

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**USO DE BACTERIAS PSICROTOLERANTES DE ORIGEN ANTÁRTICO PARA EL  
CONTROL BIOLÓGICO DE *PHLYCTEMA VAGABUNDA* EN POSCOSECHA  
DE MANZANAS**

**POR**

**CAROLINA ISABEL ALBORNOZ ALBORNOZ**

**MEMORIA PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERA AGRÓNOMA.**

**CHILLÁN – CHILE  
2023**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**USO DE BACTERIAS PSICROTOLERANTES DE ORIGEN ANTÁRTICO PARA EL  
CONTROL BIOLÓGICO DE *PHLYCTEMA VAGABUNDA* EN POSCOSECHA  
DE MANZANAS**

**POR**

**CAROLINA ISABEL ALBORNOZ ALBORNOZ**

**MEMORIA PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERA AGRÓNOMA.**

**CHILLÁN – CHILE  
2023**

Aprobada por:

Profesor Asociado, Marisol Vargas C.  
Ing. Agrónomo, Dr.

---

Guía

Profesor Asociado, Macarena Gerding G.  
Ing. Agrónomo, Ph. D.

---

Asesor

Profesor Asociado, Ernesto Moya E.  
Ing. Agrónomo, Ph.D.

---

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.  
Ing. Agrónomo, Mg. Cs.

---

Decano

**TABLA DE CONTENIDOS**

	<b>Página</b>
Resumen.....	1
Summary.....	1
Introducción.....	2
Materiales y Métodos.....	4
Resultados y Discusión.....	11
Conclusiones.....	19
Referencias.....	20

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		<b>Página</b>
Figura 1	Cladograma del análisis de conglomerados de la inhibición del crecimiento micelial de <i>P. vagabunda</i> , mediante el uso de bacterias psicrotolerantes.....	12
Figura 2	Actividad de compuestos volátiles de aislados de bacterias psicrotolerantes sobre el número de colonias de <i>Phlyctema vagabunda</i> .....	14
Figura 3	Actividad antagonista de aislados de bacterias psicrotolerantes sobre el diámetro de crecimiento de <i>Phlyctema vagabunda in vitro</i> .....	15
Figura 4	Cladograma generado a partir de la reducción de la severidad de la enfermedad causada por <i>Phlyctema vagabunda</i> en manzanas, mediante el uso de bacterias psicrotolerantes.....	18
Figura 5	Actividad antagonista <i>in vivo</i> de dos aislados bacterianos psicrotolerantes frente <i>Phlyctema vagabunda</i> a 0 °C y 20 °C.....	19
Tabla 1	Aislados bacterianos extraídos de la rizósfera de muestras de <i>Deschampsia antarctica</i> y <i>Colobanthus quitensis</i> .....	6
Tabla 2	Efecto de distintos aislados de bacterias psicrotolerantes en la germinación conidial de <i>Phlyctema vagabunda</i> , incubadas a temperaturas de 0 °C y 18 °C por 20 y 5 días, respectivamente.....	14

## USO DE BACTERIAS PSICROTOLERANTES DE ORIGEN ANTÁRTICO PARA CONTROL BIOLÓGICO DE *PHLYCTEMA VAGABUNDA* EN POSCOSECHA DE MANZANAS

USE OF PSICROTOLERANT BACTERIA OF ANTARCTIC ORIGIN FOR BIOLOGICAL CONTROL OF *PHLYCTEMA VAGABUNDA* IN APPLE POSTHARVEST

**Palabras índice adicionales:** *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Malus domestica*, biocontrol.

### RESUMEN

*Phlyctema vagabunda* es el agente causal de la podredumbre ojo de buey, enfermedad que produce grandes pérdidas económicas en la poscosecha de manzanas. El control de la enfermedad es a través del uso de fungicidas sintéticos, pero el incremento en la preocupación por el uso de químicos y los efectos secundarios que estos puedan generar a través de los residuos que permanecen en la fruta, ha llevado a buscar alternativas para el control de enfermedades que sean libres de químicos, como el control biológico. El objetivo de esta investigación fue evaluar 23 cepas de bacterias psicrotolerantes previamente aisladas desde la rizósfera de plantas antárticas, para el control de *P. vagabunda* en poscosecha de manzanas. Se realizaron ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar la actividad antagonista de las bacterias sobre el patógeno. Las bacterias AG-157 y AG-161 correspondiente a *Pedobacter cryoconitis* y *Pseudomonas graminis* respectivamente, presentan actividad antagonista frente a *P. vagabunda* en condiciones *in vivo*, sin embargo, la cepa AG-157 fue la que presentó mayor actividad antagonista frente al patógeno, reduciendo la incidencia de la enfermedad en un 52 % y 69 %, cuando fue evaluado en fruta a 0 °C y a 20 °C, respectivamente.

### SUMMARY

*Phlyctema vagabunda* is the causative agent of bull's-eye rot, a disease that causes

major economic losses in post-harvest apples. The disease is controlled by the use of synthetic fungicides, but the increasing concern about the use of chemicals and the side effects that can be caused by the residues that will remain in the fruit has led to the search for alternatives for disease control that are free of chemicals, such as biological control. The objective of this research was to evaluate 23 previously isolated strains of psychrotolerant bacteria of Antarctic origin, for the control of *P. vagabunda* in apple postharvest. *In vitro* and *in vivo* tests were carried out to determine the antagonistic activity of the strains against the pathogen. The AG-157 and AG-161 bacterial strains, corresponding to *Pedobacter cryoconitis* and *Pseudomonas graminis* respectively, showed antagonistic activity against *P. vagabunda* under *in vivo* conditions. However, the strain AG-157 showed the greatest antagonistic activity against the pathogen, reducing the incidence of the disease in 52 % and 69 %, when evaluated in fruit at 0 °C and at 20 °C, respectively.

## INTRODUCCIÓN

El consumo mundial de manzana (*Malus domestica* Borkn) ha ido en aumento, en la temporada 2021- 2022 la producción mundial de manzana alcanzó los 83 millones de toneladas (USDA, 2023). Siendo China el principal exportador con 959.000 toneladas, seguido por Polonia con 921.000 toneladas e Italia con 920.000 toneladas (Trademap, 2022). Chile, en 2022, se posiciona en el quinto lugar a nivel mundial y principal exportador del hemisferio sur con 602.000 toneladas (Pefaur, 2023) y sus principales compradores en orden de importancia es Colombia, Estados Unidos y Países Bajos (ODEPA, 2023a). La superficie plantada de manzano en nuestro país alcanzó las 29.028 hectáreas en el año 2022, representando el 8 % de la producción frutícola total (ODEPA, 2023b). Los principales cultivares de manzana exportados desde Chile corresponden a 'Royal Gala', 'Granny Smith' y 'Richared Delicious' (ODEPA, 2023a).

La manzana se caracteriza por ser una fruta climatérica, tiene una alta producción de etileno lo que acelera el proceso de maduración y senescencia, por lo cual es primordial mantener una atmósfera de almacenaje adecuada en temperatura y humedad para impedir su deterioro y prolongar su vida útil. La manzana almacenada

a una temperatura de entre  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  puede permanecer hasta 6 meses, conservando sus características organolépticas (López, 2003). Lo que se espera al mantener la fruta almacenada es conservarla el tiempo suficiente para continuar comercializándola, aun cuando ya no es época productiva, y de esa manera lograr precios competitivos cuando el mercado este desabastecido. Para lograr el tiempo deseado de almacenaje es importante reducir al mínimo la incidencia de enfermedades que perjudiquen la producción. Las manzanas al estar almacenadas quedan expuestas a diversos patógenos que actúan en la poscosecha, estos patógenos generan grandes pérdidas económicas (Soto-Alvear *et al.*, 2013) y muchos de ellos no se presentan de inmediato, sino varios meses después de almacenadas.

*Phlyctema vagabunda*, sin. *Neofabraea vagabunda*, es un patógeno que actúa en la poscosecha. Fue descrito en Chile el año 2005, afectando principalmente a cultivares tardíos como 'Cripps Pink' (Henriquez, 2005). Desde ese año las pérdidas generadas por este hongo patógeno han ido en aumento. La forma de actuar del patógeno es a través de una infección en las lenticelas de los frutos, en donde se producen lesiones subcirculares formada por anillos concéntricos de color marrón claro y oscuro, redondos, ligeramente hundidos, siendo el perímetro externo de color más oscuro (Cameldi *et al.*, 2017). En condiciones de alta humedad se desarrollan acérvulos blanquecinos que rompen la epidermis y afloran liberando numerosas conidias. En campo, estas conidias, se diseminan por el salpicado de lluvia y se adhieren a la fruta, pero los síntomas recién se presentan después de tres a cuatro meses de almacenaje a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Neri *et al.*, 2009). Durante la poscosecha no existe contaminación entre las frutas almacenadas, pero las conidias se pueden redistribuir si la fruta se somete a algún proceso con agua. En Chile no se ha descrito el ciclo completo de la enfermedad. Estudios realizados en Europa y América del Norte, reportan que el patógeno habita en el árbol asociado a canchros, en forma epífita o colonizando madera muerta (Mondino *et al.*, 2009).

Para el control de *P. vagabunda*, una medida cultural que se recomienda es la eliminación de restos de poda, fruto de raleos y fruta madura dejada después de la cosecha, de esa forma se reduce la presencia del inóculo; aplicaciones de fungicidas en pre y poscosecha, como los productos a base de cobre que son ampliamente

utilizados (Agrios, 2011) pueden ser eficaces, al igual que el uso de fludioxonil y tiabendazol, cuando el patógeno se encuentre en las lenticelas del fruto (Soto *et al.*, 2012). Sin embargo, actualmente, debido a la mayor demanda existente por productos orgánicos, sobre todo en mercados exigentes como el europeo, se requiere que se comercialicen alimentos libres de residuos y químicos sintéticos, lo que hace muy atractiva la opción de poder controlar los patógenos con alternativas biológicas, naturales y de bajo impacto ambiental (Neri *et al.*, 2009; Urrea *et al.*, 2023).

Dentro de los diversos métodos de control biológico para enfermedades de poscosecha causadas por hongos, se han reportado estudios como el de Michaud (2004), que demostró que existen bacterias psicrófilas y psicrotolerantes capaces de desarrollar habilidades antagonistas frente a patógenos, debido a que producen una amplia variedad de compuestos, entre estos antibióticos, así como enzimas únicas que son activas a bajas temperaturas. Estas bacterias pueden desarrollarse a 0 °C, sin embargo, las bacterias psicrotolerantes pueden crecer sobre los 20° C, mientras que las psicrófilas a una temperatura máxima de 15 ° C (Gounot, 1986). Bacterias de este tipo, se encuentran en ambientes fríos como el del ecosistema antártico, donde son microorganismos predominantes, ya que han colonizado y desarrollado estrategias para poder sobrevivir frente a las diversas fluctuaciones físicas y químicas extremas a las que están expuestas (Shekh *et al.*, 2011; Contreras, 2011). De acuerdo con estos antecedentes, las bacterias psicrotolerantes de la Antártica podrían ser una alternativa para el control biológico de patógenos que se desarrollan a baja temperatura como lo es *P. vagabunda* en la poscosecha de manzanas.

Por lo antes señalado, el objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto antagonista de bacterias psicrotolerantes aisladas desde la rizósfera de plantas de la Antártica sobre el hongo *P. vagabunda*, evaluar la actividad antagonista *in vitro* a distintas temperaturas y evaluar la actividad antagonista *in vivo* a 20 °C y a 0 °C.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio fue realizado en el laboratorio de Fitopatología del departamento de Producción Vegetal de la Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción campus Chillán, Chile.

### **Patógeno y microorganismos antagonistas**

El patógeno fue obtenido desde la colección de microorganismos del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, Campus, Chillán.

Las bacterias psicotolerantes fueron obtenidas desde la colección de microorganismos del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía UdeC, Chillán. Estas bacterias fueron previamente aisladas desde plantas de *Colobanthus quitensis* y *Deschampsia antarctica*, colectadas en dos sectores de la Antártica marítima: Arctowski, (62° 9'40.60"S; 58°28'30.72"W, 62° 9'45.96"S; 58°28'14.29"W y 62° 9'44.72"S; 58°28'11.51"W) y Coppermine (62°24'S; 59°30'W) (Reyes, 2018), y se mantienen criopreservadas en glicerol al 80 % a -80 °C. En estudios previos se demostró su actividad promotora de crecimiento vegetal (Styczynski *et al.*, 2022).

### **Preselección de bacterias psicotolerantes con actividad antagonista**

Se utilizaron un total de 23 cepas de bacterias psicotolerantes disponibles en la colección (Tabla 1). Para evaluar el efecto antagonista de las bacterias frente al hongo patógeno *P. vagabunda*, se utilizó el ensayo *in vitro* de cultivos duales, como se describe en trabajos similares, con modificaciones (Santos *et al.*, 2020; De Melo *et al.*, 2016). En este ensayo se dispuso en el centro de una placa Petri un disco con micelio del hongo fitopatógeno, cultivado previamente en agar tomate; la placa Petri contenía 15 mL del medio APD (Agar Papa Dextrosa) + agar nutritivo (1:1), incubándose por 5 días a 20 °C. Luego se marcó la placa Petri con 6 divisiones y en cada sección se agregó una alícuota de 20 µL de una suspensión bacteriana ajustada a una densidad óptica de 0,1, a una longitud de onda de 600 nm ( $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) utilizando un espectrofotómetro UV/VIS (POP BIO, Optizen™, KLAB). Como control se dispuso una alícuota de 20 µL de solución salina. La evaluación del ensayo se realizó cuando el micelio del control de *P. vagabunda* alcanzó los 3 cm de diámetro, seleccionándose las cepas bacterianas que inhibieron en más de 50 % el crecimiento del hongo patógeno. Las cepas seleccionadas se utilizaron para los ensayos *in vitro* posteriores. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Tabla 1. Aislados bacterianos extraídos de la rizósfera de muestras de *Deschampsia antarctica* y *Colobanthus quitensis*.

Código cepario	Especie	Hospedero
AG-143	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Deschampsia antarctica</i>
AG-144	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Colobanthus quitensis</i>
AG-145	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	<i>Deschampsia antarctica</i>
AG-146	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Deschampsia antarctica</i>
AG-147	<i>Zooglea</i> sp.	<i>Colobanthus quitensis</i>
AG-148	<i>Pseudomonas graminis</i>	<i>Deschampsia antarctica</i>
AG-149	<i>Janthinobacterium</i> sp.	<i>Deschampsia antarctica</i>
AG-151	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Colobanthus quitensis</i>
AG-152	<i>Pedobacter cryoconitis</i>	<i>Deschampsia antarctica</i>
AG-153	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	<i>Deschampsia antarctica</i>
AG-154	<i>Janthinobacterium</i> sp.	<i>Deschampsia antarctica</i>
AG-155	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	<i>Colobanthus quitensis</i>
AG-156	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	<i>Deschampsia quitensis</i>
AG-157	<i>Pedobacter cryoconitis</i>	<i>Deschampsia antarctica</i>
AG-158	<i>Pseudomonas antarctica</i>	<i>Deschampsia antarctica</i>
AG-159	<i>Pseudomonas antarctica</i>	<i>Deschampsia antarctica</i>
AG-160	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	<i>Colobanthus quitensis</i>
AG-161	<i>Pseudomonas graminis</i>	<i>Deschampsia antarctica</i>
AG-162	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Colobanthus quitensis</i>
AG-163	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Colobanthus quitensis</i>
AG-164	<i>Pedobacter cryoconitis</i>	<i>Deschampsia antarctica</i>
AG-165	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Deschampsia antarctica</i>
AG-167	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Deschampsia antarctica</i>

### **Inhibición de la germinación de conidias de *Phlyctema vagabunda***

El ensayo de inhibición germinación de conidias se realizó siguiendo la metodología de Zuñiga (2012) adaptada. En placas Petri con 15 mL de medio APD + agar nutritivo (1:1), se dispuso una suspensión de conidias del patógeno 150  $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^5$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ ) en la zona media de la placa Petri, correspondiente a las cepas seleccionadas en el ensayo anterior que fueron AG-148, AG-151, AG-152, AG-153, AG-155, AG-156, AG-158, más el control. La suspensión bacteriana se dispuso en la parte centro superior de la placa Petri, rodeando de forma circular al patógeno, agrupadas de a cuatro y tres cepas por placa, más el control, y fueron incubadas por 5 d a 18 °C y por 20 d a 0 °C. Se consideró que existe inhibición de la germinación de conidias al observarse un halo alrededor de la colonia bacteriana.

### **Actividad de compuestos volátiles sobre la germinación de conidias**

Para probar la respuesta del patógeno *P. vagabunda* a los compuestos volátiles de las bacterias psicrotolerantes se realizó el ensayo de acuerdo con la metodología descrita por Chitarra *et al.* (2004) con modificaciones. Se utilizó la parte inferior de dos placas Petri, en una de ellas, se dispuso medio APD y en la otra parte agar nutritivo. El lado que contenía el medio APD contenía una suspensión de conidias (150  $\mu\text{L}$ ) con una concentración de  $1 \times 10^4$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  del hongo *P. vagabunda*, y en el lado que contenía el medio agar nutritivo, se dispuso 200  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana ( $1 \times 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ). Posteriormente, se sellaron las placas Petri con film plástico y se incubaron por 14 d a 18 °C. Una vez finalizada la incubación de las colonias bacterianas, se realizó una evaluación que consistió en el recuento de colonias del hongo, y se determinó el porcentaje de inhibición de la germinación de conidias utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición de la germinación de conidias (\%)} = \frac{\text{GC} - \text{GT}}{\text{GC}} \times 100$$

Donde GC corresponde al número de colonias en el control y GT corresponde al número de colonias del tratamiento con bacterias psicrotolerantes.

### **Actividad antagonista de bacterias psicrotolerantes frente a *Phlyctema vagabunda* utilizando cultivos duales**

Para este ensayo se dispuso en el centro de una placa Petri un disco con micelio de *P. vagabunda*, cultivado previamente en agar tomate, la placa Petri contenía 15 mL del medio APD + agar nutritivo (1:1), estas placas con el patógeno se incubaron por 5 d a 20 °C, luego se dispuso de forma horizontal contando 3 cm del borde al centro, en forma de estría, una alícuota de 20 µL de suspensión bacteriana ajustada a una densidad óptica de 0,1, a una longitud de onda de 600 nm ( $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>), más un control con solución salina, y fueron incubadas a 18 °C. Para este ensayo sólo se utilizaron las bacterias AG-151, AG-152, AG-153, AG-155 y AG-156, ya que fueron las que presentaron inhibición en la germinación de conidias.

La evaluación del ensayo se realizó cuando el micelio del control de *P. vagabunda* alcanzó los 3 cm. Para determinar la inhibición del crecimiento del patógeno y la actividad antagonista de las bacterias psicrotolerantes se usó la fórmula descrita por Manici *et al.* (1997):

$$\text{Inhibición de crecimiento (\%)} = \frac{\text{DC} - \text{DT}}{\text{DC}} \times 100$$

Donde DC corresponde al diámetro del control (mm) y DT corresponde al diámetro del tratado (mm).

Se seleccionaron las bacterias que inhibieron el crecimiento del hongo patógeno, en un 50 % o más.

### **Patogenicidad de bacterias psicrotolerantes *in vivo* sobre el fruto**

Para determinar una posible actividad patogénica de las bacterias psicrotolerantes seleccionadas sobre las manzanas, se utilizaron seis unidades de manzanas 'Cripps Pink', las cuales eran homogéneas en color y tamaño, además estaban libres de daño mecánico u ocasionado por algún patógeno. Estas se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 1 % por 3 min y se enjuagaron con agua destilada. Se realizaron dos ensayos, el primer ensayo consistió en realizar ocho heridas (3 x 3 mm) con la punta de una pipeta estéril, en la zona ecuatorial del fruto, en cada herida se aplicó 30 µL de suspensión bacteriana ( $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), con

cada una de las bacterias; AG-148, AG-151, AG-152, AG-153, AG-155, AG-156, AG-158. Como control se dispusieron 30  $\mu\text{L}$  de solución salina. Se realizaron tres repeticiones y la fruta se incubó a 20 °C por 8 días en un recipiente plástico sellado. Para el segundo ensayo se utilizó el mismo procedimiento, pero se incubó a 0 °C por 12 días, se evaluó si presentó lesión en la herida y en caso de existir lesión se determinó la incidencia y severidad de la enfermedad.

### **Determinación de actividad antagonista *in vivo* de las bacterias psicrotolerantes**

Para la preselección de bacterias con actividad antagonista *in vivo* se utilizaron 12 manzanas 'Cripps Pink', las cuales eran homogéneas en color y tamaño, además estaban libre de daño mecánico u ocasionado por algún patógeno. Estas se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 1 % por 3 min y enjuagadas con agua destilada. El ensayo consistió en realizar siete heridas (3 x 3 mm) en la zona ecuatorial del fruto con la punta de una pipeta estéril, una para cada bacteria (total de 23 más el control), en cada una de las heridas se aplicaron 30  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana ( $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) y 30  $\mu\text{L}$  de solución salina como control, y se dejaron secar por 24 horas, posteriormente se aplicó en cada herida una suspensión de conidias (20  $\mu\text{L}$ ) del patógeno ( $1 \times 10^5$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ ). La fruta fue incubada a 20 °C por 20 d con 85 % humedad relativa (HR) en una caja plástica de 15 L, debidamente sellada y con un recipiente con agua de 50 mL en el centro para mantener la HR. Para cada tratamiento se utilizaron tres repeticiones. Se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad para cada una de las 23 bacterias, de acuerdo con la fórmula descrita por Vero *et al.* (2002), en donde incidencia y severidad se calcularon según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{Número de heridas con pudrición}}{\text{Número de heridas totales}} \times 100$$

$$\text{Severidad (\%)} = \frac{\text{DLA}}{\text{DLC}} \times 100$$

Donde DLA es el promedio del diámetro de la lesión en las heridas tratadas con antagonistas y DLC es el promedio del diámetro de la lesión en las heridas inoculadas en el tratamiento control.

### **Determinación de actividad antagonista *in vivo* de las bacterias sobre el patógeno a 0 °C y a 20 °C**

Para el ensayo *in vivo* se utilizaron manzanas 'Cripps Pink', seleccionándose frutos homogéneos en color y tamaño, libres de daño mecánico. Estas se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 1 % por 3 min y fueron enjuagadas con agua destilada. Se realizaron dos ensayos, cada uno con 28 manzanas. El primer ensayo consistió en realizar dos heridas (3 x 3 mm) en la zona ecuatorial del fruto con una pipeta estéril; en una de las heridas se aplicaron 30 µL de suspensión bacteriana ( $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), de las bacterias seleccionadas en el ensayo anterior y en la herida opuesta se aplicó 30 µL de solución salina como control y se dejó secar por 24 h, posteriormente se aplicó en cada herida una suspensión de conidias (20 µL) del patógeno ( $1 \times 10^5$  conidias mL<sup>-1</sup>). La fruta se incubó a 20 °C por 20 d con 85 % HR en cajas plásticas de 15 L, debidamente selladas y con un recipiente de 50 mL de agua en el centro para mantener humedad relativa. Para cada tratamiento se utilizaron 4 repeticiones, con siete unidades de manzanas cada uno. En el segundo ensayo antes de ingresar al almacenaje en frío, se realizó de forma similar al anterior con heridas en la zona ecuatorial del fruto, inoculando una suspensión bacteriana ( $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) de dos bacterias seleccionadas, más el control y 24 h posteriores se aplicó una suspensión de conidias de *P. vagabunda* en una concentración de  $1 \times 10^5$  conidias mL<sup>-1</sup>. La fruta se almacenó por 2 meses a  $0 \pm 1$  °C y luego por 10 d a 20 °C. Como control se utilizaron manzanas inoculadas solución salina. Se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad de acuerdo con lo previamente descrito.

### **Diseño experimental**

Para todos los ensayos se utilizó el diseño experimental completamente al azar (DCA). Para todos los bioensayos se realizaron tres repeticiones, a excepción del ensayo de determinación de actividad antagonista *in vivo* de las bacterias seleccionadas sobre *Phlyctema vagabunda* a 0 °C y 20 °C.

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados utilizando el software estadístico Infostat versión 2011 (Balzarini *et al.*, 2008). Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA), previa verificación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas con la prueba de Shapiro-Wilk modificado y prueba de Levene, para ambos casos con un nivel de confianza del 95 %. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre tratamientos se realizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0,05.

Por otra parte, se empleó un análisis de conglomerados (datos estandarizados) donde se utilizó el método del vecino más cercano y la distancia euclídea con el fin de obtener cladogramas para visualizar los distintos niveles de las variables evaluadas en este estudio.

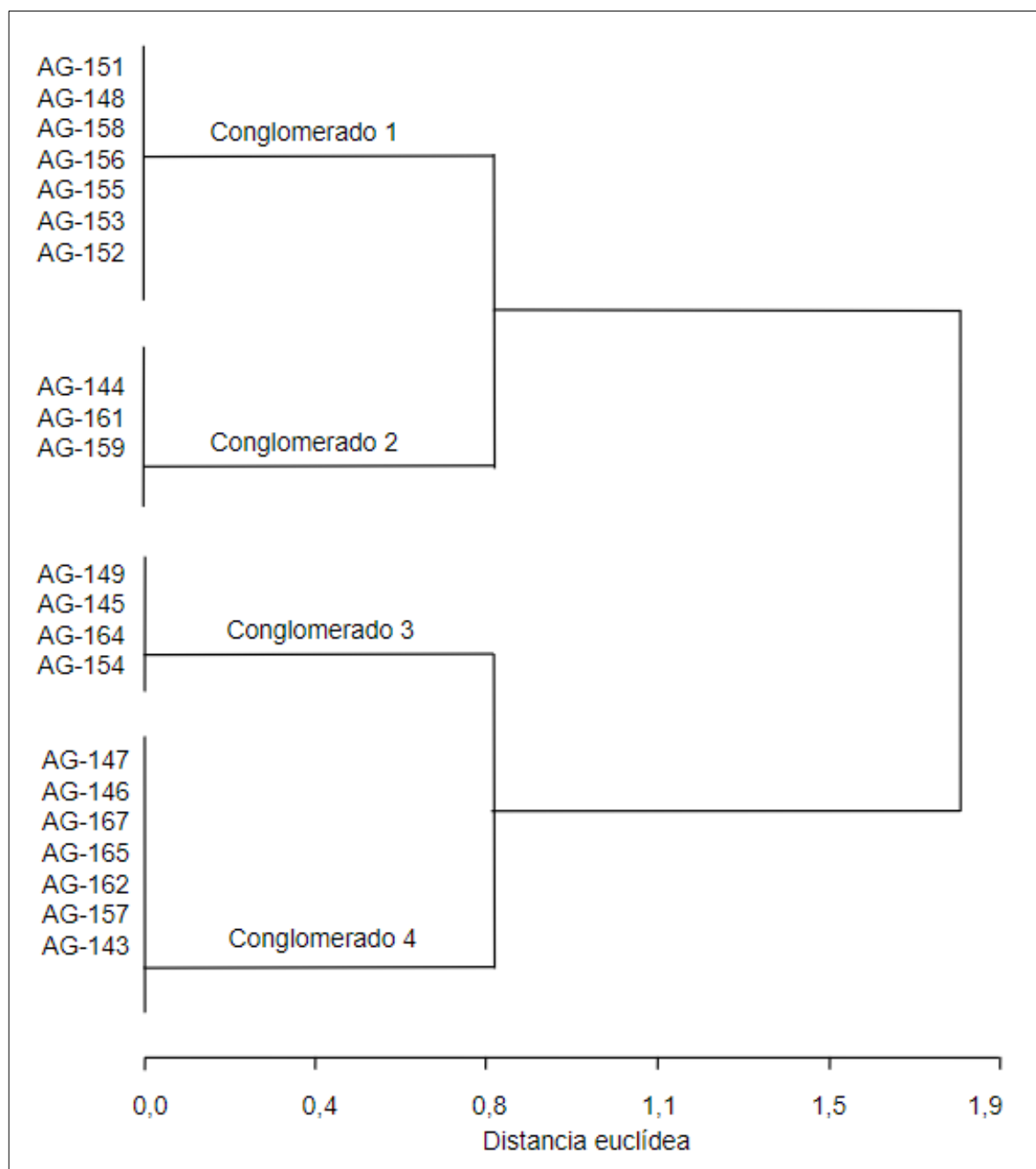
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Preselección de bacterias psicrotolerantes antagonistas**

Como resultado de la preselección mediante cultivos duales, de las 23 bacterias psicrotolerantes utilizadas en el presente estudio, se observó que siete de ellas (AG-148, AG-151, AG-152, AG-153, AG-155, AG-156, AG-158) presentaron inhibición del crecimiento micelial, agrupándose en el primer conglomerado del cladograma (Figura 1), las cuales se seleccionaron para ser usadas en ensayos *in vitro* posteriores.

Los resultados de este ensayo confirman que las bacterias psicrotolerantes de origen antártico, presentan actividad antagonista frente al patógeno *P. vagabunda*, que coincide con la investigación de Santos *et al.* (2020), cuyos hallazgos indican una alta actividad antagonista de aislados de actinobacterias de la Antártica, debido a que estos microorganismos han adoptado estrategias de supervivencia para reducir la presencia de otros organismos competitivos, alguna de estas estrategias es la adaptación a bajas temperaturas, cambiando la fluidez de la membrana, reduciendo la actividad enzimática para transcripción y translocación, adaptando proteínas anticongelantes y crioprotectoras (D'amico *et al.*, 2006) y el efecto antagonista se produce por la secreción de metabolitos bioactivos que tienen un efecto antifúngico amplio y pronunciado.

Figura 1. Cladograma del análisis de conglomerados de la inhibición del crecimiento micelial de *P. vagabunda*, mediante el uso de bacterias psicrotolerantes.



### Inhibición de la germinación de conidias de *Phlyctema vagabunda*

Los resultados observados en ensayo de germinación de conidias mostraron que, de las siete bacterias preseleccionadas desde el conglomerado 1 (Figura 1) incubadas a una temperatura de 0 °C por 20 d, sólo 4 de ellas, AG-151, AG-153, AG-155 y AG-

156, presentaron un halo alrededor de la colonia bacteriana (Tabla 2). Por otra parte, cuando estas bacterias fueron incubadas a una temperatura de 18 °C por 5 d, sólo los aislados AG-151, AG-152 y AG-155, presentaron un halo alrededor de la colonia bacteriana. Esto se debe a que existen bacterias que son conocidas por su capacidad para reducir la germinación de conidias mediante la competencia por los nutrientes frente al patógeno y producción de antibióticos. En la investigación realizada por Filonow *et al.* (1996) indican que cepas de *Pseudomonas cepacia* fueron eficaces en el control de la pudrición por *Botrytis*, *Penicillium* y *Mucor* de manzanas y peras, al producir el antibiótico pirrolnitrina, que es altamente antifúngico.

### **Actividad de compuestos volátiles sobre la germinación de conidias**

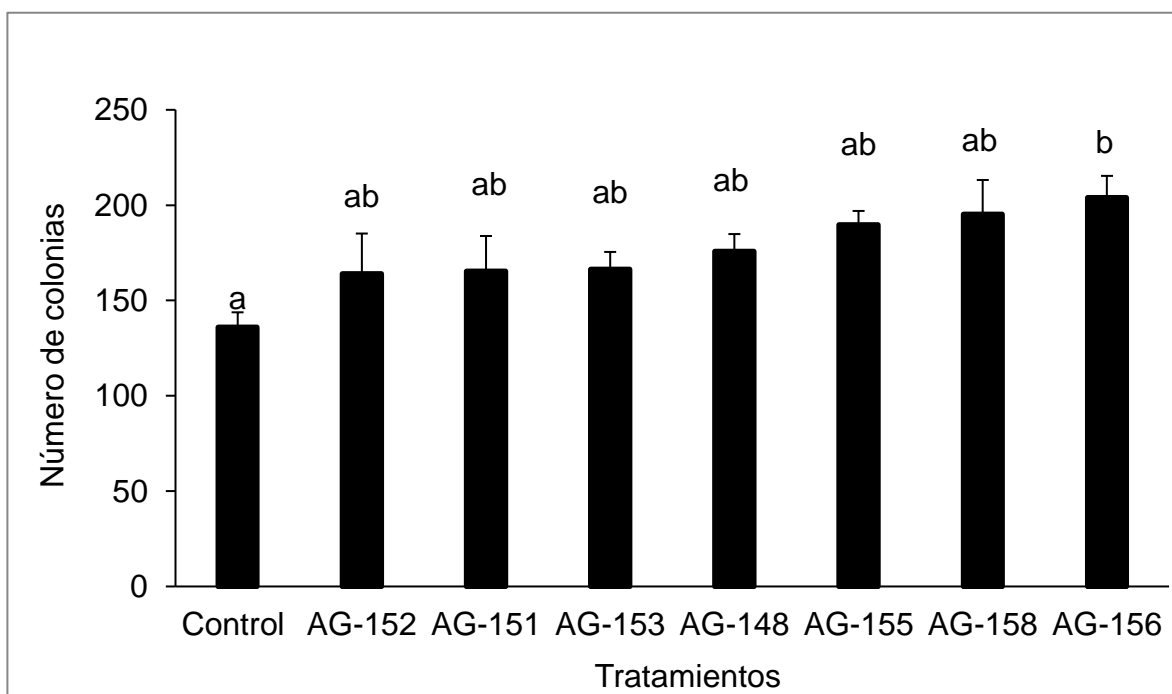
En este ensayo para determinar la actividad antagonista de los compuestos volátiles producidos por las bacterias frente al patógeno, se observó la germinación de conidias de *P. vagabunda* en presencia de las siete cepas seleccionadas (Figura 2), en donde no hubo una reducción del patógeno ( $P > 0,05$ ) en el número de colonias generadas a partir de conidias, inclusive el número de colonias generado frente a los volátiles de la cepa AG-156, aumentó con relación al control. Los compuestos volátiles de las siete bacterias psicotolerantes no presentaron un efecto antagónico frente al patógeno, estos resultados no coinciden con estudios como los de Cruz-Martín *et al.* (2012), que demostró que las bacterias cuentan con mecanismos antagonistas frente a patógenos como la emisión de compuestos volátiles. Otros estudios como el de Sarabia *et al.* (2010) reportan que bacterias, en particular las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, son capaces de controlar patógenos, principalmente hongos, sintetizando moléculas antifúngicas de forma volátil. El aumento en el número de colonias del hongo frente a los volátiles de la cepa AG-156 lo explica el estudio realizado por Briard *et al.* (2016), que menciona que hay microorganismos que ocupan nichos ambientales similares en donde interactúan entre sí, como lo es el hongo *Aspergillus fumigatus* cuyo crecimiento se vio estimulado por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, este efecto está mediado por la fase gaseosa, y el compuesto volátil responsable de este efecto es el sulfuro de dimetilo. Otros estudios como el de Amiri *et al.* (2008) utilizó compuestos volátiles a partir de eugenol, los que presentaron un efecto antagonista frente a *P. vagabunda*.

Tabla 2. Efecto de distintos aislados de bacterias psicrotolerantes en la germinación conidial de *Phlyctema vagabunda*, incubadas a temperaturas de 0 °C y 18 °C por 20 y 5 días, respectivamente.

Bacteria	Inhibición germinación (0 °C)	Inhibición germinación (18 °C)
AG-148	- - -	- - -
AG-151	+ + +	+ + +
AG-152	- - -	+ + +
AG-153	+ + +	- - -
AG-155	+ + -	+ + +
AG-156	+ + -	- - -
AG-158	- - -	- - -

Los símbolos + y - indican si las cepas bacterianas mostraron o no un halo alrededor de la colonia en las tres repeticiones del ensayo a 0 °C y 18 °C.

Figura 2. Actividad de compuestos volátiles de aislados de bacterias psicrotolerantes sobre el número de colonias de *Phlyctema vagabunda*.

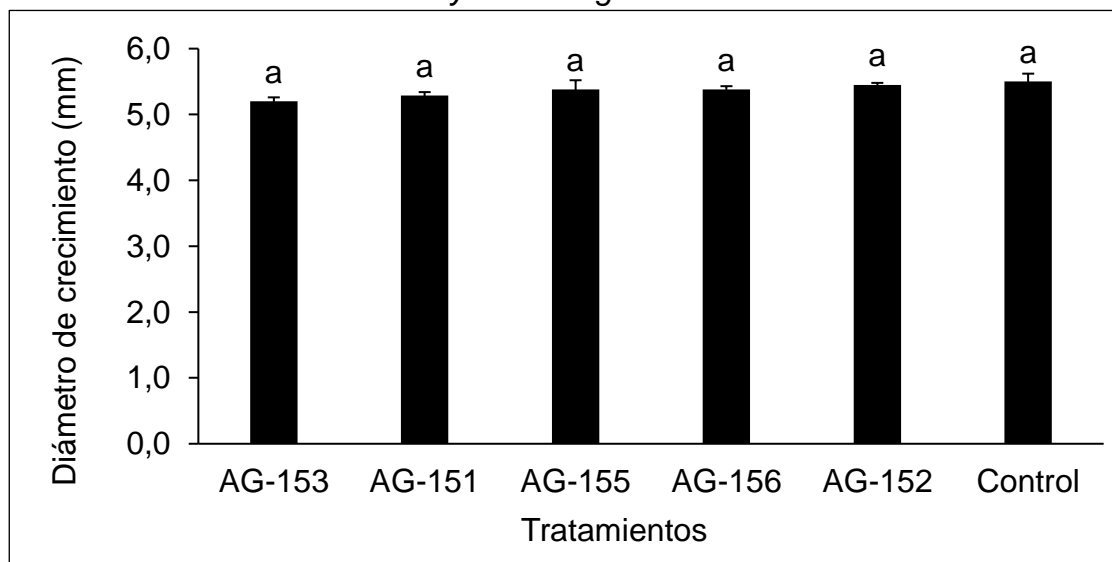


Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos, según prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ). Control: Sin suspensión bacteriana. AG-152: Tratamiento con *Pedobacter cryoconitis*. AG-151: Tratamiento con *Pseudomonas* sp. AG-153, AG-155 y AG-156: Tratamiento con *Pseudomonas frederiksbergensis*. AG-148: Tratamiento con *Pseudomonas graminis*. AG-158: Tratamiento con *Pseudomonas antarctica*.

### Actividad antagonista de bacterias psicrotolerantes frente a *Phlyctema vagabunda in vitro*

Como muestra la Figura 3, las bacterias utilizadas en este ensayo y que fueron incubadas a  $20 \pm 2$  °C por 5 d, no presentaron diferencias en la inhibición del diámetro de crecimiento de patógeno, respecto al control, observándose valores de 5,2 a 5,5 mm de crecimiento micelial. En estudios realizados por Villa *et al.* (2005) y Dimkic *et al.* (2013), se utilizaron bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus* como antagonistas de hongos fitopatógenos, y en ambos casos los aislados bacterianos sí mostraron inhibición en el crecimiento micelial del patógeno evaluado. Esta respuesta se debe a los metabolitos secundarios presentes en estas bacterias como la producción de sideróforos y lipopéptidos, sin embargo, en el presente ensayo los aislados bacterianos no presentaron una actividad antagónica significativa frente al control.

Figura 3. Actividad antagonista de aislados de bacterias psicrotolerantes sobre el diámetro de crecimiento de *Phlyctema vagabunda in vitro*.



Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos según prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ). Control: Solución salina. AG-153, AG-155 y AG-156: Tratamiento con *Pseudomonas frederiksbergensis*. AG-151: Tratamiento con *Pseudomonas* sp. AG-152: Tratamiento con *Pedobacter cryoconitis*.

### Patogenicidad de bacterias psicrotolerantes sobre manzanas

Las siete bacterias seleccionadas en los ensayos *in vitro* e inoculadas en las heridas realizadas a las manzanas, no generaron lesión, pudrición u otro tipo de

sintomatología en las frutas, estas fueron evaluadas por 8 d a 20 °C y también por 12 d a 0 °C. Al estudiar alternativas de control biológico frente a patógenos es importante comprobar que los microorganismos cuenten con una serie de características que permitan tener un ‘antagonismo ideal’ y seguro frente a patógenos de poscosecha, como lo indica Winiewski y Wilson (1992), algunas de estas características son: que sean genéticamente estables, no exigentes en el requerimiento de nutrientes, que tengan la capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales adversas, fáciles de dispersar, que no produzcan metabolitos nocivos para la salud humana y que no sea patogénico para el huésped (Pérez *et al.*, 2015), lo que se comprobó en este ensayo. Las enfermedades que afectan principalmente en poscosecha a los frutos de pomáceas, no se producen por bacterias patógenas, sino por hongos (Aragón *et al.*, 2010). *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila*, *Phacidium lacerum*, y *Phacidiopycnis washingtonensis*, junto a *P. vagabunda*, son los principales patógenos de enfermedades en poscosecha de manzana (Lolas y Díaz, 2016).

### **Selección *in vivo* de bacterias psicrotolerantes**

A diferencia de los ensayos *in vitro*, se utilizaron los 23 aislados bacterianos, éstos se ordenaron en tres conglomerados en el cladograma (Figura 4), donde el conglomerado uno fue conformado por el aislado AG-157, el cual redujo en mayor cantidad la expresión de la enfermedad. El segundo conglomerado fue compuesto por cuatro aislados AG-161, AG-147, AG-148 y AG-158, siendo el aislado AG-161 el que redujo en mayor proporción la severidad. Por último, en el conglomerado tres se ubicaron todos los demás aislados, los que presentaron un menor nivel de actividad antagonista frente al patógeno, los cuales no redujeron significativamente el avance de la enfermedad, siendo las cepas AG-157 y AG-161 seleccionadas para el ensayo posterior. Estos resultados se contradicen con los resultados *in vitro* de los ensayos anteriores, en donde los aislados AG-157 y AG-161 no tuvieron un comportamiento antagonista frente al patógeno, sin embargo, *in vivo* fueron los que mejor resultado obtuvieron para un posible uso comercial en el almacenamiento de las manzanas, señalando que no hubo similitud entre el antagonismo *in vitro* de los aislados bacterianos, comparado con el antagonismo *in vivo*. Estudios como los

realizados por Dal Bello *et al.* (2008) y Janisiewicz (1987), corroboran que pueden existir discrepancias en los resultados de los ensayos en dos entornos aparentemente favorables y con susceptibilidad del hospedero. Falconi y Mendgen (1994) señalan que algunos antagonistas seleccionados pueden inhibir la germinación de conidias y el crecimiento micelial, pero no afectan considerablemente la lesión en frutos, esto se debe a las complejas interacciones que pueden ocurrir en la superficie de los frutos de manzano, que puede ser el resultado de competencia por espacio y nutrientes, y efectos antagonistas de los metabolitos secundarios (Zuñiga, 2012). Las bacterias *Pedobacter cryoconitis* y *Pseudomonas graminis* fueron capaces de competir con el patógeno, lo que coincide con el estudio realizado por Saraf *et al.* (2014), quienes indican que existen rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, de los géneros *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. que se caracterizan por poseer mecanismos de acción capaces de controlar fitopatógenos, debido principalmente a la producción de metabolitos secundarios. Algunos de estos mecanismos son la producción de compuestos alelopáticos como sideróforos, antibióticos, lipopéptidos, compuestos volátiles biocidas, enzimas líticas, detoxificación y degradación de factores de virulencia.

#### **Determinación de actividad antagonista *in vivo* de las bacterias seleccionadas sobre *Phlyctema vagabunda* a 0 °C y 20 °C**

Los aislados AG-157 y AG-161 utilizados en el ensayo (Figura 5), presentaron comportamientos diferentes en las temperaturas evaluadas frente al control, a 0 °C el aislado AG-157 redujo en 52 % (6,1 mm), la severidad de la enfermedad, y a 20 °C, la redujo en 69 % (8,6 mm), sin embargo, el aislado AG-161 no redujo la severidad de la enfermedad a 0 °C, pero a 20 °C sí presentó una reducción del halo de pudrición en un 51 % (6,4 mm). Ambos aislados redujeron mayormente la severidad de la enfermedad a 20 °C, esto se puede deber a que las bacterias psicrotolerantes tienen una mejor actividad metabólica a 20 °C que a 0 °C, lo que favorece sus mecanismos de acción frente a otros microorganismos. El estudio realizado por Wong *et al.* (2011) indica que *Pedobacter cryoconitis* es una bacteria Gram negativa, que contiene compuestos antimicrobianos de amplio espectro, que

se dirigen a una variada gama de patógenos. Estas capacidades probablemente proporcionaron la ventaja competitiva a las bacterias antárticas para sobrevivir en el duro entorno, mientras que las bacterias o microorganismos que carecen de tales capacidades serían suprimidos. Además, Männistö *et al.* (2006) indica que bacterias del género *Pedobacter*, pueden crecer sin problemas a una temperatura de  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , lo que explica su comportamiento antagonista en condiciones *in vivo*.

Figura 4. Cladograma generado a partir de la reducción de la severidad de la enfermedad causada por *Phlyctema vagabunda* en manzanas, mediante el uso de bacterias psicrotolerantes.

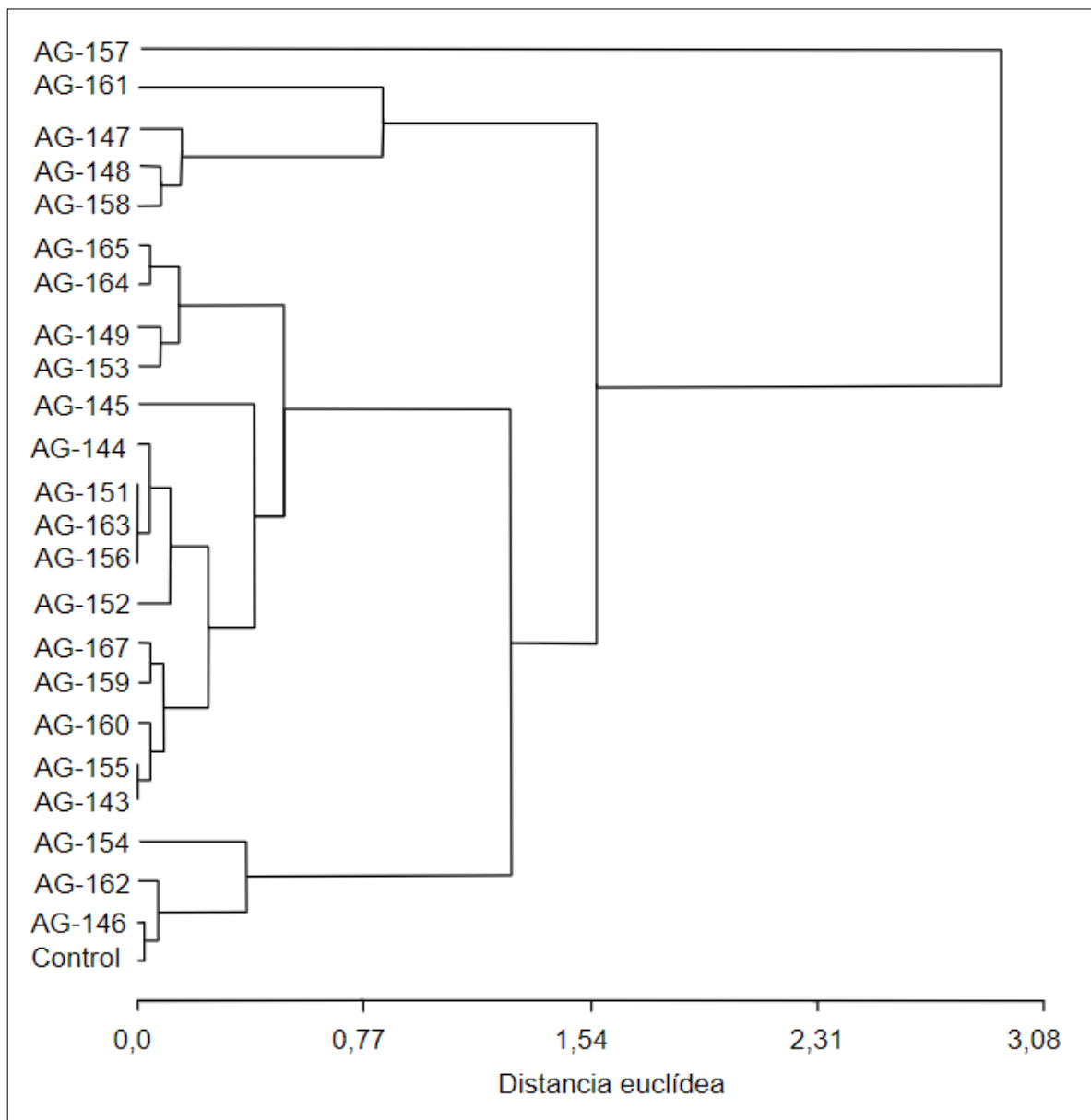
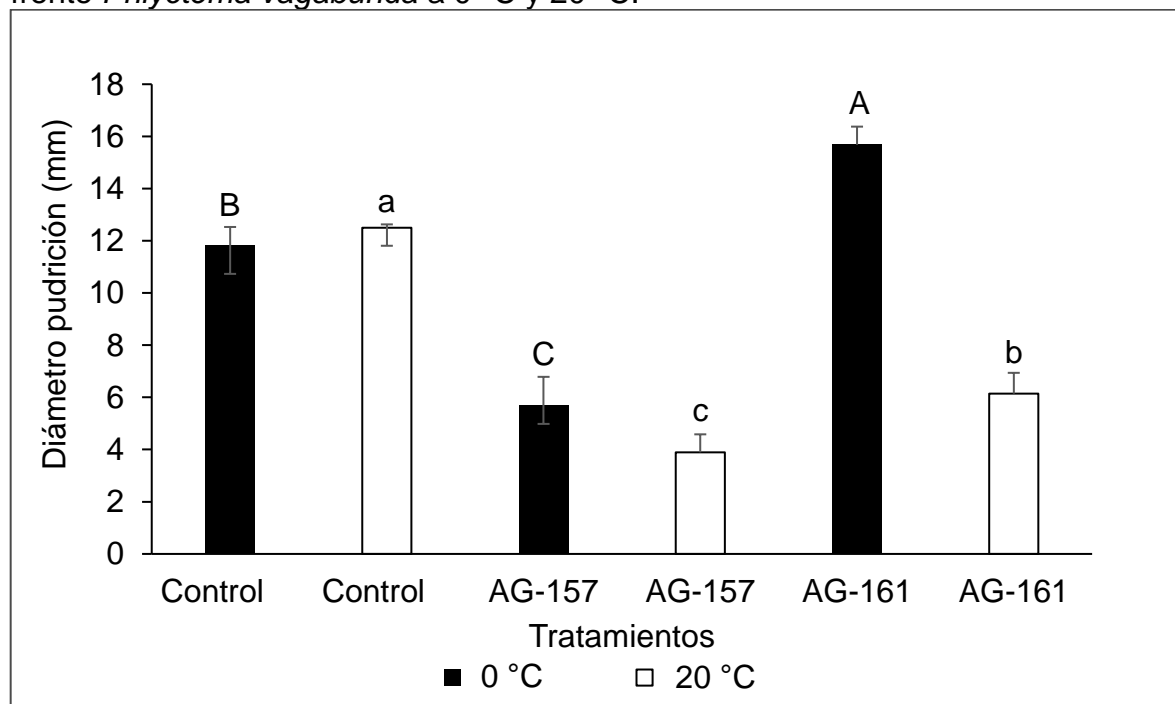


Figura 5. Actividad antagonista *in vivo* de dos aislados bacterianos psicrotolerantes frente *Phlyctema vagabunda* a 0 °C y 20 °C.



Letras distintas sobre barras de un mismo color indican diferencias significativas entre los tratamientos según prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ). Letras mayúsculas corresponden a evaluación a 0 °C y letras minúsculas a 20 °C. Control: Aplicación de solución salina más conidias de *P. vagabunda*; AG-157: Aplicación de solución salina más suspensión bacteriana de *Pedobacter cryoconitis*; AG-161: Aplicación de solución salina más suspensión bacteriana de *Pseudomona graminis*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio hacen promisoría la utilización de la bacteria psicrotolerante AG-157, correspondiente a *Pedobacter cryoconitis* como control biológico de *Phlyctema vagabunda* en poscosecha de manzanas, sin embargo, se sugiere nuevas investigaciones que conlleven una mejora en el desarrollo de técnicas para seleccionar el método de acción más idóneo para la utilización como biocontrol de patógenos con posible uso comercial.

## CONCLUSIONES

1. Las bacterias psicrotolerantes de origen antártico evaluadas en este estudio, tuvieron resultados diferenciales en el control de *P. vagabunda* en ensayos *in vitro* e *in vivo*.
2. Las bacterias AG-157 y AG-161, correspondiente a *Pedobacter cryoconitis* y *Pseudomona graminis* respectivamente, presentan actividad antagonista frente

al patógeno *Phlyctema vagabunda* en condiciones *in vivo*.

3. La cepa AG-157, correspondiente a la bacteria *Pedobacter cryoconitis*, presentó la mayor actividad antagonista frente al patógeno *P. vagabunda* a 0 °C y a 20 °C *in vivo*.

## REFERENCIAS

1. Agrios, G.N. 2011. Plant pathology. (5th. ed.). Elsevier Academic Press. Burlington, USA.
2. Amiri, A., R. Dugas, A.L. Pichot and G. Bompeix. 2008. *In vitro* and *in vitro* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. Int. J. Food Microbiol. 126(1-2): 13-19.
3. Aragón, J., N. Barnes, A. Colodner, S. Di Masi, C. Franco, G. Giambelluca, C. Miracca, M.E. Salvador, D. Sánchez, C. Sanoner y M.C. Sosa. 2010. Enfermedades en postcosecha. pp: 140-159. En: J. Álvarez, G. Colavita, M.C. Dussi, D. Fernández, A. Giayetto, P. Reeb, E. Sánchez, P. Schmid (Eds.). Pera Williams Manual para el productor y el empacador. Patagonia, Argentina.
4. Balzarini, M.G., L. González, E.M. Tablada, F. Casanoves, J.A. Di Rienzo y C.W. Robledo. 2008. InfoStat: software estadístico. Manual del usuario. Versión 2008. Brujas. Córdoba. Argentina.
5. Briard, B., C. Heddergott, C. and J.P Latgé. 2016. Volatile compounds emitted by *Pseudomonas aeruginosa* stimulate growth of the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. mBio 7(2): 1-5.
6. Cameldi, I., F. Neri, M. Menghini, A. Pirondi, I.M. Nanni, M. Collina and M. Mari. 2017. Characterization of *Neofabraea vagabunda* isolates causing apple bull's eye rot in Italy. Plant Pathol. 66(9): 1432-1444.
7. Chitarra, G.S., T. Abee, F.M. Rombouts, M.A. Posthumus and J. Dijksterhuis. 2004. Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. Appl. Environ. Microbiol. 70(5): 2823-2829.
8. Contreras, F.A. 2011. Detección molecular y fenotípica de proteínas CSP en bacterias psicrotolerantes, aisladas del territorio Patagónico y Antártico Chilenos. Tesis postgrado, Magíster en Ciencias Mención Microbiología. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Biológicas. Concepción,

Chile.

9. Correa, J.M. 2019. Caracterización del crecimiento *in vitro* del hongo *Phlyctema vagabunda*, agente causal de la enfermedad 'ojo de buey' en manzanas. Memoria de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias. Talca. Chile.
10. Cruz-Martín, M., M. Acosta-Suárez, I. Poveda, M. Leiva-Mora, B. Roque y Y. Alvarado-Capó. 2012. Actividad antifúngica *in vitro* de bacterias frente a *Mycosphaerella fijiensis* mediada por metabolitos difundidos y volátiles. *Biotechnol. Veg.*12(3): 179-182.
11. D'Amico, S., T. Collins, J.C. Marx, G. Feller and C. Gerday. 2006. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep.* 7(4): 385-389.
12. Dal Bello, G., C. Mónaco, M.C. Rollan, G. Lampugnani, N. Arteta, C. Abramoff, L. Ronco and M. Stocco. 2008. Biocontrol of postharvest grey mould on tomato by yeasts. *J. Phytopathology* 156(5):257-263.
13. Dimkić, I., S. Živković, T. Berić, Ž. Ivanović, V. Gavrilović, S. Stanković and D. Fira. 2013. Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biol. Contr.* 65(3): 312-321.
14. Falconi, C. and K. Mendgen. 1994. Epiphytic fungi on apple leaves and their value for control of the postharvest pathogens *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructigena* and *Penicillium expansum*. *JPDP.* 101(1): 38-47.
15. Filonow, A.B., H.S. Vishniac, J.A. Anderson and W.J. Janisiewicz. 1996. Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biol. Contr.* 7(2): 212-220.
16. Gounot, A.M. 1986. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experientia* 42(11-12): 1192-1197.
17. Henriquez, J.L. 2005. First report of apple rot caused by *Neofabraea alba* in Chile. *Plant. Dis.* 89(12): 1360-1360.
18. Janisiewicz, W.J. 1987. Postharvest biological control of blue mold on apples. *Phytopathology* 77(3): 481-485.

19. Lolas, M. y G. Díaz. 2016. Enfermedades pre y postcosecha de manzanos. pp: 1-11. Boletín Técnico Pomáceas N°11. Universidad de Talca. Talca, Chile.
20. López, A. 2003. Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO N°151. Food and Agriculture Organization. Roma, Italia.
21. Manici, L.M., L. Lazzeri and S. Palmieri. 1997. *In vitro* fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. J. Agric. Food Chem. 45(7): 2768-2773.
22. Männistö, M.K. and M.M. Häggblom. 2006. Characterization of psychrotolerant heterotrophic bacteria from Finnish Lapland. Syst. Appl. Microbiol. 29(3): 229-243.
23. Melo, I.S., W.R Sousa, L.J. Silva, S.N. Santos, M.R. Assalin, T.D. Zucchi and S.C.N. Queiroz. 2016. Antifungal activity of *Pseudomonas frederiksbergensis* CMAA 1323 isolated from the antarctic hair grass *Deschampsia antarctica*. Br. Microbiol. Res. J. 14(3): 1-11.
24. Michaud, L., F. Di Cello, M. Brilli, R. Fani, A. Lo Giudice and V. Bruni. 2004. Biodiversity of cultivable psychrotrophic marine bacteria isolated from Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). FEMS Microbiol. Lett. 230(1): 63-71.
25. Mondino, P., S. Di Masi, C. Falconi, J. Montealegre, J.L. Henríquez, C. Nunes, M. Salazar, M.J. Stadnik, S. Vero y J. Usall. 2009. Manual de identificación de enfermedades de manzanas en poscosecha. pp:42- 45. Ciencia y Tecnología para el desarrollo. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay.
26. Neri F, M. Mari, S. Brigati and P. Bertolini. 2009. Control of *Neofabraea alba* by plant volatile compounds and hot water. Postharvest Biol. Technol. 51: 30-425.
27. ODEPA. 2023a. Avance por producto país de exportaciones / importaciones [en línea]. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Chile. <<https://www.odepa.gob.cl/avance-por-grupos-de-productos>>. [Consulta: 13 de abril 2023].
28. ODEPA. 2023b. Catastro superficie frutícola regional [en línea]. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Chile. <<https://www.odepa.gob.cl/estadisticas-del-sector/estadisticas-productivas>>. [Consulta: 13 de abril 2023].
29. Pefaur, J. 2023. Boletín de la fruta [en línea]. ODEPA, Chile

.<<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrljoiNDkwMzI3NGMtMjE1ZS00MDQ1LTk4OTktZWl2OWYyNmY3ZGJhliwidCI6IjMzYjdmNzA3LTZINmYtNDJkMi04ZDZmLTk4YmZmOWZiNWZhMCIsImMiOjR9>. [Consulta: 20 abril 2023].

30. Pérez, S., O. Coto, M. Echemendía y G. Ávila. 2015. *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno. Rev. Prot. Veg. 30(3): 225-234.
31. Reyes, J.C. 2018. Identificación de rizobacterias psicrotolerantes asociadas a *Colobanthus quitensis* y *Deschampsia antarctica* con actividad promotora de crecimiento vegetal. Memoria de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
32. Santos. A., K. Núñez-Montero, C. Lamilla, M. Pavez, D. Quezada-Solís y L. Barrientos. 2020. Antifungal activity screening of antarctic actinobacteria against phytopathogenic fungi. Acta Biol. Colom. 25(2): 353-358.
33. Sarabia, M., R. Madrigal, M. Martínez y A. Carreón. 2010. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. Biológicas 12(1): 65-71.
34. Saraf. M., U. Pandya and A. Thakkar. 2014. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. Microbiol. Res. 169(1): 18-29.
35. Sepúlveda, X., D. Silva, R. Ceballos, S. Vero, M.D. López, and M. Vargas. 2022 Endophytic yeasts for the biocontrol of *Phlyctema vagabunda* in apples. Horticulturae 8(6): 535-547.
36. Shekh, R. M., P. Singh, S.M. Singh and U. Roy. 2011. Antifungal activity of Arctic and antarctic bacteria isolates. Polar Biol. 34(1): 139-143.
37. Soto-Alvear, S., M. Lolas, I.M. Rosales, E.R. Chávez and B.A Latorre. 2013. Characterization of the bull's eye rot of apple in Chile. Plant Dis. 97(4):485-490.
38. Soto, S., M. Rosales y M. Lolas. 2012. Enfermedad de postcosecha: identificación y control de ojo de buey en manzanas Cripps Pink. pp: 41-44. Revista Tierra Adentro N°98. INIA. Santiago, Chile.
39. Styczynski, M., G. Bieg niewski, P. Decewicz, B. Rewerski, K. Debiec-Andrzejewska and L. Dziejewit. 2022. Application of psychrotolerant antarctic bacteria and their metabolites as efficient plant growth promoting

- agents. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10: 772891(Art. No.) doi: 10.3389/fbioe.2022.772891 [en línea].
40. Trademap. 2021. Lista de los países exportadores de manzana en 2021 [en línea]. Trademap. <[https://www.trademap.org/Country\\_SelProduct.aspx?nvpm=3%7c%7c%7c%7c%7c080810%7c%7c%7c6%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1%7c1](https://www.trademap.org/Country_SelProduct.aspx?nvpm=3%7c%7c%7c%7c%7c080810%7c%7c%7c6%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1%7c1)>. [Consulta: 11 julio 2022].
41. Urrea, I., N. Arismendi, X. Sepúlveda, M. Gerding, S. Vero and M. Vargas. 2023. Antifungal activity of propolis extracts against postharvest pathogen *Phlyctema vagabunda*. *Agronomy* 13(1): 104-117.
42. USDA. 2023. Fresh apples, grapes, and pears: world markets and trade [en línea]. FAS, USA. <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/fruit.pdf>>. [Consulta: 28 julio 2023].
43. Vero, S., P. Mondino, J. Burgueño, M. Soubes and M. Wisniewski. 2002. Characterization of biocontrol activity of two yeast starins from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biol. Technol.* 26 (1): 91-98.
44. Villa, P.M., A. Frías y G. González. 2005. Evaluación de cepas de *Pseudomonas* sp para el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de interés económico. *ICIDCA*. 39(3): 40-44.
45. Wong, C.M.V.L., H.K. Tam, S.A. Alias, M. González, G. González-Rocha and M. Domínguez-Yévenes. 2011. *Pseudomonas* and *Pedobacter* isolates from King George Island inhibited the growth of foodborne pathogens. *Pol. Polar Res.* 32(1): 3-14.
46. Zhang, H., L. Wang, Y. Dong, S. Jiang, J. Cao and R. Meng. 2007. Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. *Biol. Contr.* 40(2): 287-292.
47. Zuñiga, L.A. 2012. Selección de levaduras epífitas con actividad antagonista frente a *Penicillium expansum* en poscosecha de manzana. Memoria de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Chillán, Chile