



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

**Detección de infecciones latentes de *Botrytis cinerea* en flores de manzana cvs. Cripps Pink
y Fuji cultivados en la Región del Maule**

MEMORIA DE TÍTULO

YASNA ARANZÁZU GÓMEZ COFRÉ

TALCA, CHILE

2018

CONSTANCIA

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



Talca, 2019



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

**Detección de infecciones latentes de Botrytis cinerea en flores de manzana cvs. Cripps Pink
y Fuji cultivados en la Región del Maule**

Por

YASNA ARANZÁZU GÓMEZ COFRÉ

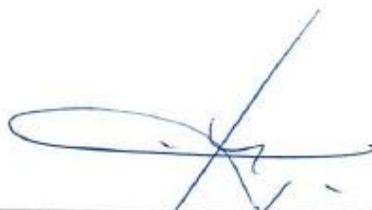
MEMORIA DE TITULO

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

INGENIERO AGRÓNOMO

TALCA, 2018

Aprobación:

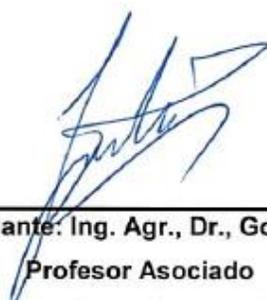


Profesor Guía: Ing. Agr., M.S., Ph.D. Mauricio Lolas Caneo

Profesor Guía

Escuela de Agronomía

Facultad de Ciencias Agrarias



Profesor informante: Ing. Agr., Dr., Gonzalo Díaz Ulloa

Profesor Asociado

Escuela de Agronomía

Facultad de Ciencias Agrarias

Fecha de presentación de Memoria de Título 04 de Octubre de 2018

Agradecimientos

Agradezco a mi mamá, que en todo momento durante mi vida y en especial en los años de la carrera no me ha dejado en ningún momento sola, gracias por cuidarme todos estos años, por enseñarme a terminar lo que empiezo y por tener más fe en mí, que yo misma. Gracias mamita por enseñarme a luchar por lo que quiero y a no bajar los brazos en los momentos difíciles.

A mis hermanos Daniela y Jorge que desde niños han sido mi razón para salir adelante, gracias por darme tanto apoyo cuando más lo he necesitado, en especial en este año que ha sido bastante duro como familia.

A mis sobrinos hermosos Agustín y Tomás que han dado alegría a nuestras vidas y más de alguna de vez nos han sacado una sonrisa en momentos complicados.

A mis abuelos, a mi cuñado Matías, a todos mis familiares que por una u otra razón han ayudado en esta etapa de mi vida.

A la familia de mi pololo, mi segunda familia, que desde ya varios años me han acogido como una más de los suyos, a mi suegra Rosa que es un amor, me ha recibido como su hija, y a mis cuñados que me han querido como su hermana.

A mi novio Alexis, que más que un pololo ha sido un amigo, un confidente, un hermano, un padre, un todo lo que siempre soñé, gracias por enseñarme cuando ni yo misma tenía fe que podría aprender, gracias por apoyarme este año con todo lo que conllevó el bendito cáncer, gracias por hacer cosas que nadie había hecho por mí, gracias por ser tanto para mí.

Agradezco a mi amigos Pablo Calquín, Ilonka Silva, María Quinteros, Patricio Faúndez, Francisco Ramírez, Camila Soto, Daniela Núñez, Daniel Sepúlveda y Constanza Sumonte, por ser los mejores amigos de la historia, es muy poco lo que nos vemos, pero los momentos juntos fueron y serán los más increíbles que pude tener con personas que no fueran de mi familia, los tendré en el corazón siempre y espero juntarnos hasta viejitos para recordarnos que hicimos locuras, trabajos, pruebas, copuchas y salidas juntos.

A mi perro Pedrito Antonio que no me deja sola en ningún momento.

Finalmente debo agradecer de forma muy especial a todos los integrantes del equipo del laboratorio de Sanidad Vegetal en especial al profesor Gonzalo Díaz, profesor Cristian Muñoz, Enrique Ferrada, Claudia Pacheco, Paulina González, Mauricio, Don Víctor, Cecilia Saavedra, por su buena disponibilidad siempre para ayudarme y guiarme en cualquier duda que se me presentara. A mi profesor guía Don Mauricio Lolas, que me ha tenido una paciencia única para ayudar en todo lo que ha podido, por guiarme, darme consejos y ser un gran guía en esta etapa

A Marcela Cáceres que sin duda, es una de las mejores profesionales que me ha tocado conocer, empática, cariñosa y positiva a todo, en todo momento, gracias por ayudarme, entenderme y cobijarme como un pollito de los tuyos en este último tiempo.

ABSTRACT

Chile is a country exporting different fruit species, including apples, which is why the country has around 37.297, has planted apple trees, which, 87% is concentrated between the regions of Maule and O'Higgins. Despite having a large number of hectares of apple trees, producers have barriers that hinder the commercialization of these, due to diseases that can originate in both pre-harvest and post-harvest, these are the decay, associated with fungi, which they lower the quality and condition of the fruits, implying substantial losses in the commercial value, either for the producers, or for the exporters. Within these fungal-associated rots, we have recently the fungus *Botrytis cinerea*, which is causing problems in the apples of the Maule Region, which leads to this, are the predisposing conditions that are in the area, leading to the pathogen to reach a state of dormancy for a long time and consequently a high destructive potential, conditions that originate in areas with springs and very wet summers. Considering the economic importance of the apple tree, it is important to carry out an investigation to know the most effective method in determining the latent inoculum load that the flowers of different apple cultivars possess; and identify the associated *Botrytis* species, which would potentially cause calicinal rot.

Therefore, the objective of the present study was to determine the early presence of *Botrytis cinerea* from cvs flowers. Cripps Pink and Fuji, treated with different methods (paraquat 1ppm, sterile water and freezing -20 ° C) during flowering, in two locations in the Maule Region.

This is why we carried out incidence tests on the floral structures, with 3 different methods, of two cultivars, then we extracted isolates from the flowers with symptoms and signs of *Botrytis cinerea*, which were re-isolated to obtain pure cultures and select some with high sporulation, to perform pathogenicity tests on flowers of the following season and on ripe apple fruits, to check the postulates of Koch. The obtained results indicate that the freezing method -20 ° C, was the one that achieved the highest induction in the incidence of *Botrytis cinerea*, with 100% in most of the study in the floral structures, being the structure mostly affected the pistils, followed by stamens, petals and finally sepals. As for the methods of paraquat and sterile water were statistically different from each other, in the cultivar Fuji and Cripps Pink was only significantly different in the town of Yervas Buenas. It is worth mentioning that the lowest incidence values were in the sterile water and paraquat 1ppm method in the Fuji cultivar of San Clemente. The isolates obtained from flowers, were found to be pathogenic in mature fruits and flowers of cultivar Cripps pink and Fuji. It is concluded that the method of detection of latent infections more effective to obtain *Botrytis cinerea* from flowers, was the freezing -20 ° C.

RESUMEN

Chile es un país exportador de distintas especies frutícolas, entre ellas las manzanas, de las cuales posee alrededor de 37.297 ha plantadas y un 87% concentrada entre las regiones Del Maule y O'Higgins. A pesar de tener una gran cantidad de hectáreas de manzanos, los productores tienen barreras que dificultan la comercialización de estas, siendo una de las principales las enfermedades que pueden originarse tanto en pre cosecha como en poscosecha. Por ello, las pudriciones asociadas a hongos fitopatógenos, disminuyen la calidad y condición de las frutas, implicando pérdidas cuantiosas en el valor comercial, ya sea para los productores, o para las exportadoras. Una de las pudriciones importantes es la causada por el hongo Ascomiceto *Botrytis cinerea*, que anualmente causa problemas en las manzanas de la Región del Maule. Lo anterior, es debido a las favorables condiciones predisponentes que se tiene en la zona para su infección durante floración y crecimiento del fruto, lo que lleva al patógeno a alcanzar un estado de latencia por largo tiempo y por consecuencia una alta potencialidad destructiva, condiciones que se originan en zonas con primaveras y veranos muy húmedos. Considerando la importancia económica del manzano es importante realizar una investigación para conocer el método más efectivo en determinar la carga de inóculo latente que poseen las flores de distintos cultivares de manzano; e identificar las especies de *Botrytis* asociadas, que potencialmente causarían pudrición calicinal.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la presencia temprana de *Botrytis cinerea* desde flores cvs. Cripps Pink y Fuji, tratados con diferentes métodos (paraquat 1ppm, agua estéril y congelamiento -20°C) durante floración, en dos localidades de la Región del Maule. Es por esto que se realizaron pruebas de incidencia en las estructuras florales, con 3 métodos distintos, de dos cultivares, luego se extrajeron aislados de las flores con síntomas y signos de *Botrytis cinerea*, los cuales fueron re-aislados para obtener cultivos puros y así seleccionar algunos con alta esporulación, para realizar pruebas de patogenicidad en flores de la temporada siguiente y en frutos de manzanas maduros. Los resultados obtenidos indican que el método de congelamiento -20°C, fue el que logró la mayor inducción en la incidencia de *Botrytis cinerea*, con un 100% en la mayor parte del estudio en las estructuras florales, siendo la estructura mayormente afectada los pistilos, seguidos de estambres, pétalos y por último sépalos. En cuanto a los métodos de paraquat y agua estéril fueron estadísticamente diferentes uno de otro, en el cultivar Fuji y en Cripps Pink solo fue significativamente diferente en la localidad de Yervas Buenas. Cabe mencionar que los valores más bajos de incidencia fueron en el método de agua estéril y paraquat 1ppm en el cultivar Fuji de la localidad de San Clemente. Los aislados obtenidos desde flores, resultaron ser patogénicos en frutos maduros y flores de cultivar Cripps Pink y Fuji. Se concluye que el método de detección de infecciones latentes más eficaz para obtener *Botrytis cinerea* desde flores, fue el congelamiento -20°C.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Hipótesis.....	3
1.2. Objetivo general.....	3
1.3. Objetivos específicos.....	3
CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Producción de manzana en Chile.....	4
2.2. Pudriciones en manzanas.....	4
2.3. Pudrición calicinal en manzanas.....	5
2.3.1. Agente causal.....	5
2.3.2 Ciclo de la enfermedad.....	5
2.3.3. Sintomatología.....	7
2.3.4. Métodos de detección de <i>Botrytis cinerea</i>	8
2.3.4.1. Golpe de frío.....	8
2.3.4.2. Paraquat.....	9
2.3.5. Métodos de control.....	9
2.3.5.1 Control cultural.....	9
2.3.5.2 Control químico.....	10
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. Obtención del material vegetal.....	11
3.2. Ubicación del estudio.....	11
3.3. Métodos de detección de infecciones latentes.....	11

3.3.1. Inmersión en agua destilada estéril.....	11
3.3.2. Inmersión de material vegetal utilizando paraquat.....	12
3.3.3. Tratamiento del material vegetal utilizando congelamiento a -20°C.....	12
3.4. Aislamiento desde flores.....	12
3.5. Identificación del agente causal.....	13
3.6. Evaluaciones.....	14
3.7. Pruebas de patogenicidad en frutos.....	14
3.8. Pruebas de patogenicidad en flores.....	15
3.9. Diseño experimental y análisis estadístico.....	16
CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	17
4.1. Observación de síntomas y morfología.....	17
4.2. Incidencia de atizonamiento floral.....	19
4.3 Cuantificación porcentual de aislados fúngicos.....	27
4.4 Determinación y separación de aislados de <i>B. cinerea</i> según esporulación.....	27
4.5 Pruebas de patogenicidad en frutos.....	29
4.6 Pruebas de patogenicidad en flores.....	33
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN.....	35
CAPÍTULO 6. CONCLUSIÓN.....	40
CAPÍTULO 7. CITAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 3.1. Cultivares de manzano considerado en el estudio, según localidad.....	11
Cuadro 3.2. Aislados de <i>Botrytis cinerea</i> , con su procedencia, hospedero, tratamiento y cultivar, además de abreviación del nombre del aislado.....	13
Cuadro 4.1. Porcentaje de incidencia de atizonamiento floral en cv. Cripps Pink, positivos a la presencia de <i>B. cinerea</i> (%), según método de detección temprana, en la localidad de San Clemente.....	20
Cuadro 4.2. Porcentaje de incidencia de atizonamiento floral en cv. Fuji, positivos a la presencia de <i>B. cinerea</i> (%), según método de detección temprana, en la localidad de San Clemente.....	22
Cuadro 4.3. Porcentaje de incidencia de atizonamiento floral cv. Cripps Pink, positivos a la presencia de <i>B. cinerea</i> (%), según método de detección temprana, en la localidad de Yerbas Buenas.....	24
Cuadro 4.4. Porcentaje de incidencia de atizonamiento floral cv. Fuji, positivos a la presencia de <i>B. cinerea</i> (%), según método de detección temprana, en la localidad de Yerbas Buenas.....	26
Cuadro 4.5. Tamaño de la lesión promedio (mm) por la inoculación con conidias y micelio de <i>B. cinerea</i> en manzanas cv. Fuji, después de 7 días a 20°C en cámara húmeda.....	30
Cuadro 4.6. Tamaño de la lesión promedio (mm) por la inoculación con conidias y micelio de <i>B. cinerea</i> en manzanas cv. Cripps Pink, después de 7 días a 20°C en cámara húmeda.....	32
Cuadro 4.7. Prueba de patogenicidad en flores, en la cual se muestra a continuación el porcentaje de incidencia de atizonamiento floral, positivos a la presencia de <i>B. cinerea</i> (%)......	34

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 2.1. Desarrollo de las enfermedades producidas por <i>Botrytis cinerea</i> . (Fuente: Agrios, 2007).....	7
Figura 3.1. Disposición de flores cv. Cripps Pink en cámara húmeda. Flores sumergidas en agua estéril, 100 ppm.....	12
Figura 3.2. Posicionamiento de las estructuras de la flor en las placas Petri con APDa para su aislación, las imágenes en orden de izquierda a derecha son; pétalos, estambres+pistilos y sépalos.....	13
Figura 4.1. Flores variedad Cripps Pink, con lesiones circulares asociadas a <i>Botrytis</i> sp. en los pétalos, antes del tiempo de evaluación.....	17
Figura 4.2: Detalle de flor mostrando síntomas de atizonamiento floral y colonización de <i>B. cinerea</i> en todas sus estructuras, desde flores tratadas a -20°C, después de 10 días de incubación a 20°C.....	18
Figura 4.3. Clasificación del grado de esporulación de <i>B. cinerea</i> recolectados desde flores de manzana cv. Cripps Pink y Fuji sometidas a distintos métodos de detección precoz de infecciones latentes del hongo.....	27
Figura 4.4. Placas Petri con aislados de <i>Botrytis cinerea</i> , con escasa (abajo) y abundante (arriba) producción de conidias, de 10 días a 20°C, aislados desde flores con síntomas de atizonamiento floral asociado a <i>B. cinerea</i>	28

1. INTRODUCCIÓN

En Chile, la exportación de fruta fresca de calidad se encuentra dentro de las actividades agrícolas que más aporta a la economía del país (ODEPA, 2012). Entre los años 2000 y 2010, las exportaciones chilenas de fruta han tenido un continuo crecimiento, registrando un aumento de un 116% en el volumen exportado y de un 209% en el valor de las exportaciones (ODEPA, 2011). En Chile, la producción frutícola se concentra principalmente entre la Región de Coquimbo y Del Maule, en las cuales 5,1 millones de hectáreas se encuentran dedicadas a diversas especies frutícolas (ODEPA, 2011).

El manzano (*Malus x domestica*), es una de las especies frutícolas más plantada, alcanzando el segundo lugar con un 12,5% de la superficie nacional con 37.297 ha, las cuales se concentran en un 87% entre las Regiones del Maule y O'Higgins (Bravo, 2013). Actualmente, es posible encontrar un número considerable de variedades dedicadas a la exportación, principalmente Royal Gala, Fuji, Red Chief y Scarlett, entre las variedades rojas y Granny Smith en variedades verdes (ODEPA, 2011).

Una de las principales barreras que dificultan la comercialización de manzanas frescas de calidad son las enfermedades de poscosecha, conocidas como pudriciones, cuyos síntomas se expresan tras meses de almacenaje en cámaras refrigeradas. Esto trae como consecuencia, múltiples pérdidas tanto a nivel del campo, como en las mismas exportadoras (Pinilla, 2013b).

Las pudriciones se originan por las condiciones climáticas predisponentes presentes en la zona de producción de manzanos, las cuales aumentan las posibilidades de que la fruta constituya un excelente sustrato para los hongos (Latorre, 2004). Esto sumado a las características organolépticas propias de la manzana (Morales, 1982), constituyen un medio favorable para el desarrollo de distintas patologías (Arancibia, 2003).

Las pudriciones de manzanas en poscosecha son enfermedades que afectan considerablemente la condición del fruto, lo que incide directamente en el valor comercial de la fruta almacenada (Lolas y Díaz, 2016). El hongo *Botrytis cinerea* es el principal patógeno responsable de pudriciones durante el almacenaje en frío (Farías, 2009). La pudrición calicinal, causada por este patógeno, representa serios problemas tanto a nivel de campo como en poscosecha. Esto, debido a que el patógeno alcanza un estado de latencia por largo tiempo y

por consecuencia una alta potencialidad destructiva, condiciones que se originan en zonas con primaveras y veranos muy húmedos (Tortora et al., 1994).

Considerando la importancia económica del manzano es importante realizar una investigación para conocer el método más efectivo en determinar la carga de inóculo latente que poseen las flores de distintos cultivares de manzano que potencialmente causarían pudrición calicinal.

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

1.1. Hipótesis

La utilización de un método artificial para estimular la expresión de infecciones latentes de *Botrytis cinerea* puede ser una herramienta para su detección precoz en flores y frutos de manzana.

1.2 Objetivo general

Evaluar la eficacia de métodos para detectar infecciones latentes de *Botrytis cinerea* desde flores de manzano en cultivares Cripps Pink y Fuji.

1.3 Objetivos específicos

- Determinar la eficacia de detección de *Botrytis cinerea* latentes de los métodos: inmersión en agua destilada estéril; congelamiento a -20°C, e inmersión en paraquat a 1 ppm.
- Cuantificar la incidencia de atizonamiento floral, en condiciones controladas, en flores de manzanos cultivares Cripps Pink y Fuji aparentemente sanas pero infectadas por *Botrytis cinerea* en forma latente

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Producción de manzana en Chile.

El manzano (*Malus x domestica*) es la segunda especie frutal más plantada en Chile, después de la vid. En 2017, se registraron 35.937 hectáreas de manzanos a nivel nacional, concentradas entre las Regiones del Maule y de O'Higgins, con un 62,1% y 25,5% respectivamente (ODEPA, 2015a).

Entre las regiones anteriormente mencionadas, se registró una producción promedio de 50,2 ton/ha, las cuales, alcanzaron una producción de 45,1 toneladas/ha para variedades rojas y 53,4 para variedades verdes. Las producciones obtenidas fueron destinadas principalmente a la exportación (63,8%), seguido de la agroindustria (22%), y al mercado interno (14,2%) (ODEPA, 2015b; ODEPA, 2013). La producción nacional de manzanas alcanzó 1.615.398 toneladas de frutos, de las cuales sobre un 50% se exportaron principalmente a Estados Unidos y los Países Bajos (Bravo, 2013).

Dentro de las variedades verdes se encuentra Granny Smith, representando el 90% del total. Por su parte las variedades rojas, corresponden a Royal Gala, Fuji, Red Chief, Scarlett y Red Delicious (ODEPA, 2016).

2.2. Pudriciones en manzanas

El manzano puede ser afectado por diversas enfermedades, las que se manifiestan, afectando las estructuras vegetativas del árbol, como raíces, tronco, brazos, ramillas, hojas, y reproductivas como frutos (Agrios, 1998). Para que estas enfermedades ocurran deben existir condiciones climáticas óptimas para el desarrollo, las que se pueden encontrar en Chile, debido a las constantes variaciones que han surgido en los últimos años, tales como mayor frecuencia de lluvias en estaciones cálidas (verano- primavera), las que han llevado a que haya una mayor número de incidencia en enfermedades (Agrios, 1998; Latorre, 2004). Las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, asociadas a cultivos y frutales, son las más numerosas y con mayor impacto económico, representando alrededor del 75% del total de las enfermedades que ocurren en Chile (Latorre, 2004).

Uno de los factores que inciden en la calidad y condición de manzanas son las pudriciones asociadas a hongos fitopatógenos (Latorre, 2004). Generalmente sus síntomas se expresan luego de algunos meses de almacenaje en cámaras refrigeradas, o a la llegada a los mercados de destino (Pinilla, 2013a). Estas enfermedades causan pérdidas directas por desecho de la fruta sin valor comercial, e indirectas por la necesidad de adoptar medidas de control, además de los costos que implica el re embalaje de los frutos, tanto en Chile como en el extranjero (Pinilla y Álvarez, 1998).

Las pudriciones más comunes que afectan a las manzanas son causadas por hongos, entre los que destacan 'Moho Verde' y 'Pudrición Calicinal', causadas por *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*, 'Corazón Mohoso', causado por *Alternaria alternata*, "Ojo de Buey", causado por *Neofabraea alba* y la "'Pudrición Blanca', causada por *Botryosphaeria dothidea* (Henríquez, 2005; Latorre, 2004; Pinilla, 2013; Soto-Alvear *et al.*, 2013).

2.3 Pudrición calicinal en manzanos

La pudrición calicinal afecta a peras y manzanas, luego de cosecha. La enfermedad se acentúa durante el almacenaje en frío por períodos prolongados de guarda, alcanzando pérdidas mayores al 5% (Pinilla y Álvarez, 2002; Jones y Aldwinckle, 2002). Esta enfermedad fue descrita en Chile en frutos de peras Packham's Triumph provenientes de la VI región (Montealegre, 1987, citado por Álvarez *et. al.*, 2004). Las variedades de manzana más sensibles corresponden a Granny Smith, Fuji y Royal Gala (Álvarez *et al.*, 2004).

2.3.1 Agente causal

Esta enfermedad es producida por el hongo *B. cinerea* (Latorre, 2004; Álvarez *et al.*, 2004; Jones y Aldwinckle, 2002), el cual es un patógeno ampliamente distribuido en Chile y afecta a un gran número de huéspedes, tanto silvestres como cultivados.

B. cinerea es sobre todo un parasito de herida. Tiene orígenes muy variados teniendo en cuenta la polifagia de esta especie: muchos residuos vegetales pueden ser el soporte de conidias incluidos los que hay en los propios arboles: canchales, hojas secas, frutos podridos (Bondoux, 1994).

2.3.2 Ciclo de la enfermedad

Durante el otoño el hongo forma esclerocios en los frutos infectados los que quedan en el árbol o sobre el suelo en el huerto hasta la primavera siguiente (Montealegre, 1987). *Botrytis* inverna en el suelo en forma de esclerocios o de micelio, el cual se desarrolla sobre restos de plantas en proceso de descomposición. Requiere de un clima húmedo y moderadamente frío (18 a 23° C) para que se desarrolle adecuadamente, esporule y germine sus esporas para que produzca la infección (Agrios, 1998).

En primavera este hongo coloniza los restos florales senescentes, mayoritariamente en septiembre, octubre, durante la floración del manzano, donde el hongo se ve beneficiado por la humedad ambiental que existe, más las altas temperaturas (Latorre, 2004), en donde los esclerocios germinan produciendo conidias, las que son arrastradas por el viento a los órganos florales senescentes, los que son colonizados por el patógeno. Entre estos órganos se destacan pistilos, estambres y pétalos, en donde una vez cuajados los frutos, este hongo, permanece latente en ellos, en la cavidad calicinal de los frutos, hasta la cosecha (Sutton et al., 2014). Ello hasta pasado un periodo de incubación en almacenaje, donde se activa y comienza a provocar los primeros síntomas de pudrición (Alvarez et al., 2004). El patógeno resiste temperaturas de almacenamiento de hasta -3°C con un lento desarrollo del micelio pudiendo así recolonizar otros frutos, aumentando la incidencia de la enfermedad (Pinilla y Álvarez, 2002).

El micelio de este hongo causa abundantes conidióforos los cuales producen conidias, que ocasionan un mayor número de infecciones, como se puede apreciar en la **Figura 2.1** (Agrios, 2007). Las conidias producidas son transportadas por el viento y por las salpicaduras de la lluvia, las cuales son formas de diseminación de la enfermedad. La forma de diseminación del patógeno, en poscosecha, es por contacto de frutos infectados con otros que están sanos (Latorre, 2004). Las conidias son unicelulares, hialinas, elipsoidales a ovoides, de 6-10 x 7,5- 14 µm. El micelio puede crecer en temperaturas de hasta -2°C, mientras que las conidias pueden germinar a 0°C y a una humedad relativa de 90 % (Sutton et al., 2014).

La germinación de las conidias es influenciada por la presencia de agua libre o alta humedad relativa, siendo esenciales estas condiciones para la germinación y penetración. Existe un amplio rango de condiciones de temperatura y humedad para el desarrollo de la infección, siendo el óptimo de 15-20°C y humedad relativa sobre el 90 % por al menos 4 horas.

B. cinerea puede entrar en la zona peduncular durante la cosecha, y crecer a temperaturas de 0°C a través del pedúnculo, llegando finalmente a la pulpa (Sutton et al., 2014).

El hongo posee una alta capacidad saprofítica, la cual le permite sobrevivir en el suelo como esclerocios (compactación de micelios) y sobre restos orgánicos, como micelio. También ataca frutos a partir de heridas causadas en el huerto o en el proceso de la fruta, además puede colonizar los pedúnculos de los frutos, produciendo la llamada podredumbre peduncular (Mondino et al., 2009).

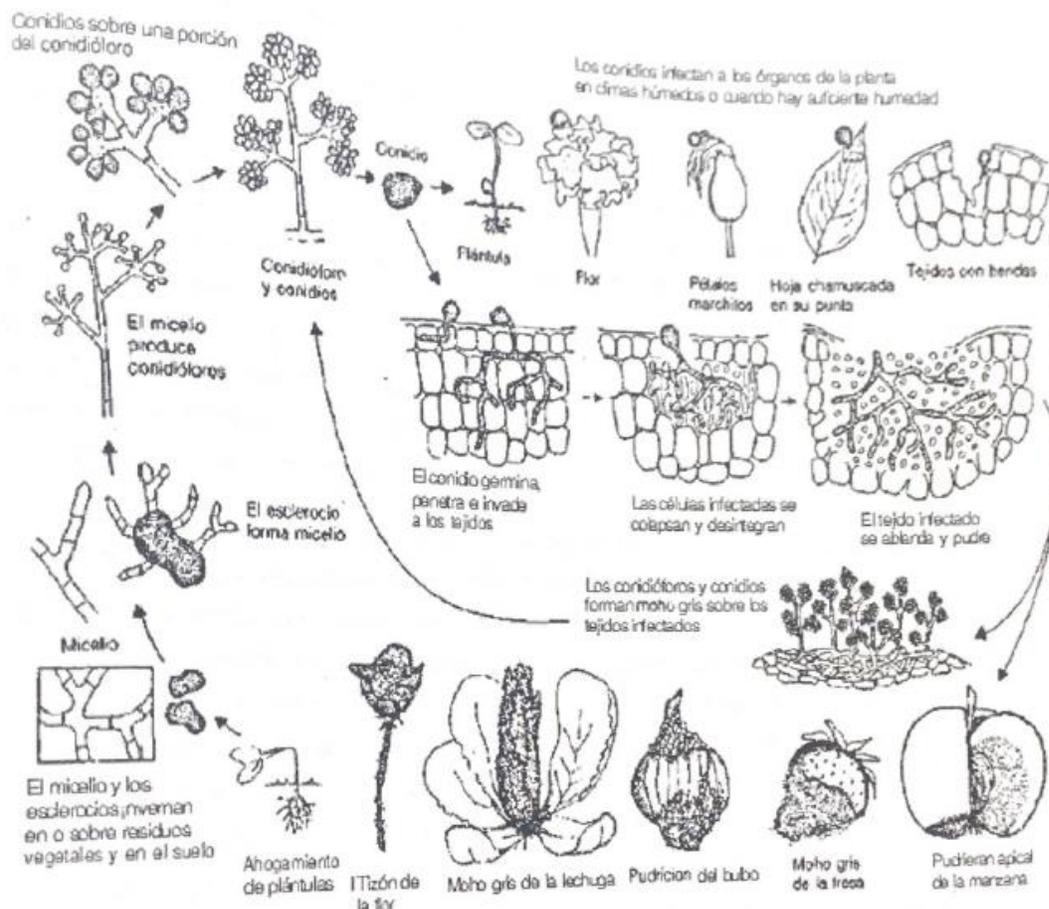


Figura 2.1. . Desarrollo de las enfermedades producidas por *B. cinerea*. (Fuente: Agrios, 1998).

2.3.3 Sintomatología

Los síntomas se pueden manifestar en las distintas etapas fenológicas del manzano. En floración, se aprecian síntomas de *Botrytis* en los pétalos de la flor, con lesiones necróticas de color café de forma circular. También en estambres y pistilos antes de caída de pétalos, en donde se puede apreciar micelio de color gris. Una vez cuajados los frutos, el patógeno permanece latente, hasta cuando se dan las condiciones predisponentes y comienza a provocar los primeros síntomas de pudrición. Esto ocurre generalmente en los meses de almacenaje, cuando el fruto ya está en proceso de maduración (Álvarez et al., 2004).

En manzanas, cuyos restos florales vienen contaminados con el hongo desde el huerto, en postcosecha se forma un micelio de color blanco que crece formando los “nidos de *Botrytis*”, que dependiendo de la duración de la guarda, pueden ocasionar pudriciones a un número significativo de frutos. Pasados uno a dos meses de almacenamiento en frío, se presenta una pudrición blanda y acuosa de color pardo, que generalmente se inicia en el extremo calicinal y que en medida que avanza el almacenaje en frío, se desarrolla hacia el interior del fruto (Pinilla y Álvarez, 2002).

2. 3.4 Métodos de detección de *Botrytis cinerea*.

La literatura describe distintos métodos de detección de *Botrytis cinerea* como agente causal de infecciones latentes. Biggs, (1995), estudió el efecto del herbicida paraquat en las pudriciones de manzanas en pre y post cosecha, identificando los hongos desde fruta tratada, pudiendo determinar el uso potencial de este herbicida como medida rápida de cuantificación de patógenos en fruta almacenada. Holz *et al*, (2003) señala que en bayas tratadas con paraquat o expuestas a temperatura de -12°C por 1 hora permite promover el desarrollo del patógeno a través de los tejidos, debido a que estos tratamientos reducen la resistencia del hospedero, permitiendo la colonización.

Actualmente, otras metodologías han sido desarrolladas para la detección de infecciones latentes causadas por *B. cinerea*, como el qPCR utilizando sondas y partidores específicos en bayas de vid (Saito et al., 2013; Sanzani et al., 2012).

2.3.4.1. Golpe de frío

El método de detección de infecciones latentes, conocido también como ‘Overnight Freezing–Incubation Technique’ (ONFIT), descrito por Michailides et al., (2000), permite identificar algunos géneros fungosos como *Monilia*, *Botrytis* y *Alternaria*. Esto lo explica también Sanzani et al., (2011), en el cual, dice que es una técnica tradicional, que induce a la senescencia el tejido de la

fruta, provocando así el ataque de diferentes patógenos, esto en flores podría darse con el rompimiento de las paredes muy delgadas de los pétalos, o la senescencia de las estructuras florales. Esto fue comprobado con un ensayo realizado en uva de mesa, cuyo objetivo era conocer las poblaciones de hongos asociados; en el cual consideró la exposición de los frutos durante 24 horas en frío y luego fueron expuestos a temperatura ambiente. Los resultados mostraron que la fruta era sensible al tratamiento de golpe de frío, ya que fue el tratamiento donde más proliferó *B. cinerea*.

Por otro lado también corroboran el estudio Luo and Michailides, (2003) en donde indican que el uso del golpe de frío, permitiría conocer la incidencia de un determinado patógeno y predecir el riesgo de una enfermedad a cosecha.

2.3.4.2. Paraquat

El paraquat es un herbicida de contacto total, no selectivo (SAG, 2009), el cual afecta al proceso de fotosíntesis y provoca una peroxidación lipídica de los tejidos, el cual está destinado para el control de gramíneas y dicotiledóneas (Dodge y Harris, 1970), aunque este, en poscosecha es usado como tratamiento en diversos frutales para afirmar la presencia de ciertos patógenos como lo es en este caso la *B. cinerea*. Los estudios de Biggs (1995) en manzana resultaron exitosos en inducir la presencia y detectar *Alternaria alternata*, *Colletotrichum acutatum*, *Botryosphaeria dothidea*, *Phoma* sp., y *Penicillium* spp. en manzanas de los cultivares Golden Delicious y Nittany.

2.3.5. Métodos de control

Las pudriciones causadas por *B. cinerea* se consideran de gran importancia económica, debido a que causan daños en el campo, durante el transporte y en el almacenamiento. La pudrición calicinal es difícil de controlar, por lo que deben utilizarse diversas medidas para el manejo de las enfermedades tales como, el control biológico, la aplicación de fungicidas protectores y sistémicos, el manejo en los tratamientos de poscosecha y en las técnicas de almacenamiento, la realización oportuna de las prácticas culturales y la utilización de cultivos resistentes. Los avances y la integración de algunas de esas medidas han llevado a mejorar en gran parte el control de la enfermedad (Clavijo y Cruz, 1997).

2.3.5.1 Control cultural

Según Pinilla y Álvarez (1998), algunos manejos culturales para reducir la incidencia de pudrición calicinal son:

- Eliminar las fuentes de inoculo en el campo, como restos de plantas y frutos infectados, para evitar diversas formas de sobrevivencia del hongo (Agrios, 1996).
- Proporcionar una adecuada ventilación de la planta.
- Evitar condiciones de baja luminosidad en las copas de los árboles.
- Cosechar oportunamente, evitando cosechar frutos maduros, dañados o con machucones, además de utilizar cajones y bins limpios, y realizar limpieza y desinfección de las salas de embalaje y cámaras de frío (Latorre, 1994).
- Enfriar rápidamente la fruta y mantener la cadena de frío hasta el destino final de la fruta (Latorre, 1994).

En Chile la descomposición de la materia orgánica es muy lenta debido al tipo de clima, por lo que frutos que permanecen en el suelo luego de la cosecha no se descomponen completamente hasta la brotación, estos frutos se encuentran llenos de hongos y se diseminan por todo el huerto y por las plantas, reduciendo la efectividad de los programas fitosanitarios (Pinilla, 2014).

2.3.5.2 Control químico

El control químico permanece como el principal camino contra la lucha de la incidencia de este hongo fitopatógeno (Dardari et al, 2004). Para evitar pudriciones en el almacenamiento refrigerado, desde hace varios años en las plantas embaladoras de manzanas de Chile, se sigue un control tradicional, el cual involucra el uso de fungicidas, presentando resultados variables, dependiendo de las especies presentes en el huerto, causantes de las pudriciones (Pinilla, 2013).

Según Latorre (2004), se recomienda la aplicación de fungicidas en la época de floración que son los momentos más críticos para la infección tales como: fenbuconazol (360-480 g i.a./ha), pirimetanil (800 g i.a./ha), tebuconazol (300-450 g i.a./ha) y trifloxystrobin (75-100/g i.a./ha).

Luego en el proceso de poscosecha, según Latorre (1994), se pueden utilizar los siguientes fungicidas como inmersión, aspersion o en la cera: benomilo (20-30 g ia/100L.), captan (120-150 g ia/100L.), carbendazima (40-50 g ia/100L.), iprodione (60-75 g ia/100L) y metiltiofanato (50-70 g ia/100L).

Los fungicidas son usualmente valiosos pero en su mayor parte se utilizan como preventivos, de este modo un programa regular de aspersiones con productos preventivos es casi siempre la mejor estrategia de control

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención del material vegetal

El material vegetal fue colectado desde 3 diferentes huertos sujetos a un control integrado de plagas y enfermedades, localizados en distintas localidades de la Región del Maule (Cuadro 3.1). Se recolectaron flores (n=150) de manzanos, cultivares Cripps Pink y Fuji durante el periodo de floración,

Cuadro 3.1. Cultivares de manzano considerado en el estudio, según localidad

Cultivares de manzano	Localidad
Fuji	San Clemente, Fundo Casas Patronales
Cripps pink	San Clemente, Fundo Casas Patronales
Cripps pink	Yerbas Buenas, Fundo Esmeralda
Fuji	Yerbas Buenas, Fundo Lisonjera

3.2 Ubicación del estudio

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Patología Frutal de la Universidad de Talca, ubicado en el Campus Lircay, de esta misma ciudad.

3.3 Métodos de detección de infecciones latentes

Para detectar las infecciones latentes causadas por *Botrytis* spp., el material fue tratado utilizando tres diferentes métodos, definidos como los tratamientos del estudio:

3.3.1 Tratamiento 1 (T1) Inmersión en agua destilada estéril

El método consideró la inmersión del material vegetal en agua destilada estéril, en un vaso precipitado, durante 1 minuto. Luego se recolectaron las flores, se eliminó el exceso de agua sobre papel absorbente, y se les dejó secar a temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$) dentro de una

cámara de flujo laminar para evitar posibles contaminaciones. Posteriormente las flores fueron dispuestas en cámaras húmedas durante 10 días a 20°C como se puede apreciar en la Figura 3.1.



Figura 3.1. Disposición de flores cv. Cripps Pink en cámara húmeda, luego de permanecer sumergidas en agua estéril.

3.3.2 Tratamiento 2 (T2) Inmersión en paraquat.

El método consideró la inmersión del material vegetal en paraquat (Paraquat 27,6 SL Agrospec), a una concentración de 1 ppm en un vaso precipitado estéril, por 1 minuto. Luego, se eliminó el exceso de producto en las flores tratadas sobre papel absorbente y se les dejó secar a temperatura ambiente dentro de una cámara de flujo laminar. Posteriormente las flores tratadas con paraquat fueron incubadas en las cámaras húmedas durante 10 días a 20°C y ≥ 90 %HR.

3.3.3 Tratamiento 3 (T3) Tratamiento del material vegetal utilizando congelamiento a -20°C

Para este método, las flores fueron sometidas a una temperatura de -20° C por 2 horas. Posteriormente, se dispusieron en cámaras húmedas e incubadas durante 10 días a 20°C y ≥ 90 %HR.

3.4 Aislamiento en flores

Después de los tiempos de incubación, se seleccionaron flores con síntomas de atizonamiento desde las cámaras húmedas. En una cámara de flujo laminar, estas fueron separadas por cada estructura floral como se aprecia en la Figura 3.2, poniendo cada parte de la flor por separado en placas Petri (marca Greiner, 19 mm diámetro), con medio de cultivo APD suplementado con ácido láctico, 0,05 ml/L (APDa), para impedir la colonización bacteriana.

Las placas luego se incubaron por 7 días a una temperatura de alrededor de 20°C y ≥ 90 %HR. Desde las placas que se apreciaban signos de *Botrytis* spp. se sembraron en placas con APD suplementado con ácido láctico para la obtención de cultivos puros.

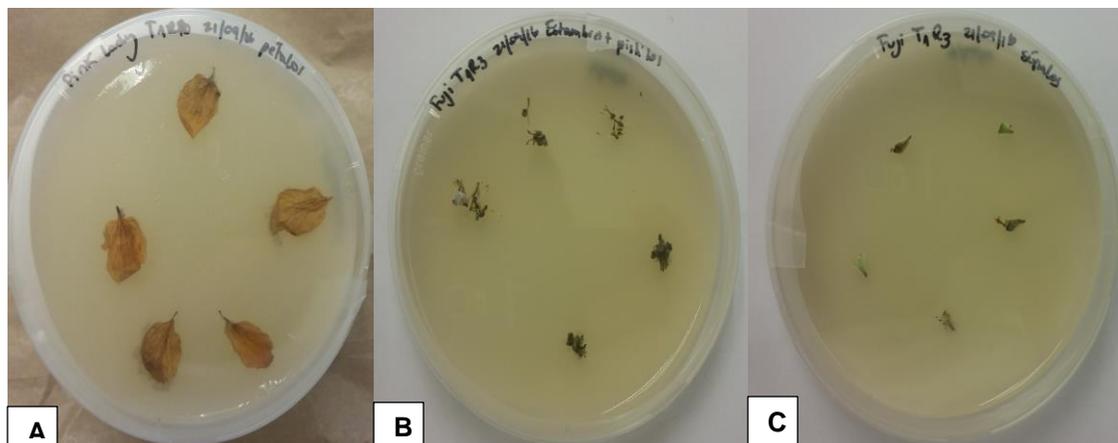


Figura 3.2. Posicionamiento de las estructuras de la flor en las placas Petri con APD suplementado con ácido láctico, para su aislación. Las imágenes en orden de izquierda a derecha son: (A) pétalos; (B) estambres+pistilos y (C) sépalos.

3.5 Identificación del agente causal

Con el propósito de identificar al agente causal, y en atención a que se logró diferenciar fácilmente dos expresiones de crecimiento *in vitro* del hongo en estudio, se seleccionaron 6 aislados del género *Botrytis* con alta esporulación, identificados morfológicamente como *Botrytis cinerea* y 6 de escasa esporulación rotulándolos tentativamente como *Botrytis* sp. 1 (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Aislados de *Botrytis cinerea* de alta esporulación y baja esporulación, de acuerdo a su procedencia, hospedero, tratamiento y cultivar, además de abreviación del nombre del aislado.

Especie	Aislado	Estructura Floral	Hospedera	Cultivar	Localidad
<i>B. cinerea</i>	BC92	Sépalos		Pink Lady	Esmeralda
<i>B. cinerea</i>	BC41	Pétalos		Pink Lady	Esmeralda
<i>B. cinerea</i>	BC15	Estambres+pistilos		Pink Lady	Esmeralda
<i>B. cinerea</i>	BC2	Sépalos		Pink Lady	Esmeralda
<i>B. cinerea</i>	BC55	Sépalos		Granny Smith	Itahue
<i>B. cinerea</i>	BC72	Sépalos		Fuji	Lisonjera
<i>B.sp1</i>	HB83	Estambres+pistilos		Fuji	Lisonjera

<i>B.sp1</i>	HB98	Estambres+pistilos	Granny Smith	Itahue
<i>B.sp1</i>	HB77	estambres+pistilos	Fuji	Panguilemo
<i>B.sp1</i>	HB134	Sépalos	Scarlet	Quiriquiño
<i>B.sp1</i>	HB85	Pétalos	Granny Smith	Itahue
<i>B.sp1</i>	HB3	Estambres+pistilos	Pink Lady	Esmeralda

3.6 Evaluaciones

En flores, se evaluó la incidencia, de atizonamiento floral (según estructura floral), luego de 10 días, a una temperatura de 20°.

Para realizar este cálculo se utilizó la fórmula de Owaga (1986), expresándola en porcentajes:

$$\text{Incidencia (I): } \frac{\text{N}^\circ \text{ de individuos afectados por repetición}}{\text{Total de individuos afectados y no afectados}} * 100$$

En la cual el número de individuos afectados por repetición, dependían de la estructura a la cual se estaba contabilizando, en el caso de pétalos, sépalos y estambres, el total de individuos por repetición constaba de 25, esto debido a que en la cámara húmeda, habían 5 flores (unidades experimentales), las cuales en cada una de ella se tiene 5 pétalos, 5 sépalos, 5 pistilos, es por esto que al ser 5 se multiplicaban por este número dando como resultado que por repetición se tenían 25 pétalos, 25 sépalos y 25 pistilos. En el caso del conteo de individuos de estambres, por cada una de las 5 flores de cada repetición, se tienen 20 estambres, los que en total suman 100 individuos por repetición. Para contar como positivo a cada una de las estructuras, se observaron los síntomas y signos de la enfermedad en la superficie.

3.7. Pruebas de patogenicidad en frutos.

La prueba de patogenicidad se realizó en manzanas cultivar Fuji (calibre aprox. 100) y Pink Lady (calibre aprox. 80) con madurez de cosecha y aparentemente sanas, las cuales al momento del estudio tenían 15,3 ±1,7° Brix y 13,5 ± 0,6° Brix, respectivamente. Se utilizaron cuatro repeticiones por cada aislado (n=12) más un testigo sin inoculación. Las manzanas fueron lavadas con detergente a una concentración de 2 mL por litro de agua por 3 minutos, desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% (204 mL de NaClO al 4,9% y 796 mL de agua destilada) por 3 minutos, lavadas con agua destilada por 3 minutos y secadas a temperatura ambiente y ≥90 %HR.

Los 7 aislados utilizados para este estudio fueron aquellos que morfológicamente correspondían a *B. cinerea*, mostrando una alta esporulación en APDA. Al momento de la

inoculación, se utilizaron dos tipos de inóculos: conidias y micelio, por separado. Para la obtención de conidias, se realizó una siembra con un disco de micelio de seis milímetros de diámetro por cada aislado seleccionado, en cuatro repeticiones en medio de cultivo APDA. Las placas se incubaron a 20°C por 7 días a oscuridad, posteriormente se preparó una suspensión a una concentración de 10^6 conidias/ml de agua estéril utilizando un hemocitómetro (cámara de Neubauer). Para la obtención de micelio, se extrajo un disco de 6,5 mm de diámetro desde aislados en placas APDA de 7 días de incubación a 20°C en oscuridad.

Las manzanas se separaron en 2 grupos, al primero se realizaron heridas con un alfiler esterilizado, a una profundidad de 4 mm en la parte calicinal del fruto; al otro grupo se le realizó una herida con un sacabocado de 6,5 mm de diámetro a una profundidad de 4 mm en la zona calicinal del fruto.

El grupo con heridas del alfiler esterilizado, se inoculó con 40 μ L de la suspensión de conidias previamente descrita. El grupo con herida de sacabocado, se inoculó con un disco de micelio de 6 mm de diámetro del cultivo puro y posteriormente se cubrió con parafilm. Se dejó un grupo de manzanas con ambas heridas, inoculadas con agua estéril y agar, como testigo.

La incubación de las manzanas se realizó a 20°C, ≥ 90 %HR, en un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad durante 7 días en cámara húmeda. Posteriormente, la evaluación consistió en medir el avance de la lesión, además de caracterizar las lesiones producidas (color, forma y tamaño), comparando la virulencia de los aislados de *B. cinerea*. De los frutos inoculados se realizó un nuevo aislamiento en medio de cultivo APDA para cumplir con los postulados de Koch.

3.8 Pruebas de patogenicidad en flores

La prueba de patogenicidad se realizó con flores obtenidas en plena flor, aparentemente sanas de los cultivares Fuji y Cripps Pink. Se utilizaron cuatro repeticiones por cada aislado (n=12) más un testigo sin inoculación. Las flores fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,1% por 3 minutos, lavadas con agua destilada por 3 minutos y secadas a temperatura ambiente. Enseguida fueron asperjadas con una suspensión de conidias (10^6 conidias/ml) de cada aislado en estudio. Luego fueron puestas en cámaras húmedas, a 20°C por 7 días, seguido a este tiempo, se realizaron mediciones de incidencia, después a esto se realizó aislamiento de las flores aparentemente con síntomas en placas con APDA, con un tiempo de incubación de 7 días a 20°C, separando cada una de sus estructuras, para su observación de signos en placas.

3.9 Diseño experimental y análisis estadístico

Para las dos variedades y las dos localidades usadas en el estudio, el diseño experimental utilizado en el ensayo de evaluación de la eficacia de los métodos de detección de *Botrytis* latente en flores de manzano, fue un diseño completamente al azar (DCA) con estructura factorial 3 x 4 (Método de Detección x Estructura). La unidad experimental fue 5 flores y se utilizaron 10 repeticiones. Los datos utilizados fueron los porcentajes de incidencia.

En cuanto al diseño usado para la patogenicidad de flores se realizó un diseño completamente al azar (DCA) con estructura factorial 13 x 2 (Aislados x Variedad), para este ensayo se ocuparon flores Cripps Pink y Fuji, en la cual la unidad experimental fue de 10 flores por repetición y se realizaron 4 repeticiones por aislado.

El diseño experimental utilizado en el ensayo de prueba de patogenicidad en frutos, fue un diseño completamente al azar con arreglo factorial 7x2 (Aislados x Tipo de inóculo). La unidad experimental fue 1 manzana. Se utilizaron 4 repeticiones.

Para los estudios mencionados anteriormente se realizó una transformación de los datos con arcoseno $\sqrt{x/100}$ de los valores, en porcentaje, esto se realizó para cumplir con la normalidad e igualdad de varianza previos al análisis fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA), y en caso de existir diferencias entre las medias, estas se separaron mediante una prueba de rango múltiple HSD de Tukey ($P < 0,05$). Se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.15 (StatPoint Technologies, Inc., Virginia, EEUU).

4. RESULTADOS

4.1 Observación de síntomas y morfología en flores

La expresión de síntomas en el tiempo de incubación en flores, dio inicio como pequeños moteados de color marrón claro en los pétalos, como se puede apreciar en la Figura 4.1. Estas lesiones se propagaron rápidamente y finalmente afectaron a los pétalos enteros.

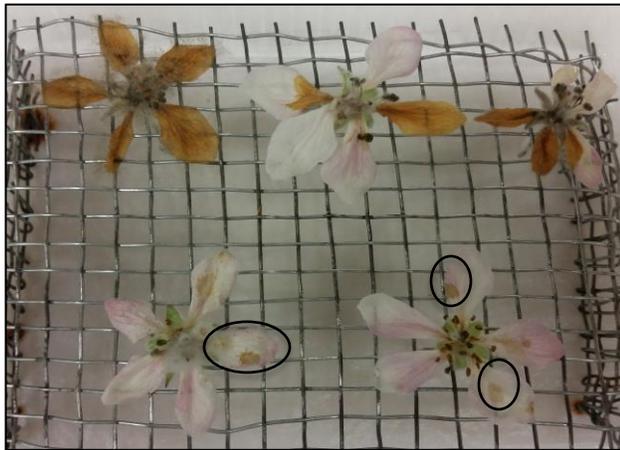


Figura 4.1. Flores variedad Cripps Pink, con lesiones circulares asociadas a *Botrytis* en los pétalos, antes del tiempo de evaluación.

Los estambres y pistilos eventualmente también se volvieron marrones; en la mayoría de ellos, se logró apreciar signos de la enfermedad, como micelio con abundantes conidióforos de color gris, antes que los pétalos estuvieran completamente necrosados. Transcurrido los 10 días del periodo de incubación en las cámaras húmedas, las estructuras que habían presentado síntomas en los primeros días de observación, desarrollaron en su mayoría, una esporulación gris, con micelio y conidióforos en la superficie, asociada a *B. cinerea*, (Figura 4.2) como se pudo apreciar en el microscopio óptico, en el cual se observaron los signos característicos de esta especie.

Adicionalmente, se pudo apreciar que en algunas flores, los síntomas observados fueron similares a los anteriormente descritos, pero estos eran producidos en un tiempo más prolongado; además se produjo un micelio esponjoso de color blanco a amarillento en la superficie, sin la presencia notoria de conidióforos de color gris, como en *B. cinerea*. Además de esto el crecimiento del micelio era más lento, en relación al crecimiento del micelio de *B. cinerea* en la superficie de las estructuras florales.



Figura 4.2: Detalle de flor mostrando síntomas de atizonamiento floral y colonización de *B. cinerea* en todas sus estructuras, desde flores tratadas a -20°C , después de 10 días de incubación a 20°C .

4.2 Incidencia de atizonamiento floral

En el Cuadro 4.1 se puede observar la incidencia de *B. cinerea*, en cuanto a los métodos de detección temprana en la variedad de manzanas Cripps Pink, ubicadas en la localidad de San Clemente. La interacción entre el factor estructura floral y el factor método de detección fue altamente significativa ($P < 0,0001$). Se encontraron diferencias significativas entre los métodos utilizados, siendo así el método de congelamiento -20°C , el que mostró los valores más altos de incidencia en las distintas estructuras florales, alcanzando un valor de 99,6, 98, 98, y 97,7% de incidencia en pétalos, sépalos, pistilos y estambres, respectivamente, con la excepción de los pistilos en agua estéril que obtuvo un 100% de incidencia.

Mientras que para los demás tratamientos agua y paraquat 1 ppm, en cuanto a los resultados de sépalos-agua estéril, sépalos-paraquat, pétalos-agua estéril y pétalos-paraquat, se obtuvieron porcentajes de incidencia similares, obteniendo diferencias significativas con el resto de las estructuras, que obtienen valores de incidencia por sobre el 74,1 %.

También se puede mencionar que se observaron diferencias significativas entre las distintas estructuras y que de las estructuras florales, la que obtuvo una mayor incidencia, fue pistilos con 100%, 98% y 94% en agua estéril, paraquat y congelamiento -20°C respectivamente. También cabe mencionar que los sépalos, con el tratamiento con paraquat y agua estéril, mostraron las incidencias más baja alcanzando un valor de 18 % y 35,2% en relación a los demás tratamientos.

En agua estéril y paraquat; sépalos, estambres y pétalos, son estadísticamente semejantes, en las incidencias de *Botrytis*, a diferencia de congelamiento -20°C que es estadísticamente diferente de los otros dos métodos de detección de infecciones latentes, en las estructuras antes descritas, pero en pistilos, ocurre que cualquier sea el método de detección, no hay diferencia significativa entre ellos.

Cuadro 4.1. Porcentaje de incidencia de atizonamiento floral en cv. Cripps Pink, positivos a la presencia de *B. cinerea* (%), según método de detección temprana, en la localidad de San Clemente.

Método de detección (M)	Estructura Floral (E)				Promedio
	Sépalos	Pétalos	Estambres	Pistilos	
Agua estéril	18 d	34 cd	77,3 b	100 a	57,3
Paraquat 1ppm	35,2 cd	49,2 c	74,1 b	94 a	63,1
Congelamiento -20°C	98 a	99,6 a	97,7 a	98 a	98,3
Promedio	50,4	60,9	83	97,3	
Análisis de varianza					
Método (M)					
gl	2				
P	<0,0001				
Estructura (E)					
gl	3				
P	<0,0001				
M x E					
gl	6				
P	<0,0001				

Promedios seguidos por la misma letra minúscula en cada columna o en cada fila no difieren según prueba de rango múltiple de Tukey ($P > 0,05$). Los valores fueron transformados por arcoseno $\sqrt{x/100}$ previos al análisis. Los datos presentados corresponden a los promedios no transformados.

En el cuadro 4.2 que se muestra a continuación, se puede observar la incidencia de *Botrytis cinérea*, en cuanto a los métodos de detección temprana de Botrytis, en la variedad de manzanas Fuji, ubicadas en la localidad de san Clemente, en la cual podemos indicar que la interacción entre el factor estructura floral y el factor método, fue altamente significativa ($P < 0,0001$). Por lo tanto, ambos métodos no se pueden ver de manera independiente, es por esto que podemos decir que las 4 estructuras, con el método de paraquat 1ppm, son los que tienen los menores porcentajes de incidencia, con valores por debajo del 57,6 %, además, la estructura sépalos en el método de paraquat 1ppm, es la que tuvo la menor incidencia en el estudio en su totalidad con un 6,4 %.

También se aprecia que entre métodos el paraquat 1ppm y el agua estéril, es muy semejante en sus resultados, no así en el método de congelamiento (-20°C) donde las estructuras fueron significativamente distintas, respecto a las tratadas con los otros métodos, alcanzando valores de 100 % de incidencia, en todas las que fueron tratadas con congelamiento -20°C. En cuanto al factor estructuras, hubo diferencias significativas entre ellas, como podemos apreciar, los pistilos, fueron los que tuvieron la mayor incidencia de *Botrytis cinerea*, ya sea en cualquiera de los 3 métodos empleados en ellos.

Cuadro 4.2 Porcentaje de incidencia de atizonamiento floral en cv. Fuji, positivos a la presencia de *B. cinerea* (%), según método de detección temprana, en la localidad de San Clemente.

Método de detección (M)	Estructura Floral (E)				Promedio
	Sépalos	Pétalos	Estambres	Pistilos	
Agua estéril	16,4 de	36 cd	65,1 bc	82 b	49,9
Paraquat 1ppm	6,4 e	36,4 cd	39,7 cd	57,6 bc	35
Congelamiento -20°C	100 a	100 a	100 a	100 a	100
Promedio	41	57,5	68,3	79,2	
Análisis de varianza					
Método (M)					
gl	2				
P	<0,0001				
Estructura (E)					
gl	3				
P	<0,0001				
M x E					
gl	6				
P	<0,0001				

Promedios seguidos por la misma letra minúscula en cada columna o en cada fila no difieren según prueba de rango múltiple de Tukey ($P > 0,05$). Los valores fueron transformados por arcoseno $\sqrt{x/100}$ previos al análisis. Los datos presentados corresponden a los promedios no transformados.

A continuación en el cuadro 4.3 se muestran los resultados de incidencia de Botrytis cinérea, en cuanto a los métodos de detección temprana de Botrytis en flores, en el cv. Cripps Pink, ubicadas en la localidad de Yervas Buenas, en donde podemos indicar que la interacción entre el factor estructura floral y el factor método, fue altamente significativa ($P < 0,0001$). Es por esto que ambos métodos deben verse no de manera independiente, debido a que uno puede afectar al otro.

En cuanto al factor método de detección, también se encontró que es estadísticamente significativo, en los cuales, agua estéril fue notablemente menor en la incidencia de Botrytis cinerea, en todas las estructuras, exceptuando en pistilos, esto, en relación con los métodos de paraquat 1ppm, que tuvo una media global de 83,73% y congelamiento -20°C con una media global de 100% de incidencia, en los cuales los porcentajes de incidencia estuvieron por encima de agua estéril, en al menos un 19 % más.

En cuanto al factor estructura al ser también estadísticamente significativo, tenemos diferencias entre las estructuras florales, en las cuales se puede apreciar que los pistilos son la estructura que mayor porcentaje de incidencia obtiene, ya sea en cualquiera de los 3 métodos utilizados, luego a esto, le siguen los estambres con una media global de 92,1 %, seguido por pétalos con un 79,73% y finalmente de sépalos con un promedio de 60 %. Es por esto que el método congelamiento en conjunto con pistilos, presenta en la mayor parte del estudio los porcentajes de incidencia más altos.

Cuadro 4.3 Porcentaje de atizonamiento floral cv. Cripps Pink, positivos a la presencia de *B. cinerea* (%), según método de detección temprana, en la localidad de Yervas Buenas.

Método de detección (M)	Estructura Floral (E)				Promedio
	Sépalos	Pétalos	Estambres	Pistilos	
Agua estéril	27,6 d	49,2 cd	81,4 b	98,8 a	64,3
Paraquat 1ppm	52 c	90 ab	94,9 a	98 a	83,7
Congelamiento -20°C	100 a	100 a	100 a	100 a	100
Promedio	60	79,7	92,1	98,9	
Análisis de varianza					
Método (M)					
gl	2				
P	<0,0001				
Estructura (E)					
gl	3				
P	<0,0001				
M x E					
gl	6				
P	<0,0001				

Promedios seguidos por la misma letra minúscula en cada columna o en cada fila no difieren según prueba de rango múltiple de Tukey ($P > 0,05$). Los valores fueron transformados por arcoseno $\sqrt{x/100}$ previos al análisis. Los datos presentados corresponden a los promedios no transformados.

En este cuadro 4.4 que se encuentra a continuación, se puede observar la incidencia de *Botrytis cinérea*, en cuanto a los métodos de detección temprana de Botrytis en flores, en la variedad de manzanas Fuji, ubicadas en la localidad de Yerbas Buenas, donde podemos indicar que la interacción entre el factor estructura floral y el factor método, fue altamente significativa ($P < 0,0001$).

Por lo tanto se obtuvieron diferencias significativas entre los métodos de detección de infecciones latentes utilizados, obteniendo los niveles más altos de incidencia en el método de congelamiento -20°C con un 100% de incidencia en promedio global, luego en paraquat con un 72,5 % de incidencia y por último en agua estéril con un 50,4 % de incidencia de *Botrytis*.

En cuanto al factor estructura, también se puede observar que hubo diferencias significativas entre ellos, en las cuales los pistilos obtuvieron los mayores porcentajes de incidencia en los 3 métodos utilizados con un 100 % en pistilos-congelamiento, 97,6 % en pistilos-paraquat y un 86,8 % de incidencia en pistilos-agua estéril, seguido de estambres y pétalos que son similares estadísticamente en cuanto a el factor estructura floral y sépalos que obtuvo los porcentajes de incidencia más bajos entre los 3 métodos utilizados.

En pistilos, en cualquiera sea el método de detección de infecciones latentes de *Botrytis*, se encontró los valores de incidencia más altos, pero no hubo diferencia significativa en la incidencia de Botrytis entre métodos, en pistilos, ya que en la columna, se comparte en los 3 promedios de incidencia, una letra.

Cuadro 4.4. Porcentaje de atizonamiento floral cv. Fuji, positivos a la presencia de *B. cinerea* (%), según método de detección temprana, en la localidad de Yerbas Buenas.

Método de detección (M)	Estructura Floral (E)				Promedio
	Sépalos	Pétalos	Estambres	Pistilos	
Agua estéril	24 d	47,6 d	43 d	86,8 abc	50,4
Paraquat 1ppm	36,8 d	76 c	79,7 bc	97,6 ab	72,5
Congelamiento -20°C	100 a	100 a	100 a	100 a	100
Promedio	53,6	74,5	74	94,8	
Análisis de varianza					
Método (M)					
gl	2				
P	<0,0001				
Estructura (E)					
gl	3				
P	<0,0001				
M x E					
gl	6				
P	<0,0001				

Promedios seguidos por la misma letra minúscula en cada columna o en cada fila no difieren según prueba de rango múltiple de Tukey ($P > 0,05$). Los valores fueron transformados por arcoseno $\sqrt{x/100}$ previos al análisis. Los datos presentados corresponden a los promedios no transformados.

4.3. Cuantificación porcentual de aislados fúngicos

Se obtuvieron 360 aislados fungosos de las 600 flores con atizonamiento, de los cuales 245 (95,9%) correspondieron al género *Botrytis* spp. Los aislados restantes, 4,1%, correspondieron a los hongos *Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* spp. y bacterias saprofitas.

4.4. Determinación y separación de aislados según su nivel de esporulación

Según la clasificación por el grado de esporulación de los 345 aislados de *Botrytis* spp. obtenidos, se determinó visualmente desde las colonias cultivadas en medio APDa, un 75,9 % de ellos con alta producción de conidias (BAP) y un 24,1% con escasa producción de conidias (BEP) (Figura 4.3).

Todos los aislados fueron identificados morfológicamente como especies de *Botrytis*, y por ello fueron seleccionados 6 aislados BEP y 6 aislados BAP, como se puede apreciar en la Figura 4.4; esto independiente de la variedad, estructura floral o localidad en la que fue extraída la flor.

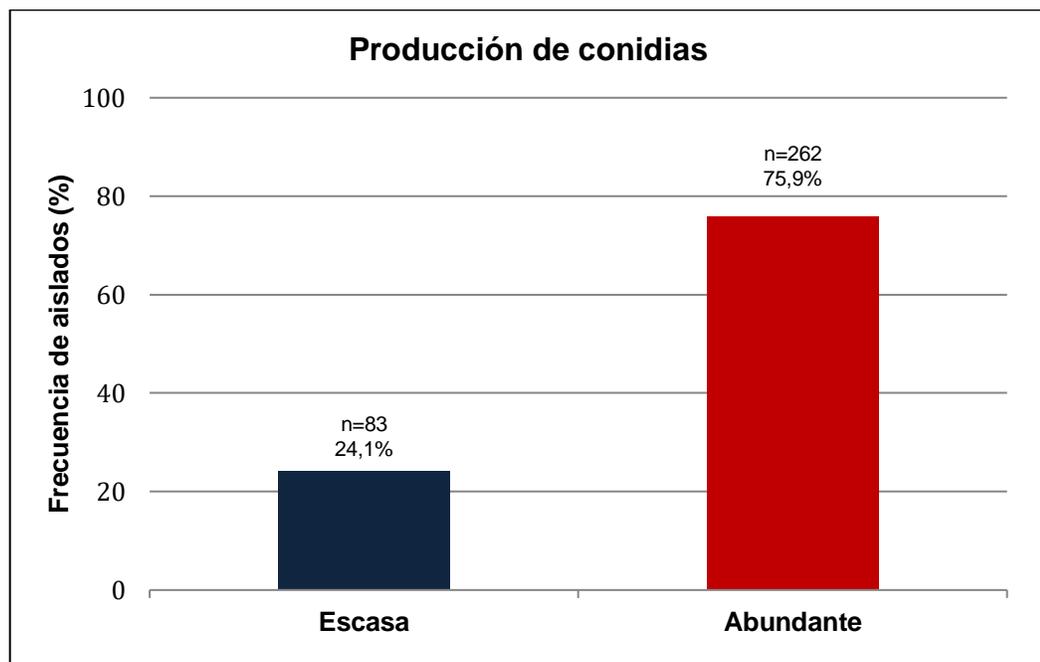


Figura 4.3: Clasificación del grado de esporulación de aislados de *Botrytis* spp. recolectados desde flores de manzana cv. Cripps Pink y Fuji sometidas a distintos métodos de detección precoz de infecciones latentes del hongo.

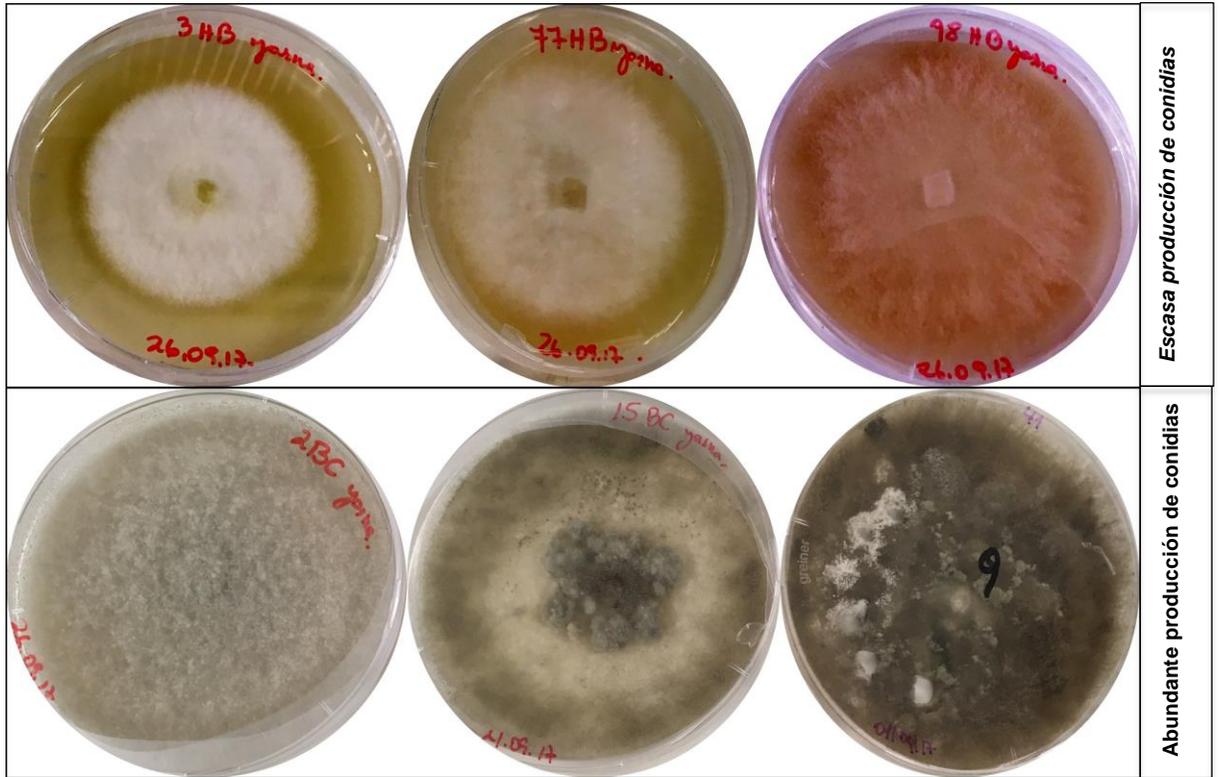


Figura 4.4: Colonias de aislados de *Botrytis cinerea* de escasa (arriba) y abundante (abajo) producción de conidias en APDA, cultivadas a 20°C por 10 días.

4.5. Pruebas de patogenicidad en frutos

La patogenicidad utilizando micelio y conidias de los aislados *B. cinerea* 2; *B. cinerea* 4; *B. cinerea* 15; *B. cinerea* 72; *B. cinerea* 73 y *B. cinerea* 92 de *Botrytis cinerea*, resultó positiva en manzanas cv. Fuji, en las cuales se obtuvo variación en el tamaño de la lesión entre los aislados, al igual así hubo diferencias en los síntomas con los aislados, de las distintas especies. El rango de lesión fue de 11,9 mm. a 63,4 mm. en manzanas del cultivar Fuji, después de 7 días inoculados a 20°C. Las manzanas inoculadas con los aislados de *B. cinerea* resultaron presentar los mismos síntomas de pudrición calicinal que en la literatura se nos presentan, estos fueron: color pardo claro a oscuro y una pudrición blanda al tacto, con distinta profundidad de lesión dependiendo el aislado.

Los re aislamientos resultaron positivos a *Botrytis cinerea*, los que concordaban con los aislados puros extraídos desde flores de manzanas.

Según los resultados del Cuadro 4.5, podemos indicar que la interacción entre el factor aislado y el factor tipo de inóculo si fue significativa ($P < 0,0029$). Es por esto que los factores no pueden verse independiente uno de otro, se aprecia que estadísticamente los que tuvieron mayor diámetro de lesión fueron el *B. cinerea* 72 y *B. cinerea* 92 con diámetros de lesión promedio, más altos en inoculación con conidias, lo que conlleva que algunos aislados se comportaron de manera diferente en la virulencia, sobre el tipo de inóculo utilizado sobre manzanas cv. Fuji.

El factor tipo de inóculo no fue significativo ($P < 0,0729$) siendo similar en la virulencia entre los aislados en las manzanas, ya sea con la aplicación de conidias o micelio sobre la superficie de estas. Pero a pesar que no hubo diferencias significativas entre el tipo de inóculo, en inoculación con conidias el diámetro fue mayor que en inoculación con micelio.

También se puede apreciar que las inoculaciones en los testigos, no presentaron síntomas y fueron significativamente distintos al resto de los aislados, esto es debido a que al ser testigo no hubo diámetro de lesión.

Cuadro 4.5 Tamaño de la lesión promedio (mm) por la inoculación con conidias y micelio de especies de *Botrytis* en manzanas cv. Fuji, después de 7 días a 20°C en cámara húmeda.

Aislado	Diámetro de la lesión promedio (mm)		Media
	Micelio	Conidias	
	Cv. Fuji		
<i>B. cinerea</i> 2	14,8 c	17,7 c	16,2
<i>B. cinerea</i> 15	27,6 abc	20,2 bc	23,9
<i>B. cinerea</i> 72	38 abc	59,6 ab	48,8
<i>B. cinerea</i> 92	16,5 c	63,4 a	40
<i>B. cinerea</i> 4	11,9 c	21,4 bc	16,7
<i>B. cinerea</i> 73	22,2 bc	0 c	11
Media	21,82	36,45	
Andeva	gl	Valor - p	
Aislado(A)	6	0,0001	
Tipo de inóculo(T)	1	0,0729	
A x T	6	0,0029	

Promedios con la misma letra en cada columna, no difieren estadísticamente según la prueba de rango múltiple Tukey, ($p \leq 0,05$). n.s.= no significativo; * = significativo ($p \leq 0,05$) y **= altamente significativo ($p \leq 0,01$).

La patogenicidad utilizando micelio y conidias en los 6 aislados de *Botrytis cinérea*, resultó positiva en manzanas cv. Cripps pink, en las cuales se obtuvo diferencias significativas en el tamaño de la lesión entre los aislados, por lo tanto se cumplió los postulados de Koch. El rango de lesión fue de 11,83 mm. A 68,52 mm. en manzanas del cultivar Cripps Pink, después de 7 días inoculados a 20°C. Las manzanas inoculadas con los aislados de *B. cinérea* resultaron presentar los mismos síntomas de pudrición calicinal que en la literatura se nos presentan, estos fueron: color pardo claro a oscuro y una pudrición blanda al tacto, en la cual la profundidad de la lesión dependía de la patogenicidad del aislado.

Según los resultados del Cuadro 4.6, podemos indicar que la interacción entre el factor aislado y el factor tipo de inóculo no fue significativa ($P=0,1604$). Por lo tanto, independiente del aislado, al observar el factor tipo de inóculo, no muestra diferencias significativas en la presencia de *B. cinerea* entre los tipos de inóculo, debido a que estadísticamente micelio y conidias son iguales. ($P < 0,0077$).

En Manzanas Cripps Pink, como se aprecia en el cuadro 4.6, el factor aislado, fue estadísticamente significativo ($P < 0,0000$), lo que conlleva que los aislados son distintos, en la forma de expresar su virulencia en las manzanas. Algunos de los aislados más agresivos en su forma de expresión de patogenicidad, fueron los aislados B. cinerea 72 y B. cinerea 92, que concuerdan con los aislados de mayor virulencia en el cultivar Fuji. Siendo el aislado B. cinerea 73, el que tuvo la lesión más pequeña del estudio con lesión de 11,83 mm.

También se puede apreciar que las inoculaciones en los testigos, no presentaron síntomas, por esto fueron estadísticamente diferentes de los otros aislados del estudio, ya sea en inoculación con conidias o con micelio.

Los re aislamientos resultaron positivos a *Botrytis cinérea*, los que concordaban con los aislados puros extraídos desde flores de manzanas.

El factor tipo de inóculo no fue significativo ($P < 0,0717$) siendo similar en la virulencia entre los aislados en las manzanas, ya sea con la aplicación de conidias o micelio sobre la superficie de estas.

Cuadro 4.6 Tamaño de la lesión promedio (mm) por la inoculación con conidias y micelio de especies de *Botrytis* en manzanas cv. Cripps Pink, después de 7 días a 20°C en cámara húmeda.

Aislado	Diámetro de la lesión promedio (mm)		
	Micelio	Conidias	Media
Cv. Cripps Pink			
<i>B.cinerea</i> 2	46,095	27,61	36,85 c
<i>B.cinerea</i> 15	51,49	36,33	43,91 bc
<i>B.cinerea</i> 72	68,52	49,16	58,84 ab
<i>B.cinerea</i> 92	63,99	67,28	65,64 a
<i>B.cinerea</i> 4	26,73	30,01	28,37 cd
<i>B.cinerea</i> 73	24,71	11,83	18,27 d
media	46,92 a	37,03 b	
Andeva	gl	Valor - p	
Aislado(A)	6	0,0001	
Tipo de inóculo(T)	1	0,0082	
Ax T	6	0,2264	

Promedios con la misma letra en cada columna, no difieren estadísticamente según la prueba de rango múltiple Tukey, $p \leq 0,05$). n.s.= no significativo; * = significativo ($p \leq 0,05$) y **= altamente significativo ($p \leq 0,01$).

4.6. Patogenicidad en flores

La patogenicidad en los 6 aislados de *Botrytis cinérea* y 6 de *Botrytis* sp1. resultó positiva en manzanas cv. Cripps Pink y Fuji, en las cuales se obtuvo diferencias significativas en la incidencia entre los aislados. El rango de incidencia estuvo entre el 25% al 100% de incidencia.

Las flores inoculadas con los aislados de *B. cinérea* resultaron presentar los mismos síntomas de atizonamiento floral, que las flores de donde fueron extraídos los aislados que concordaban con los síntomas y signos de *Botrytis cinerea*, en cuanto a los síntomas de la especie *Botrytis* sp1. también se obtuvieron en flores de patogenicidad, los mismos síntomas y signos que se obtuvieron con las flores de donde se extrajeron los aislados.

Según los resultados del Cuadro 4.7, podemos indicar que la interacción entre el factor aislado y el factor cultivar no fue significativa ($P < 0,1983$). Por lo tanto, independiente del cultivar, al observar el factor aislados, no muestra diferencias significativas en la presencia de *B. cinerea* entre ambas variedades, debido a que estadísticamente Cripps Pink y Fuji son iguales ($P = 0,9827$), pero si se muestran diferencias entre los aislados.

En flores Cripps Pink, como se aprecia en el cuadro 4.7, el factor aislado, fue estadísticamente significativo ($P < 0,0001$), lo que conlleva que los aislados son distintos, en la forma de expresar su patogenicidad en las flores. Algunos de los aislados más agresivos en su forma de expresión de virulencia, fueron los aislados *B. cinerea* 72 y *B. cinerea* 15, *B. cinerea* 73 y *B. cinerea* 4, con un 100% de incidencia de *B. cinerea*. Los aislados con menor incidencia fueron los aislados inoculados con HB 3, HB 85, HB 83, HB134, HB 98 y HB 77. Siendo el aislado del testigo con un 25 %de incidencia y el aislado HB 3 con un 77,5 % de incidencia, los que menores porcentajes alcanzaron en flores Cripps Pink.

En flores Fuji, como se aprecia en el cuadro 4.7 el factor aislado, fue estadísticamente diferente, pero solo al realizar una aneova, con los aislados de un solo cultivar, en este caso Fuji, lo que conlleva es que los aislados evaluados en el cv. Fuji son diferentes en su patogenicidad en flores. Algunos de los aislados más agresivos en su forma de expresión de virulencia, fueron los aislados *B. cinerea* 73, *B. cinerea* 4, *B. cinerea* 92 y *B. cinerea* 15 con un 100% de incidencia de *B. cinerea*. Los aislados con menor incidencia fueron los aislados inoculados con HB 134, HB 98, HB 83, HB 77. Siendo el aislado del testigo con un 70 % de incidencia y el aislado HB 77 y HB 83 con un 75 % de incidencia los que menores porcentajes obtuvieron en flores Fuji.

Cuadro 4.7 Prueba de patogenicidad en flores, en la cual se muestra a continuación el porcentaje de incidencia de atizonamiento floral, positivos a la presencia de *Botrytis* spp. con distintos aislados (%).

Aislado	Incidencia de atizonamiento en flores (%)		Media
	Cv. Fuji	Cv. Cripps Pink	
B. cinerea 2	97,5	97,5	97,5 ab
B. cinerea 15	100	100	100 a
B. cinerea 72	97,5	100	98,8 ab
B. cinerea 92	100	97,5	98,8 ab
B. cinerea 4	100	100	100 a
B. cinerea 73	100	100	100 a
Botrytis sp.1 134	77,5	82,5	80 ab
Botrytis sp.1 85	80	80	80 ab
Botrytis sp.1 3	82,5	77,5	80 b
Botrytis sp.1 98	77,5	85	81,3 b
Botrytis sp.1 83	75	82,5	78,8 b
Botrytis sp.1 77	75	92,5	83,8 ab
Testigo	70	25	47,5 c
media	87,1	86,2	
Andeva	Valor - p	gl	
Aislado(A)	0,0000	12	
Cultivar (C)	0,9827	1	
Ax C	0,1983	12	

Promedios con la misma letra en cada columna, no difieren estadísticamente según la prueba de rango múltiple Tukey, ($p \leq 0,05$). n.s.= no significativo; * = significativo ($p \leq 0,05$) y **= altamente significativo ($p \leq 0,01$).

5. DISCUSIÓN

Basado en las características morfológicas observadas en flores, luego de la incubación en cámaras húmedas y aisladas posteriormente, el agente causal se identificó como *Botrytis cinerea*. Los caracteres de morfología visto fueron una esporulación gris, con micelio y conidióforos ramificados erectos abundantes, que eran de color marrón claro hacia el ápice, en la superficie, los que concuerdan con la identificación descrita por Latorre, (1994) y Ferrada, (2016). Los síntomas en flores, se dieron inicio como pequeños moteados de color marrón claro en los pétalos, como se puede apreciar en la figura 4.1, también como lo describe E. Ferrada (2016) en sus resultados de especies y distribución de *Botrytis* y consistente con los resultados de Fourie et al. (2002), en vid. Estas lesiones se propagaron rápidamente y finalmente afectaron a los pétalos enteros, en las cuales luego de la evaluación a los 7 días, se apreciaba la aparición de moho gris en la superficie de todas las estructuras, asociado a *Botrytis cinerea*, que también se dio en el estudio de Ferrada et al., (2016).

Por otro lado se pudo apreciar que existía otra especie, a la que se le asignó el nombre de *Botrytis* sp. 1 que podría estar asociada a la especie de *Botrytis prunorum*, la cual concuerda con los síntomas y signos encontrados por E. Ferrada (2016) en sus estudios, los cuales fueron la esporulación de micelio de color blanquecino a amarillo, más esponjoso que los aislados de *B. cinerea*, pero con menor esporulación, y un menor número de conidias, además en ambas especies se produjeron esclerocios negros irregulares u ovoides en los aislados en placas con APDM, también esta especie fue menos virulenta en comparación con *Botrytis cinerea*.

La detección temprana de infecciones latentes de fitopatógenos, en flores, las cuales podrían llegar a ser las causales de las enfermedades en cosecha y poscosecha, pueden causar pérdidas en fruta u hortalizas, es por esto, que es primordial para realizar manejos y segregación de los productos, el tener datos de cuantificación e identificación de enfermedades fungosas en floración, para así poder realizar manejos adecuados. Es por lo anteriormente mencionado que la detección temprana utilizando compuestos herbicidas como paraquat y tratamientos de temperatura han sido utilizados en varios productos agrícolas con el propósito de conocer los hongos presentes (Biggs, 1995; Cerkauskas et al., 1980; Holz et al., 2003; Sanzani et al., 2011).

Por lo anteriormente mencionado es que en el estudio de los métodos de detección latente de *Botrytis cinerea*, el congelamiento fue el método que mayor incidencia obtuvo en la detección

de infecciones latentes, esto puede ser debido a que al exponer una estructura a una temperatura baja de -20°C , el frío que se le está aplicando induce la senescencia en el tejido al cual se le aplica el frío prolongado, esto facilita la entrada y desarrollo del ataque de diferentes patógenos, como lo indica Sanzani et al., (2011), que realizó experimentos, en el tejido de la fruta, expuesta a temperaturas inferiores a 0°C , induciendo enfermedades en ellas, por la ruptura de las membranas, por lo cual podríamos basarnos en el mismo principio.

Además como indica Sanzani et al., (2011), este patógeno puede perdurar a muy bajas temperaturas, por lo que aumenta las posibilidades de que penetren los tejidos dañados, estando en un estado de latencia, hasta encontrar las condiciones óptimas que fueron dadas en las cámaras húmedas, luego de la exposición al frío. Por otro lado una vez que las condiciones de humedad y temperatura son las óptimas, las conidias posadas en las estructuras florales, producto de la diseminación en el campo, germinan, donde se han posado sobre la estructura, se hidratan y fijan (primera etapa) a la superficie del huésped (Cotoras y Silva, 2005; Doss et al., 1995), lo que conlleva a que formen un tubo germinativo único o ramificado, a menudo con un apresorio en la parte distal (Viret et al., 2004). Este apresorio facilita la unión (segunda etapa) y la penetración activa (directa) de las superficies del huésped intactas por medio de hifas penetrantes que le dan las condiciones óptimas para el crecimiento, esto en condiciones naturales, sucede en el estado fenológico de floración en los manzanos, que están expuestos a temperaturas y condiciones de humedad propicias para iniciar el ciclo biológico de *B. cinerea*, además de tener tejidos senescentes como estambres, pistilos y pétalos que con la formación del fruto, van cayendo de a poco, siendo esto esencial en la entrada al fruto de la infección.

En cuanto al método de detección de infecciones latentes el método del Herbicida de paraquat 1ppm, fue inferior en el porcentaje de incidencia en flores, respecto a congelamiento -20°C , pero mayor que en agua estéril, esto concuerda con lo propuesto por Holz et al., (2003) que dice en sus primeros estudios que la congelación es mucho más efectiva que el paraquat en la detección de infecciones latentes y también concuerda con Sanzani et al., (2011), que menciona que las infecciones de moho gris se desarrollan un 40 % más rápido en racimos de uva cv. Red glove sometidos a congelación, que los racimos con paraquat y los no tratados, por tanto los resultados de este estudio concuerdan con la literatura mencionada anteriormente, en que el congelamiento promueve el desarrollo precoz de poblaciones de *Botrytis cinerea*, en mayor cantidad y mayor rapidez.

Los resultados de incidencia en paraquat 1ppm, a pesar que no son mayores que los obtenidos en el método con congelamiento -20°C por 2 horas, concuerda con los datos de incidencia obtenidos por Perez, (2018), en el cual encontró que el método de detección de paraquat a 500 ppm en frutos, fue el que mayor incidencia produjo en manzanas, con promedios de un 60-95%,

lo que está en el rango de incidencia obtenidos en este estudio con paraquat a 1ppm en flores, lo que sí, hubo valores más bajos en algunas localidades y variedades, que puede deberse a una menor cantidad de inóculo de infecciones latentes. Esto también puede haber sido causado por la baja concentración de paraquat usada en flores, lo que sí es correcto hacer, debido a que los tejidos de las flores son mucho más sensibles a sufrir daños por la toxicidad del herbicida paraquat, el cual afecta a la membrana de la células vegetales, causando un daño al proceso fotosintético por alterar los flujo de electrones en el fotosistema I y II, provocando así una peroxidación lipídica de los tejidos (Dodge y Harris, 1970). Por lo mencionado anteriormente es que el patógeno penetra más fácilmente en las estructuras florales, debido a que son tejidos con las paredes más delgadas que las hojas, que las protege una cutícula gruesa o la epidermis de una manzana, como lo menciona Ngugi y Scherm, (2006).

El uso de congelamiento -20°C por 2 horas, para inducir la presencia prematura de *B. cinerea* desde flores de distintos cultivares, es una herramienta de fácil implementación para predecir el desarrollo de infecciones latentes, por lo tanto, pudiendo segregar fruta con distintos niveles de poblaciones de *B. cinerea* (estimar potenciales pérdidas) posterior al crecimiento del fruto, es así, que es una buena forma para confirmar la eficacia de fungicidas en las especies encontradas antes que se expresen en frutos, realizando los tratamientos para disminuir la carga de inóculo en floración y estudiar la epidemiología de diversas enfermedades, antes que la enfermedad se exprese en los frutos en cosecha o poscosecha.

En cuanto a las estructuras florales observadas en este estudio, la que tuvo mayor incidencia de *Botrytis cinerea*, en cuanto a los métodos de detección de infecciones latentes fueron los pistilos, seguido de estambres, pétalos y al final sépalos. Los porcentajes de incidencia en pistilos en casi todo el estudio, estuvieron por encima del 79 %, hasta el 100% de incidencia, seguido de estambres con un 72% a un 92%, lo que pudo deberse a que son las primeras estructuras florales en senescer a medida que pasa el tiempo, siendo estos un reservorio de inóculo de patógenos en condiciones de campo, como lo indica Pezet y Pont (1986), en su estudio en flores, de infecciones latentes en *Botrytis cinerea* en *vitis vinífera* (var. Gamay), en las cuales encontró que en estambres y pistilos la incidencia superó el 65 %, en estudios de laboratorio, al aplicarles congelamiento a las estructuras, también detectaron que en las flores que encontraron *B. cinerea* en el laboratorio, los frutos que se produjeron de esos lotes de flores que quedaron en los árboles, tuvieron valores similares de incidencia de *B. cinerea*, en frutos cosechados y almacenados, por lo que estos métodos de detección podrían ser una herramienta valiosa para el diagnóstico temprano y preciso del patógeno en distintos productos agrícolas y podría ser extremadamente útil para los productores, no solo para elegir

los lotes menos contaminados para ser almacenados o enviados por mucho tiempo, sino también para aplicar de manera adecuada y oportuna los medios de control disponibles, ya sea químico, cultural o biológico.

La infección latente de *Botrytis* spp. podría darse debido a que las flores al senescer, los pistilos, estambres y sépalos permanecen adheridos a algunos tipos de frutos y las conidias que lograron posarse en las estructuras ya sea por el viento, el agua o algunos insectos que se posaron en la flor, se mantienen en estado de latencia hasta cuando el fruto aumenta su contenido de azúcar acercándose a la maduración e incluso cuando ya están en almacenaje. Esto lo confirma McClellan and Hewitt, (1973), que realizaron pruebas con cada uno de los exudados de las estructuras florales, en las que se intentaba germinar conidias de *B.cinerea*, en estos exudados, en distintas etapas fenológicas de la vid, dando como resultado que las conidias no germinaban cuando los exudados se encontraban en etapas donde el fruto aun no maduraba. Es por esto antes mencionado es que existe la posibilidad de las enfermedades en latencia, y también que coexistan varios patógenos, es posible, debido a que, en los aislados obtenidos desde flores, se tuvieron múltiples patógenos tales como *B. cinerea*, *Alternaria alternata*, *Botryosphaeria dothidea*, *Fusarium* spp. *Phomopsis* spp. y *Penicillium* spp. que coincide con los encontrados en los estudios de Biggs, (1995); Cerkauskas et al., (1980); Holz et al., (2003), en donde al aislar se obtuvieron distintos patógenos, no solo *B. cinerea*.

En relación a la patogenicidad en frutos cv. Cripps Pink y cv. Fuji, hubo diferencias significativas en relación a los aislados, a pesar que tuvieron todas las mismas condiciones al ser cultivados, de tipo de agar, temperatura, humedad relativa y exposición a la luz, esto indica que tuvieron diferencias en sus grados de patogenicidad o virulencia al expresarse en frutos, estas diferencias de crecimiento de diámetro (mm.) pueden ser debido a lo que explica Tortora et al. (1994), expone que dentro de una misma población existe una alta variabilidad genética que explicaría las diferencias de áreas de crecimiento de los aislados. Por tanto es necesario seguir realizando estudios de esta temática con mayor profundidad de manera tal de conocer más a las poblaciones locales predominantes de *Botrytis* y así lograr manejarlas más eficazmente.

Por otro lado las mayores lesiones en diámetro (mm) de las pudriciones en frutos, se dieron en el cultivar Cripps Pink, en cambio en las manzanas del cultivar Fuji las lesiones fueron significativamente menores, esto puede ser debido a lo explica Spotts et al., (1999), respecto a los cvs. Fuji y Granny Smith los cuales han sido descritos como cultivares que poseen alta

resistencia a la rotura de la epidermis, lo que podría dificultar la degradación de los tejidos epidérmicos por parte de patógenos, produciéndose una descomposición más lenta de la fruta.

Respecto a la prueba de patogenicidad en flores, esta obtuvo diferencias significativas, en la patogenicidad de los aislados, esto puede ser debido a la variabilidad genética que existe entre las poblaciones de aislados como menciona Tortora et al. (1994), pero la diferencia significativa se puede apreciar respecto al aislado testigo del estudio, no se observan diferencias altamente significativas entre aislados de *B. cinerea*, con los aislados de *Botrytis* sp. 1 que se asocia a *B. prunorum*, en el cultivar Cripps Pink y en el cv. Fuji, respecto al porcentaje de incidencia en flores. Pero aunque la estadística no realice diferencias respecto a un aislado de otro, se puede decir de todas formas, que la prueba de patogenicidad fue positiva en flores de manzano, esto indica que el manzano podría ser un hospedero de otras especies de *Botrytis*, tales como *B. prunorum* (E. Ferrada, 2018, Comunicación Personal), en el cual podría coexistir en simpatria causando el atizonamiento floral en floración y luego la pudrición calicinal en frutos.

Seguido a lo mencionado anteriormente, es que los porcentajes de incidencia de los aislados inoculados en flores en ambos cultivares no fueron estadísticamente diferentes. Otra perspectiva de porque la especie de *Botrytis* sp1. fue menor en porcentaje de incidencia, es debido en parte, a que posee una baja producción de conidias, la cual es la principal estructura de inóculo y dispersión de *Botrytis* (Holz et al., 2004) y tiene una tasa de crecimiento relativamente lenta, que reduce la agresividad de este patógeno en comparación con *B. cinerea*, como lo menciona Coley-Smith, (1980).

Este estudio de los métodos de detección temprana permiten conocer el potencial de inóculo de una determinada muestra vegetal y tomar decisiones de manejo en pre y poscosecha, para así poder realizar labores para reducir la incidencia de enfermedades fungosas causantes de pérdidas económicas en manzanos. Es por esto si centramos nuestras investigaciones venideras en identificar las infecciones latentes en flores, de distintos huéspedes que hallan en la zona, se podrán atacar, de forma efectiva, además de poder realizar manejos culturales, químicos y biológicos en conjunto, que beneficien tanto los retornos comerciales del productor, como el medio ambiente.

6. CONCLUSIONES

En relación a los resultados obtenidos en este estudio se concluye que:

En flores, el tratamiento más efectivo para la detección de infecciones latentes causadas por *Botrytis cinerea*, fue congelamiento a -20°C y además fue el más rápido para la observación de síntomas de *Botrytis cinerea* en flores.

El 95,6 % de los Fitopatógenos aislados desde manzanas cvs. Cripps Pink y Fuji, con síntomas de atizonamiento, resultaron corresponder al género *Botrytis*.

Los aislados de *Botrytis* spp. pudieron ser diferenciados en dos grupos: de alto grado de esporulación (76%) y de bajo grado de esporulación (24%). Los aislados con alto grado de esporulación pudieron asociarse morfológicamente a la especie *B. cinerea*. Los aislados de bajo grado de esporulación corresponderían a otra especie de *Botrytis*, por confirmar.

Todos los aislados fueron patogénicos en manzanas cv. Fuji y Cripps Pink, además de ser patogénicos en flores de los cultivares antes mencionados.

7. CITAS BIBLIOGRAFICAS

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

AFIPA, 2007. Manual fitosanitario. 2006-2007. Asociación nacional de fabricantes e importadores de productos de plaguicidas agrícolas A. G. p. 412.

Agrios, G. 1998. Fitopatología 3ra Edición. Editorial Limusa, México. p. 1-819.

Álvarez, M., Pinilla, B., Herrera, G. 2004. Enfermedades del Manzano. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, (INIA). Ministerio de agricultura. Chile: La platina. p. 71.

Arancibia, A. 2003. Efectividad del 1-MCP sobre el control de hongos Fitopatógenos en poscosecha de manzanas. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca. Talca, Chile. p. 45.

Bayer, 2010 .Descripción de productos comerciales. Recuperado en http://www.bayercropscience.cl/soluciones/ficha_producto.asp?id=93. Consultado el: 20 de noviembre 2016.

Bravo, M. 2013. Manzanas: una temporada de alto valor de exportaciones. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile. p.13.

Biggs, A. 1995. Detection of latent infections in apple fruit with paraquat. Plant Disease 79:1062-1067.

Clavijo, M., Cruz, E. 1997. Control químico de *Botrytis cinerea* Pers. En clavel miniatura y evaluación de un método de predicción de la enfermedad en un cultivo comercial. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional. Bogotá.

Cerkauskas, R. and Sinclair, J. 1980. Use of paraquat to aid detection of fungi in soybeans tissues. Phytopathology 70:1036-1038.

Coley-Smith, J. R. 1980. Sclerotia and other structures in survival. Pages 85-114. In: J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff, and W. R. Jarvis, eds. The Biology of *Botrytis*. Academic Press, United Kingdom.

Cotoras, M., and E. Silva. 2005. Differences in the initial events of infection of *Botrytis cinerea* strains isolated from tomato and grape. Phytopathology 97:485-492

Díaz, G. A., Zoffoli, J.P., Lolas, M., Blanco, A., Latorre, B. A., Ferrada, E. E., Elfar, K., y Naranjo, P. 2016. Occurrence of *Phacidopycnis washingtonensis* causing speck rot on stored Pink Lady apple fruit in Chile. *Plant Disease* 100: 211-212.

Dirección General de Relaciones Económicas Internacionales. Ministerio de Relaciones Exteriores, Chile (Ed.) 2009, noviembre. Chile, 20 años de negociaciones comerciales. Santiago, Chile: DIRECOM (Edición 2009). p. 19.

Dodge, A. D., and Harris, N. 1970. The mode of action of paraquat and diquat. *Biochemical Journal* 118(3): 43-44.

Doss, RP., SW Potter, AH. Soeldner, JK Christian, LE Fukunaga. 1995. La adhesión de *Botrytis cinerea*, *Appl. Env. Microbiol.* 61: 260-265.

Farías, E. 2009. Expresión de manejos de huerto en la calidad de los kiwis en poscosecha. *Revista Frutícola*. Agosto 2009 (2): 40-43.

Ferrada, E., Latorre, B., Zoffoli, J. and Castillo, A., 2016. Identification and characterization of *Botrytis* blossom blight of Japanese plums caused by *Botrytis cinerea* and *B. prunorum* sp. nov. in Chile. *Phytopathology* 106:155-165.

Fourie, J.F., and Holz, G. 1994. Infection of plum and nectarine flowers by *Botrytis cinerea*. *Plant Pathol.* 43: 309-315.

Henriquez, J. L. 2005. First report of apple rot caused by *Neofabraea alba* in Chile. *Plant Disease* 89:1360-1360.

Holz, G., Gütschow, M., Coertze, S. and Calitz, F. 2003. Occurrence of *Botrytis cinerea* and subsequent disease expression at different positions on leaves and bunches of grape. *Plant Disease* 87:351-358.

Jones, A. J. y Aldwinckle. 2002. Plagas y enfermedades del manzano y del peral. The American Phytopathological Society. España: Ediciones Mundi-Prensa. p. 99.

Kim, K., Min, J., and Dickman, M. B. 2008. Oxalic Acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Molecular plant-microbe interactions* 21:605-612.

Latorre, B. A., y Toledo, M. V. 1984. Occurrence and relative susceptibility of apple cultivars to *Botryosphaeria* canker in Chile. *Plant Disease* 68: 3-36.

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

Lolas, M. 2005. Enfermedades de verano en manzanas Pink Lady (Bol. Tec. N°2), Centro de Pomáceas de la Universidad de Talca. Talca, Chile. 4 p. Recuperado en: <http://pomaceas.otalca.cl/html/Docs/pdf/20050502.pdf>. Consultado el: 25 de octubre 2016.

Lolas, M. y Diaz, G. 2016. Enfermedades de pre y post cosecha en manzanos (Bol. Tec. N°16), Centro de Pomáceas de la Universidad de Talca. Talca, Chile. 2-7 p. Recuperado en: <http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/enfermedades-pre-y-pos-cosecha.pdf>. Consultado el: 20 de diciembre 2017.

Luo, Y. and Michailides, T. J. 2003. Threshold conditions that lead latent infection to prune fruit rot caused by *Monilinia fructicola*. *Phytopathology* 93:102–111.

Morales, A. 1982. Pudriciones en fruta de exportación y mercado interno. *Revista Frutícola*. (3):83-85.

Montealegre, J. R. 1987. Pudrición de la cavidad calicinal en peras. *Revista Frutícola*. (8)2:57-58.

Navarro, M., y Ramírez, J. 2010. Especial obtención de fruta de calidad. *Revista Frutícola* 2:4-9.

Ngugi, K. and Scherm, H. 2006. Biology of Flower-Infecting Fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 261-282.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Ministerio de Agricultura, Chile (Ed.). 2011, octubre. Mercados agropecuarios. (Bol. Sem. N° 231), Santiago, Chile: ODEPA. p. 16.

Oficina de estudios y políticas agrarias (ODEPA). Ministerio de agricultura, Chile (Ed.). 2012, enero. Panorama de la agricultura Chilena. Santiago, Chile: ODEPA (Edición 2012). 127p.

Oficina de estudios y políticas agrarias (ODEPA). Ministerio de agricultura, Chile (Ed.). 2015a. Superficie plantada nacional, regional, número de huertos e infraestructura frutícola. Recuperado en <http://www.odepa.cl/wp-content/uploads/2013/03/Superficie-plantada-nacional.xlsx>. Consultado el: 25 de Octubre 2016.

Oficina de estudios y políticas agrarias (ODEPA). Ministerio de agricultura, Chile (Ed.). 2015b. Catastro frutícola principales resultados Región del Libertador General Bernardo O'Higgins.

Julio 2015. Recuperado en <http://www.odepa.cl/wp-content/uploads/2015/09/CF-VI-Region-2015.pdf> Consultado el: 25 de Octubre 2016.

Oficina de estudios y políticas agrarias. Ministerio de agricultura. Chile (Ed.). 2015. Catastro frutícola principales resultados Región del Maule/junio 2015. Recuperado en http://www.odepa.cl/wp-content/uploads/2015/09/catastro_Maule_junio2015.pdf. Consultado el: 25 de Octubre 2016.

Oficina de estudios y políticas agrarias. Ministerio de agricultura. Chile (Ed.). 2016. Catastro frutícola principales resultados Región del Maule/junio 2016. Recuperado en <http://www.odepa.gob.cl/catastros-de-superficie-fruticola-regional/>. Consultado el: 20 de diciembre 2017.

Pérez, D. 2018. Detección temprana de *Botrytis cinerea* desde frutos de manzanas obtenidos en cosecha y poscosecha en la Región del Maule. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca. Talca, Chile. 35h.

Pezet, R., and V. Pont. 1986. Infection florale et latence de *Botrytis cinerea* dans les grappes de *Vitis vinifera* (var. Gamay). Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.18:317–322.

Pezet, R., O. Viret, C. Perret, and R. Tabacchi. 2003. Latency of *Botrytis cinerea* Prs.:Fr. and biochemical studies during growth and ripening of two grape berry cultivars, respectively susceptible and resistant to grey mould. J. Phytopathology.151:208-214.

Pinilla, B. 2013a. Principales enfermedades de las pomáceas. (Bol.Tec nº5), Centro de Pomáceas de la Universidad de Talca. Talca, Chile.6p. Recuperado en http://pomaceas.otalca.cl/html/Docs/pdf/Boletin_Septiembre2013.pdf. Consultado el: 25 de Octubre 2016.

Pinilla, B. 2013b. Principales enfermedades de las pomáceas. (Bol.Tec nº5), Centro de Pomáceas de la Universidad de Talca. Talca, Chile.6p. Recuperado en http://pomaceas.otalca.cl/html/Docs/pdf/Boletin_Septiembre2013.pdf. Consultado el: 25 de Octubre 2016.

Pinilla, B., Álvarez, M. 2002. Estudios epidemiológicos de la “pudrición calicinal” de las pomáceas causadas por *Botrytis cinerea*. XI Congreso Nacional de Fitopatología resúmenes. Santa Cruz, Chile. p.47.

- Pinilla, B. 2014. Manejos fitopatológicos de invierno en frutales. Revista Redagícola 61. p. 26-27.
- Pinilla, B., y Álvarez, M. 1998. Pudrición en cámaras frigoríficas. Revista Tierra Adentro 22. p. 10-13.
- Pinilla, B., Alvarez, M., y Villafranca, J. 1998. Efecto del tratamiento por hidrocooler sobre la incidencia de la pudrición calicinal causada por *Botrytis cinerea* en manzanos cv. Royal Gala. En: Congreso Chileno de la Manzana. Universidad de Talca. Chile. p. 109-110.
- Saito, S., Margosan, D., Michailides, T., and Xiao, C. L. 2016. *Botrytis californica*, A new Cryptic species in the *B. cinerea* species complex causing gray mold in blueberries and table grapes. Phytopathology 108: 330-343.
- Sanzani, S., Schena, L., De Cicco, V., and Ippolito, A., 2011. Early detection *Botrytis cinerea* latent infections as a tool to improve postharvest quality of table grapes. Postharvest Biology and Technology. 68:64-71.
- Soto-Alvear, S., Lolas, M., Rosales, I. M., Chávez, E. R., y Latorre, B. A. 2013. Characterization of the bull's eye rot apple in Chile. Plant Disease 97:485-490.
- Spotts, R., Cervantes, L. and Mielke, E. 1999. Variability in postharvest decay among apple cultivars. Plant Disease 83(11): 1051-1054.
- Tortora, A., L. Ciampi and S. González. 1994. Características culturales y biológicas en cepas de *Botrytis cinerea* Pers. Ex FR, aisladas en la IX y X regiones. Agricultura Técnica (Chile) 54(3): 243-251.
- Viret, O., M. Keller, VG Jaudzems y FM Cole. 2004. Infección de *Botrytis cinerea* de uva de uva: estudios de luz y microscopía electrónica de infecciones. Phytopathology 94: 850-857