



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

**CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO *IN VITRO* DEL HONGO *NEOFABRAEA*
VAGABUNDA, AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD 'OJO DE BUEY' EN MANZANAS**

MEMORIA DE TÍTULO

JOSÉ MIGUEL CORREA INDA

**TALCA-CHILE
2019**



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

**CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO *IN VITRO* DEL HONGO *NEOFABRAEA*
VAGABUNDA, AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD 'OJO DE BUEY' EN MANZANAS**

por

JOSÉ MIGUEL CORREA INDA

MEMORIA DE TÍTULO

**Presentada a la Universidad de Talca como parte de los requisitos para optar al título
de**

INGENIERO AGRÓNOMO

Talca, 2018

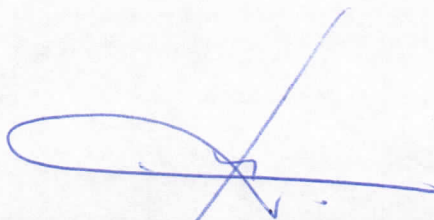
CONSTANCIA

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

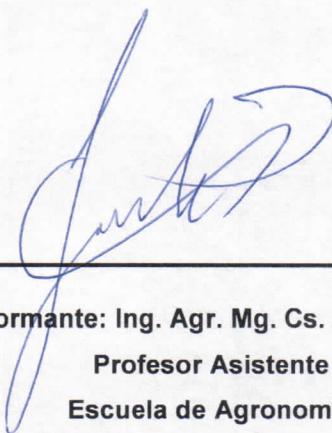


Talca, 2019

Aprobación:



**Profesor Guía: Ing. Agr. M.S. PhD. Mauricio Lolas C.
Profesor Asociado
Escuela de Agronomía
Facultad de Ciencias Agrarias**



**Profesor informante: Ing. Agr. Mg. Cs. Dr. Gonzalo A. Díaz
Profesor Asistente
Escuela de Agronomía
Facultad de Ciencias Agrarias**

Fecha de presentación de memoria: 14 de Mayo de 2019.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a todas aquellas personas que de cierta forma u otra hacen posible este gran logro, concretar una de las etapas más anheladas de mi vida, convertirme en Ingeniero Agrónomo. Sin duda alguna esto no hubiese llegado a buen puerto sin la ayuda de mi Familia, profesores y amigos que me alentaron a seguir adelante con mis objetivos, especialmente agradecer al gran equipo de Patología Frutal de la facultad de ciencias Agrarias de la Universidad de Talca, conformado por personas de gran voluntad y disposición, pero en especial a Mauricio Lolas Caneo, Marcela Cáceres Pinto y Gonzalo Díaz Ulloa por su disposición y aguante.

RESUMEN

El manzano (*Malus domestica*) es uno de los frutales de mayor importancia del sector hortofrutícola. Una de las principales enfermedades del manzano que afectan a los frutos en postcosecha es Ojo de Buey causada por el hongo fitopatógeno *Neofabraea vagabunda* (= *N. alba*). La finalidad de este estudio fue caracterizar el crecimiento *in vitro* del hongo *N. vagabunda* mediante la utilización de distintos medios de cultivo y temperaturas de incubación. Diez aislados patogénicos de este hongo, fueron cultivados en cuatro medios de cultivo: Agar Papa Dextrosa (APD), Agar Extracto de Malta (AEM), Agar Agua (AA) y Agar Maíz (AM). Los cultivos fueron incubados a 20 y a 0°C. Después de 7 días de incubación, se midió el crecimiento micelial logrado en cada medio de cultivo y en ambas temperaturas semanalmente. Los resultados obtenidos indican que todos los aislados de *N. vagabunda* pudieron crecer en los medios de cultivo Agar Papa Dextrosa, Agar Agua, Agar Extracto de Malta y Agar Maíz, tanto a 20°C como a 0°C. Además, los medios de cultivo Agar Papa Dextrosa y Agar Agua permitieron el mayor crecimiento de los aislados del hongo *N. vagabunda* tanto a las temperaturas de incubación de 0 y 20°C. En el medio de cultivo Agar Extracto de Malta, los 10 aislados de *N. vagabunda* presentaron un crecimiento significativamente menor a los demás medios, tanto a las temperaturas de incubación de 0 y 20°C. Finalmente, no se observó ninguna tendencia en el crecimiento de los 10 aislados de *N. vagabunda* en los cuatro medios de cultivo evaluados que indicara que algún aislado o grupo de ellos tuviera un comportamiento diferenciado.

Palabras claves: *Neofabraea vagabunda*, Ojo de buey, postcosecha, *in vitro*, medios de cultivo.

ABSTRACT

The apple tree (*Malus X domestica*) is one of the most important fruit trees cultivated in Chile. One of the main diseases that affects the apples in postharvest is Bull's Eye Rot caused by the fungus *Neofabraea vagabunda* (= *N. alba*). The purpose of this study was to characterize the growth *in vitro* of this fungus through the use of different cultivation media and incubation temperatures. Ten pathogenic isolates of this fungus were cultivated in four culture media: Potato Dextrose Agar (PDA); Malt Extract Agar (MEA), Water Agar (WA) and Maize Agar (MA). The Petri plates were incubated at 20 and 0 ° C. After 7 days of incubation, the mycelial growth achieved in each culture medium and in both temperatures was measured weekly. The results obtained indicate that the isolates of *N. vagabunda* were able to grow in PDA, WA, MEA and MA, both at 20 and 0°C. In addition, the PDA and WA allowed the greatest growth of the fungus isolates both at incubation temperatures of 0 and 20°C. In the culture medium MEA, the 10 isolates showed a significantly lower growth than the other culture media, both to the incubation temperatures of 0 and 20°C. Finally, no trend was observed in the growth of the 10 isolates of *N. vagabunda* in the four culture media evaluated which would indicate that some isolates or group of them had a differentiated behavior.

INDICE

Página.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis.....	2
1.2 Objetivo general.....	3
1.3 Objetivos específicos.....	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Importancia del manzano	4
2.2 Producción nacional.....	4
2.3 Producción en la Región del Maule	4
2.4 Descripción del manzano	5
2.5 Enfermedades de postcosecha	5
2.5.1 Neofabraea spp.....	5
2.5.2 Síntomas.....	6
2.5.3 condiciones predisponentes	6
2.6 Control de la enfermedad.....	7
2.6.1 Control cultural	7
2.6.2 Control químico.....	7
2.7 Medios de cultivo.....	7
2.7.1 Agar Papa Dextrosa (APD).....	8
2.7.2 Agar Agua (AA)	8
2.7.3 Agar Extracto de Malta (AEMT)	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1 Ubicación del ensayo	10
3.2 Origen de los aislados de <i>N. vagabunda</i>	10
3.3 Medios de cultivos	11
3.4 Evaluación del crecimiento de aislados de <i>N. vagabunda</i> en los medios de cultivo APD, AEM, AM y AA.....	12
3.5 Diseño de experimento y análisis estadístico	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13

4.1 Evaluación del crecimiento de aislados de <i>N. vagabunda</i> en los medios de cultivo APD, AEM, AM y AA.....	13
4.2 Crecimiento <i>in vitro</i> de 10 aislados de <i>N. vagabunda</i> en los medios de cultivo APD, AEM, AM y AA.....	16
5. CONCLUSIONES.....	18
6. BIBLIOGRAFÍA.....	19

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 3.1. Origen de los aislados del hongo <i>Neofabraea</i> <i>vagabunda</i>	8
Cuadro 4.1 Crecimiento del hongo <i>Neofabraea vagabunda</i> a 20°C temperatura ambiente.....	11
Cuadro 4.2 Crecimiento del hongo <i>Neofabraea vagabunda</i> a 0°C temperatura de almacenaje.....	12
Cuadro 4.3 Resumen análisis estadístico	12

INDICE DE FIGURAS

Página.

Figura 2.1. Síntomas de pudrición causada por <i>Neofabraea vagabunda</i>	5
Figura 4.1 Crecimiento de <i>Neofabraea vagabunda</i> en medio Agar Papa Dextrosa.....	13
Figura 4.2 Crecimiento de <i>Neofabraea vagabunda</i> en medio Agar Agua.....	14

1. INTRODUCCIÓN

Chile posee una superficie potencial frutícola de 321.590 hectáreas, lo que le permite ocupar el décimo lugar como productor mundial y ser uno de los países más importantes exportadores del hemisferio Sur, ya que produce 5 millones de toneladas de frutas aproximadas (FEDEFruta, 2016).

Los destinos de la fruta son principalmente Estados Unidos, China y Holanda (Fedefruta, 2019). En la temporada 2017 se exportaron más de 32.888 toneladas de fruta fresca a través de transporte aéreo y un total de 2.513.960 toneladas de fruta a través del transporte marítimo. Destacándose la uva de mesa, con 712.271 toneladas (28,3% del total de envíos), seguido por las manzanas con 546.538 toneladas (21,7%) y los kiwis con 157.760 toneladas (6,3%) transportadas mediante esta vía. Entre el 55-60 % de los envíos de la fruta de nuestro país se realizan por el puerto de Valparaíso, buscando que el producto llegue a tiempo a destino final (MUNDOAGRO, 2018).

Uno de las rutas más importantes que recorre nuestra fruta es la que va con destino a China demorando entre 45 a 50 días dependiendo de la naviera (Chilenut, 2017).

El manzano (*Malus domestica*) es uno de los frutales de mayor importancia del sector hortofrutícola; el área plantada alcanzaría las 34.428 hectáreas haciéndola la tercera especie frutícola más plantada del país, cubriendo cerca del 11% de la superficie frutícola nacional. Casi el 90% de la producción nacional se distribuye entre las regiones del Maule y O'Higgins (Catastro Frutícola CIREN-ODEPA. 2018).

Entre los años 2000 y 2001 se comenzaron a detectar pudriciones anormales en frutos provenientes de huertos de la zona centro del País. Específicamente daños asociadas a las lenticelas, sobre todo en fruta desarrollada bajo condiciones de primaveras cálidas y de abundantes lluvias (Lolas 2005).

Pero en países como Estados Unidos, Europa y Brasil ya se les clasifica como "enfermedades de verano". En nuestro país el agente causal de este tipo de pudriciones fue asociado al hongo *Neofabraea Vagabunda*. Observándose una mayor incidencia de este tipo de daño en cultivares que son cosechados tarde en la temporada, tal como ocurre con Fuji y Pink Lady. Causando daños incluso después de los cuatro meses de almacenaje bajo condiciones de frío (Lolas, 2005).

Las pudriciones causadas por hongos fitopatógenos que ocurren durante el almacenaje de la fruta, son un importante problema para la exportación, entre los que se destacan las causadas por *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp., *Penicillium expansum* y *Neofabraea vagabunda* (Soto-Alvear *et al.*, 2013; Sutton *et al.*, 2014).

N. vagabunda incide a nivel lenticelar y se expresa durante el almacenamiento en frío (0°C) y/o en el transporte al mercado de destino. La pudrición que origina éste hongo es de crecimiento lento y de diversa expresión sintomatológica, predominando halos pardos claros de diversa intensidad, concéntricos rodeando una lenticela de la piel y por el cual se la conoce como pudrición “Ojo de Buey” (Pinilla, Lolas y Soto, 2005; Soto-Alvear *et al.*, 2013).

La alta incidencia de ‘Ojo de Buey’ durante los últimos años no sólo ha forzado la incorporación de nuevos manejos, sino también ha llevado a acortar los periodos de almacenamiento en cámaras refrigeradas y acortar los tiempos de vitrina. Esto significa un problema si se considera que los principales mercados de destino para la fruta chilena son Estados Unidos, Europa y Lejano Oriente. Entre más tiempo son almacenadas, aumenta la posibilidad que aparezcan los síntomas asociados a esta enfermedad (EL MERCURIO; Campo, 2014).

Debido a la importancia que posee el hongo fitopatógeno *N. vagabunda* en la producción y exportación de manzanas, se hace necesario una evaluación del crecimiento de éste hongo *in vitro*, de manera de contar con micelio de éste para realizar estudios epidemiológicos necesarios que definan la mejor estrategia de control de esta enfermedad de postcosecha.

A continuación, se plantean la hipótesis y objetivos del presente estudio:

1.1 Hipótesis

Neofabraea vagabunda presentaría un crecimiento diferencial cuando es cultivado en medios de cultivos estándares utilizados para el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos, siendo el medio Agar Papa Dextrosa el que le permite un mayor desarrollo de su micelio.

1.2 Objetivo general

Evaluar distintos medios de cultivo a distintas temperaturas de incubación que maximicen el desarrollo del micelio del hongo *Neofabraea vagabunda*, agente causal de la enfermedad 'Ojo de Buey' en manzanas Cripps Pink.

1.3 Objetivos específicos

- ❖ Evaluar el crecimiento *in vitro* de 10 aislados del hongo *N. vagabunda* en los medios de cultivo Agar Maíz, Agar Malta, Agar Papa Dextrosa y Agar Agua incubados a 20°C.

- ❖ Evaluar el crecimiento *in vitro* de 10 aislados del hongo *N. vagabunda* en los medios de cultivo AM, AEM, APD Y AA incubados a 0°C.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importancia del manzano

El manzano, cuenta con una gran plasticidad a la hora de adaptarse a los diversos climas y tipos de suelo alrededor de todo el mundo, haciéndolo uno de los frutales de mayor disponibilidad en los distintos mercados nacionales e internacionales con una gran gama de cultivares que suplen la demanda de los consumidores durante todo el año (CIREN, 2017).

El escenario frutícola nacional sitúa al cultivo del manzano (*Malus pumila*) como la segunda especie frutícola más plantada en el país si sumamos las hectáreas correspondientes al cultivo de manzano rojo y de manzano verde respectivamente totalizando las 35.937 ha. No así con la uva de mesa que ocupa el primer lugar con una superficie de 48.202 ha plantadas y dejando en la tercera posición al Nogal con 35.377 ha (ODEPA, 2017).

2.2 Producción nacional

Hoy en día la fruticultura nacional se enfrenta a mercados cada vez más exigentes en cuanto a parámetros de calidad, sabores, coloración, madurez, calibre, peso, entre otros por parte de los consumidores (FAO 2010). Chile que cuenta con las casi 36.000 ha plantadas a nivel país (ODEPA, 2017) produce cerca de 1,4 millones de toneladas de fruta. Principalmente en base a cultivares de las variedades rojas, Royal Gala, Pink Lady, Fuji, Ambrosia y Granny Smith. Que nos sitúa como el principal productor del hemisferio sur y el cuarto exportador en el mundo (Redagráfica, 2017).

2.3 Producción en la Región del Maule

La Región del Maule posee la mayor superficie plantada de este frutal, alcanzando las 22.068 ha que representarían un 62% de la superficie total de ha plantadas a nivel país, seguido del cultivo de Cerezo que reúne 11.130,28 ha plantadas en la región (ODEPA, 2017). Por lo que la importancia de este frutal en la actividad agrícola de la región es de gran importancia.

Sin embargo la rentabilidad de este frutal hoy en día ha decaído fuertemente llegando a US\$ 0,6 por kilo (ODEPA, 2019), ubicándose bajo el promedio que marcan las frutas en el mercado internacional, que es aproximadamente de 2,2 US\$/kg (Redagráfica, 2017).

El panorama exportador se ha tornado agreste para el cultivo del manzano, que se ha visto empañado por los buenos precios del cerezo; segundo cultivo más plantado en la región y que

en las temporadas recién pasadas marco US\$ 7,79 por kilo, más de diez veces el valor de las manzanas (ODEPA, 2018.) quitándole protagonismo a este cultivo y desplazándolo al tercer puesto del ranking con 627,4 millones de dólares FOB declarados y así ocupar el segundo puesto con los 839,4 millones de dólares para la temporada 2017 (Fedefruta, 2018).

2.4 Descripción del manzano

Este cultivo pertenece a la familia Rosaceae, subfamilia Maloideae y género *Malus*. La manzana corresponde a un pomo, órgano carnosos en donde el receptáculo floral se engrosa y se origina un mesocarpo comestible (Yuri, 2013).

El manzano es un árbol frutal de hoja caduca que requiere entre 900 a 1100 horas frío dependiendo del cultivar para salir del letargo. La temperatura óptima durante floración es de 15-20° C y el desarrollo del fruto se favorece con temperaturas de 18-20°C (Cruz, 2008).

2.5 Enfermedades de postcosecha

Las principales enfermedades de postcosecha de manzanas en Chile son el Moho Azul causada por *Penicillium expansum* y pudrición calicinal causada por *Botrytis cinerea* (Sutton *et al.*, 2014). Sin embargo, desde el año 2001, la producción nacional de manzanas, en especial de cultivares tardíos como “Cripps Pink” (Pink Lady®), se han visto afectadas por enfermedades asociadas a las lenticelas. Una de ellas es la conocida como “Ojo de Buey”, producida por *Neofabraea vagabunda* (Soto-Alvear *et al.*, 2012).

2.5.1 *Neofabraea* Spp.

En el mundo existen tres especies del fitopatógeno *Neofabraea* spp. asociados a esta enfermedad. Sin embargo, en Chile sólo es producida por una: la *Neofabraea alba*. Así lo pudo determinar el estudio “Characterization of the Bull's Eye Rot of Apple in Chile”. Esta especie, a diferencia de las otras, no produce canchales en la planta y sólo estaría sobreviviendo en madera muerta donde produce las conidias (esporas asexuales del hongo) que son arrastradas por el agua hasta la fruta que está en desarrollo” (Soto *et al.*, 2013).

Neofabraea vagabunda es una especie que se observó en huertos ubicados desde Curicó al sur, evidenciándose pudriciones causadas por este hongo, comúnmente conocida en nuestro país como “Ojo de buey”, sobre todo en cultivares de cosecha tardía como Pink Lady ©, Gala y

Braeburn las cuales se encuentran expuestas durante más tiempo a condiciones medioambientales favorables para el desarrollo de esta enfermedad (Henríquez, 2005).

La infección primaria de este patógeno ocurre en el huerto, previo a la cosecha, pero permanece en estado de latencia al interior de las lenticelas, desencadenando la pudrición después de 3 o 4 meses en almacenaje refrigerado a 0 °C (Spotts, 1990).

2.5.2 Síntomas

La pudrición se observa en fruta almacenada por al menos tres meses, en forma de numerosas lesiones circulares localizadas en las lenticelas de consistencia firme, con un centro de color pardo claro rodeado de un halo más oscuro, lo que semeja un 'ojo de buey', nombre común a la enfermedad (figura 2.1). Las lesiones pueden iniciarse como pequeños puntos o pecas e ir aumentando su tamaño hasta 1 o 2 centímetros de diámetro, la pudrición tiende a ser poco profunda, con un ancho y profundidad similares, en forma de 'U'. (Soto *et al*, 2013).



Figura 2.1. Síntomas de pudrición ojo de buey causada por *Neofabrea vagabunda*.

2.5.3 Condiciones predisponentes

La infección ocurriría en el huerto, estableciéndose en los frutos en cualquier estado de desarrollo, desde caída de pétalos en adelante. Abundantes lluvias y T^o media de 20°C, especialmente previo a la cosecha, son condiciones predisponentes óptimas. La pudrición se desarrolla rápidamente entre los 18 a 24 °C; sin embargo, también lo hace a 0 °C, pero lentamente. Por lo general, esta pudrición comienza en una lenticela abierta, desarrollándose

lentamente en almacenaje refrigerado, por lo que su expresión en los frutos es detectada luego de los cuatro meses de cosechado o cuando comienza a ser comercializada (Soto *et al*, 2013).

2.6 Control de la enfermedad

Las pudriciones de postcosecha son un problema de relevancia económica para las empresas frutícolas, los productores deben utilizar estrategias de control preventivo, que minimicen el uso de agroquímicos, escogiendo siempre los más eficaces, en conjunto con medidas culturales que garanticen la eliminación de fuentes de inóculo.

2.6.1 Control cultural

Las medidas preventivas consisten en verificar que el árbol no tenga heridas en su madera. En caso contrario, éstas deben ser selladas con pastas fungicidas u otro producto. Otra acción que reduce las posibilidades de desarrollar esta enfermedad es evitar dejar fruta sin cosechar en los árboles y restos de poda en el piso del huerto que puedan transformarse en huéspedes (Fernández, 2013)

Para el control de *Neofabraea* spp., se ha recomendado la eliminación de los restos de poda, frutos de raleo y fruta madura dejada después de la cosecha, además de la destrucción de frutos enfermos y ramillas con canchales, para así reducir la presión del inóculo (Pinilla, 2013).

2.6.2 Control químico

Productos a base de cobre, como el hidróxido de cobre, y el fosfito de potasio aplicados en precosecha demostraron controlar de manera eficiente la aparición de esta enfermedad en postcosecha. Este control preventivo permite proteger el tronco, las ramas y los frutos conjuntamente, reduciendo el potencial del inóculo en el huerto (Lolas, 2005).

2.7 Medios de cultivo

Un medio de cultivo, es el sustrato o solución de nutrientes que proporciona una mezcla equilibrada de elementos requeridos en el que los microorganismos crecen y se multiplican. Para realizar el estudio de los microorganismos es necesario recuperarlas del hábitat natural en medios

artificiales que proporcionen sus requerimientos nutricionales. Este procedimiento se le conoce como cultivo “*in vitro*” (Condayan, 2008).

No obstante, el desarrollo adecuado de los microorganismos en un medio de cultivo se ve afectado por una serie de factores de gran importancia y que, en algunos casos, son ajenos por completo al propio medio (Wang, 2009)

1. Disponibilidad de nutrientes adecuados.
2. Consistencia adecuada del medio.
3. Presencia (o ausencia) de oxígeno y otros gases.
4. Condiciones adecuadas de humedad.
5. pH.
6. Temperatura.
7. Esterilidad del medio.

En la actualidad se ocupan medios de cultivos enriquecidos para el estudio de este hongo. Donde el inóculo se agrega al sistema de crecimiento, ajustándose las condiciones físico-químicas, como temperatura, Ph, luz entre otras, adecuadas para el cultivo (Ramos, 1998).

2.7.1 Agar Papa Dextrosa (APD)

En 1970 los investigadores Drewer y Bolland desarrollaron este medio de cultivo para caracterizar el crecimiento de levaduras y hongos a partir de muestra de alimentos y otros componentes (Drewer y Bolland, 1970)

El Agar Papa Dextrosa (APD) está compuesto por Infusión de Papa deshidratada y Dextrosa que fomentan el crecimiento exuberante de los hongos; La base del medio es altamente nutritiva. El agar es adicionado como agente solidificante. Muchos procedimientos estándares usan una cantidad específica de ácido tartárico estéril (10%) para reducir el pH de este medio a $3,5 \pm 0.1$, y así inhibir el crecimiento bacteriano (Acumedia, 2015).

2.7.2 Agar Agua (AA)

Se trata de un medio sin el agregado de nutriente alguno. El agar es el extracto espesante de un alga de su mismo nombre que se usa para preparados gelatizantes. Es de rico contenido en carbohidratos calcio y hierro (Hildebrant, 2005).

2.7.3 Agar Extracto de Malta (AEM)

Se extrae la parte soluble de ese cereal comúnmente cebada, para crear el medio de cultivo asociado al agar. Este extracto de malta se encuentra en el mercado nacional de manera deshidratada. Es bajo en grasas y alto contenido de carbohidratos.

2.6.4 Agar maíz (AM)

Este sustrato de crecimiento es en base a extractos de maíz; específicamente a partir de harina de este y caracteriza su alto contenido de carbohidratos en forma de almidón, el cual es el principal constituyente de este cereal (Agrociencia, 2013.)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del ensayo

La caracterización del crecimiento de los aislados de *N. vagabunda* se realizó en el Laboratorio de Patología Frutal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Talca, durante los meses de abril y agosto de 2018.

3.2 Origen de los aislados de *N. vagabunda*

Los aislados de *N. vagabunda* que se utilizaron en este estudio se obtuvieron desde manzanas Cripps Pink (Pink Lady®) y Scarlet, almacenadas por más 90 días a 0°C, con síntomas de la pudrición Ojo de Buey. Estas manzanas provenían desde huertos comerciales ubicados entre las Regiones del Maule y de Los Lagos (Cuadro 3.1).

Para evaluar su crecimiento en diferentes medios de cultivo y temperaturas de incubación, fueron seleccionados 10 aislados, los cuales habían sido obtenidos durante los meses de Agosto y Septiembre de 2017 y que habían sido identificados como *N. vagabunda* a través de la examinación de sus conidias, forma y color de la colonia fungosa en medio Agar Papa Dextrosa (APD), junto a una identificación molecular utilizando para ello los procedimientos rutinarios del Laboratorio de Patología Frutal. Luego, fueron registrados en la base de datos del Cepario de hongos fitopatógenos del mismo Laboratorio para así conformar los aislados fungosos bases para realizar este estudio.

Cuadro 3.1 Origen de los aislados del hongo *Neofabraea vagabunda* utilizados para evaluar su crecimiento en diferentes medios de cultivo y temperaturas de incubación.

Nº Aislado	Localidad	Cultivar
1	Angol, IX Región de la Araucanía	Cripps Pink
2	Longaví, Región del Maule	Cripps Pink
3	Temuco, Región de la Araucanía	Cripps Pink
4	Coihueco, Región de Ñuble	Cripps Pink
5	Linares, Región del Maule	Cripps Pink
6	Yerbas Buenas, Región del Maule	Scarlet
7	Pelarco, Región del Maule	Cripps Pink
8	Chimbarongo, Región de O'Higgins	Cripps Pink
9	Yerbas Buenas, Región del Maule	Cripps Pink
10	Molina, Región del Maule	Cripps Pink

3.3 Medios de cultivos

En este estudio se utilizaron cuatro medios de cultivos para evaluar el crecimiento de los 10 aislados de *N. vagabunda*.

3.3.1. Agar Papa Dextrosa (APD)

El medio APD fue preparado utilizando 10 g de dextrosa (Difco TM); 15 g de Agar (Winkler TM); 10 g de papa deshidratada (Maggie [®]) y 500 ml de agua destilada. Los frascos con el medio homogenizado fueron autoclavados a 121°C y 15 psi. Una vez esterilizado, el medio APD fue acidificado a pH 4,5 con ácido láctico (Arquimed [®]). Finalmente, placas plásticas de Petri, de 9 cm de diámetro, fueron preparadas usando 20 ml de medio APD en cada una, utilizando una cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones.

3.3.2. Agar Extracto de Malta (AEM)

El medio AEM fue preparado utilizando 7,5 g de extracto de malta (Laboratories TM); 10 g de Agar (Winkler TM); y 500 ml de agua destilada. Los frascos con el medio homogenizado fueron autoclavados a 121°C y 15 psi. Una vez esterilizados, placas plásticas de Petri, de 9 cm de diámetro, fueron preparadas usando 20 ml de medio AEM en cada una, utilizando una cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones.

3.3.3. Agar Maíz (AM)

El medio AM fue preparado utilizando 7,5 g de Agar Maíz (Winkler TM); y 500 ml de agua destilada. Los frascos con el medio homogenizado fueron autoclavados a 121°C y 15 psi. Una vez esterilizados, placas plásticas de Petri, de 9 cm de diámetro, fueron preparadas usando 20 ml de medio AM en cada una, utilizando una cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones.

3.3.4. Agar Agua (AA)

El medio AA fue preparado utilizando 15 g de Agar (Winkler TM); y 500 ml de agua destilada. Los frascos con el medio homogenizado fueron autoclavados a 121°C y 15 psi. Una vez esterilizados, placas plásticas de Petri, de 9 cm de diámetro, fueron preparadas usando 20 ml de medio AEM en cada una, utilizando una cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones.

3.4 Evaluación del crecimiento de aislados de *N. vagabunda* en los medios de cultivo APD, AEM, AM y AA

Los 10 aislados seleccionados se hicieron crecer en medio APD acidulado a una T° de incubación de 15°C y en oscuridad, por 30 días. Luego desde las colonias formadas, un disco de micelio (5 mm de diámetro) con la ayuda de un sacabocados, fue retirado de la placa de crecimiento y puesta al centro de una placa de Petri conteniendo el medio de cultivo en estudio, ya preparado previamente. Las placas fueron selladas con papel Parafilm y luego dispuestas en incubación a 0 y 20°C en oscuridad. El crecimiento radial fue medido semanalmente, hasta que la colonia completara la totalidad de la placa de Petri. Las mediciones del diámetro de la colonia fueron realizadas con un pie de metro digital (Mitutuyo).

3.5 Diseño de experimento y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar, correspondiendo la unidad experimental a una placa de Petri. Por lo tanto, los 10 aislados fueron analizados según su crecimiento en cada medio de cultivo, utilizándose 3 repeticiones por cada aislado y medio de cultivo (tratamiento). Los datos recolectados (mm de diámetro de un aislado en un medio de cultivo y a una T° y tiempo de incubación) fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA). Las medias fueron separadas a través de la prueba de rango múltiple HSD Tukey ($P < 0,05$). Se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI Versión 16.1.11 (StatPoint Technologies, Inc, Virginia, EEUU).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación del crecimiento de aislados de *N. vagabunda* en los medios de cultivo APD, AEM, AM y AA

Las manzanas, en especial las de cosecha tardía como Cripps Pink (Pink Lady®), son infectadas durante su precosecha por el hongo fitopatógeno *N. vagabunda*, principalmente en sus lenticelas (Spotts, 2014). La infección permanece latente en almacenaje refrigerado hasta al menos 3 meses, desarrollando inicialmente una lesión y luego desarrollándose en forma de anillos concéntricos de diferente intensidad de color, lo que le da el nombre a la enfermedad de pudrición Ojo de Buey. Para los estudios epidemiológicos de esta importante enfermedad, es necesario contar con micelio y esporas del hongo, de manera de realizar inoculaciones en forma rápida, con abundante producción de ambos tipos de estructuras y confiable (Everett et al., 2017). El hongo *N. vagabunda* crece lentamente *in vitro* y a menudo es fácilmente contaminado por otros hongos y bacterias de mayor rapidez de crecimiento (Cameldi et al., 2017).

Este estudio demostró que los 10 aislados utilizados, independiente de su origen, fueron capaces de crecer en los medios de cultivo APD, AEM, AA y AM a una T° de incubación de 20°C (Figura 4.1). Sin embargo, la tasa de crecimiento del hongo en el medio AEM fue inferior a la lograda con los medios APD, AA y AM. En este medio, el crecimiento logrado luego de 5 semanas a 20°C alcanzó 22,5 ($\pm 6,0$) mm, siendo significativamente menor a lo presentado por los demás medios APD, AA y AM, de 68,5 ($\pm 6,1$), 74,8 ($\pm 3,3$) y 62,8 ($\pm 12,7$) mm, respectivamente. Cameldi et al. (2017) y Olsson (1965) concuerdan que la temperatura óptima de crecimiento para *N. vagabunda* es de 20°C, lo que demuestra que este factor no influyó en el menor crecimiento del hongo en el medio AEM en nuestro estudio. Este medio de cultivo ha sido utilizado para la producción de conidias de *N. vagabunda* en estudios epidemiológicos, demorándose al menos 60 días (Amiri et al., 2008) por lo que nuevos métodos de crecimiento del hongo, más rápidos y eficaces, han sido estudiados usando AM (Everett et al., 2017) y Agar Tomate (Cameldi et al., 2017). En nuestro estudio, el crecimiento de los aislados de *N. vagabunda* en AM fue similar al obtenido con AA y APD a 20°C, aunque en este último se observa una tendencia a un mayor desarrollo del micelio.

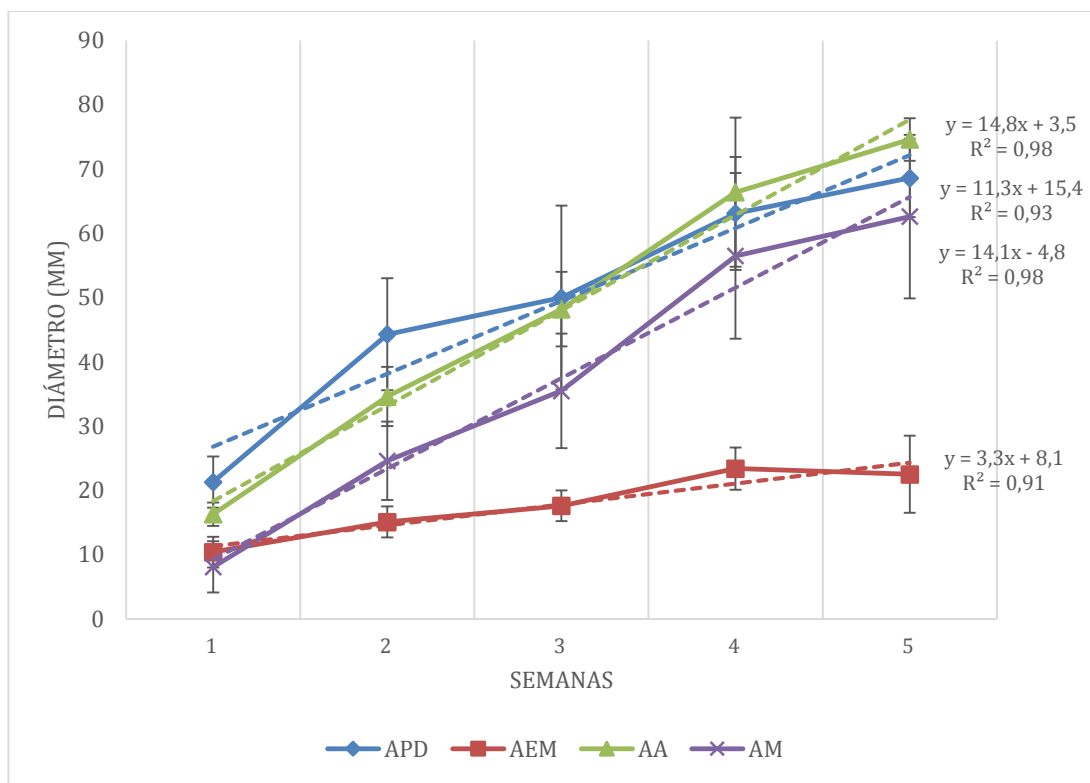


Figura 4.1 Crecimiento (mm por semana) del hongo *Neofabraea vagabunda* (promedio de 10 aislados) en 4 medios de cultivo y a una temperatura de incubación de 20°C. Barras verticales indican la desviación estándar del promedio estimado.

A la T° de incubación de 20°C, el crecimiento del micelio de *N. vagabunda* desde el trozo de micelio sembrado comenzó a medirse a la primera semana, y completó la placa de Petri en el medio AA, a las 5 semanas a esa T°. La tasa de crecimiento de *N. vagabunda* en el medio AA fue de 14,8 mm a la semana (Figura 4.1). Sin embargo, cuando los mismos aislados crecieron en los medios APD, AA, AM y AEM a una T° de incubación de 0°C, sólo a las 3 semanas después se pudo realizar la primera medición del diámetro del crecimiento micelial. Además, la tasa de crecimiento del micelio de *N. vagabunda* en los medios APD, AA, AM y AEM fluctuó entre 1,6 y 4,7 mm a la semana, siendo AA el de mayor desarrollo comparado con AEM que presentó la menor tasa. En el medio AA, el hongo en estudio demoró hasta 14 semanas en lograr completar la placa (Figura 4.2). Sin embargo, en los estudios con 7 aislados de *Phlyctema vagabunda* de Romero et al. (2018) ninguno de ellos pudo crecer en APD acidulado a 0°C durante las 6 semanas que duró la incubación. Ellos estimaron que la T° óptima de crecimiento del micelio fluctuaba entre 14,6 y 19,3°C, e indicaron que no existieron diferencias en la tasa de crecimiento de los 7 aislados estudiados en ese medio de cultivo. Distintos resultados muestran Cameldi et al. (2017), ya que luego de 14 días en Agar-Tomate, el crecimiento del micelio de 10 aislados de *N. vagabunda* aumentó al subir la T° de incubación de 0 (4,5 mm en promedio) a 10°C (22,7 mm en promedio), siendo la T° de 20°C la que logró el mayor crecimiento (33,7 mm en promedio). A esta

T° y luego de 14 días, nuestros aislados chilenos presentaron un crecimiento similar de 34,6 mm y 44,3 mm, pero en los medios AA y APD, respectivamente. Tanto en los estudios de Cameldi et al. (2017) y los nuestros, los aislados de *N. vagabunda* estudiados pudieron crecer a 0°C, aunque a una tasa menor que a 20°C. La epidemiología de la enfermedad Ojo de Buey en Chile, indica que la infección de lenticelas en la piel de la manzana ocurriría en algún momento en la precosecha, permaneciendo latente hasta al menos 2-3 meses en almacenaje refrigerado, a 0°C (Soto-Alvear et al., 2005). Esta infección ocurre a través de conidias del hongo, producidas posiblemente en canchales pequeños en el mismo árbol (Sutton et al., 2014). En nuestros estudios, se evaluó el crecimiento del micelio en medios nutritivos, y a pesar de que a 0°C demoró 3 semanas en iniciar este crecimiento, este tiempo es muy menor a los 3 meses que demoraría una infección latente de conidias, en situaciones naturales. Por lo tanto, la temperatura de incubación juega un rol importante en el desarrollo del hongo *N. vagabunda* tanto desde infecciones de conidias como de micelio.

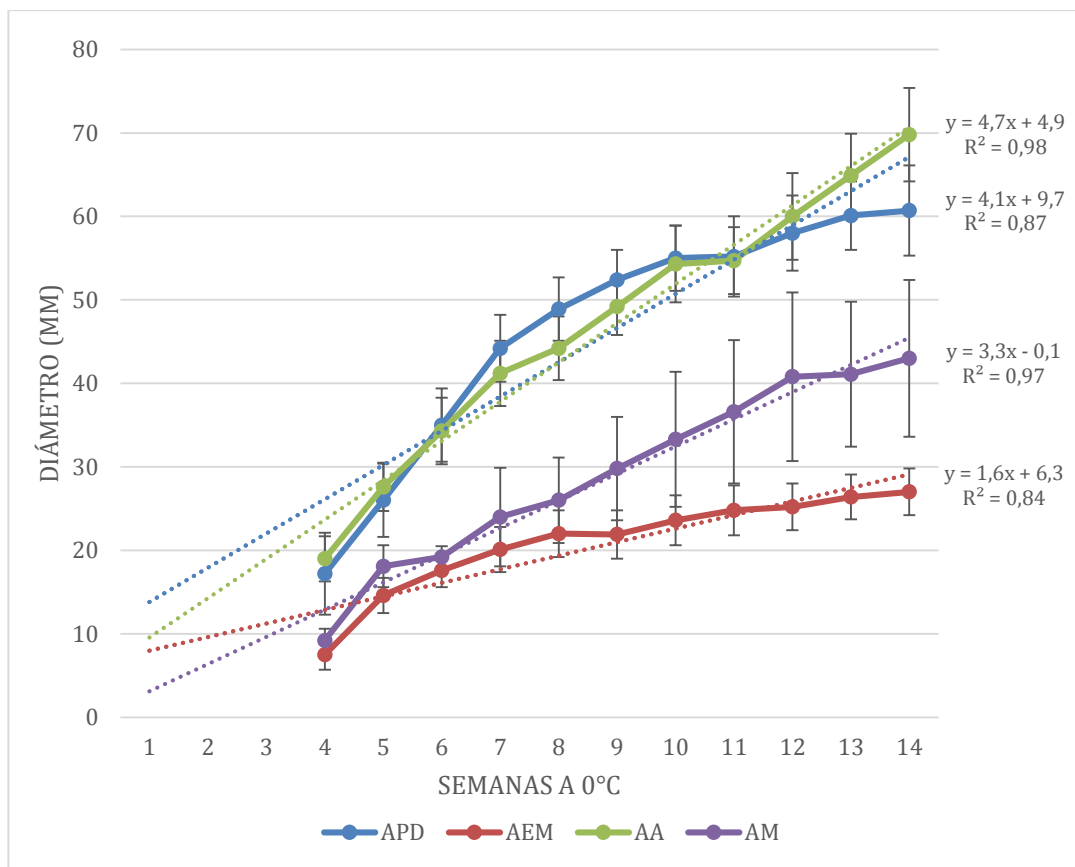


Figura 4.2 Crecimiento (mm por semana) del hongo *Neofabraea vagabunda* (promedio de 10 aislados) en 4 medios de cultivo y a una temperatura de incubación de 0°C. Barras verticales indican la desviación estándar del promedio estimado.

4.2 Crecimiento *in vitro* de 10 aislados de *N. vagabunda* en los medios de cultivo APD, AEM, AM y AA

El crecimiento de los aislados de *N. vagabunda* (Cuadro 3.1) utilizados para evaluar su comportamiento frente a distintos medios nutritivos de cultivo de hongos presentó algunas diferencias dependiendo del aislado en estudio. En medio APD, el crecimiento fluctuó entre 58,8 y 78 mm de diámetro, siendo el aislado N°6, obtenido de la variedad Scarlett, el que presentó un crecimiento significativamente menor al alcanzado por el aislado N°2 y 3, obtenido de una lesión en manzanas Cripps Pink provenientes de Longaví y de Temuco, respectivamente (Cuadro 4.1). Sin embargo, esta tendencia no fue consistente entre los distintos aislados y los demás medios de cultivo en evaluación. Por ejemplo, en medio AA, el crecimiento fluctuó entre 65,7 mm de diámetro para el aislado N°8 y 76,6 mm para el aislado N°1, ambos obtenidos de una lesión en manzana Cripps Pink provenientes de Chimbarongo y Angol, respectivamente.

Cuadro 4.1. Crecimiento micelial (mm) de aislados (n=10) del hongo *Neofabraea vagabunda* luego de 5 semanas de crecimiento *in vitro* a 20°C.

Aislado	Diámetro de la colonia (mm) a 20°C			
	APD	AEM	AA	AM
1	70,5 ab	25,1 bc	76,6 a	70,5 a
2	78,0 a	30,2 a	75,9 a	65,4 a
3	77,1 a	23,3 c	76,3 a	76,0 a
4	68,7 ab	21,8 c	72,7 ab	58,9 a
5	62,3 ab	31,0 a	76,2 a	66,1 a
6	58,8 b	28,5 ab	75,4 a	72,9 a
7	64,9 ab	24,3 bc	74,9 a	63,2 a
8	71,3 ab	24,9 bc	65,7 b	64,5 a
9	68,6 ab	22,1 c	75,8 a	30,2 b
10	65,6 ab	21,4 c	76,3 a	58,1 a
Promedio	68,6	25,2	74,6	62,6
<i>Significancia</i>	0,009	<0,001	0,002	<0,001

Al evaluar el crecimiento *in vitro* de los aislados a 0°C, se observa una mayor variabilidad de desarrollo en los distintos medios de cultivo (Cuadro 4.2). En APD, el crecimiento luego de 14 semanas a 0°C fluctuó entre 51,7 y 68,3 mm de diámetro, para los aislados provenientes de Yerbas Buenas y Chimbarongo, respectivamente. Nuevamente, esta tendencia no se mantuvo con estos aislados y los otros medios de cultivo.

Cuadro 4.2. Crecimiento micelial (mm) de aislados (n=10) del hongo *Neofabraea vagabunda* luego de 14 semanas de crecimiento *in vitro* a 0°C.

Aislado	Diámetro de la colonia (mm) a 0°C			
	APD	AEM	AA	AM
1	64,5 ab	27,0 ab	72,7 ab	49,0
2	65,4 ab	29,1 ab	75,4 a	58,1
3	57,3 bc	27,4 ab	76,1 a	51,6
4	64,8 ab	26,0 b	64,1 bc	46,2
5	58,5 bc	32,7 a	59,2 c	37,3
6	58,0 bc	29,2 ab	71,0 ab	45,7
7	54,5 c	24,3 b	70,8 ab	44,7
8	68,3 a	26,4 ab	64,3 bc	29,3
9	51,7 c	23,4 b	70,0 ab	28,8
10	63,5 ab	24,5 b	74,8 a	39,5
Promedio	60,7	27	69,8	43
<i>Significancia</i>	<0,001	0,002	<0,001	0,058

V. CONCLUSIONES

1. Todos los aislados de *N. vagabunda* pudieron crecer en los medios de cultivo Agar Papa Dextrosa, Agar Agua, Agar Extracto de Malta y Agar Maíz, tanto a 20°C como a 0°C.
2. Los medios de cultivo Agar Papa Dextrosa y Agar Agua permitieron el mayor crecimiento de los aislados del hongo *N. vagabunda* tanto a las temperaturas de incubación de 0 y 20°C.
3. En el medio de cultivo Agar Extracto de Malta, los 10 aislados de *N. vagabunda* presentaron un crecimiento significativamente menor a los demás medios, tanto a las temperaturas de incubación de 0 y 20°C.
4. No se observó ninguna tendencia en el crecimiento de los 10 aislados de *N. vagabunda* en los cuatro medios de cultivo evaluados que indicara que algún aislado o grupo de ellos tuviera un comportamiento diferenciador.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Acumedia 2015. Recuperado el 20 de febrero de 2019 del sitio web: (https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7149_sp_pi.pdf) Agar Papa Dextrosa – Potato Dextrose Agar (7149).
- Agrocienca, 2013 recuperado el 05 de marzo de 2019 de (<http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v47n1/v47n1a1.pdf>) Características del almidón de maíz y relación con las enzimas de su biosíntesis.
- Bocanegra Hernández, Hernández Huerta, Cano Cuevas, Santiago Pantoja, Villarroel Garduño, 2014. Recuperado 19 julio, 2018, de (<https://es.scribd.com/doc/232146268/PREPARACION-DE-MEDIOS-DE-CULTIVO-PARA-MICROBIOLOGIA>).
- CIREN. Centro de Información de Recursos Naturales 2017. Manzano, información de avance del proyecto, zonificación. Recuperado en <<https://www.ciren.cl/wp-content/uploads/2017/12/Manzana.pdf>> Consultado el: 16 de Abril del 2018.
- Cruz, M. 2008. El clima y su efecto sobre la productividad y calidad del manzano. INIA Quilamapu, Chile. Boletín 35. 2p.
- Condayan C. Culture media. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2017 Nov 18]; 6(9):646–646. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro1981>.
- Catastro Frutícola CIREN-ODEPA, 2018. Catastro Frutícola. Principales Resultados. Publicación conjunta de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, ODEPA, y el Centro de Información de Recursos Naturales, CIREN. P.8-10. Recuperado en <https://www.odepa.gob.cl/estadisticas-del-sector/catastros-fruticolas/catastro-fruticola-ciren-odepa>. Consultado 28 Marzo 2019.
- Cameldi, I., Neri, F., Menghini, M., Pirondi, A., Nanni, I.M., Collina, M. and Mari, M. 2017. Characterization of *Neofabraea vagabunda* isolates causing apple bull's eye rot in Italy (Emilia-Romagna region). Plant Pathology 66(9):1432-1444.
- CHILENUT; UCC soluciones logísticas “Logística, en el viaje desde Chile a China” Recuperado en <http://www.chilenut.cl/infonut/07_2017/assets/ucc-china.pdf> Consultado el: 10 de Abril del 2019.
- Drewer, P. and Bolland, 1970. Agar-pap—dextrosa para hongos y levaduras. Disponible en <[www.lablinsan.cl/productos/page 20, html](http://www.lablinsan.cl/productos/page%2020.html)> Consultado 5 agosto de 2018.
- Everett, K.R.; Pushparajah, I.P.S.; Fisher, B.M. and Wood, P.N. 2017. A simple method for conidial production and establishing latent infections of apples by *Phlyctema vagabunda* (syn: *Neofabraea alba*). New Zealand Plant Protection 70: 106-111.

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>).

FEDEFruta. FEDERACIÓN DE PRODUCTORES DE FRUTA DE CHILE. (En Línea) Santiago, Chile: Recuperado en < <http://fedefruta.cl/exportaciones-chilenas-de-manzanas-cerraran-el-2016-con-740-mil-toneladas/>> Consultado el: 16 de Abril del 2018.

FEDEFruta. FEDERACIÓN DE PRODUCTORES DE FRUTA DE CHILE. "Exportaciones de fruta fresca en Chile sumaron 2.7 millones de toneladas durante 2017". (En Línea) Santiago, Chile: Recuperado en <<https://fedefruta.cl/exportaciones-de-fruta-fresca-de-chile-sumaron-27-millones-de-toneladas-durante-2017/>> Consultado el: 10 de Abril del 2019.

FEDEFruta 2018. FEDERACIÓN DE PRODUCTORES DE FRUTA DE CHILE. (En Línea) Santiago, Chile: Recuperado en < <https://fedefruta.cl/cerezas-desplazan-a-manzanas-del-ranking-de-exportaciones-de-chile/>> Consultado el: 10 de Abril del 2019.

Garipey TD, Levesque CA, de Jong SN, Rahe JE 2003. Species specific identification of the *Neofabraea* pathogen complex associated with pome fruits using PCR and multiplex DNA amplification. *Mycological Research* 107: 528-536.

Garipey TD, Rahe JE, Levesque CA, Spotts RA, Sugar DL, Henriquez JL 2005. *Neofabraea* species associated with bull's-eye rot and cankers of apple and pear in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27: 118-124.

Henriquez JL, Sugar D, Spotts RA 2004. Etiology of bull's eye rot of pear caused by *Neofabraea* spp. in Oregon, Washington, and California. *Plant Disease* 88: 1134-1138.

Henriquez, J.L. 2005. Pudrición lenticelar en manzanas. Un enemigo oculto en la bodega. *Revista del campo. El Mercurio*. 1472: 16-17p.

Hildebrant, R. 2005. Agar-papa. Disponible en <http://www.universidadpolitecnicodevalencia.com/agar-agar.html>. Consultado el 5 de agosto de 2018.

LOLAS, M. 2005. "Enfermedades de verano en manzanas Pink Lady", (Boletín Técnico, Centro de Pomáceas .Universidad de Talca. Talca, Chile, volumen 5, número 2 , 4p) Recuperado en: <<file:///D:/Mis%20Documentos/Downloads/Clase%20III%20Citas%20bibliogr%C3%A1ficas%20y%20b%C3%BAsqueda%2013%20abril.pdf>> Consultado él: 26, junio, 2018.

EL MERCURIO. CAMPO, 2014. Revista del campo "Las claves para entender las enfermedades de las manzanas en postcosecha Recuperado en<<https://www.elmercurio.com/Campo/Noticias/Análisis/2014/02/13/Las-claves-para-entender-las-enfermedades-de-las-manzanas-en-poscosecha.aspx>

MOGGIA Y YURI, 2004. Universidad de Talca, centro de Pomáceas, boletín técnico Volumen 4, Número 6 Noviembre 2004 ISSN 0717-6910 DESARROLLO DE LENTICELOSIS EN MANZANAS CV. ROYAL GALA.

MUNDO AGRO, Revista; “Logística de clase mundial para la exportación de fruta”; 3 de enero 2018. Recuperado en <<http://www.mundoagro.cl/logistica-de-clase-mundial-para-la-exportacion-de-fruta/>>

ODEPA.OFICINA DE POLITICA Y ESTUDIOS AGRARIAS .MINISTERIO DE AGRICULTURA. CHILE (Ed). 2017, Octubre. Mercados Agropecuarios. Santiago, Chile: ODEPA (Boletín N°231, 16p.).

ODEPA. OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS. 2017. Catastro superficie nacional. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Recuperado en: <http://www.odepa.cl/wpcontent/uploads/2013/03/Superficie-plantada-nacional.xlsx>. Consultado el 26 de abril del 2018.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACION Y AGRICULTURA (FAO). En línea en< <http://www.fao.org/docrep/x5056s/x5056S07.htm.>>, consultado el: 16 de Abril del 2018.

Olsson K, 1965. A study of the biology of *Gloeosporium album* and *G. perennans* on apples. Meddelanden Statens Væxtskyddsanstalt 13, 189–259.

PINILLA, B. 2013. Principales enfermedades de las pomáceas. Boletín técnico, volumen 13. Centro de Pomáceas. Universidad de Talca. Talca, Chile. 6 p. Disponible en: http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/Boletin_N13_5.pdf. Consultado el 26 de abril de 2018.

PINILLA, B.; LOLAS, M. Y SOTO, S. 2005. Ojo de Buey: Aspectos relevantes de la pudrición que afecta a las manzanas en Chile. Revista Frutícola 26(3):113-116.
RAMOS, J. 1998. Microorganismos del suelo. Disponible en <http://www.Organismos.com.html>. Consultado 6 Diciembre. 2005.

Phillips DJ, 1982. Changes in conidia of *Monilinia fructicola* in response to incubation temperature. Phytopathology 72, 1281–3.

Phillips DJ, 1984. Effect of temperature on *Monilinia fructicola* conidia produced on fresh stone fruits. Plant Disease 68, 610–2.

RED AGRICOLA 2017 Recuperado 19 julio, 2018, de (<http://www.redagricola.com/cl/principal-empresa-exportadora-manzanas-del-pais/>) Leiva, M. (s.f.).

Romero, J., Raya, M.C., Roca, L.F., Agustí-Brisach, C., Moral, J. and Trapero, A. 2018. Phenotypic, molecular and pathogenic characterization of *Phlyctema vagabunda*, causal agent of olive leprosy. *Plant Pathology* 67:277-294.

Soto Alvear, S., Lolas, Rosales, I.M., Chavez, E.R., y Latorre, B.A. 2013. Characterization of the bull's eye rot of Apple in Chile. *Plant Disease* 97:485-490.

Spotts, R. 1990. Bull's eye rot p. 56. In: Jones A. L. and Aldwinckle H.S. (eds.) *Compendium of Apple and Pear Diseases*; American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 100 p.

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

Spotts RA 2014. Postharvest diseases: Bull's-Eye Rot. In: Sutton TB, Aldwinckle HS, Angelo AM, Walgenbach JF Eds. *Compendium of Apple and Pear Diseases*. 2nd edition. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. Pp. 78-79.

Tian SP, Bertolini P, 1999. Effect of temperature during conidial formation of *Monilinia laxa* on conidial size, germination and infection of stored nectarines. *Journal of Phytopathology* 147, 635-41.

Walker, A. 2017. El futuro del negocio de las manzanas. *Revista frutícola Red Agrícola*, Chile. 88 p.

Wang JD, Levin PA. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2009 [cited 2017 Oct 4]; 7(11):822-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19806155>

Yuri, J. 2013. La manzana una fruta compleja. Centro de Pomáceas. Consultado el 05 de junio de 2015. Recuperado desde <http://www.fedefruta.cl/regionales2013/Curico/presentaciones/Yuri.pdf>