revista Frutícola*. 26(3):113-116.
53. Quiroz, I. 2017. Plantación de manzanos, perales y cerezos y su impacto en la oferta. Disponible en: <http://pomaceas.utralca.cl/wp-content/uploads/2016/06/Boletin_Tecnico_Mayo_2017.pdf> Consultado el: 8 de agosto del 2020.
54. Ramírez, M., Jacobo, J., Gardea, A. y Parra. R. 2008. Modelo de Desarrollo Floral en Manzanos [*Malus sylvestris* (L.) Mill. Var. domestica (Borkh) Mansf.] Red Delicious y Golden Delicious como Herramienta de Toma de Decisiones en manejo Integrado de Enfermedades. *Rev. Mex. Fitopatol* vol.26 N°2 Texcoco. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092008000200008> Consultado el: 13 de abril de 2021.
55. Red agrícola. 2017. Manzana, un mercado de alta competitividad y complejidad. Disponible en: <<http://www.redagricola.com/cl/un-mercado-de-alta-competitividad-y-complejidad/>> Consultado el: 02 de mayo de 2019.
56. Reginato, G., Luchsinger, L., Alvarez, R. 2002. Caracterización de la maduración de manzanas var. Pink Lady. *Simiente* 72 (3-4).
57. Romero-Cortes, T., López-Pérez, P., Ramírez-Lepe, M. y Cuervo-Parra, J. 2016. Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Chilean Journal of Agricultural and Animal Science, ex Agro-Ciencia* 31(3):32-45. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0719-38902016000100004&lng=es&nrm=iso> Consultado el: 12 de abril del 2021.
58. Samuels, G. 2006. *Trichoderma*: Systematic, the sexual state, and ecology. *Phytopathol.* 96(2), 195.
59. SAG (Servicio Agrícola y Ganadero), 2020. Etiqueta Tiffi Polvo, fungicida biológico polvo mojable (WP). N°2708. Disponible en: <https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/tifi_polvo_02-03-2020.pdf> Consultado el: 17 de marzo de 2021.
60. SAG (Servicio Agrícola y Ganadero), 2020. Etiqueta Mamull, fungicida biológico polvo mojable (WP). N°2964. Disponible en: <<https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/etiqueta-mamull-09-07-20.pdf>> Consultado el: 17 de marzo de 2021.

61. Siwek, K., Scott, E., Harris, A. 1997. Role of antibiosis in biological control of *Pythium ultimum* by binucleate *Rhizoctonia*. Australasian Plant Pathology Society. Eleventh Biennial Conference. Abstract. P.252
62. Soto-Alvear, S., Rosales, I. y Lolas, M. 2012. Enfermedad de Postcosecha: Identificación y control de Ojo de Buey en manzanas Cripps Pink [en línea]. Tierra Adentro. no. 98. Disponible en: <<https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/5306>> Consultado el: 12 abril de 2021.
63. Soto-Alvear, S., Lolas, M., Rosales, I., Chavéz, E., y Latorre, B. 2013. Characterization of the Bull's eye rot of apple in Chile. *Plant Disease* 97:485-490.
64. Spotts, R. 1990. Bull's eye rot. *Compendium of Apple and Pear Diseases*. (Eds AL Jones and HS Aldwinckle) (American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA), 56-57.
65. Spotts, R., Cervantes, L., Mielke, E. 1999. Variability in Postharvest Decay Among Apple Cultivars. *Plant Disease* 83:1051-1054.
66. Spotts, R., Seifert, K., Wallis, M., Sugar, D., Xiao, C. y Henríquez, J. 2009. Description of *Cryptosporiopsis kienholzii* and species profiles of *Neofabraea* in major pome fruit growing districts in the Pacific Northwest USA. *Mycological Research* 113:1301-1311. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/26792723_Description_of_Cryptosporiopsis_kienholzii_and_species_profiles_of_Neofabraea_in_major_pome_fruit_growing_districts_in_the_Pacific_Northwest_USA> Consultado el: 20 de marzo de 2021
67. Tjamos, E., Papavizas, G. y Cook, R. 1992. Biological control of plant diseases. Progress and challenges for the future. Plenum Press, New York.
68. Torres, A., Barrientos, L., Gutiérrez, A. y Gidekel, M. 2002. Control Biológico de *Venturia* o Sarna del Manzano. *Revista Tierra Adentro*, (45):16-19.
69. Uriarte, M. 2019. La manzana (*Malus domestica*) una fruta de colación completa. Universidad Autónoma de Occidente. Disponible en: <<https://es.slideshare.net/NUTRICIONUDEOGUAMUCHIL/la-manzana-malus-domestica-una-fruta-de-colacin-completa>> Consultado el: 30 de octubre de 2019.
70. Verger, P. y Boobis, A. 2013. Reevaluate pesticides for food security and safety. *Science*, 341(6147), 717-718. doi:10.1126/science.1241572
71. Verkley, G. 1999. A monograph of the genus *Pezicula* and its anamorphs. *Studies in Mycology* 44: 1e180.

72. Viñas, M., Usall, J., Graell, J., Lara, I. y Recasens, D. 2013. Postcosecha de pera, manzana y melocotón. Mundi-prensa Libros. 335p. Disponible en: <<https://www.mundiprensa.com/catalogo/9788484765493/poscosecha-de-pera--manzana-y-melocoton>> Consultado el :28 de octubre del 2020.
73. Xeda international, 2003. Tratamiento de postcosecha por termonebulizador. Disponible en <http://www.Xeda.com/Doc/prodgb>. Consultado 19 de enero 2021.
74. Yuri, J. 1995. Aspectos Fundamentales de la Bioquímica y Fisiología del Calcio. Calcio en Fruticultura. Simposium Internacional Universidad de Talca. Pág. 25-45. Disponible en:<<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/123456789/28221/NR22660.pdf?sequence=1>> Consultado el: 17 de octubre del 2020
75. Ahmad, J. y Baker, R. Rhizosphere Competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathol.* 1987;77: 182-189. Disponible en: <https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1987Articles/Phyto77n02_182.PDF> Consultado el: 10 de marzo del 2021
76. Hjeljord, L. y Tronsmo, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds). Volumen 2. p.131-151. Taylor & Francis.