



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

**Sensibilidad y control de Botryosphaeriaceae causantes de muerte regresiva
en manzanos**

MEMORIA DE TÍTULO

MATÍAS IGNACIO GALDAMES VILCHES

**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, 2022

Aprobación:



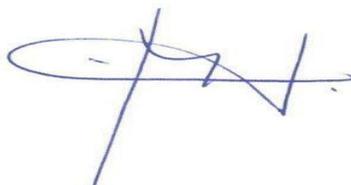
Gonzalo Díaz Ulloa

Profesor guía: Gonzalo Díaz Ulloa

Ing. Agr. Mg. Cs. Dr. Profesor asociado

Escuela de Agronomía

Facultad de Ciencias Agrarias



Mauricio Lolas Caneo

Profesor informante: Mauricio Lolas Caneo

Ing. Agr. MS. PhD. Profesor asociado

Escuela de Agronomía

Facultad de Ciencias Agrarias

Fecha de presentación de memoria de Título, 21 de septiembre 2021

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia, sobre todo a mis padres, Marisel y Domingo, quienes siempre me han apoyado en todo momento de mi vida, velan por mi bienestar, y a través de sus enseñanzas me han motivado a nunca rendirme y luchar por mis metas, porque cuando uno cae lo único que tiene que hacer es levantarse e intentarlo de nuevo. El trabajo y la humildad abre muchas puertas.

A mis amigos Marco, Felipe, Ignacio, Matías, Ian, Álvaro, Gino, Miguel por su apoyo incondicional, porque son la familia que uno escoge. Una persona que destacare es Soledad porque fue muy importante en todo mi periodo universitario por su apoyo incondicional, mis amigos junto a ella me brindaron quizás los mejores momentos de mi vida.

A mi profesor guía Gonzalo Díaz Ulloa, por la paciencia que me tuvo a pesar de mis problemas, siempre me brindo su apoyo y consejos para finalmente terminar este trabajo.

**El presente estudio fue apoyado y financiado por el Proyecto Fondecyt Regular
1180677 (ANID, Chile).**

RESUMEN

La variedad de manzanos Fuji, Gala y Cripps Pink, son importantes en la Región del Maule. La muerte regresiva de árboles de manzanos es uno de los principales problemas que presenta la producción a nivel de campo. Esta enfermedad es causada por especies de Botryosphaeriaceae, que provocan síntomas de muerte de ramillas, brazos y plantas, disminuyendo la productividad de los huertos comerciales. Sin embargo, a nivel nacional no se ha estudiado la eficacia de fungicidas. Por esta razón, la investigación se centró en estudiar la sensibilidad *in vitro* de fungicidas (grupos SDHI, MBC, QoI y DMI) contra Botryosphaeriaceae y determinar la eficacia como protectores de heridas de poda contra *Diplodia seriata*. Los resultados de la sensibilidad *in vitro* en medio APD (2%), mostraron que los aislados de *D. seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti* fueron sensibles a los fungicidas benomil (MBC) con valores de EC50 entre 0,07 a 0,422 µg/ml y para tebuconazol (DMI) valores entre 0,12 y 046 µg/ml (EC50). Para los fungicidas piraclostrobin (QoI) y boscalid (SDHI) los valores de EC50 variaron entre 0,58 a 39,6 µg/ml y 10,03 a 1383,8 µg/ml, respectivamente. Los productos fungicidas obtuvieron una eficacia entre un 40% para el producto en base a *Trichoderma* sp. (Utalca) y 78% para el producto benomil aplicados en forma líquida. Interesantemente, los productos biológicos comerciales basados en consorcios biológicos proporcionaron una eficacia de 55% para su versión líquida (Mamull) y 62% para su versión en pintura (Coraza).

Palabras clave: Manzanos, Heridas de poda, Fungicidas, Infección.

ABSTRACT

Apple trees cvs. Fuji, Gala and Cripps Pink, are important in the Maule Region. The canker and dieback of apple trees is one of the main problems of production at the field level. This disease is caused by Botryosphaeriaceae species, which cause symptoms of death of twigs, arms and plants, reducing the productivity of commercial orchards. However, at the national level the efficacy of fungicides has not been studied. For this reason, the research focused on studying the in vitro sensitivity of fungicides (SDHI, MBC, Qol and DMI groups) against Botryosphaeriaceae and determining their efficacy as pruning wound protectors against *Diplodia seriata*. The results of the in vitro sensitivity in APD medium (2%), showed that the isolates of *D. seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum arbuti* were sensitive to benomyl fungicides (MBC) with EC50 values between 0.07 to 0.422 $\mu\text{g} / \text{ml}$ and for tebuconazole (DMI) values between 0.12 and 0.46 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (EC50). For the fungicides pyraclostrobin (Qol) and boscalid (SDHI) the EC50 values ranged between 0.58 to 39.6 $\mu\text{g} / \text{ml}$ and 10.03 to 1383.8 $\mu\text{g} / \text{ml}$, respectively. The commercial fungicides obtained an efficiency between 40% for the product based on *Trichoderma* sp. (Utalca) and 78% for the benomyl (applied as spray). Interestingly, commercial biological products provided an efficiency of 55% (Mamull; sprayed application) to 62% (Coraza, painted application).

Key words: Apple trees, Pruning wounds, Fungicides, Infection.

INDICE

Página

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis.....	2
1.2 Objetivo General.....	2
1.3 Objetivos Específicos	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 El manzano (<i>Malus x domestica Borkh</i>).....	3
2.1.1 Descripción Botánica.....	3
2.1.2 Morfología	4
2.2 Ciclo del manzano	5
2.3. Situación actual de superficie de manzanos en Chile	7
2.4. Cultivares de manzano	7
2.4.1. Fuji	7
2.4.2. Royal Gala.....	8
2.4.3 Granny Smith.....	8
2.5 Aspectos agronómicos del manzano	8
2.6 Poda.....	9
2.6.1 Poda de plantación	10
2.6.2 Poda de formación.....	10
2.6.3 Poda de fructificación	10
2.7 Principales enfermedades del manzano en Chile	10
2.8 Botryosphaeriaceae causante de canchros y muerte regresiva en manzanos.....	12
2.9 Incidencia y síntomas de muerte regresiva en manzanos.....	13
2.10 Epidemiología y heridas de poda.....	14
2.11. Métodos de Control	15
2.12 Fungicidas Comerciales.....	15
2.12.1 Mamull.....	15
2.12.2 Coraza.....	16
2.12.3 Trichoderma	16

2.12.4 Podexal	17
2.12.5 Apolo	17
2.12.6 Benomilo	17
2.12.7. Cantus	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1 Ubicación de la Investigación	19
3.2 Cultivos fúngicos de Botryosphaeriaceae	19
3.3 Sensibilidad del crecimiento micelial de Botryosphaeriaceae a fungicidas (ED50)	19
3.4 Protección de heridas de Poda en ramillas.....	20
3.5 Inoculación de ramillas de manzano.....	22
3.6 Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	22
4. RESULTADOS	23
4.1 Sensibilidad in vitro de Botryosphaeriaceae a fungicidas.....	23
4.2 Control de lesiones de poda	24
5. DISCUSIÓN.....	28
6. CONCLUSIÓN.....	32
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1. INTRODUCCIÓN

El manzano (*Malus x domestica* borkh) es una especie leñosa y de hoja caduca que pertenece a la familia *Rosaceae*, uno de los primeros árboles cultivados por el hombre, remontando su domesticación al siglo X; siendo su centro de origen en la zona de Asia y Turkestán, siendo introducido a Europa por los romanos y posteriormente a América por los ingleses, en el siglo XVII. Para el siglo XIX el manzano se encontraba plenamente establecido en toda América (CIREN, 2017).

Actualmente el cultivo del manzano de cultivares rojos abarca una superficie aproximada de 29.698 hectáreas, siendo la Región del Maule, la más importante con 18.863 hectáreas (63,5%), seguido por la Región de O'Higgins con 6.777 ha (22,8%), Región de La Araucanía con 2.313 ha (7,7%) y la Región del Bío Bío con 1.415 ha (4,8%) en Chile (ODEPA, 2014).

En el mercado internacional, Chile se encuentra posicionado dentro de los diez mayores exportadores de manzanas a nivel mundial, según cifras del Centro de Comercio Internacional (CCI), en 2010 Chile fue el segundo exportador mundial de manzanas, repitiendo la alta ubicación lograda en el año 2006, que disputa constantemente con Italia y Estados Unidos (INIA, 2015).

Dentro de las labores que se le realizan al manzano se encuentran las podas de invierno, que comienzan desde la caída de hojas hasta el desborre. Son menos debilitantes si se realizan bastante pronto, antes de que se produzca la emigración de las reservas hacia los órganos extremos. La poda precoz tiene, pues, el inconveniente de que las heridas quedan sin cicatrizar durante todo el invierno, expuestas a diferentes infecciones (Coutanceau, 1976).

La producción de manzanas, presentan algunos problemas como los asociados a desórdenes fisiológicos (ej, Bitter pit) y presencia de enfermedades y plagas. En cuanto a las enfermedades, los principales agentes causales asociados son los hongos a nivel nacional (Latorre, 2004). En Chile el manzano se ve afectado por enfermedades de importancia como lo son el cancro europeo de manzano (*Neonectria ditissima*), muerte regresiva de brazos (*Botryosphaeria dothidea*) y enfermedades que afectan al follaje y frutos como la sarna del manzano (*Venturia inaequalis*) entre otras (Latorre, 2018).

Recientemente en Chile, se ha descrito una importante presencia de muerte regresiva de brazos en manzanos en la Región del Maule (Herrera, 2018). Previamente, el único trabajo

disponible solo describió a la especie *B. dothidea* causando muerte regresiva (Latorre y Toledo, 1984). En este sentido, en la actualidad se han descrito a las especies *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti* asociados a la muerte de brazos en manzanos de la Región del Maule. La nueva descripción de especies y la falta de información sobre efectividad de fungicidas hace necesario conocer la eficacia de los fungicidas disponibles nacionalmente para controlar a estas especies. Por lo tanto, a continuación, se plantea la hipótesis y objetivos del presente estudio:

1.1 Hipótesis

Las especies de Botryosphaeriaceae muestran sensibilidad *in vitro* a fungicidas sintéticos y la protección de heridas frescas de manzanos con aspersiones líquidas son eficaces en disminuir la infección asociada a *Diplodia seriata* en ramillas de manzano en el huerto.

1.2 Objetivo General

Determinar la sensibilidad y la eficacia de fungicidas comerciales en el control de Botryosphaeriaceae causando muerte regresiva en manzanos.

1.3 Objetivos Específicos

- Evaluar la sensibilidad *in vitro* (CE50) de aislados de *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti* a los fungicidas piraclostrobin (QoI) boscalid (SDHI), benomil (MBC) y tebuconazol (DMI).
- Evaluar la efectividad de la protección de heridas de poda con productos fungicidas y biocontroladores de ramillas en un huerto comercial de manzana cv. Fuji contra la infección de *Diplodia seriata*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El manzano

El manzano (*Malus x domestica* Borkh) produce una de las frutas más conocidas y consumidas en el mundo 'la manzana', donde la riqueza en antioxidantes y su beneficio en la salud son ampliamente conocidos y la hacen una de las frutas más aceptadas en programas alimenticios. Sus beneficios y aportes nutricionales son ampliamente estudiados (Boyer y Liu, 2004). Es más, recientemente Raudone et al., 2017 establece las características y propiedades del manzano en el tratamiento nutricional de enfermedades asociadas a problemas cardiovasculares, inflamatorias, microbianas y cancerígenas lo que permite un equilibrio al momento de la ingesta de compuesto fenólicos presentes incluyendo ácidos hidroxibenzóicos (ácido gálico, ácido syringico, ácido gentísico), ácido hidroxicinámico y sus derivados (ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido clorogénico), flavonoides (quercetina, epicatequina, catequina, procianidinas) y antocianinas (cianidinas y sus glucósidos).

En la actualidad existen más de siete mil variedades, las cuales gracias a su riqueza en antioxidantes forman parte de numerosos estudios entre los productos hortofrutícolas. Entre las especies más conocidas por su alto valor y rendimiento haciéndolas comerciales se encuentran las del grupo "Fuji", "Gala", "Golden", "Granny Smith", Cripps Pink' y "Red Delicious" entre otras (Gil, 2012). La manzana es un fruto de gran valor, considerado como el producto hortícola más importante de la nutrición humana en el mundo. Los mayores productores son China con una producción estimada en 49% y Estados Unidos con 7%. A nivel nacional, la superficie plantada de manzanos es de alrededor de 32.370 hectáreas, siendo las variedades rojas las más importantes. La principal zona productora de manzana se localiza entre las regiones del General Bernardo O'Higgins y del Maule, siendo esta última la de mayor superficie con 19.636 ha, correspondiendo al 60% de la superficie nacional (ODEPA, 2019).

2.1.1 Descripción Botánica

El manzano pertenece al Reino Plantae, Subreino Tracheobionta, División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Subclase Rosidae, Orden Rosales, Familia Rosaceae y género *Malus*. Las plantas pertenecientes a la familia de las Rosaceae, pertenece a la subfamilia Maloideae

(Pomoideae) corresponden a arbustos, hierbas, árboles, con flores terminales, en racimo o cimas, pétalos de 3-5 libres o unidos, hojas simples a compuestas, semillas sin endosperma o escaso, estambres numerosos, libres. Esta familia incluye la mayor parte de las especies de fruta de consumo masivo entre la que destaca la manzana (Gil, 2009). La familia de las rosáceas comprende alrededor de cien géneros, en las que se reparten alrededor de tres mil especies, originarias sobre todo de las regiones templadas y subtropicales del hemisferio boreal (Merlet et al., 2016).

Las características genéticas de la especie definen a la pomoideas con 17 cromosomas, se caracteriza por: “hojas ovaladas, elípticas, lanceoladas, oblongas, lobuladas o aserradas” (Baugher, 2003), de esta forma se presentan las condiciones para enfrentar los cambios de temperatura de las regiones en las que se cuenta con mayor producción, se producen gemaciones ovoides y pequeñas con escamas diferenciándose de las yemas reproductivas por su presentación en posición terminal y ocasionalmente se presentan en yemas laterales como el caso de una de las especies la Granny Smith que se caracteriza por yemas mixtas, con entre cinco y ocho flores. Las flores son de color blanca, rosas o carmín organizadas en cimas que da origen al desarrollo de un fruto carnoso e indehiscente, oblongo, cónico u obicuo con tamaño entre 2 a 13 cm (Baugher, 2003). El tiempo de maduración varía entre 70 y 180 días según la especie.

2.1.2 Morfología

El árbol alcanza unos 10 metros de altura y tiene una copa en forma de globo. El tronco es derecho, la corteza es lisa, de color ceniciento verdoso sobre las ramas y escamosa y gris parda sobre las partes viejas del árbol. Las plantas se injertan en ángulo abierto sobre el tallo, de color verde oscuro. El sistema radical es leñoso; las plantas de semilla tienen una o más raíces pivotantes, mientras que las de estacas, tienen varias raíces principales alrededor del tronco (Merlet et al., 2016).

La profundidad radical depende del tipo de portainjerto y de la calidad del suelo. Las hojas son de forma oval, bordes aserrados, nervios alternados y bien desarrollados (Gil, 2009). Las flores son grandes, se abren unos días antes que las hojas y son hermafroditas de color rosa pálido, son sensibles a las heladas tardías en invierno (Gil, 2012). La manzana es un fruto carnoso, tanto la forma como el color y el sabor difiere dependiendo de la variedad (Merlet et al., 2016).

2.2 Ciclo del manzano

Se cultiva en zonas con inviernos fríos, en la actualidad se han ampliado a áreas de clima templado o tropical. Dependiendo el clima el árbol demostrara cambios morfológicos, los que permitirán regular los manejos agronómicos del manzano, los cuales apuntan a diferentes objetivos. Un ejemplo de esto es la poda invernal, la cual se realiza durante el receso, esto es para que las ramas crezcan separadas, contribuyendo una adecuada exposición a la luz al árbol y formación y distribución de la ramillas productivas (Yuri y Lepe, 2007).

Cuadro 2.1. Requerimiento de horas frío por variedad de manzanos

Variedad	Zona cálida	Zona fría
Pink Lady	-	< 500
Granny Smith	600-800	1.040
Braeburn	740	1.150
Grupo Fuji	600 – 800	1.050
Grupo Gala	600 – 800	1.150
Grupo Delicious	600 – 800	1.200 – 1.300

Fuente: Yuri, y Lepe, 2007.

En el ciclo de vida del manzano, se evidencian la perdida de hojas en las estaciones de otoño e invierno entrando posteriormente en un estado de reposo hasta que se inicia la temporada de primavera a este período se le denomina dormancia, en esta etapa se produce el almacenamiento del nitrógeno, fosforo y potasio (Yuri y Lepe, 2007).



Figura 2.1. Estados fenológicos de *Malus domestica*.

Fuente: Portal Frutícola, 2018

En este proceso del ciclo, el manzano necesita temperaturas invernales de forma tal que actúe como inhibidor y se paralice el crecimiento de yemas y de frutos (Gil, 2012). Someter a los manzanos a bajas temperaturas asegura el retraso en la aparición de brotes, especialmente en órganos vegetativos y frutos (Gil, 2012). Posteriormente en el surgimiento de los brotes se da origen a tallos, yemas, hojas y floración, de esta forma con temperaturas cercanas a los 21 ° C (máximo) y 10° C (mínimo) se activan las enzimas y promueven el desarrollo y maduración de las hojas para dar inicio al almacenamiento de nutrientes para la preparación de la cosecha (Yuri y Lepe, 2007).

Los frutales anualmente se le diferencian los estadios de desarrollo incluyendo (Figura 2.1.): “dormancia, desarrollo vegetativo, formación de yemas, floración, fructificación, maduración y cosecha” como lo establece Urbina (2010).

2.3. Situación actual de superficie de manzanos en Chile

El manzano es la cuarta especie más plantada a nivel nacional, después de la uva de mesa (45.489 ha), nogal (43.327), cerezo (39.645 ha) El área plantada en nuestro país alcanzaría unas 32.313 hectáreas aproximadamente que representan un 9,45% del total nacional (ODEPA, 2020). Siendo las Regiones del Maule y O'Higgins las que reúnen un 87% de la superficie plantada nacional, seguidos por la Región de la Araucanía y Bio-Bío.

2.4. Cultivares de manzano

Existen numerosos tipos de cultivares de manzanos que se adaptan a las condiciones y zonas productoras del país entre ellas destacan (Figura 2.2).



Figura 2.2. Cultivares de manzano con sus respectivos frutos.

2.4.1 Fuji

Cultivar originaria de Japón, su producción va orientada a mercados específicos por sus características de producción. La piel es de color rojo brillante sobre un fondo de color verde claro, la pulpa blanco amarillenta, crocante aromático, y muy dulce (López-Hernández, 2017). Madura a mediados de septiembre. La fecundación es autógama y con 550 horas de frío (Adams, 2006). Su tallo es pequeño y es considerada en el mercado como una de las variantes más apreciada por su textura crujiente, buen tamaño y un tiempo de conservación superior a otras variantes.

2.4.2 Royal Gala

Cultivar proveniente de Nueva Zelanda (1939), el árbol es medianamente vigoroso, productivo, de rápida entrada a producción y poco alternante (López-Hernández, 2017). Fruto de textura firme, equilibrada entre dulce/ácida; color de la cáscara anaranjado/rojizo; cosecha temprana, autopolinizante y con 550 horas de frío (Adams, 2006). Su producción es constante en el mercado nacional.

2.4.3 Granny Smith

Originaria de Nueva Zelanda. Fruto de textura firme, agría, de madurez tardía, color de la cáscara verde, autopolinizable. Con requerimientos de frío de 600 horas (Adams, 2006).

Su tamaño predominante es mediano de forma redondeada, se caracteriza por tener fondo blanco verdoso, jugosa y con una ligera acidez. Requiere de ambientes fríos y su floración se produce a mediados de octubre. Esta variedad produce un rendimiento promedio de 25 a 30 toneladas (Fautapo, 2014) lo que la convierte en un cultivar de alto consumo en las regiones donde se produce.

2.5 Aspectos agronómicos del manzano

En el cultivo de la manzana soporta temperaturas inferiores a los -10°C , sin que por ello se afecte su corteza (Gil, 2009), Sin embargo, aunque al descender por debajo de los -15°C pueden perderse algunas yemas florales. Su mayor limitación es el requerimiento de horas frío, por encima de las mil horas frío (en función de las variedades). Las características de la zona radicular, permiten que se extienda a nivel superficial abarcando una mayor superficie y permitiendo una mayor absorción de nutrientes, de esta forma se alcanza el soporte necesario para el eje central y le permite vivir en suelos poco profundos. Sin embargo, por estas características, es necesario cuidar el sistema de riego debido a la posibilidad de altas saturaciones con las que la corre el riesgo de producir hinchamiento y ruptura de las paredes celulares ocasionando su muerte. Estas características le permiten tolerar la presencia de césped en la superficie, lo cual no es común de los frutales debido a las condiciones de humedad a las que se hace referencia.

El manzano requiere de suelos que retengan la humedad, de esta forma la porosidad de los mismos, permite la oxigenación de las raíces otorgándoles la posibilidad de enraizarse con facilidad en zonas susceptibles tanto a la inundación como a climas más secos.

Esta particularidad, protege la fase de floración en temperaturas menores a los 0°C, su mecanismo de propagación varía desde las semillas hasta el uso de estacas o injertos en plantas afines lo cual representa una ventaja para ofrecerle la resistencia necesaria contra las plagas y los cambios climáticos drásticos como heladas o períodos extensos de lluvia (Merlet et al., 2016).

La necesidad de contar con suelos profundos (1,20 a 1,50 m) le otorga la posibilidad de sobrevivir a condiciones extremas y sobreponerse al período invernal, el pH requerido en el suelo oscila entre 6.5 -7.5 el cual se corresponde con la descripción de suelos arenosos con subsuelos fértiles. Por esta razón, al momento de instalar un cultivo, el productor debe realizar un estudio previo y de ser necesario realizar lavados de suelo y enmiendas químicas que otorguen el equilibrio el mismo puede alcanzarse con mezclas de yeso agrícola y drenajes permitiendo así asumir un buen plan de fertilización (Urbina, 2010).

2.6 Poda

El objetivo principal de esta labor es dejar el árbol bien iluminado, eliminando las ramas y mamillas que impidan la entrada de luz, es decir, aquellas altas, muy grandes, muy bajas, las que están en la misma dirección y que no están suficientemente separadas y las demasiado largas hacia la entre hilera (Coque et al., 2012).

Si se eliminan todas las ramillas por encima de las ramas, se produce un problema, que consiste en tener las ramas con muchos chupones todos los años y con pocas ramillas productivas. Por el contrario, al dejar más ramas nuevas por encima de las anteriores, algunas se encardarán y el resto seguirá creciendo sin producir yemas florales. Las ramas y ramillas sombrías producirán poca fruta y de baja calidad (Warrington y Weston, 1990).

Es así, como la poda tiene como objetivo principal la regulación de la capacidad vegetativa y reproductiva de las plantas, garantizando una mayor producción y eficacia al momento de la cosecha. Considerando la variedad y las condiciones de clima y suelo, la poda se constituye en el mecanismo de regularización manteniendo las condiciones de iluminación y aireación necesarias para aumentar la capacidad reproductiva. La eliminación de ramas rotas, secas o dañadas permite el ahorro de la mano de obra al hacer más fácil el trabajo de la colecta (Warrington y Weston, 1990).

2.6.1 Poda de plantación

Se emplea con frecuencia para nivelar la porción aérea del manzano y la porción radicular, se emplea en el momento de la plantación (Ojer et al., 2011).

2.6.2 Poda de formación

Este tipo de poda se emplea con frecuencia en los primeros años de la planta, de esta forma se logra la estructura en los arboles para optimizar los sistemas de conducción y transporte de nutrientes; por ejemplo: eje central, vaso entre otros (Gil, 2009; Ojer et al., 2011).

2.6.3 Poda de fructificación

Es la poda que se emplea para potencializar la carga de las frutas, de esta forma se alcanza el crecimiento vegetativo y reproductivo del manzano, obteniendo una mayor producción. Son podas que se emplean en el período final del ciclo productivo, de esta forma se prepara el manzano para un nuevo período de formación y fructificación al estimular la actividad vegetativa de la misma (Warrington y Weston, 1990).

Es importante señalar que, según Latorre, (2004), se debe evitar realizar la poda en días húmedos y lluviosos, además de proteger inmediatamente las heridas de poda con el uso de mezclas fungicidas, para evitar el ingreso de hongos de la madera en la planta.

2.7 Principales enfermedades del manzano en Chile

En Chile el cultivo del manzano es afectado por varios problemas fitopatológicos, los cuales disminuyen su productividad y longevidad, además de afectar a la fruta (manzana) durante su maduración, almacenamiento y transporte (postcosecha) (Latorre, 2018). Entre las enfermedades de mayor importancia en el manzano se destacan las micosis, siendo las más habituales y problemáticas que incluyen a la sarna del manzano causada por *Venturia inaequalis* la más importante que afecta cada temporada (Sutton et al., 2014; Latorre, 2018). El Cancro europeo del manzano causado por *Neonectria ditissima* y Cancro áspero y muerte regresiva de brazos causado por *Botryosphaeria dothidae* y *Diplodia seriata*, son enfermedades que afectan a la madera de ramillas, brazos y troncos (Figura 2.4). Las pudriciones en frutos como la pudrición calicinal de los frutos causada por *Botrytis cinerea* y

el ojo de buey causado por *Phlyctema vagabunda* (Figura 2.5), son importantes que afectan a los frutos a nivel nacional (Latorre, 2004; Ferrada, et al., 2017).

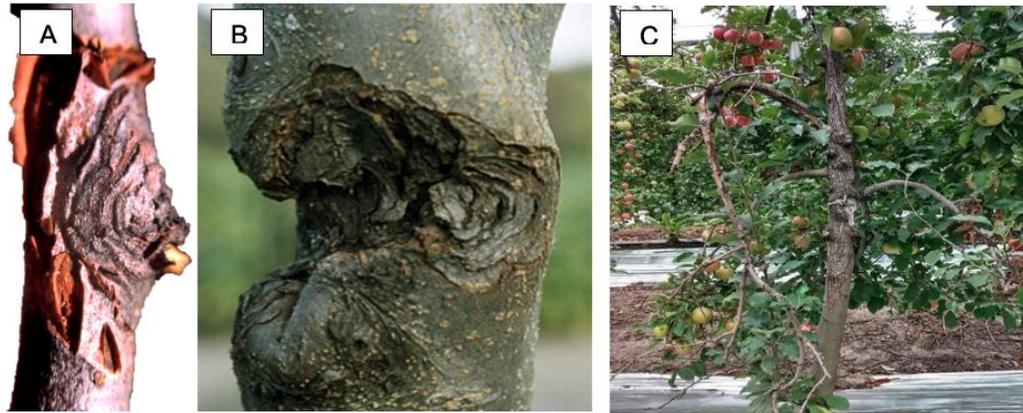


Figura 2.3. Cancros en la madera de manzanos: Cancro europeo del manzano (A) con síntomas de cancros elípticos anaranjados en ramillas que muestra inicio de infección desde alrededor de la yema, y cancro anillado en tronco adulto (B) que provocan estrangulamiento de ramas y troncos asociados a *Neonectria ditissima*; Cancro y muerte regresiva de manzanos (C) causado por *Diplodia seriata*. Fuente G. Díaz.

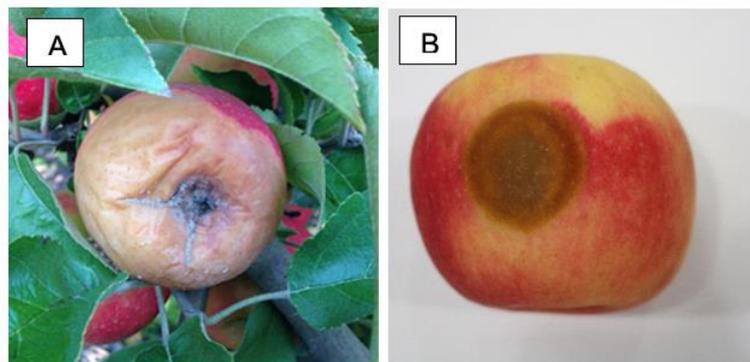


Figura 2.4. Pudriciones de frutos de manzana. Pudrición calicinal asociado a *Botrytis cinerea* en un huerto comercial cercano a la cosecha (A). Manzana con lesiones concéntricas denominada ojo de buey asociado a *Phlyctema vagabunda* durante almacenaje en frío por 60 días (B). Fuente G. Díaz.

2.8 Botryosphaeriaceae causante de canchros y muerte regresiva en manzanos

La familia Botryosphaeriaceae, está compuesta en parte por hongos fitopatógenos oportunistas que pueden provocar la pudrición de frutas, manchas en las hojas, gomosis, pudrición en el cuello, canchros en la madera, tizón de brotes y plántulas, muerte regresiva y completa de especies leñosas (Pelleteret et al., 2017; Alves et al., 2013).

La familia Botryosphaeriaceae está compuesta por 18 géneros de anamorfos (estado asexual) que han sido asociados a *Botryosphaeria*, los cuales se han reducido bajo la sinonimia como por ejemplo *Diplodia* (conidios mayoritariamente ovoides, pigmentados y paredes gruesas) o *Neofusicoccum* (conidias en su mayoría fusoides, hialinos y paredes delgadas) entre otros géneros (Crous et al., 2006). En Chile, estas especies como *D. seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *N. arbuti*, *D. mutila* han sido descritas previamente causando canchros y muerte de brazos, ramillas y cargadores en frutales como vides (Díaz et al., 2013); nogales (Díaz et al., 2018), arándanos (Espinoza et al., 2009).

En Chile previamente se había descrito a la especie *B. dothidea* causando canchros en manzanos en Curicó (Latorre y Toledo, 1984) y *D. seriata* en huertos de la Región del Maule (Díaz et al., 2019b). En Chile, recientemente se describieron y caracterizaron a las especies *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti* causando muerte regresiva en manzanos en la Región del Maule (Rossi, 2019) (Figura 2.7).

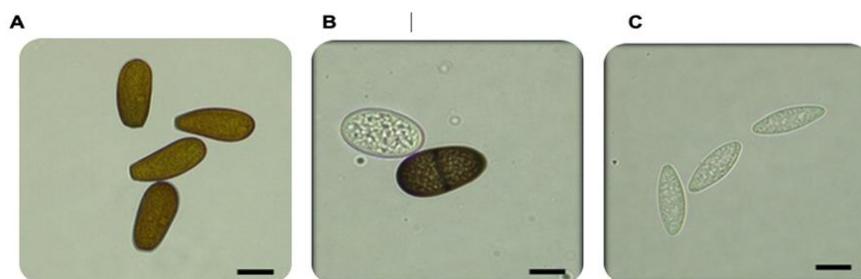


Figura 2.5. Conidias de especies de Botryosphaeriaceae causantes de muerte regresiva en manzanos en Chile. **A**, Conidias maduras de forma ovoide a elipsoides, de color café oscuro, de extremo obtuso, con una base truncada, aseptada, de paredes lisas y delgadas de *Diplodia seriata*. **B**, Conidias de forma subovoide a elipsoide de ápice ampliamente redondeada, con base truncada, de paredes finas, inicialmente hialina y aseptada, pero pardo oscura y septada en la madurez, con patrón de estriado en la superficie de *Lasiodiplodia theobromae*. **C**, Conidias fusiformes, hialinas, aseptadas de base truncada y ápice obtuso de *Neofusicoccum arbuti*. Barra = 10 μ m. **Fuente:** Rossi, 2019.

2.9 Incidencia y síntomas de muerte regresiva en manzanos

La cancrrosis y muerte regresiva de manzanos o conocida en inglés como 'canker and dieback of apple trees' es una micosis de una importancia relativa, que se ha incrementado en los últimos años en varias partes donde se producen manzanas (Latorre, 2018; Sutton et al., 2014; Sessa et al., 2016). Es más, reportes han indicado incidencias entre un 5 y 15% de plantas de manzanos con cancrrosis y muerte regresiva, la cual se ha incrementado hasta en un 35% en trabajos recientes realizados en Uruguay, Estados Unidos y Sudáfrica (Sutton et al., 2014; Delgado-Cerrone et al., 2016).



Figura 2.6. Síntomas de cancrrosis y muerte regresiva en manzanos en huertos comerciales cv. Cripps Pink en la Región del Maule. Fuente: Díaz, G. 2020.

Los síntomas asociados a las infecciones por Botryosphaeriaceae en manzanos incluyen una declinación general de la planta, presencia de canchros rugosos y alargados, muerte de ramillas y muerte regresiva de brazos y troncos (Figura 2.7) (Latorre y Toledo, 1984; Díaz et al., 2019b; Brown y Hendrix, 1981; Delgado-Cerrone et al., 2016). En cortes longitudinales y transversales de brazos enfermos presentaban pudrición dura de la madera (Figura 2.8).



Figura 2.7. Corte transversal de brazos con canchros y muerte regresiva en manzanos mostrando pudrición parda de consistencia dura de forma V o U. **Fuente:** Díaz, G. 2020.

2.10 Epidemiología y heridas de poda

Los estudios realizados por Sutton et al., (2014); Díaz y Latorre (2020) han demostrado que el ciclo de la enfermedad a nivel de campo, se inicia con la planta de manzano enferma en el huerto (infección de campo). En ramillas, brazos y troncos enfermos desarrollan canchros en donde son una de las principales fuentes de inóculo al tener estructuras reproductivas de los hongos (picnidios). Estas estructuras reproductivas asexuales (picnidios) de las Botryosphaeriaceae se desarrollan en abundancia sobre los residuos de poda dejados en el suelo de los huertos de manzanos (fuente de inóculo importante). Los frutos con pudrición negra dejados en el suelo o momificados en los árboles son otra fuente de inóculo potencial en el huerto al contener también picnidios (Cáceres et al., 2016; Díaz et al., 2019b) (Figura 2.8).

Los picnidios, con la lluvia se hidratan y con el salpicado de las precipitaciones y el viento, se diseminan, pudiendo llegar a las heridas frescas de poda y es entonces cuando se inicia una nueva infección en las ramillas o brazos en el huerto de manzanos. Las heridas de poda es el periodo crítico (donde deben protegerse), al ser la vía de entrada. Las heridas infectadas por el ingreso de Botryosphaeriaceae, desarrollan canchros y necrosis de la madera con los meses y años, pudiendo causar la muerte de ramillas y brazos (Figura 2.8).



Figura 2.8. Ciclo de la enfermedad cancrrosis y muerte regresiva en manzanos asociados a especies de Botryosphaeriaceae. Díaz y Latorre (2020).

2.11. Métodos de Control

Actualmente no existe ningún medio curativo de estas enfermedades afectan a la madera, por lo que su control solo se efectúa de forma preventiva junto con manejos culturales. Dentro de los controles preventivos se encuentran las sustancias químicas (en diferentes formulaciones e ingredientes activos) que previenen en la infección de estos fitopatógenos mediante sus aplicaciones sobre las heridas dejadas en la poda (Díaz y Latorre, 2013; Latorre et al., 2013).

2.12 Fungicidas Comerciales

Los fungicidas son aquellos plaguicidas empleados en la protección de los cultivos, específicamente para casos de infección con hongos inhibiendo o eliminando el hongo causante de las enfermedades.

2.12.1 Mamull

La presentación en polvo permite su aplicación al mojarse, se compone de cepas nativas de microorganismos colonizadores de tejidos vegetales, heridas de poda y heridas por causas naturales. Es un estimulante biológico que puede ser empleado directamente sobre la herida,

cancros o cortes. Está compuesto por cepas de *Bionectria ochroleuca*, *Trichoderma gamsii* e *Hypocrea virens* las cuales tienen acción fungicida, en el caso específico de *Bionectria ochroleuca* e *Hypocrea virens* actúa como un inhibidor al competir con el hongo en una función de parasitismo; mientras que el *Trichoderma gamsii* actúa a nivel de microparasitismo, por esta razón su aplicabilidad en plantas permite la cicatrización y de esta forma al no haber heridas expuestas no se propaga ni se infecta de canchros causados por los hongos fitopatógenos. Estos tres biocontroladores no requieren limpieza física, lo cual facilita el trabajo en los cultivos, siendo aplicado con facilidad en las heridas naturales y de poda. La formulación de Mamull®, es una mezcla de micelio y conidias de los hongos biocontroladores.

2.12.2 Coraza

Es un fungicida bactericida de componentes biológicos que se caracteriza por presentar cepas de microorganismos que invaden los tejidos vegetales. Su composición se basa en micelios y conidias de la cepa Mitique del hongo *Bionectria ochroleuca*, que combinado con cepas de Copihue de bacterias se combina con las cepas del hongo dando como producto un fungicida de tres biocontroladores (*Bionectria ochroleuca* Cepa Mitique, *Hypocrea virens* cepa Ñire y *Bacillus licheniformis* cepa Copihue).

Las cepas de *Bionectria ochroleuca*, *Hypocrea virens* cumplen una función fungicida y bactericida compitiendo con el hongo creando inhibición y parasitismo; mientras que el *Bacillus licheniformis* solo actúa como inhibidor, de esta forma se crea una película cicatrizante sobre la herida y cumple función curativa. Los biocontroladores se presentan como micelio y conidias de los hongos; mientras que la bacteria se presenta en forma de espora.

2.12.3 Trichoderma

Es un hongo anaeróbico que se emplea con frecuencia como agente de control biológico contra diversos patógenos vegetales. Su uso en el tratamiento de suelos para la protección radicular es ampliamente conocido de esta forma se evita el contagio por hongos. Se comporta como parásito saprofítico con capacidad reproductiva alta, lo cual lo hace accesible como control biológico debido a su habilidad para sobrevivir en condiciones ambientales extremas. *Trichoderma*, actúa sobre la rizósfera con un crecimiento micelar rápido y gran producción de esporas lo que ayuda a la protección del sustrato y del suelo. Al momento de su exposición con el sustrato, se genera mecanismos de competencia por espacio y

nutrientes, por esta razón actúa como un biocontrolador, su capacidad de invadir espacios con rapidez permite abarcar mayor superficie garantizando la acción de compuestos orgánicos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos. En este proceso se involucran enzimas líticas extracelulares, antibióticos y compuestos que promueven la formación de condiciones biológicas para la colonización del suelo.

2.12.4 Podexal

Es un fungicida formulado para la protección de heridas de poda, se aplica directamente sobre el corte protegiéndolo de la infección por germinación de esporas o desarrollo de micelios que atacan con frecuencia heridas en madera. Su presentación comercial es una pintura fungicida con piraclostrobin (Qol, inhibidores de la quinona extrema, inhibe la cadena transportadora de electrones en la respiración) como ingrediente activo. Recomendado para los cortes de poda en maderas frutales. Al aplicarse sobre los cortes de poda, crea una película protectora de la infección causada por la germinación de esporas, este producto es ampliamente conocido y aplicado en pomáceas, carozos y berries.

2.12.5 Apolo

Apolo es un fungicida comercial de la empresa ANASAC, que contiene un 25% p/v de como ingrediente activo tebuconazol y otros coformulantes c.s.p 100% p/v. Este i.a. pertenece al grupo de los DMI (inhibidores de la demetilesterasa) que afecta la integridad de la membrana celular de los hongos. Es un producto formulado en emulsión aceite en agua. Presenta una acción contacto y preventiva, para el uso agrícola con el fin de controlar importantes enfermedades causadas por hongos y bacterias en diferentes tipos de cultivos. Apolo está recomendado para ser utilizado en pomáceas, carozos, vides y otros frutales (SAG, 2019).

2.12.6 Benomilo

De ingrediente activo benomil, perteneciente al grupo de los bencimidazole, que inhiben la mitosis celular. Es un fungicida de amplia gama comercial, acción sistémico y su absorción es a nivel radicular y foliar. Se emplea con frecuencia como prevención, aunque puede ser empleado como acción curativa. Se degrada lentamente en el suelo actuando a lo largo de 6 a 12 meses en suelos desnudos. En los manzanos actúa en el control de Oídio (*Podosphaera leucotrichia*), fumagina (*Capnodium* sp.), antracnosis (pudrición amarga de frutos) entre otros.

2.12.7. Cantus

Ingrediente activo Boscalid, perteneciente al grupo de SDHI (inhibidores de la succinato deshidrogenasa; en la respiración). Fungicida de acción sistémica y translaminar su acción es a lo largo de la vida del hongo, inhibe la esporulación, germinación y el crecimiento del tubo germinativo de las esporas, su uso más frecuente es en vides, donde se ha comprobado su acción impidiendo el crecimiento del micelio. Se recomienda su aplicación con otros fungicidas alternando su acción, lo que constituye una ventaja ya que no registra amplia tolerancia al no presentar resistencia cruzada con otros fungicidas comerciales. Su largo efecto residual garantiza un aumento en la protección del cultivo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación de la Investigación

La investigación para determinar la sensibilidad *in vitro* de Botryosphaeriaceae como *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti* a fungicidas, se realizó en el Laboratorio de Patología Frutal de la Universidad de Talca, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias, Campus Talca, Universidad de Talca. Para la evaluación de la eficacia de la protección de heridas de poda contra *Diplodia seriata* se realizó en la Estación Experimental Panguilemo, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Talca. La estación experimental está localizada en Panguilemo, Región del Maule, en ruta 5 Sur Km 245.

3.2 Cultivos fúngicos de Botryosphaeriaceae

Se utilizaron cuatro aislados de especies *D. seriata* (DS1 a DS4), *L. theobromae* (LS1 a LS4), y *N. arbuti* (NA1 a NA4), obtenidos desde muestras de brazos con síntomas de muerte regresiva provenientes de diferentes zonas de Chile. Los aislados fúngicos se obtuvieron desde la siembra de trozos de madera que se sembraron en placas Petri de 88 mm de diámetro con medio de cultivo agar papa dextrosa (APD, 2 %) modificado (APDM) con Igepal CO-630 (Sigma Aldrich, MO, E.E.U.U) manteniendo los cultivos sembrados a 20 °C por al menos 5 días (Díaz et al., 2011). Para obtener cultivos puros, se realizó repiques desde puntas de hifas de los aislados fúngicos incubados en medios de cultivo APD (2%) de tres días de crecimiento a 20°C. Las placas de Petri de cultivos puros de los 12 aislados se mantuvieron en condiciones de 20-22°C por 5 días con régimen de 12h/12h luz/oscuridad, hasta observar crecimiento micelial del agente causal. Los cultivos puros se multiplicaron periódicamente cada 7 días para disponer de cultivos activos para los diferentes estudios.

3.3 Sensibilidad del crecimiento micelial de Botryosphaeriaceae a fungicidas (ED50)

Para la determinación de la sensibilidad del crecimiento micelial por ED50 en los cuatro aislados de Botryosphaeriaceae, se emplearon las concentraciones de 0 (testigo); 0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 y 50,0 µg/mL (=ppm) de ingrediente activo benomil (Benomilo), boscalid (Cantus), tebuconazole (Apolo) y piraclostrobin (Podexal) en medio de cultivo APD (2%) siguiendo de indicado por Latorre y Torres, (2012). Para obtener las diferentes concentraciones de los fungicidas, se prepararon soluciones madres de 1000 µg/mL y 10

$\mu\text{g/mL}$ con cada uno de los fungicidas. Después de autoclavar (121°C por 10 min) el correspondiente medio de cultivo líquido (500 ml), y enfriado a unos 60°C , se adicionó las diferentes cantidades de las concentraciones madres de los ingredientes activos, para obtener todas las concentraciones previamente señaladas. Una vez obtenidas las placas de Petri (90 mm de diámetro) con las diferentes concentraciones de fungicidas, en el centro de cada placa de Petri se colocó un trozo invertido de agar de 5 mm de diámetro con crecimiento activo de los cuatro aislados de 5 días de edad en las tres especies. Inmediatamente después, estas placas se colocaron en una cámara de crecimiento con temperatura de 20°C con un régimen de oscuridad. Después de los 5 días de incubación, a cada placa de Petri, se le determinó el diámetro de crecimiento micelial de cada aislado de Botryosphaeriaceae. El crecimiento relativo (CR, %), se determinó entre la relación = (crecimiento micelial (CM) del medio con fungicida / CM del medio sin fungicida) x 100. Para determinar la concentración efectiva para obtener un 50% de control (CE50), se realizó un análisis de regresión, en que X= el log de la concentración del fungicida e Y= el probit del % del CR (Latorre, 1989), a través del programa estadístico SPSS (versión 20, Chicago, E.E.U.U).

3.4 Protección de heridas de Poda en ramillas

El estudio de la protección de heridas de poda, se realizó en el huerto de manzanos adultos de 25 años de edad del cv. Fuji/ mm111 (Figura 3.1). Con este propósito se utilizaron árboles aparentemente sanos de manzanos. Se seleccionaron 5 ramillas/árbol, a las cuales se les realizó un corte en bisel manualmente utilizando una tijera de podar manualmente dejando ramillas de 30 a 40 cm de largo durante finales de julio 2019. Después de la poda se realizó la aplicación líquida localizada de los productos fungicidas y productos biológicos en las dosis comerciales sobre las heridas de poda (cuadro 3.1). Se incluyeron productos aplicados como pintura sobre las heridas de poda como podexal (piraclostrobin) y coraza (Trichoderma + Bacillus) (Cuadro 3.1).



Figura 3.1. estudio de la protección de heridas de poda en manzanos cv. Fuji, en el Centro experimental de Panguilemo, Universidad de Talca, Región del Maule.

Cuadro 3.1 Productos fungicidas sintéticos y biológicos evaluados en la protección de heridas de poda de ramillas de manzano cv. Fuji contra infecciones por *Diplodia seriata*.

Nombre comercial/	Ingrediente Activo	Aplicación	Dosis comercial
Agua	Agua	Líquida	
Mamull/ Bio Insumos nativa	B. cepa Mitique + T. gamsii cepa Volqui + H. virens cepa Ñire.	Líquida	100 g/ 100 L
Coraza/ bio Insumos nativa	H. virens cepa Ñire + Bacillus licheniformis	Pintura	
Trichoderma/ Utalca	<i>Trichoderma</i> sp.	Líquida	10 ⁵ esporas/ mL
Podexal/ Basf	Piraclostrobin (Qol)	Pintura	
Benomilo	Benomilo (MCB)	Líquida	50 g/ 100 L

Apolo/ Anasac	Tebuconazol (DMI)	Liquida	40 mL/100 L
Cantus/ Basf	Boscalid (SDHI)	Liquida	120 g/ 100 L

3.5 Inoculación de ramillas de manzano

Después de 24 horas de protección de las heridas de poda de ramillas de manzano cv. Fuji con los respectivos fungicidas convencionales y biológicos (Cuadro 3.1), cada herida se inoculó 100 uL con una suspensión de trozos de micelio (10^5 fragmentos de micelio; Twizeyimana et al., 2013) de *Diplodia seriata* (aislado DS1) en todas las ramillas que se protegieron previamente. Un igual número de ramillas sin protección e inoculados se dejaron como el tratamiento testigo (agua). Posteriormente 9 meses después de la inoculación las ramillas de todos los tratamientos fungicidas (Cuadro 3.1), se podaron para ser evaluados según la longitud (mm) del daño necrótico desde la herida de poda. Después de las mediciones, se realizó un re-aislamiento del agente causal desde la zona de avance de cada lesión necrótica en medio de cultivo APD (2%) para confirmar que el daño observado fue provocado por el hongo.

3.6 Diseño Experimental y Análisis Estadístico

El estudio de la evaluación de la protección de las heridas de poda fue conducido en un diseño completamente al azar (DCA). La unidad experimental correspondió a una planta con 5 ramillas y se utilizaron 6 repeticiones. Los promedios se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA), seguido de una prueba de LSD ($p < 0.05$). Se utilizó el programa estadístico Statgraphics.

4. RESULTADOS

4.1 Sensibilidad *in vitro* de Botryosphaeriaceae a fungicidas

Los aislados de Botryosphaeriaceae mostraron una sensibilidad *in vitro* en medio APD (2%) variable entre los cuatro fungicidas pertenecientes grupos químicos diferentes como benomil (MBC), boscalid (SDHI), piraclostrobin (QoI) y tebuconazol (DMI). Los aislados de *D. seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti* fueron sensibles a los fungicidas donde benomil presentó valores de EC50 entre 0,07 a 0,42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para tebuconazol se lograron valores entre 0,12 y 046 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (EC50). Para los fungicidas piraclostrobin y boscalid los valores de EC50 variaron entre 0,58 a 39,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10,03 a 1383,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Cuadro 4.1).

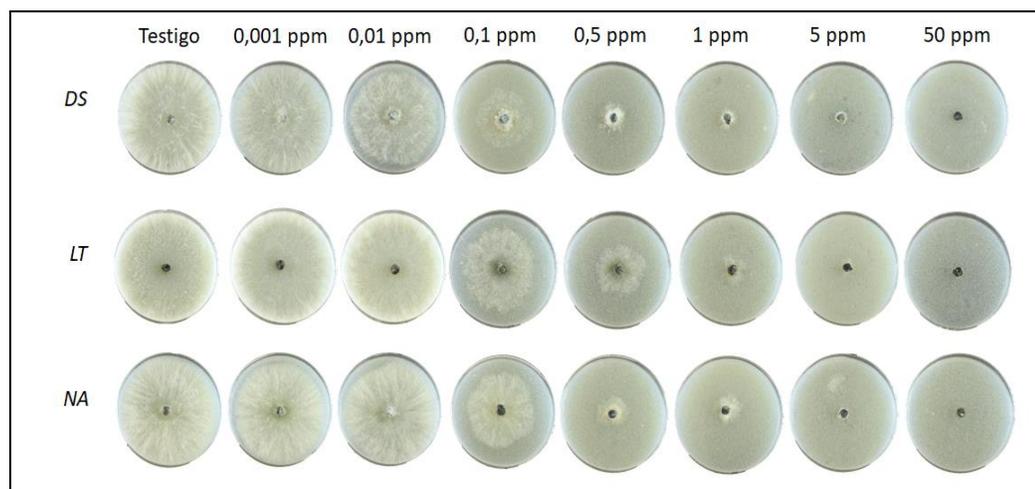


Figura 4.1. Sensibilidad *in vitro* del crecimiento micelial de *Diplodia seriata* (DS), *Lasiodiplodia theobromae* (LT) y *Neofusicoccum arbuti* (NA) en medio de cultivo APD después de 5 días de incubación a 20°C con diferentes concentraciones de piraclostrobin (entre 0,001 a 50 μg i.a. /mL).

Cuadro 4.1. Sensibilidad in vitro de aislados de *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti* a los fungicidas benomil (Benomyl 50 PM, Point, Chile), boscalid (Cantus, Basf, Chile), piraclostrobin (Comet, Basf, Chile) y tebuconazol (Tebuconazol 43 SC, Agrospec, Chile) en inhibir el 50 % del crecimiento micelial.

Especie/ aislado	EC50 (ppm)			
	Benomil	Boscalid	Piraclostrobin	tebuconazol
<i>Diplodia seriata</i>				
DS1	0,08	15,92	6,52	0,14
DS2	0,09	10,93	4,48	0,12
DS3	0,08	34,47	10,20	0,13
DS4	0,07	46,63	17,90	0,12
Promedio	0,08	26,99	9,77	0,13
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>				
LS1	0,09	663,39	33,45	0,46
LS2	0,10	560,70	37,67	0,38
LS3	0,09	1383,85	36,46	0,40
LS4	0,08	213,75	39,26	0,36
Promedio	0,09	705,42	36,71	0,40
<i>Neofusicoccum arbuti</i>				
NA1	0,11	22,72	0,97	0,26
NA2	0,21	10,03	1,76	0,22
NA3	0,22	24,00	2,34	0,18
NA4	0,21	34,38	0,58	0,27
Promedio	0,19	22,78	1,41	0,23

EC50= Concentración efectiva en reducir el 50% del crecimiento micelial.

4.2 Control de lesiones de poda

Después de (9) meses en el campo, las ramillas inoculadas, pero sin protección (tratamiento testigo) desarrollaron lesiones necróticas en la madera entre longitudes de 18 y

56 mm, desde la zona de inoculación (herida de poda) (Figura 4.2). El promedio obtenido fue de 38,5 mm de necrosis de la madera en ramillas de manzano cv. Fuji (Figura 4.2).



Figura 4.2. Cancro externo (A) y lesiones necróticas en la madera (B) de ramillas de dos años de manzano cv. Fuji inoculadas con *Diplodia seriata* (aislado DS1) en la herida de poda, mostrando síntomas de muerte regresiva, después de 9 meses en el campo, Panguilemo, Región del Maule.

Todos los tratamientos utilizados mostraron diferencias significativas con el tratamiento testigo (agua) ($P < 0,0001$; $F = 39,65$), mostrando menores lesiones en las ramillas protegidas, con un rango de lesiones entre 8,4 y 22,8 mm para los tratamientos benomilo y *Trichoderma* sp. (Figura 4.3). El mejor producto fue la aplicación líquida de benomilo (8,4 mm de lesión), seguido por piraclostrobin en pasta (11,9 mm de lesión) (figura 4.3).

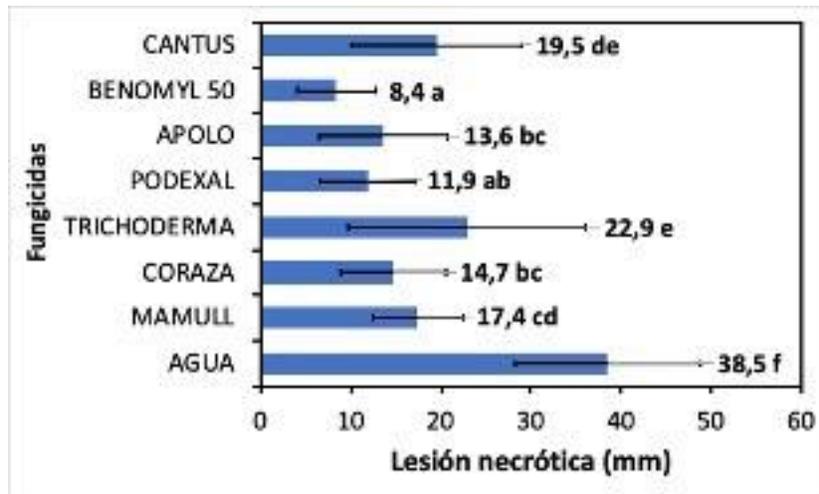


Figura 4.3. Promedio del largo de lesión necrótica (mm) asociadas a ramillas protegidas con fungicidas sintéticos cantus (boscalid, SDHI), benomyl (benomilo, MBC), apolo (tebuconazol, DMI), podexal (piraclostrobin, Qol), y agentes biológicos como *Trichoderma* sp. (Utalca, biológico), coraza (*Trichoderma* spp. + *Bacillus*), mamull (*Trichoderma* spp., biológico) y tratamiento agua (tratamiento testigo sin protección). Promedios seguidos de letras distintas muestran diferencia significativa según prueba de LSD ($P < 0,05$).

En cuanto a la eficacia de los productos fungicidas y biológicos en relación al tratamiento testigo, estas variaron entre 41% por la aplicación líquida de *Trichoderma* sp. (Utalca) y 78% por la aplicación líquida de benomilo (benomyl 50). Como se observa en los resultados obtenidos, la eficacia del piraclostrobin (pintura, Podexal) 69.1 %, seguido por tebuconazol (líquido, Apolo) con 64.5 %. Sin embargo, los productos biológicos comerciales alcanzaron una eficacia de 55 y 62% para mamull (líquido) y coraza (pintura) (Figura 4.2).

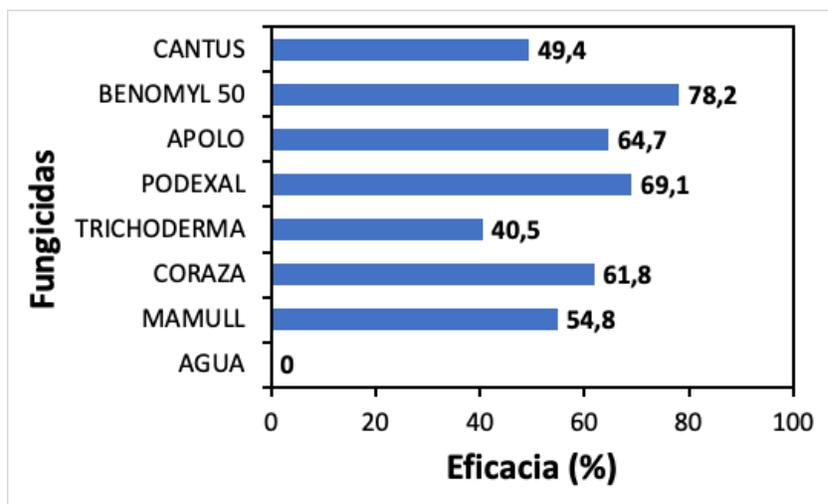


Figura 4.4. Eficacia (%) de la protección asociadas a ramillas protegidas con fungicidas sintéticos cantus (boscalid, SDHI), benomyl (benomilo, MBC), apolo (tebuconazol, DMI), podexal (piraclostrobin, Qol), y agentes biológicos como *Trichoderma* sp. (Utalca, biológico), coraza (*Trichoderma* spp. + *Bacillus*), mamull (*Trichoderma* spp., biológico) sobre las heridas de poda frescas en manzanos cv. Fuji después de 9 meses de incubación en el huerto de manzanos en Panguilemo, Universidad de Talca, Región del Maule.

5. DISCUSIÓN

Las Botryosphaeriaceae son fitopatógenos que causan importantes problemas de muerte regresiva en diversas especies frutales en Chile y en el mundo (Úrbez-Torres et al., 2006; Díaz et al., 2013; Díaz et al., 2020), incluyendo el manzano (Díaz et al., 2019b). Por lo tanto, estudio de sensibilidad y de control son necesarios para conocer la sensibilidad y conocer las mejoras moleculares sintéticas y biológicas para su control preventivo (Latorre, 2018). En este sentido, los resultados obtenidos en esta investigación, permiten indicar que todos los aislados de las especies de Botryosphaeriaceae asociados a muerte regresiva de manzanos mostraron sensibilidad del crecimiento micelial de *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti* a los fungicidas y ser eficaces en el control preventivo de *D. seriata* en heridas de poda en el campo.

Diversos estudios han permitido verificar la presencia de *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti*, como agentes causales de la canchrosis o muerte regresiva en plantas de manzano sometidos al proceso de poda. Entre ellos, el trabajo de Velis (2020), el cual señala que de las principales enfermedades que afectan la producción y sobrevivencia de los huertos de manzano en la Región del Maule, se encuentran ciertas enfermedades de la madera, como el cancro europeo y la muerte regresiva, asociados a *Neonectria ditissima* y *Diplodia seriata*, respectivamente; la investigación de Catalán (2016), donde se determina que en Chile la producción de este frutal se ve afectada por varias eventualidades, entre las que destacan los problemas de pudriciones asociados a hongos, como el patógeno *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila*, *Neofabraea alba*, *Phacidium lacerum* y *Phacidiopycnis washingtonensis*, lo que incide en la calidad y condición final de la fruta; así como el estudio de Rossi (2019), que ha permitido evidenciar recientemente la presencia de *Diplodia seriata* causando la muerte regresiva de manzanos en la Región del Maule.

A nivel de laboratorio, el cultivo *in vitro* de aislados de hongos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae, ha permitido determinar la sensibilidad del crecimiento micelial por ED50, empleando un medio de cultivo APD (2%) y concentraciones de los ingredientes activos de benomil (MBC), boscalid (SDHI), piraclostrobin (QoI) y tebuconazol (DMI), de 0,01 hasta 50,0 µg/ml (ppm). Los resultados del ensayo *in vitro* indican que benomil (MBC) y tebuconazol (DMI) exhiben considerable actividad *in vitro* contra *D. seriata*, *L. theobromae* y *N. arbuti*, reportando valores de EC50 que van de 0,07 a 0,22 µg/mL para benomil (MBC) y de 0,12 a 0,46 µg/mL para tebuconazol (DMI). Menor efectividad fue demostrada por los ingredientes activos de piraclostrobin (QoI) y boscalid (SDHI), los cuales reportan valores

entre 0,58 a 39,26 $\mu\text{g/mL}$ y 10,03 a 1383,85 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. En este sentido los resultados son concordante con el trabajo de donde aislados de *D. seriata*, *L. theobromae*, *N. parvum* y *B. dothidea* obtenidos desde vides en Australia, mostraron sensibilidad *in vitro* a fungicidas DMI (tebuconazol y Penconazol) y Bencimidazole (Cabendamzima) con rangos entre 0,02 a 0,33 $\mu\text{g/mL}$ y 0,01 a 0,07 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estos mismo aislados mostraron ser sensibles a piraclostrobin y menor sensibilidad a boscalid (1,05 a 21,39 $\mu\text{g/mL}$) (Pitt et al., 2012), coincidiendo con el presente trabajo.

Los resultados *in vitro* obtenidos en el presente estudio demuestran la efectividad de los fungicidas benomil (MBC) y tebuconazol (DMI) en el control del crecimiento micelial radial de los hongos *D. seriata*, *L. theobromae* y *N. arbuti*, asociados a la muerte regresiva en manzano. El efecto inhibitorio del benomil a concentración ED50 afecta los microtúbulos durante el proceso de la mitosis lo que ocasiona la interrupción del crecimiento micelial y la división celular, ocasionando la muerte de las células en proceso de formación del hongo (Núñez, 2012). Por su parte, el tebuconazol a concentración ED50, inhibe la síntesis del ergosterol, el esterol que compone las membranas celulares de los hongos, impidiendo su multiplicación en el medio de cultivo PDA (Daza, 2016). En cuanto a los fungicidas piraclostrobin (QoI) y boscalid (SDHI) su efecto inhibitorio micelial a nivel de laboratorio es inferior a concentraciones ED50.

En resumen, los resultados de este estudio sugieren que los fungicidas benomil y tebuconazol, que se encuentran registrados como agentes de control de la canchrosis o muerte regresiva en plantas de manzano en Chile, poseen una considerable actividad *in vitro* contra *Diplodia seriata*, *Lasiodyplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti*. Por su parte, piraclostrobin y boscalid parecen ser menos eficaces contra estas especies de hongos de la familia Botryosphaeriaceae, que se asocian comúnmente con enfermedades del tronco del manzano. Sin embargo, para llegar a resultados concluyentes, es importante estudiar la efectividad de estos compuestos a nivel de campo.

Este estudio demuestra, la reducción significativa del largo de la estría necrótica por la protección de las heridas de poda contra hongos que dañan a la madera, obteniendo con productos fungicidas agroquímicos y biológicos formulados tanto en pasta como en líquido, coincidiendo con trabajos previos contra Botryosphaeriaceae en vides (Díaz y Latorre, 2013; Zuñiga, 2016), arándanos (Latorre et al., 2013) en Chile, como en California y España en vides (Rolshausen et al., 2010) y almendros (Olmo et al., 2017). Con los ingredientes activos tebuconazol (DMI) y piraclostrobin (QoI) se lograron eficacia de 65 a 69%, respectivamente,

contra *D. seriata*, concordando con estudio previos realizados en vides (Díaz y Latorre, 2013; Zuñiga, 2016) y arándanos (Latorre et al., 2013) y avellanos (Muñoz, 2017), con eficacias sobre el 60% de protección de heridas de poda contra Botryosphaeriaceae en Chile. En este sentido, las aplicaciones líquidas también han demostrado ser efectivas, en el trabajo de Rolshausen et al., (2010), lograron eficacia del 54 al 83% para piraclostrobin (QoI) y del 77 al 82% para metil-tiofanato (carbamato bencimidazol) para el control de Botryosphaeriaceae spp. en heridas de poda en vides en California. Estas eficacia son similares a las obtenidas en el presente trabajo, logrando un 78% de eficacia con otra molécula del grupo bencimidazole como benomil.

En el actual estudio, se demostró que hubo efectividad de todos los tratamientos para *D. seriata*, el que fue menos eficaz o genera menos protección fue el agente biológico aplicado de forma líquida *Trichoderma* sp. (Utalca, biológico) con un porcentaje menor al resto (41%). Sin embargo, los productos biológicos comerciales Mamull (liquido) y Coraza (pintura) alcanzaron rendimientos muy aceptables (lograron una efectividad sobre el 55%). Además de cómo se está orientando el mercado hoy en día hacia una producción más sustentable y amigable con el medio ambiente, pueden ser opciones viables para incorporarlas como aplicaciones de campo para combatir las especies provenientes de las Botryosphaeriaceae.

Las aplicaciones líquidas son una muy buena alternativa, al ser mas rápidas y eficaces en cubrir y proteger a un huerto comercial. Trabajos realizados en Nueva Zelanda han demostrado la eficacia de fungicidas aplicados por nebulizadora obteniendo un control cercano al 80% contra de *N. luteum* en la protección de heridas frescas de poda de vides cv. Sauvignon blanc (Sosnowsky y Mondy, 2019). Coincidentemente, Brown et al (2020), también lograron altas eficacias con fungicidas aplicados líquidamente con maquinaria, usando las dosis comerciales de piraclostrobin (QoI) + boscalid (SDHI) y metil-tiofanato (Bencimidazol) + miclobutanil (DMI). Sin embargo, en el trabajo de Pitt et l. (2012), lograron una baja eficacia en vides con protecciones con Cabendamizma entre 27% y 41% y tebuconazol entre 27% y 54%. Por lo tanto, es necesario evaluar con mayor profundidad la aplicación en campo por mas temporadas de las moléculas para determinar una eficacia. Además, sería interesante evaluar las aplicaciones líquidas que combinen grupos químicos diferentes en manzanos.

Si bien varios trabajos han demostrado la alta eficacia de las formulaciones en pasta (Díaz y Latorre, 2013; Latorre et al., 2013, Rolshausen et al., 2010), estas aplicaciones en pasta son más costosas y lentas, especialmente en grandes superficies es mucho el tiempo en que las heridas quedan sin protección (Díaz et al. 2013), por lo que la elección del tipo de

formulación a utilizar para la protección depende de factores ambientales, de capital, tamaño de superficie, disponibilidad de mano de obra, entre otros. Siendo en la actualidad, la mano de obra una gran limitante en la fruticultura. Basados en estudios por Sosnowsky y Mondy (2019), demuestran que el costo de pintar las heridas de poda es de \$166 US dólar/ha versus \$ 87 US dólar/ha cuando se aplica por nebulizadora, mostrando una disminución de los costos de la aplicación líquida durante la protección de las heridas de poda en frutales. Por lo tanto, las aplicaciones líquidas deben ser estudiadas en mayor profundidad para determinar la mejor forma de aplicación a nivel nacional e incorporarse y combinarse con biocontroladores.

Los estudios realizados Sutton et al., (2014) y Delgado-Cerrone et al., (2016), han mostrado que el ciclo de la enfermedad, se inicia con la planta de manzano enferma en el huerto, las cuales tienen estructuras afectadas como ramillas y brazos (fuente de inóculo-planta enferma), que con frecuencia están acompañadas de estructuras reproductivas de los hongos (picnidios), las que también se desarrollan en abundancia en los residuos de poda dejados en el suelo (Elena y Luque, 2016). Los frutos con pudrición negra dejados en el suelo o momificados en los árboles, son otra fuente de inóculo potencial en el huerto (Díaz et al., 2019a). Con la lluvia los picnidios se hidratan y descargan las conidias principalmente durante otoño-inverno, y se diseminan con el salpicado de la lluvia y el viento, pudiendo llegar a las heridas de poda; es entonces cuando se puede iniciar una nueva infección, luego las heridas infectadas, principal vía de entrada para Botryosphaeriaceae, desarrollan canchales con los meses y años, pudiendo causar muerte de ramillas y brazos.

Finalmente, estos resultados nos indican que la protección de poda con los actuales fungicidas agroquímicos y agentes biológicos en formulación pasta y líquida pueden reducir de gran manera el desarrollo de hongos de la madera como *Diplodia seriata* en manzanos. Para mantener huertos sanos contra los patógenos se debe proteger de forma inmediata las heridas de poda, ojalá con más de una aplicación de fungicida durante dicha temporada (Díaz y Latorre, 2013), eliminar de forma inmediata restos de poda de huertos frutales porque son fuente de inóculo de dichos patógenos, complementando con combinación de manejos culturales, entre otras (Elena y Luque, 2016).

6. CONCLUSIÓN

En función de los objetivos planteados y en conocimiento de los resultados obtenidos en el estudio, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

Los aislados de *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum arbuti* mostraron ser muy sensibles en los estudios *in vitro* a los fungicidas piraclostrobin, tebuconazole y benomilo, pero una menor sensibilidad a Boscalid.

La protección de las heridas de poda mostró ser eficaces, donde los productos fungicidas obtuvieron una eficacia entre un 40% para el producto en base a *Trichoderma* sp. (Utalca) y 78% para el producto benomil aplicados en forma líquida. Interesantemente, los productos biológicos comerciales basados en consorcios biológicos proporcionaron una eficacia de 55% para su versión líquida (Mamull) y 62% para su versión en pintura (Coraza) en la protección de heridas de poda en ramillas de manzano cv. Fuji.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, W. D. (2006). Variedades de frutas y nueces recomendadas para el condado de Harris y la vecindad. Traducción de Sabrina Kovalchuk. Texas Cooperative Extension. The Texas A&M University System. Houston, Texas. USA. 16 pp.

Alves, A., Barradas, C., Phillips, J., and Correia, A. (2013). Diversity of Botryosphaeriaceae species associated with conifers in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*. 135:791-804.

Boyer, J., and Liu, R. H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2891-3-5>

Baugher, A. (2003). Anatomy and taxonomy. Pp 3-8. En: Baugher, A y S. Singha (eds). *Coincise encyclopedia of temperate tree fruit*. Food Products Press, New York, NY.

BASF. Disponible electrónicamente en: <https://agriculture.basf.com/cl/es.html> Fecha de la consulta: junio, 2021.

Bio insumos nativa. Empresa biotecnológica. Recuperada de: <http://www.bionativa.cl/web/> Fecha de la consulta: junio, 2021.

Brown, E., and Hendrix, F. (1981). Pathogenicity and histopathology of *Botryosphaeria dothidea* on Apple stems. *Phytopathology* 71:375-379.

Brown, A. A., Travadon, R., Lawrence, D. P., Torres, G., Zhuang, G., & Baumgartner, K. (2020). Pruning-wound protectants for trunk-disease management in California table grapes. *Crop Protection*, 141, 105490. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105490>

Catalán Escobar, C. (2016). Control químico de *Diplodia mutila*, *Diplodia seriata*, *Neofabraea alba*, *Phacidiopycnis washingtonensis* y *Phacidium lacerum* durante almacenaje en frío convencional en manzanas cvs. Cripps Pink y Fuji (Tesis de Grado) Universidad de Talca (Chile). Escuela de Agronomía. 48p.

Coque, M., Díaz, M y Garcia, J. (2012). El cultivo del manzano. Edit orial: imp. ediciones paraninfo S.A. – mundi-prensa. Primera edición. Madrid. España. 221 p.

Cáceres, M. Lolas, M., Gutierrez, M. Ferrada, E. and Díaz, G. (2016). Severe Outbreak of Black Rot in Apple Fruit cv. Fuji Caused by *Diplodia seriata* During Pre-Harvest in Maule Region, Chile. Plant Disease 100(11), 2333.

CIREN. (2017). Manzano. Recuperado el 25 de Abril de 2019, de Centro de Información de Recursos Naturales: <https://www.ciren.cl/wp-content/uploads/2017/12/Manzana.pdf>

Coutanceau, M. (1976). Fruticultura. Segunda edición. Ediciones Oikos-tau. Barcelona, España. 608 p.

Crous, P., Slippers, B., Wingfield, M., Rheeder, J., Marasas W., Philips, A., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., and Groenewald, J. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. Studies in Mycology 55:235-253.

Daza Aravena, T. V. (2016). Efectividad de fungicidas en el control de *Diplodia mutila*, *Diplodia seriata* y *Phacidium lacerum* asociados a pudriciones de manzanas cv. Cripps Pink en la Región del Maule (Tesis de Grado). Universidad de Talca (Chile). Escuela de Agronomía.

Delgado-Cerrone, L., Mondino-Hintz, P., and Alaniz-Ferro., S. (2016). Botryosphaeriaceae species associated with stem canker, die-back and fruit rot on Apple in Uruguay. European Journal of Plant Pathology 146(3):637-655.

Díaz, G, A., Latorre, B.A., Ferreda, E.E., and Lolas., M. (2019a). Identification and characterization of *Diplodia mutila*, *D. seriata*, *Phacidiopycnis washingtonensis* and *Phacidium lacerum* obtained from apple (*Malus x domestica*) fruit rot in Maule Region, Chile. European Journal of Plant Pathology 153:1259-1273.

Díaz, G.A., Latorre, B.A, Ferrada, E., Gutiérrez, M, Bravo, F. and Mauricio, L. (2018). First Report of *Diplodia mutila* Causing Branch Dieback of English Walnut cv. Chandler in the Maule Region, Chile. Plant Disease, 102(7), 1451.

Díaz, G. (2020). Cancrosis y muerte regresiva en manzanos: etiología y aspectos epidemiológicos en Chile. Boletín Técnico Pomáceas. Año 20. N° 111: 2-7.

Díaz, G.A., and Latorre, B. (2013). Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile. *Crop Protection*. 46:106-112

Díaz, G.A., y Latorre.B.A. (2020). Cancrosis y muerte regresiva en manzanos: Etiología y aspectos epidemiológicos en Chile. *Revista Fruticola* 42: 31-36.

Díaz, G.A., Auger, J., Besoain, X., Bordeu, E., and Latorre, B.A. (2013). Prevalence and pathogenicity of fungi associated with grapevine trunk diseases in Chilean vineyards. *Ciencia e Investigación Agraria* 40(2):327-339.

Díaz, G. A., Mostert, L., Halleen, F., Lolas M., Gutierrez M., Ferrada E and Latorre B. A. (2019b). *Diplodia seriata* Associated with Botryosphaeria Canker and Dieback in Apple Trees in Chile. *Plant Disease*, 103(5): 1025.

Elena, G., and Luque, J. (2016b). Pruning debris of grapevine as a potencial inoculum source of *Diplodia seriata*, causal agent of Botryosphaeria dieback. *European Journal of Plant Pathology* 144:803-810.

Espinoza, J. Briceño, E., Chávez, E. Úrbez-Torres, J., and Latorre, B. (2009) *Neofusicoccum* spp. Associated with Stem Canker and Dieback of Blueberry in Chile. *Plant Disease* 97:1042-1050.

Ferrada E E., Lolas M., Pacheco C.V., and Díaz G.A. (2017). Occurrence of severe outbreak of calyx-end rot associated with *Botrytis cinerea* in *Malus x domestica* cv. Cripps Pink during harvest in the Maule region, Chile. *Plant Disease*. 101:2149-2149.

Gil, G. (2009). *Fruticultura, El potencial productivo*. Editorial: Ediciones Universidad Católica de Chile. Cuarta edición. Santiago, Chile. 431 p.

Gil, G. (2012). *Fruticultura - La producción de fruta: Frutas de clima templado y subtropical*. Tercera edición. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 634 p.

Herrera, F. (2018). Caracterización molecular y patogenicidad de aislados de *Diplodia seriata* asociados a muerte regresiva de brazos de manzanos. Memoria de título para optar al grado de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca, Talca, Chile. 23 p.

INIA. (2015). La importancia de la industria de la manzana chilena en el mercado internacional. Recuperado el 25 de Abril de 2019, de El Instituto de Investigaciones Agropecuarias: http://www.inia.cl/wp-content/uploads/2015/01/Art-t%C3%A9cnico_Importancia-mercado-manzanas.pdf

Latorre, B. A. (2004). Enfermedades de las plantas cultivadas. Sexta Edición. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 638 p.

Latorre, B. A. (2018). Compendio de las enfermedades de las plantas. Editorial: Ediciones Universidad Católica de Chile. Primera edición. Santiago, Chile. 1093 p.

Latorre, B. A., and Toledo, M. V. (1984). Occurrence and relative susceptibility of apple cultivars to *Botryosphaeria* canker in Chile. *Plant Disease* 68:36-39.

Latorre, B. A.; Torres, R.; Silva, T and Elfar, K. (2013). Evaluation of the use of wound-protectant fungicides and biological control agents against stem canker (*Neofusicoccum parvum*) of Blueberry. *Ciencia e Investigación Agraria*. 40(3):537-545.

López-Hernández, A. (2017). Variedades de la manzana. *Revista unifrut* 15 (5):9-10.

Merlet, H., Navarro, A y Rosales, C. (2016). Manual técnico, productivo y económico de la manzana. Centro de Información y Recursos Naturales (CIREN). Publicación N° 191. Recuperado en: <http://bibliotecadigital.ciren.cl/handle/123456789/26085>. Consultado el 14 de julio del 2020.

Núñez, N. N. (2012). Evaluación del potencial de *Trichoderma* spp. y *Glomus intraradices* para controlar a *Lasiodiplodia theobromae*, uno de los agentes causales de la muerte regresiva por Botriosferia en vid (*Vitis vinifera* L.). (Tesis de Grado). CICESE, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (México). Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología. 127p.

ODEPA. (2014). Superficie de frutales por región. Recuperado el 25 de Abril de 2019, de Oficina de Estudios y Políticas Agrarias: <https://www.odepa.gob.cl/superficie-de-frutales-por-region-2>

Ojer, M., Reginato Meza, G., Vallejos, F and Boulet, A. (2011). Producción de duraznos para industria. Editorial: Zeta Editores. Universidad Nacional de Cuyo. Primera edición. Mendoza, Argentina. 240p.

Olmo, D; Gramaje, D and Armengol, J. (2017). Evaluation of fungicides to protect pruning wounds from Botryosphaeriaceae species infections on almond trees. *Phytopathologia Mediterranea*. 56(1): 77-86.

Pérez, S., Meriño, C. & Guerrero Jaime. (2014). Detection of *Neofusicoccum nonquaesitum* causing dieback and canker in highbush blueberry from Southern Chile. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 14:581-588.

Pelleteret, P., Crovadore, J., Cochard, B., Pasche, S., Bovigny, P.Y., Chablais, R., and Lefort, F. (2017). Urban London plane tree dieback linked to fungi in the Botryosphaeriaceae. *Urban Forestry and Urban Greening* 22:74-83.

Pitt, W.M., Sosnowski, M.R., Huang, R., Steel, C.C., and Savocchia, S. (2002). Evaluation of fungicides for management of *Botryosphaeria* canker of grapevines. *Plant Disease* 96:1303-1308.

PortalFruticol.com. (2018). Guía fruticultura: Estados fenológicos de árboles frutales de hoja caduca. Recuperado de: <https://www.portalfruticola.com/>. Fecha de la consulta: junio, 2021.

Química de alimentos. Disponible electrónicamente en: <http://laboratoriosincreibles.blogspot.com/2014/07/control-del-pardeamiento-enzimatico-1.html>. Fecha de la consulta: junio, 2021.

Raudone, L., Raudonis, R., Liaudanskas, M., Janulis, V. & Viskelis, P. (2017). Phenolic antioxidants profiles in the whole fruit, flesh and peel of apple cultivars grown un-Lithuania. *Scientia Horticulturae* 216:186-192.

Reeder, R. (2020). Invasive Species Compendium. *Diplodia seriata* (grapevine trunk disease). Wallingford, UK:CABI. Recuperado de: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/9630> Fecha de la consulta: junio, 2021.

Rossi, M. (2019). Identificación y caracterización de especies de Botryisphaeriaceae asociadas a muerte regresiva de manzanos. Universidad de Talca- Tesis Escuela de Agronomía.

Rolshausen, P., J. Úrbez-Torres, J., Rooney-Latham, S., Eskalen, A., Smith, R. and Gubler W. (2010). Evaluation of Pruning Wound Susceptibility and Protection Against Fungi Associated with Grapevine Trunk Diseases. *American Journal of Enology and Viticulture*. 61: 113-119.

SAG. (2019). Apolo. Recuperado de: <http://www.anasac.cl/agropecuario/wp-content/uploads/Etiqueta-18-Apolo-25-EW.pdf>. Consultado el 20 de agosto del 2021.

Serviagro. Produciendo cambios. Recuperado de: <http://www.serviagromx.com/producto/apolo/> Fecha de la consulta: junio, 2021.

Sessa, L., Abreo, E., Bettucci, L. and Lupo, S. (2016). Botryosphaeriaceae species associated with wood diseases of stone and pome fruits trees: symptoms and virulence across different hosts in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology* 146:519–530.

Sutton, T., Aldwinckle H., Agnello A., and Walgenbach, J. (2014). Compendium of apple and pear diseases and pests. Second edition. American Phytopathological Society (APS). Minnesota, USA. 224 p

Sosnowski, M. R., and Mundy, D. C. (2019). Pruning Wound Protection Strategies for Simultaneous Control of *Eutypa* and *Botryosphaeria* Dieback in New Zealand. *Plant Disease* 103(3): 519–525.

Twizeyimana, M., McDonald, V., Mayorquin, J. S., Wang, D. H., Na, F., Akgül, D. S., and Eskalen, A. (2013). Effect of fungicide application on the management of avocado branch canker (formerly *Dothiorella* canker) in California. *Plant Dis.* 97:897-902.

Talca Universidad de Chile 2020. Recuperado de: <https://www.otalca.cl/noticias/investigacion-sobre-enfermedad-en-manzanos-causada-por-hongos-es-clave-para-los-productores-chilenos/> Fecha de la consulta: junio, 2021.

Urbina, V. (2010). Morfología y desarrollo vegetativo de los frutales: monografías de fruticultura; fenomenología y vida de las plantas. España.

Velis Ortega, J. C. (2020). Protección de heridas de poda con fungicidas biológicos contra infecciones por *Diplodia seriata* y *Neonectria ditissima* en ramillas de manzanos en la Región del Maule, Chile (Tesis de Grado) Universidad de Talca (Chile). Escuela de Agronomía.

Warrington, I.J., and Weston, G.C. (1990). Kiwifruit: Science and management. Ray Richards publisher in association with the New Zealand Society for Horticultural Science. Auckland, New Zealand. 575p.

Yuri, J & Lepe, V. (2007). Dormancia/Receso. Centro de Pomáceas. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca, Chile.

Zuñiga, M. (2016). Evaluación de diferentes fungicidas para el control de *Phaeomoniella chlamydospora* en heridas de poda en *Vitis vinifera* cvs. Cabernet Sauvignon y Sauvignon blanc. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Talca. Chile. Facultad Ciencias Agrarias, Universidad de Talca. 43p.