



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS FORESTALES  
**PROYECTO DE TESIS**



**Patogenicidad de *Phytophthora cinnamomi* RANDES en ciprés de la cordillera  
(*Austrocedrus chilensis*) y estudios preliminares de hongos antagonistas**

***Nombre del alumno(a)***

***Javiera Francisca Marambio Marchant***

**Comisión evaluadora:**

**Dr. Eugenio Sanfuentes Von Stowasser**

**Dr. Rodrigo Hasbún Zaror**

**Dr. Daniel Aguilera Olivares**

**Dr. Mauricio Lolas C.**

**Dr. José Becerra A.**

**Dr. Vicente Hernández**

**Fecha de Presentación: Enero, 2025**

## Tabla de contenidos

<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>I. MARCO TEÓRICO</b> .....	8
<b>1.1) Antecedentes generales de Austrocedrus chilensis</b> .....	8
<b>1.2) Antecedentes de Phytophthora spp. e importancia en ecosistemas forestales</b> .....	9
<b>1.3) Phytophthora spp. y su presencia en Chile</b> .....	12
<b>1.4) Manejo de enfermedades causadas por Phytophthora</b> .....	14
<b>1.3) Control biológico como alternativa de manejo de Phytophthora</b> ....	15
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>Objetivo general</b> .....	19
<b>Objetivos específicos</b> .....	19
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	20
<b>4.1) Ensayo de patogenicidad en plantas de ciprés de la cordillera</b> .....	20
<b>4.1.1) Pruebas de patogenicidad</b> .....	21
<b>4.1.2) Diseño experimental y evaluaciones</b> .....	22
<b>4.2) Evaluación de antagonismo in vitro contra P. cinnamomi</b> .....	23
<b>4.2.1) Aislados de hongos y oomicetos utilizados</b> .....	23
<b>4.2.2) Pruebas de antagonismo in vitro</b> .....	23
<b>4.3) Identificación molecular</b> .....	24
<b>4.3.1 Extracción de ADN</b> .....	24
<b>4.3.2) PCR anidada con partidores género-especie específicos</b> .....	25
<b>4.4) Análisis estadístico</b> .....	26
<b>5. RESULTADOS</b> .....	27
<b>5.1) Ensayos de Patogenicidad</b> .....	27
<b>5.1.1) Método de infestación de substrato</b> .....	27
<b>5.1.2) Método de inoculación en tallo</b> .....	32
<b>5.2) Identificación molecular</b> .....	34

<b>5.3) Ensayos in vitro</b> .....	35
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	43
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	49
<b>8. ANEXOS</b> .....	50
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	52

## RESUMEN

El género *Phytophthora* es responsable de algunas de las epidemias más destructivas a nivel mundial. Entre las especies más importantes de este género se encuentra *Phytophthora cinnamomi*, patógeno que puede provocar importantes impactos ecológicos y pérdidas económicas en ecosistemas forestales, debido a su amplia distribución geográfica y comportamiento polífago. En Chile, el patógeno se ha detectado en plantaciones comerciales de paltos y castaños, y en los últimos años afectando especies nativas, como son araucaria, coigüe, canelo, y recientemente detectado en *Austrocedrus chilensis* (ciprés de la cordillera), aunque para esta especie aún no se ha comprobado la patogenicidad de *P. cinnamomi*. El ciprés de la cordillera posee una gran plasticidad ecológica, presentándose en bosques puros o mixtos junto con especies del género *Nothofagus*, siendo algunas de estas especies con demostrada susceptibilidad a *P. cinnamomi*. La diseminación *P. cinnamomi* dentro de bosques mixtos podría aumentar la posibilidad de infección hacia árboles de *A. chilensis*. El control de especies de *Phytophthora* en cultivos comerciales se ha basado en el manejo cultural y uso de fungicidas específicos, no obstante, aplicaciones frecuentes de estos productos podrían generar poblaciones resistentes del patógeno. Por otro lado, en ecosistemas forestales nativos no parece viable la aplicación de fungicidas, surgiendo como alternativa la utilización del control biológico. El objetivo de este estudio fue verificar la patogenicidad de aislados de *P. cinnamomi* sobre *A. chilensis* y determinar el efecto antagónico de cepas de hongos sobre *P. cinnamomi*. Los aislados de *P. cinnamomi* fueron obtenidos desde la rizosfera de árboles de ciprés de la cordillera y de otras especies nativas que presentaban síntomas atribuibles al patógeno. Los ensayos de patogenicidad se realizaron en plantas de ciprés de la cordillera de dos años, empleando los métodos de infestación de sustrato, evaluándose mortalidad de plantas y síntomas en follaje y raíces, e inoculación en tallos siguiendo un diseño factorial 5x2x5, y evaluándose síntomas y tamaño de lesión ocasionado. Para las pruebas de antagonismo *in vitro* fueron utilizadas aislados de *Trichoderma* y *Clonostachys*, proporcionados por el Laboratorio de Patología Forestal. Los ensayos consistieron en pareamientos en medios de cultivo, entre los aislados de hongos y de *P. cinnamomi*, siguiendo un diseño factorial 4x13x4 y evaluándose la

inhibición del crecimiento de la colonia, parasitismo de hifas, antibiosis y lisis de hifas de *P. cinnamomi*.

Los ensayos de patogenicidad en sustrato mostraron distintos grados de agresividad de *P. cinnamomi* en plantas de *A. chilensis*. El aislado D-17 a las 12 semanas fue el único en causar la muerte de las plantas, logrando ser reaislado en un 38%.

Por otro lado, los ensayos *in vitro*, demostraron distintos mecanismos de acción por parte de los antagonistas probados, logrando inhibir entre un 57%-95% el crecimiento micelial de *P. cinnamomi*.

**Palabras clave:** Enfermedades forestales, patologías bosque nativo, control de *Phytophthora*, patógenos de suelo.

## ABSTRACT

The genus *Phytophthora* is responsible for some of the most destructive epidemics worldwide. Among the most important species within this genus is *Phytophthora cinnamomi*, a pathogen capable of causing significant ecological impacts and economic losses in forest ecosystems due to its wide geographic distribution and polyphagous behavior. In Chile, this pathogen has been detected in commercial plantations of avocado and chestnut, and in recent years it has also affected native species such as *Araucaria*, *Nothofagus dombeyi* (coigüe), *Drimys winteri* (canelo), and it has been recently detected in *Austrocedrus chilensis* (cordilleran cypress). However, for this latter species, the pathogenicity of *P. cinnamomi* has not yet been confirmed.

*Austrocedrus chilensis* exhibits high ecological plasticity, occurring in pure or mixed forests together with species of the genus *Nothofagus*, some of which have demonstrated susceptibility to *P. cinnamomi*. The spread of *P. cinnamomi* within mixed forests could increase the likelihood of infection of *A. chilensis* trees. Control of *Phytophthora* species in commercial crops has relied on cultural management practices and the use of specific fungicides; however, frequent applications of these products may lead to the development of resistant pathogen populations. In contrast, the application of fungicides does not appear to be feasible in native forest ecosystems, making biological control a potential alternative.

The objective of this study was to verify the pathogenicity of *P. cinnamomi* isolates on *A. chilensis* and to determine the antagonistic effect of fungal strains against *P. cinnamomi*. The *P. cinnamomi* isolates were obtained from the rhizosphere of cordilleran cypress trees and other native species showing symptoms attributable to the pathogen. Pathogenicity assays were conducted on two-year-old cordilleran cypress plants using substrate infestation methods, evaluating plant mortality and foliar and root symptoms, as well as stem inoculation following a 5 × 2 × 5 factorial design, assessing symptom development and lesion size.

For in vitro antagonism assays, isolates of *Trichoderma* and *Clonostachys*, provided by the Forest Pathology Laboratory, were used. These assays consisted of dual cultures on growth media between fungal isolates and *P. cinnamomi*, following a 4 ×

13 × 4 factorial design, and evaluating inhibition of colony growth, hyphal parasitism, antibiosis, and hyphal lysis of *P. cinnamomi*.

Substrate pathogenicity assays showed different degrees of aggressiveness of *P. cinnamomi* on *A. chilensis* plants. At 12 weeks, isolate D-17 was the only one that caused plant death, and it was successfully reisolated in 38% of cases. In contrast, *in vitro* assays demonstrated different mechanisms of action by the antagonists tested, achieving inhibition of *P. cinnamomi* mycelial growth ranging from 57% to 95%.

**Keywords:** Forest diseases, native forest pathology, *Phytophthora* control, soilborne pathogens.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1.1) Antecedentes generales de *Austrocedrus chilensis*

*Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Serm. & Bizzarri con nombre común ciprés de la cordillera, es una especie endémica de los bosques subantárticos de Chile y Argentina (Rodríguez 2004). Se distribuye desde la Región de Valparaíso a la Región de los Lagos, entre las provincias de San Felipe y Palena, presentándose como poblaciones aisladas y poco densas (García y Ormazábal 2008; Pastorino *et al.* 2006).

El tipo forestal ciprés de la cordillera ocupa una superficie de 73.006 hectáreas, representando el 0,5% del total del bosque nativo en Chile (CONAF 2022). El tipo forestal posee una superficie limitada, lo que, sumado a una reducción histórica de su superficie, debido a factores como la explotación forestal, el pastoreo de ganado, y a los incendios intencionales (García y Ormazábal 2008; Cruz *et al.* 2015), la especie fue categorizada como "vulnerable" según los criterios de la Unión Internacional para la Conservación (UICN) de 2001 (Hechentleiner *et al.* 2005). No obstante, de acuerdo con una reconsideración de la Corporación Nacional del Medio Ambiente (CONAMA), la especie se encuentra actualmente en la categoría "fuera de peligro" establecido en el D.S N°51/2008 (CONAMA 2008). Aunque el manejo de *A. chilensis* está sujeto a una protección legal; los planes de manejo han resultado insuficientes para detener su degradación (Enricci y Massone 2003).

Para *A. chilensis* se han descrito varios problemas sanitarios de origen entomológico, entre los que destacan *Anthaxia concinna* (Mannerheim) (Coleoptera: Buprestidae) un insecto barrenador que se establece en árboles con madera muerta (Havrylenko y Winterhalter 1949; Rajchenberg y Gómez 2005), *Cinara cupressi* (Buckton) (Hemiptera: Aphidae) un áfido que afecta el follaje y que es considerado entre las 100 especies invasoras más dañinas en el mundo (Baldini *et al.* 2008), *Nanodacna austrocedrella* (Laundry y Adamski) (Lepidoptera: Agonoxenidae) un microlepidóptero cuyas larvas infectan conos y semillas que hasta ahora sólo ha sido detectado en Argentina (Becker *et al.* 2010) y *Nyctelia* sp. (Coleoptera:

Tenebrionidae) un insecto barrenador, cuyos adultos provocan anillamiento en el cuello de las plantas (Rajchenberg y Gómez 2005).

Entre las enfermedades descritas para *A. chilensis* se encuentran las causadas por hongos, por ejemplo; la roya blanca cuyo agente causal es *Mikronegeria alba* Oehrens et Peterson (Uredinales: Mikronegeriaceae); enfermedades foliares y de ramillas asociadas a *Seiridium cardinale* (Wag.) Sutt. et Gibs.) (Xylares: Amphispbaeraceae) y *Appendiculella austrocedri* Butin (Meliolales: Meloliaceae) (Peterson y Oehrens 1978; Butin y Peredo 1986; Rajchenberg y Gómez 2005), este último con un rol incierto como patógeno primario. Sin duda la enfermedad más relevante para *A. chilensis* es el "mal del ciprés", asociada al patógeno *Phytophthora austrocedri* (Greslebin), detectado en localidades del sur de Argentina (Greslebin y Hansen 2007; Taccari *et al.* 2019). En esta enfermedad el patógeno afecta al cambium y floema, ocasionando necrosis subcorticales que derivan en la pudrición de raíces principales y finalmente provocando la muerte del árbol (Greslebin y Hansen 2009).

En el marco de un estudio de la sanidad del ciprés de la cordillera en la línea de transmisión eléctrica Colbún-Charrúa (Empresa Celeo), realizado en el año 2018, se detectó mortalidad en un bosque en la pre-cordillera de Linares, en la región del Maule. Los síntomas observados fueron una clorosis y necrosis foliar, muerte parcial de copa (muerte regresiva) y mortalidad de árboles, aislándose en el año 2021 a *P. cinnamomi* desde la rizosfera de árboles con síntomas en la copa. Considerando los antecedentes destructivos de *P. cinnamomi* en diversos ecosistemas forestales nativos en el mundo, es posible considerarlo como una amenaza potencial a la conservación del ciprés de la cordillera en Chile (Comunicación personal, Eugenio Sanfuentes, 2022)

### **1.2) Antecedentes de *Phytophthora* spp. e importancia en ecosistemas forestales**

El género *Phytophthora* (del griego Phytón, planta y Phtora, destructor), clasificado en el reino Chromista, filo Pseudofungi y en la clase Oomycetes (oomicetos); es

causante de las epidemias más destructivas en especies forestales en todo el mundo, comprende una serie de patógenos hemibiótrofos que afectan cultivos agrícolas, plantaciones forestales y bosques nativos, representado un desafío para la bioseguridad internacional (Soto *et al.* 2017; Vannini y Morales-Rodríguez 2022).

Los oomicetos son similares a los hongos verdaderos por su forma de crecimiento y reproducción, pero sus paredes celulares están compuestas principalmente por celulosa. Poseen hifas cenocíticas y producen esporas asexuales llamadas zoosporas. Las zoosporas son biflageladas, lo que permite su movimiento y dispersión en condición de suelos saturados (Ciampi 2002; Erwin y Ribeiro 1996; Giachero *et al.* 2022). Hoy en día se conocen más de 260 especies reconocidas, y muchas están asociadas al deterioro y mortalidad de bosques, plantaciones y cultivos de diferentes partes del mundo (Ashis *et al.* 2025; Abad *et al.* 2023; Vannini y Morales-Rodríguez 2022; Jung *et al.* 2000).

Para la clasificación de las especies de *Phytophthora*, se han desarrollado claves basadas principalmente en la morfología. Tucker (1931) utilizó la morfología del esporangio y gametangio y las temperatura-crecimiento. Complementada por Waterhouse (1963-1970), fueron determinados a seis grupos basados en parámetros morfológicos, asignándose alrededor de 60 especies dentro de estos grupos. Este sistema establecido por Waterhouse fue revisado y profundizado por Newhook *et al.* (1978) y Stamps *et al.* (1990) sin embargo, estudios subsecuentes realizados por Erwin y Ribeiro (1996), consideraron validas solo 58 especies (Brasier *et al.* 2022; Abad *et al.* 2023).

El primer estudio filogenético basado en secuencias de ADNr de ITS incluyó a 50 especies de *Phytophthora* separadas en ocho clados y dos clados con una relación más (9-10). En esta filogenia del género, *P. cinnamomi* fue clasificado en el Clado 7, junto con otras especies, como *P. alni*, *P. cambivora*, *P. europaea* y *P. fragaria*. Las especies agrupadas en este clado comparten características filogenéticas que las distinguen de otros clados. Algunos rasgos comunes, comparten caracteres morfológicos, sistemas de reproducción y temperaturas cardinales, son patógenos de suelo, capaces de ser transmitido por el agua, afectando a especies leñosas como *P. uniformis*, *P. alni* y *P. multiformis*. Este clado también destaca por contener híbridos interespecíficos que son sexualmente funcionales, es decir, han surgido cruces entre

especies distintas con capacidad reproductiva (*P. x cambivora*, *P. x incrassata* y *P. x heterohybrida*) (Lamour 2013; Yang *et al.* 2017; Jung *et al.* 2016).

Entre las especies relevantes de *Phytophthora* relevantes que afectan ecosistemas forestales nativos se encuentran; *P. ramorum* que causa la muerte del roble (“Sudden Oak Death”) en América del Norte (Rizzo *et al.* 2002); la especie híbrida *P. x cambivora* asociada a la enfermedad de la tinta del Castaño en Europa central y sudoriental, *P. lateralis* causando mortalidad en cedros en la costa occidental del USA (Hansen y Hamm 1996); *P. sansomeana* en viveros de pino oregón y *P. quercetorum* en *Quercus* (Frankel y Hansen 2011); *P. kernoviae* causando necrosis del follaje en *Gevuina gavellana* y *D. winteri* en Inglaterra (Brasier *et al.* 2005) y *P. pseudosyringae* provocando canchros gomosos en fustes y ramas en árboles de *Nothofagus obliqua* (Scanu *et al.* 2012).

*Phytophthora cinnamomi* posee esporangios no papilados y persistentes (permanecen adheridos a la hifa), anteridio anfígeno, con amplio rango de hospederos especialmente leñosos (Kroon *et al.*, 2012). Es un patógeno de suelo que infecta normalmente las raíces finas alimentadoras, pero también puede invadir tallos leñosos, a través de heridas mecánicas o naturales (O’Gara *et al.* 2015). La colonización de las raicillas provoca una pudrición de raíces que interfiere con la captación y el transporte de agua hacia los brotes, provocando síntomas como marchitez y clorosis foliar, copas translúcidas, canchros en la base del fuste, y pudrición de raíces (Sena *et al.* 2018; Jung *et al.* 2018; Erwin y Ribeiro 1996). El patógeno posee cierta capacidad de crecer como saprófito en el suelo y puede sobrevivir formando clamidosporas en plantas infectadas asintomáticas hasta incluso por seis años, contribuyendo a su supervivencia a largo plazo (Hardham y Blackman 2017; Sena *et al.* 2018).

*Phytophthora cinnamomi* es considerada como la especie más devastadora del género debido a su amplia distribución y por su amplio rango de hospederos (De Andrade *et al.* 2020; Zentmyer 1983; Erwin y Ribeiro 1996; Hardham y Blackman 2018). Su impacto es dramático tanto en entornos agrícolas-forestales comerciales como en ambientes naturales (Erwin y Ribeiro 1996; 2008n *et al.* 2012; Hardham y Blackman 2018), y debido a esto, ha sido catalogada como una de las 100 peores especies exóticas invasoras (Lowe *et al.* 2004). *P. cinnamomi*, estaría más extendida en

regiones atlánticas como Inglaterra y Francia (Jung *et al.* 2018). Sin embargo, entre los mayores impactos de este patógeno es en Australia occidental, causando la enfermedad denominada “Mal de Jarrah” en las especies nativas *Banksia grandis* y *Eucalyptus marginata* provocando mortalidad que puede alcanzar hasta el 90% (Weste y Marks, 1987; Sena *et al.* 2018), y se indica que 2.284 especies nativas son susceptibles y 800 altamente susceptibles. También se ha detectado *P. cinnamomi* en bosques de *Quercus* sp. en España y Portugal (Brasier 1995) y en plantaciones de *Araucaria angustifolia* en Brasil en donde se encuentra causando pudrición de raíz y de la corona (Dos santos *et al.* 2011).

### **1.3) *Phytophthora* spp. y su presencia en Chile**

En Chile se han diagnosticado distintas especies de *Phytophthora* como patógenos en cultivos agrícolas y forestales, y en ecosistemas forestales nativos. Las especies *P. citrícola* y *P. citrophthora* son agentes causales de la pudrición de raíz y muerte regresiva en frambueso (*Rubus idaeus*) (Wilcox *et al.* 2002) y *P. cactorum* en manzanos (Latorre *et al.* 2001). Recientemente fue reportada *P. syringae* causando pudrición de frutos en manzanos, durante el almacenamiento en frío (Lolas *et al.* 2016). En plantaciones de *Pinus radiata* se relató por primera vez la enfermedad “Daño foliar del pino” cuyo agente causal es *P. pinifolia* (Durán *et al.* 2008). En la muerte regresiva en vivero de *N. macrocarpa* la patología fue asociada a *P. nicotianae* y *P. citrophthora* (Valencia *et al.* 2011). La diversidad de *Phytophthora* spp. en ecosistemas forestales nativos se confirmó en sectores del bosque valdiviano, aislándose *P. pseudokernoviae*, *P. x cambivora*, *P. pseudosyringae* y *P. cinnamomi*, entre otras (Jung *et al.* 2018).

Entre las especies de *Phytophthora*, *P. cinnamomi* podría ser la más frecuente y ampliamente distribuida en nuestro país (Besoain *et al.* 2020), detectada en viveros de especies nativas como *N. alpina*, *N. obliqua*, *N. dombeyi* y *Persea lingue* (González y Opazo 2002). En el bosque valdiviano se ha asociado al declino de *Drimys winteri*, *N. dombeyi*, *Luma apiculata*, *Prumnopitys andina* entre otras, y demostrándose su patogenicidad en plantas de *N. dombeyi* y *G. avellana* (Jung *et al.* 2018).

Recientemente, en formaciones de *A. araucana* de la Cordillera de Nahuelbuta se aisló frecuentemente *P. cinnamomi* desde la rizosfera de árboles con muerte regresiva de copa, comprobándose su patogenicidad en la especie mediante ensayos en condiciones controladas (Sanfuentes *et al.* 2022). La detección de *P. cinnamomi* en árboles de *A. chilensis* en la precordillera de Los Andes, Linares es reciente, por lo que se desconoce su rol como patógeno en la especie, así como la prevalencia del patógeno en las áreas con mortalidad de *A. chilensis* (Comunicación personal Eugenio Sanfuentes, 2022).

Se propone que una mayor severidad de algunas de las enfermedades causadas por especies de *Phytophthora*, especialmente aquellas que afectan las raíces, podrían ser beneficiadas por los efectos del cambio climático. El impacto del cambio climático en las enfermedades de las plantas afectaría varias facetas, como sería la evolución de los patógenos y su interacción con el huésped (Lahlali *et al.* 2024).

De esta manera, la intensificación del impacto de *P. cinnamomi* en ecosistemas naturales y agrícolas, favorecido por las nuevas condiciones climáticas asociadas al calentamiento global; temperaturas más cálidas y reducción y aumento en la frecuencia de lluvias en algunas regiones, podría estar creando un ambiente adecuado para la dispersión de zoosporas y el desarrollo de infecciones en las raíces (Bergot *et al.* 2004; Hardham 2005). El efecto climático indicado, combinado con temporadas con estrés hídrico y sequías, debido al aumento de temperaturas y reducción de las precipitaciones, podrían tener un efecto en debilitar las defensas naturales de las plantas (efecto de predisposición) a la infección y colonización del patógeno, significando una mayor susceptibilidad a enfermedades como la pudrición causada por *P. cinnamomi* (Desprez-Loustau *et al.* 2006).

Asimismo, se prevé que el cambio climático permita que ampliar la colonización y sobrevivencia de *P. cinnamomi* hacia otras regiones geográficas no afectados previamente, como sería en áreas montañosas y zonas más frías, ampliando su impacto a nivel mundial. Modelamientos realizados por Cidre-González *et al.* (2025), aseguran que las temperaturas invernales no son un factor limitante, es decir, que *P. cinnamomi* es capaz de sobrevivir y crecer a temperaturas bajas como 7,5°C, y que finalmente, la principal amenaza del cambio climático viene de la aceleración del ciclo

de vida del patógeno en estaciones cálidas, por lo que el crecimiento de este patógeno se verá potenciado en cualquier escenario que implique aumento de temperaturas.

Un claro ejemplo de cómo el clima interactúa con la dinámica de enfermedades causadas por *Phytophthora* es el declive del aliso europeo asociado al complejo *P. alni*, enfermedad reportada desde los años noventa. Modelos ecológicos desarrollados para este patógeno demuestran que los parámetros climáticos (Temperaturas ambientales y de suelo, temperaturas invernales, humedad y precipitación), es decir, una combinación de temperaturas favorables para el crecimiento del patógeno (aumentando con el cambio climático) y la ocurrencia de condiciones hidrológicas que facilitan la infección, explican su distribución y severidad en Europa. (Aguayo *et al.* 2014)

#### **1.4) Manejo de enfermedades causadas por *Phytophthora***

Para abordar los desafíos que plantea *P. cinnamomi* en ecosistemas forestales, es crucial implementar estrategias de manejo sostenible, basándose en los principios de manejo integrado de enfermedades, con la finalidad de mitigar el impacto del patógeno en diferentes escenarios (Garbelotto y Gonthier 2013).

En el caso de las enfermedades de raíces presentan un desafío adicional, debido a que el suelo, que es donde habitan los patógenos, les proporciona una importante protección frente a las medidas de control convencionales (García 2010). En consecuencia, métodos químicos presentan una eficacia limitada. La mayoría de los fungicidas tradicionales no tienen acción directa sobre este grupo de patógenos, y su gran plasticidad genética les permite a las poblaciones del patógeno adaptarse rápidamente y generar resistencia a los productos utilizados (Tyler 2001; Castro *et al.* 2012). En el caso de *P. cinnamomi*, las estrategias de manejo pueden resultar aún más complejas, ya que las plantas infectadas pueden permanecer asintomáticas hasta etapas avanzadas de la enfermedad (Brown *et al.* 2019).

Dada la situación anterior, se recomienda aplicar un enfoque de manejo integrado que combine las principales estrategias de control (Tyler 2001; Castro *et al.* 2012;

Töfoli *et al.* 2013). Entre ellas se incluyen (i) manejo cultural, que contempla evitar zonas de alta humedad o suelos compactados (Ribeiro 1978; Giachero *et al.* 2022); (ii) control químico, una de las estrategias más comúnmente utilizadas, aplicación de fungicidas químicos basados en fosfonatos, como fosfito potásico en sus distintas modalidades (foliar, baño de raíz, inyecciones) (Yáñez-Juárez *et al.* 2018), o fungicidas específicos como metalaxil y benalaxil (Töfoli *et al.* 2013). A pesar de la eficacia de este enfoque, ya se han reportado poblaciones resistentes a algunos de estos compuestos (Hu *et al.* 2010; Hunter *et al.* 2018; Hunter *et al.* 2023). (iii) manejo integrado de la enfermedad, que busca mantener las poblaciones de patógenos en niveles bajos sin causar daños económicos, incluyendo dentro de sus herramientas la utilización de agentes de control biológico (ACB) (Giachero *et al.* 2022).

Los ACB han generado un aumento en el interés general debido a la mayor conciencia ambiental y la implementación de estrategias de manejo integrado de plagas, lo que se propone como una alternativa más amigable al no generar efectos negativos en humanos, animales y en el medio ambiente (Bolívar-Anillo 2021; Prospero *et al.* 2021).

### **1.3) Control biológico como alternativa de manejo de *Phytophthora***

Baker y Cook (1974) definen el control biológico como “una reducción de densidad del inóculo o de las actividades determinantes de enfermedades provocadas por un patógeno o parásito en sus estados de actividad o dormancia, por uno o más organismos, realizado naturalmente o a través de manipulación del ambiente, hospedero o antagonista, o por la introducción en masa de uno o más antagonistas”. En un sentido estricto, el control biológico es el uso de un organismo vivo (ACB) que interaccionan directa o indirectamente con el agente de daño (Heimpel y Mills 2017; Stenberg *et al.* 2021).

Los mecanismos descritos para los ACB incluyen: (i) competencia, ya sea por sitio de infección o por substrato; (ii) antibiosis, en la que se producen compuestos antimicrobianos o toxinas para limitar el crecimiento del patógeno; (iii)

micoparasitismo, que implica el un ataque directo de una especie sobre otra, destruyendo sus estructuras somáticas o de sobrevivencia y el aprovechamiento de sus componentes como fuente de nutrientes (Lorito y col 1996); (iv) inducción de resistencia, que es un tipo de expresión o regulación de las defensas de las plantas (Delgado-Oramas 2020). En muchos de los casos estudiados estos mecanismos pueden actuar simultáneamente (Giachero *et al.* 2022).

El suelo contiene una enorme reserva de microorganismos que comprenden bacterias, protistas, hongos y virus; y muchos de estos microorganismos o incluso metabolitos pueden usarse para el control biológico (Giachero *et al.* 2022). Diversos géneros fúngicos, en particular, el género *Trichoderma*, ha sido ampliamente estudiado y varias especies han demostrado su capacidad de proteger la planta, inducir resistencia tanto sistémica como localizada (Harman *et al.* 2004) y reducir la población del patógeno; destacando su acción frente a patógenos de importancia económica como *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia* spp., *Pythium* spp., *Alternaria* spp., y también *Phytophthora* spp. (Infante *et al.* 2009). En el caso de especies de *Phytophthora*, *Trichoderma* sp. demostró su capacidad de inhibir hasta 62% el crecimiento micelial de *P. capsici* en condiciones *in vitro*, y con un efecto supresor de la enfermedad en cultivos de pimentón (*Capsicum annuum*) (Yao *et al.* 2016), *T. harzianum* presentó antagonismo *in vitro* contra *P. palmivora* y redujó en 81% la defoliación en plantas de caucho (*Hevea brasiliensis*) (Sirikamonsathien *et al.* 2023). *T. asperellum* contra el mismo patógeno provocó lisis de hifas y causó la desintegración de las oosporas (Jiang *et al.* 2016). Sánchez *et al.* (2019) demostraron que *T. guizhouense* inhibió el crecimiento micelial de *P. cactorum* (52,3%), *P. inundata* (62,19%), *P. rosacearum* (58,18%) y *P. lacustris* (50%), de forma similar, los ensayos en campo demostraron que cepas regionales de *Trichoderma harzianum* aplicadas de manera preventiva reducía de manera significativa el área de lesión, protegiendo a los perales de la pudrición de cuello causado por *P. cactorum*.

El éxito de *Trichoderma* no solo se ha obtenido en ensayos *in vitro*, sino que también en ensayos con plantas. *T. asperellum* redujo la población de *P. ramorum* en el suelo de viveros de *Viburnum tinus*, protegiendo las raíces y reduciendo el inóculo secundario producido desde las raíces infectadas (Widmer y Shishkoff 2017). *T.*

*harzianum* tuvo un efecto en reducir en 97% la pudrición en peral causada por *P. cactorum*, y aislados de *T. harzianum* y *T. koningii* redujeron la mortalidad causada por *P. cactorum* en huertos comerciales de manzano (Alexander y Stewart 2001; Sánchez *et al.* 2019).

Otro grupo de hongos antagonistas importantes, son aquellos pertenecientes al género *Clonostachys*. En particular *Clonostachys rosea* es una especie cosmopolita que es aislada desde suelo y de plantas, presentando un comportamiento endófito (Jensen *et al.* 2021). Su eficacia como agente biocontrol ha sido comprobada contra diversos patógenos de suelo, incluyendo especies de *Phytophthora*, *Pythium*, *Botrytis* y *Rhizoctonia*, actuando principalmente por competencia y micoparasitismo (Whipps y Lumnsden 2001; Lahlali *et al.* 2020).

Aislados de esta especie han demostrado poseer un eficaz control en cultivos hortícolas contra hongos patógenos de suelo como *Pythium* spp. y *F. culmorum*, y contra patógenos en semillas de cereales (Mamarabadi *et al.* 2008). En enfermedades causadas por *Botrytis* sp. ha reducido la incidencia en el tizón de flores y frutos de frutilla en 68% y 65%, respectivamente, aumentando el rendimiento del cultivo en 75% (Cota *et al.* 2009). En la enfermedad causada por *Fusarium* en gramíneas el control de *C. rosea* ha sido asociado a la protección de las raíces y la activación del sistema de defensa de la planta (Roberti *et al.* 2008). Aislados de *C. rosea* lograron una reducción entre 80-100% en la mortalidad de plantas de *P. radiata* asociada a *Fusarium circinatum*, principal patógeno en viveros de *P. radiata* en Chile. (Moraga *et al.* 2011). En la capacidad de *C. rosea* como agente de biocontrol frente a *P. cinnamomi*, son escasos los estudios que demuestren de manera concluyente su efectividad. Entre estos, se encuentra el efecto de *C. rosea*, aislado como endófito de *Cinnamomun cassia* (Canela), evidenciándose actividad antagónica contra *P. cinnamomi*, *P. multibullata* y *P. x vanyenensis* y reduciendo el daño en raíces y tallo (Dang *et al.* 2023). De forma similar aislamientos de *C. rosea*, obtenidos desde raíz y tallo portainjertos de manzanos, mostraron un efecto significativo de *P. cactorum*, alcanzando un nivel de control entre 74 y 77% (Cotes *et al.* 2002)

El mercado global de productos de biocontrol ha crecido rápidamente en las últimas décadas, agrupando una amplia variedad de agentes microbianos, enzimáticos y semioquímicos, comercializados para el área agrícola y cultivos en vivero y se prevé un crecimiento sostenido durante los próximos años (Palazzini y Sarroco 2023). En Chile, el crecimiento de este mercado se ve evidenciado en el interés de diversas instituciones como Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) y quienes han impulsado el primer Centro Nacional de Bioinsumos (CeNBI) (Instituto de Investigaciones Agropecuarias 2023) y el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), quién registra y publica listados y fichas técnicas de insumos biológicos (Servicio agrícola y ganadero 2025).

Dentro de los bioproductos autorizados y comercializados a nivel nacional, destacan aquellos a base de *Trichoderma*, como "Trichoforte", formulado con *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma harzianum*; también "Trichonativa" a base de *Trichoderma* spp. en que se indica acción de control frente *Phytophthora* spp. (Anasac 2025; Bionativa 2023). También se destaca "Remedier" a base de *T. gamsii*; "Incept" compuesto por *T. hamatum*; y los bioproductos "T34", "Asperello T34", "T34 Biocontrol" formulados la cepa *T. asperellum*-34, que ha demostrado ser eficaz reducir la incidencia (71%) de *P. capsici* en cultivos de pimiento en España (Segarra et al. 2013). Por otro lado, con presencia en Chile están disponibles los bioproductos "Prestop" y "Prestop mix", formulados a base de *C. rosea*. Con la excepción de Trichonativa, los otros bioproductos no han sido utilizados contra *P. cinnamomi* en condiciones de viveros forestales.

La investigación referida a la búsqueda de hongos antagonistas se ha desarrollado desde hace varias décadas. Es el caso de los estudios involucrando especies de *Trichoderma* y *Clonostachys* que han demostrado ser eficaces contra importantes fitopatógenos tanto en condiciones *in vitro* como en campo; lo que estaría indicando que pudiesen tener un efecto de control sobre *P. cinnamomi*. Para cualquiera de los casos de los antagonistas analizados, se plantea la posibilidad de desarrollar un producto biológico que debiese ser utilizado en un contexto de manejo integrado de la enfermedad.

## **2. HIPÓTESIS**

Aislados de *Phytophthora cinnamomi* son patógenos en ciprés de la cordillera, y cepas de hongos poseen actividad antagónica *in vitro* sobre *P. cinnamomi*.

## **3. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la patogenicidad de aislados de *Phytophthora cinnamomi* en ciprés de la cordillera y el potencial antagónico de hongos de suelo frente a *P. cinnamomi*

### **Objetivos específicos**

- a) Determinar la patogenicidad y agresividad de aislados de *P. cinnamomi* en ciprés de la cordillera.
- b) Evaluar la capacidad antagónica de hongos sobre *P. cinnamomi*.

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1) Ensayo de patogenicidad en plantas de ciprés de la cordillera**

El ensayo se realizó en la temporada de primavera de 2024, en el vivero de la Facultad de Ciencias Forestales, de la Universidad de Concepción. Fueron utilizadas plantas de *A. chilensis* de dos años y medio de edad, con 15 cm de altura, proporcionadas por la empresa Celeo. Las plantas fueron mantenidas en el vivero y trasplantadas de forma individual en bolsas plásticas de 20x15 cm conteniendo aproximadamente 1 L de compost de corteza de pino.

En las pruebas de patogenicidad se emplearon cuatro aislados de *P. cinnamomi*, todos colectados de la rizósfera de árboles con síntomas de muerte regresiva de copa. El aislado *P. cinnamomi* D-17 fue obtenido desde la rizosfera de árboles de ciprés de la cordillera, precordillera de Linares, Región del Maule. El aislado de *P. cinnamomi* Phy19, obtenido desde rizosfera de árboles de *N. alpina* del Parque Nacional Oncol y los aislados de *P. cinnamomi* Phy80 y Phy113 obtenidos desde rizosfera de *N. alpina* en la reserva costera valdiviana, Provincia de Valdivia, Región de Los Ríos. Los aislados Phy19, Phy80 y Phy113 fueron previamente confirmados como patógenos en especies del bosque valdiviano (Coigüe y Avellano) (Navarro *et al.* 2016). Los aislados de *P. cinnamomi* se encontraban conservados en viales con agua destilada estéril y semillas de cáñamo (Wick *et al.* 2016) en el cepario del Laboratorio de Patología Forestal del Centro de Biotecnología.

Para los ensayos realizados en plantas, los aislados de *P. cinnamomi* fueron cultivados en medio CMA-PARPH y se mantuvieron en incubación a 20°C, hasta que la colonia alcanzó el borde de la placa de Petri.

#### **4.1.1) Pruebas de patogenicidad**

Las pruebas de patogenicidad realizadas consistieron en dos métodos, uno de ellos mediante la infestación de sustrato de los aislados de *P. cinnamomi* y el otro método, en la inoculación con discos de micelio en el tallo de las plantas de *A. chilensis*.

Para el método de infestación de sustrato, la preparación de inóculo de los aislados de *P. cinnamomi* se realizó en base a lo descrito por Jung *et al.* (1996) en matraces de 1L con vermiculita (500mL), avena (40ml) y caldo de verduras (350mL). El material fue autoclavado para luego inocular con discos de 5mm de diámetro de la colonia de los patógenos crecida previamente. Se incubaron durante cuatro semanas a 20°C en oscuridad, con agitación manual de manera semanal. Para los controles se realizó la inoculación solo con discos de agar. La mezcla obtenida se mezcló con sustrato de corteza de pino en relación 1:3. La aplicación del sustrato infestado se realizó reemplazando el tercio superior de cada planta según el tratamiento correspondiente. Se realizaron inundaciones de 72h cada cuatro semanas para estimular la formación de esporangios y liberación de zoosporas.

Para el método de inoculación en tallo se utilizaron discos de la colonia de *P. cinnamomi*, que estuvieron creciendo en PDA durante 21 días en cámara de incubación a 20°C. La inoculación se realizó siguiendo la metodología de O'gara *et al.* (1996). Se procedió a desinfectar superficialmente el punto de inoculación cercano a la base del tallo. Con ayuda de bisturí esterilizado se retiró una porción de la corteza y se depositó un disco de micelio del aislado de *P. cinnamomi* correspondiente, para luego sellar con Parafilm® el punto de inoculación. Junto con la inoculación de las plantas de *A. chilensis*, se utilizaron como control plantas de *N. dombeyi* que demostraron ser susceptible a *P. cinnamomi* en ensayos previos (Navarro *et al.* 2016; Jung *et al.* 2018).

Durante el ensayo el riego de las plantas se realizó diariamente (a capacidad de campo) junto con registrar la aparición de síntomas. No se efectuaron aplicaciones de fertilizantes o fungicidas.

#### 4.1.2) Diseño experimental y evaluaciones

El ensayo de infestación de sustrato siguió un diseño experimental completamente al azar, con cinco tratamientos (aislados de *P. cinnamomi* y control (sin *P. cinnamomi*), considerando seis repeticiones y siendo la unidad experimental la planta.

Para el ensayo de inoculación en tallo, para cada aislado de *P. cinnamomi* se emplearon cinco plantas de *A. chilensis*, siendo la unidad experimental la planta. En el caso de este método, se incluyeron cinco plantas de *N. dombeyi* para ser inoculadas con cada aislado de *P. cinnamomi*, siguiendo un diseño experimental factorial (5x2x5).

Durante las 12 semanas de duración del ensayo, cada siete días se registró la severidad de síntomas y la mortalidad de plantas, realizándose un registro fotográfico de los síntomas y una evaluación de la severidad de síntomas en follaje. y se le asignó el valor correspondiente de la escala.

La severidad de los síntomas fue evaluada mediante una escala basada en la proporción del follaje con síntomas (patrón desde la porción basal del follaje hacia la porción apical), la que comprendió cinco niveles, donde:

**Tabla 1:** Escala de niveles de severidad de síntomas en follaje de plantas de *Austrocedrus chilensis*.

Categoría	Descripción
1	Follaje asintomático
2	Síntomas leves, clorosis y necrosis incipiente, marchitez leve, afectando 25% del follaje.
3	Síntomas moderados, afectando entre 26-50% del follaje. .
4	Síntomas severos, necrosis y marchitez, afectando entre 51—75% del follaje.
5	Síntomas muy severos sobre 75% necrosis y/o marchitez del follaje, muerte de la planta.

Al finalizar el ensayo, se determinó la presencia de canchros en base del cuello y necrosis en las raíces. Para esto, desde todas las plantas se realizaron aislamientos

desde cuello y raíces, colectándose cinco fragmentos desde el cuello y treinta segmentos de raíces (1 cm) por planta, para luego ser sometidos a una desinfección superficial y sembrados en placas con medio selectivo CMA-PARPH (Selectivo de *Phytophthora*). Con este procedimiento estandarizado para los Postulados de Koch permitirá establecer la patogenicidad de los aislados de *P. cinnamomi* y, por otro lado, cuantificar un nivel de colonización de las raíces por los aislados.

Después de las evaluaciones, todo material vegetal y substrato fue esterilizado a 121°C en autoclave y manejado como residuo inerte biológico, gestionado por el plan de manejo de la Universidad de Concepción.

#### **4.2) Evaluación de antagonismo *in vitro* contra *P. cinnamomi***

##### **4.2.1) Aislados de hongos y oomicetos utilizados**

Se utilizaron siete aislados de *Trichoderma*, cinco de *Clonostachys*, todos proporcionados por el Laboratorio de Patología Forestal de la Universidad de Concepción (Anexo 1). Los aislados fueron recolectados de distintos ambientes, como endófitas de árboles de *P. radiata*, *A. chilensis* y *A. araucana*. Algunos de ellos poseían antecedentes de antagonismo *in vitro* contra patógenos como *F. circinatum*, *Macrophomina phaseolina* y *Neonectria fuckeliana*.

Los aislados se encontraban almacenados en agar-papa-dextrosa (PDA) a 4°C. Para los ensayos *in vitro* los aislados fueron cultivados en medio PDA e incubados a 20°C entre 7-10 días y de 5-7 días para los aislados de *Clonostachys* y *Trichoderma*, respectivamente (Andrades-Hoyos *et al.* 2017; Moraga-Suazo *et al.* 2011). En el caso de *P. cinnamomi* los aislados fueron dispuestos para crecer en medio de cultivo PDA, durante tres semanas a 20°C.

##### **4.2.2) Pruebas de antagonismo *in vitro***

Se realizaron pareamientos *in vitro* entre los aislados de *Trichoderma* y *Clonostachys* y los de *P. cinnamomi*. Para tal efecto, se obtuvieron discos de micelio de la zona de

crecimiento activo (punta de hifa) de 5mm de diámetro de las colonias creciendo en medio PDA (4.1.1). Los discos se dispusieron en extremos opuestos de una placa de Petri con medio PDA. Los pareamientos se incubaron a 20°C, en oscuridad, hasta que las colonias de los controles (patógeno) alcanzaron el borde opuesto de la placa (Ezziyyani 2004). Se evaluaron mecanismos de antagonismo como competencia mediante el cálculo del porcentaje inhibición de crecimiento radial (I.C.R(%)) (Jaramillo (2014):

$$\frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

Donde R1 corresponde al radio del patógeno testigo y R2 es el crecimiento radial del patógeno en presencia del antagonista. La ocurrencia de antibiosis se avaluó midiendo halo de inhibición en el crecimiento de la colonia en los aislados de *Phytophthora*. Para la evaluación del parasitismo de hifas se procedió a la observación de enrollamiento de hifas de los antagonistas sobre las hifas de *Phytophthora* en la zona de interacción de las colonias, empleándose microscopio de luz (X40) (Sirikamonsathien *et al.* 2023; Dang *et al.* 2023; Van Tran *et al.* 2023)

El diseño experimental fue factorial 4x13x4, considerando cuatro aislados de *P. cinnamomi*, trece tratamientos (doce antagonistas y un control), y con cuatro repeticiones cada uno, siendo la unidad experimental la placa de Petri.

### **4.3) Identificación molecular**

#### **4.3.1 Extracción de ADN**

A partir de los cultivos puros de los aislados obtenidos desde muestras de raíces/cuello, se obtuvo micelio aéreo para la extracción de ADN genómico. Este procedimiento se realizó siguiendo el protocolo del fabricante (GeneJet). Se utilizaron matrices cilíndricas en tubos de 2mL, para la fragmentación del tejido, adicionando 180 ul de *Digestion Solution* y 20ul de *Proteinase K* para luego homogeneizar la muestra en vortex. La muestra se dejó incubar a 56°C por 60 min. Aplicando vortex cada 20 min. Se adicionó 20ul de *Rnase Solution*, se realizó vórtex y se dejó incubar

a temperatura ambiente por 10 min. Luego se adicionaron 20ul de *Lysis Solution* y se repitió vortex hasta obtener una mezcla homogénea. Se agregaron 400ul de etanol al 50% y se llevó a centrifugar por 10 min. A 12.000 XG. Desde lo obtenido se transfirieron 500ul a una columna inserta en un tubo de colecta y se centrifugó por 1 min a 6.000 XG para transferir el filtro a un nuevo tubo de colecta. Se adicionan 500ul de *Wash Buffer I* (con etanol) y se centrifugó por 1 min a 8.000 XG para descartar el filtrado. Se agregaron 500ul de *Wash buffer II* (con etanol) y se centrifugó por 1 min a 8.000 XG para descartar el filtrado y transferir el filtro a un tubo de 1,5mL. Se agregaron 40ul de *Elution Buffer* en el centro de la membrana de filtrado y se dejó incubar por 2 min a temperatura ambiente para luego centrifugar por 1min a 10.000 XG. Finalizado el proceso, se descarta la membrana de filtrado y se obtiene el ADN purificado

#### **4.3.2) PCR anidada con partidores género-especie específicos**

Para identificar los aislados a nivel de género y especie mediante PCR, se utilizaron los partidores YPh1 e YPh2 para *Phytophthora* spp. que generan un amplicón de 470pb. Y los partidores Ycin3 e Ycin4 para determinar la especie, partidores que generan un amplicón de 243 pb (Schena *et al.* 2008) (Anexo 3). Para la identificación de *Phytophthora* spp. se preparó en un tubo eppendorf de 1,5 ml el mix de reacción que incluye los reactivos: H<sub>2</sub>O, Buffer 5X, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, YPh1F, YPh2R Y Taq polimerasa. Se utilizó 11ul del mix, adicional 1ul de ADN genómico, obteniendo un volumen de 12ul. Se deja en termociclador. El ADN obtenido se analizó con PCR convencional para los dos conjuntos de partidores, con control negativo (*Pythium* sp.), control positivo *P. cinnamomi* (D-17) y un blanco ADE.

Para visualizar la amplificación de PCR se preparó un gel de agarosa al 1,5% con 0,45g de agarosa y 30 ml TAE 1X con 2,25ul de Safe view, para luego verter el contenido en un molde para gel de electroforesis con 1 peineta de 8 espacios. Para el marcador de peso se utilizó 1Kb (1000 pb) cargado en la primera casilla, se adicionaron 6ul de los productos de PCR obtenidos en las casillas siguientes.

Posteriormente se procede a realizar una PCR a partir de los productos de la PCR anterior, utilizando los partidores especie específicos Ycin3F e Ycin4R. En un tubo

ependorf de 1,5 ml se prepara el mix de reacción. En tubos de 0,2 ml se agregan 11ul del mix de reacción y 1ul del producto de PCR. Se deja en termociclador. Para visualizar la amplificación de PCR se preparó un gel de agarosa al 2% con 0,6g de agarosa y 30 ml TAE 1X con 3ul de Safe view, para luego verter el contenido en un molde para gel de electroforesis con 1 peiqueta de 8 espacios. Para el marcador de peso se utilizó 100pb cargado en la primera casilla, se adicionaron 6ul de los productos de PCR obtenidos en las casillas siguientes.

#### **4.4) Análisis estadístico**

Los valores de severidad obtenidos al finalizar el periodo de evaluación se analizaron mediante un análisis de varianza ANOVA de una vía, considerando el tratamiento como factor fijo. Se evaluaron supuestos de normalidad de residuos (Shapiro-Wilks) y de homogeneidad de varianzas (Bartlett test). Al no cumplir los supuestos los datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, se realizaron comparaciones múltiples post-hoc mediante la prueba de Dunn con corrección de Bonferroni. Para fines descriptivos y de visualización, los datos de severidad fueron transformados a valores de marca de clase y presentados como media  $\pm$  error estándar.

Para las pruebas de inoculación en tallo, el tamaño de lesión fue analizado mediante un ANOVA factorial de dos vías. Se evaluó normalidad y homogeneidad de varianzas. Los efectos significativos, las medias fueron comparadas mediante Tukey.

En caso de los ensayos *in vitro* se sometieron a pruebas de normalidad (Shapiro-Wilks) y Homocedasticidad de varianzas (Levene test), y fueron analizados mediante un análisis de varianza factorial de dos vías; al no cumplirse el supuesto de homogeneidad se aplicó un análisis de varianza robusto de dos vías, el cual es menos sensible a desviaciones de normalidad y heterocedasticidad. Las medias ajustadas de los factores principales fueron comparadas mediante Tukey.

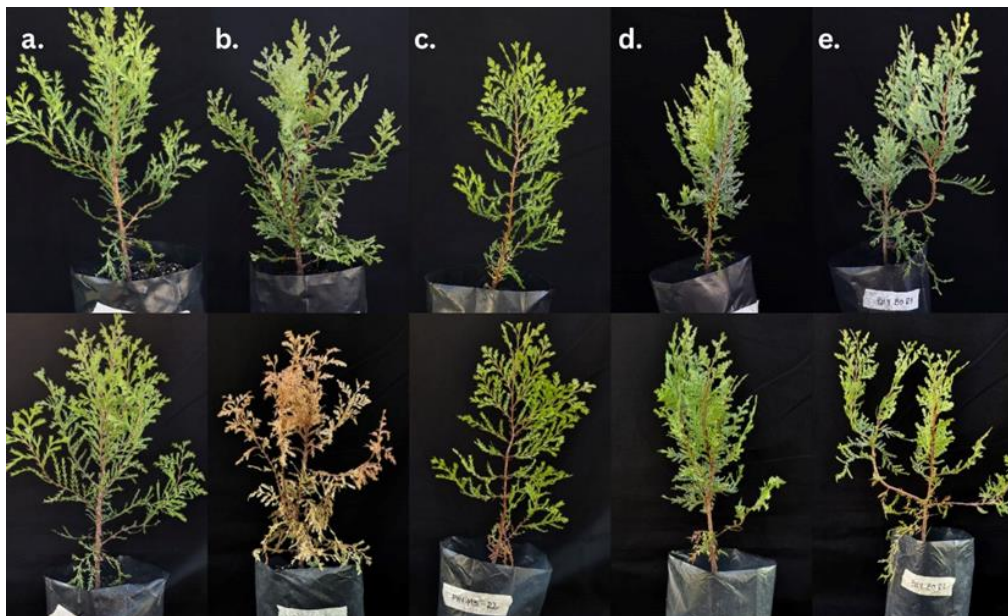
Todos los análisis estadísticos se realizaron considerando un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1) Ensayos de Patogenicidad

#### 5.1.1) Método de infestación de sustrato

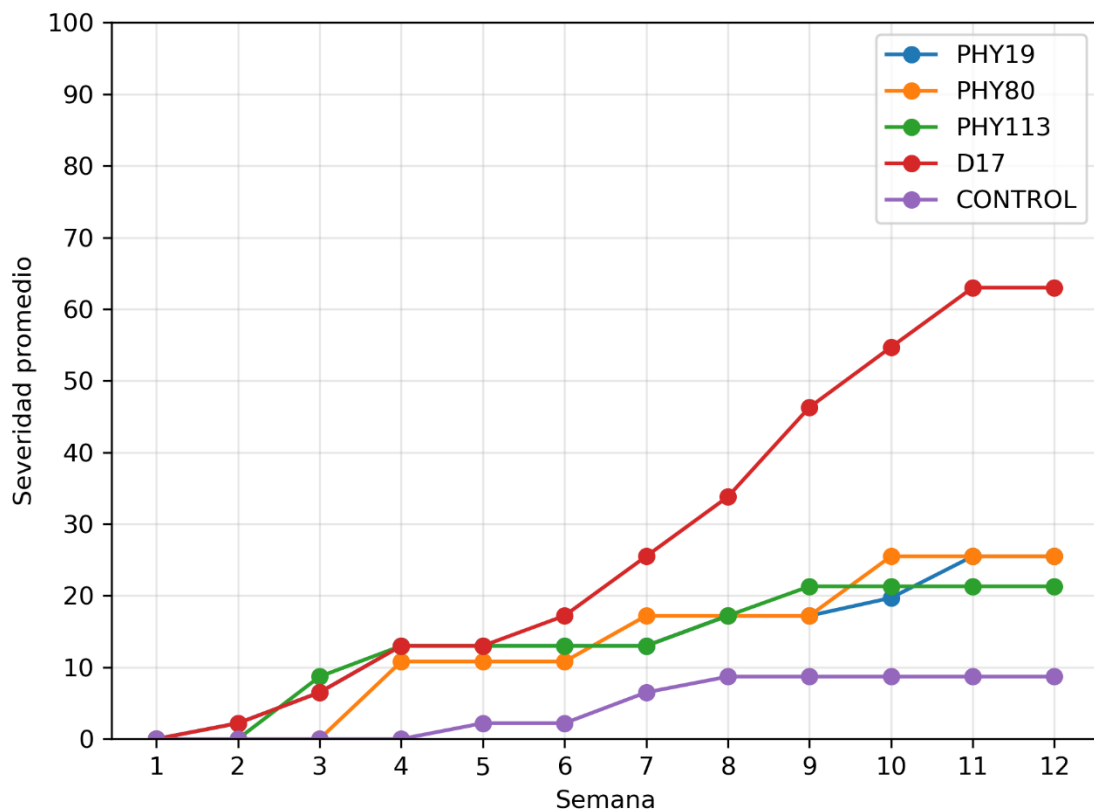
Los primeros síntomas en las plantas de *A. chilensis* se observaron a partir de la cuarta semana posterior a la infestación del sustrato, caracterizándose principalmente por una leve clorosis y amarillamiento en la porción basal del follaje. En contraste, las plantas correspondientes al grupo control no presentaron síntomas en el mismo período. A las ocho semanas, solo se evidenció una evolución marcada de los síntomas foliares en el tratamiento con el aislado D17, manifestado por una progresión del amarillamiento, extendiéndose desde la base hasta aproximadamente la mitad del follaje y luego abarcando la totalidad del follaje a las doce semanas (Figura 1).



**Figura 1:** Síntomas en plantas de *Austrocedrus chilensis* en ensayo de patogenicidad mediante infestación de sustrato con cepas de *Phytophthora cinnamomi*. a) Plantas control. b) *P. cinnamomi* D17. c) *P. cinnamomi* Phy 113, d) *P. cinnamomi* Phy 19 y e) *P. cinnamomi* Phy 80. Síntomas en la primera semana (línea superior) y duodécima semana (línea inferior).

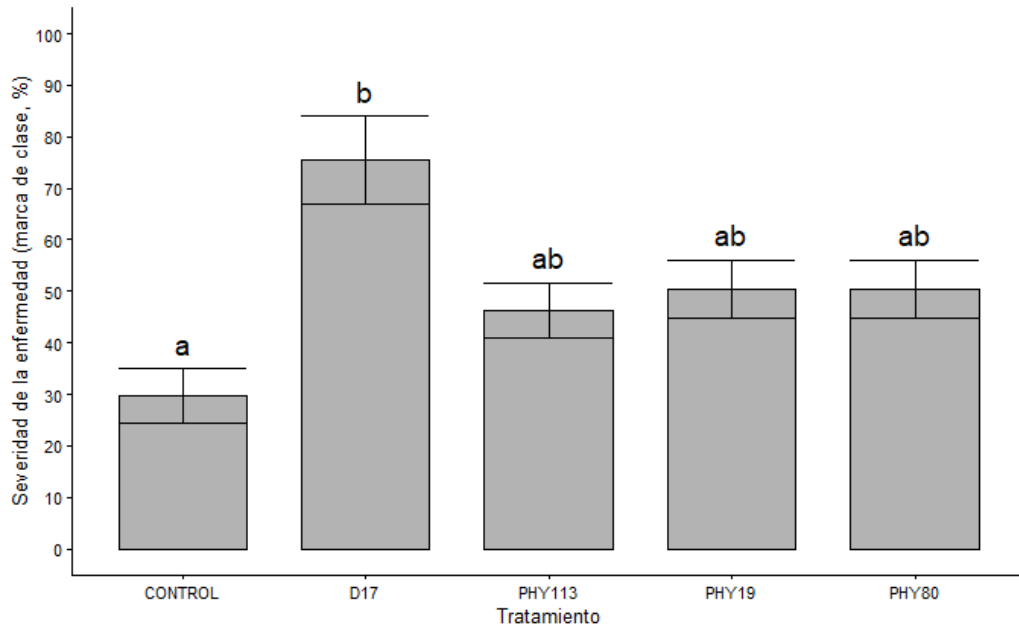
El tratamiento con la cepa D17 mostró una agresividad superior, evidenciado por una mayor severidad de los síntomas foliares, diferenciándose significativamente de las plantas control, siendo además el único aislado que causó mortalidad de plantas (50%). Referente a las plantas restantes de este tratamiento una presentó síntomas graves como clorosis, marchitez y defoliación en la porción basal-media del follaje, y las plantas restantes solo presentaron síntomas leves (Figuras 2 y 3).

En contraste, en los tratamientos con los aislados Phy113, Phy19 y Phy80 solo se desarrollaron síntomas leves restringidos a la zona basal del follaje, y no presentando diferencias significativas en la severidad con las plantas control. El tratamiento control, solo dos plantas mostraron síntomas leves, principalmente clorosis leve, las cuatro restantes se mantuvieron asintomáticas.



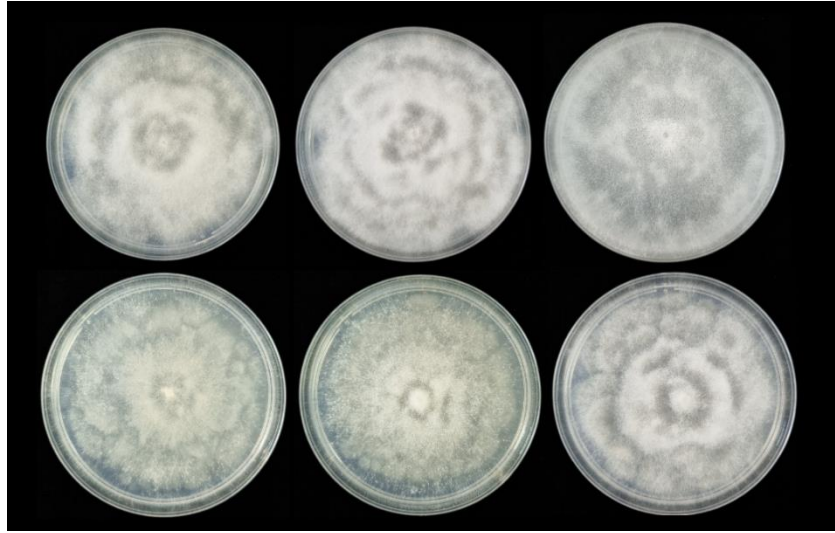
**Figura 2:** Evolución temporal de la severidad de síntomas en follaje de plantas de *Austrocedrus chilensis* en tratamientos con infestación de sustrato con aislados de

*Phytophthora cinnamomi* y control, correspondiente a las semanas 1 hasta 12. Los valores corresponden al promedio de las evaluaciones de severidad.

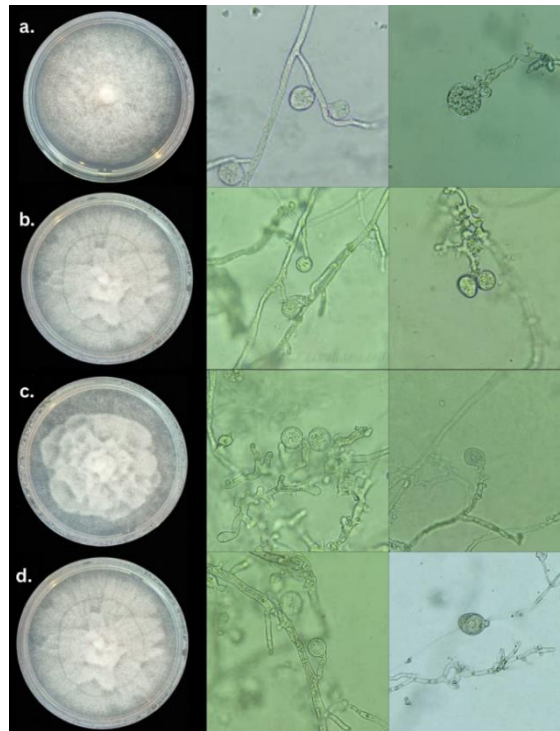


**Figura 3:** Severidad de síntomas en el follaje en plantas de *Austrocedrus chilensis* sometidas a distintos tratamientos con aislados de *Phytophthora cinnamomi*. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar (n = 6). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A partir de los aislamientos obtenidos desde el cuello y raíces de las plantas, se detectó la presencia de *Phytophthora* y *Pythium* (Figura 4 y Figura 5). La mayor frecuencia de aislamiento se registró en las plantas del tratamiento con *P. cinnamomi* D-17(38,8%), por otro lado, en los tratamientos con los aislados de *P. cinnamomi* Phy 80, Phy 19 y Phy 113, las frecuencias de re-aislamiento desde las raíces fueron 13,8%, 12,7%, 15,5%, respectivamente.



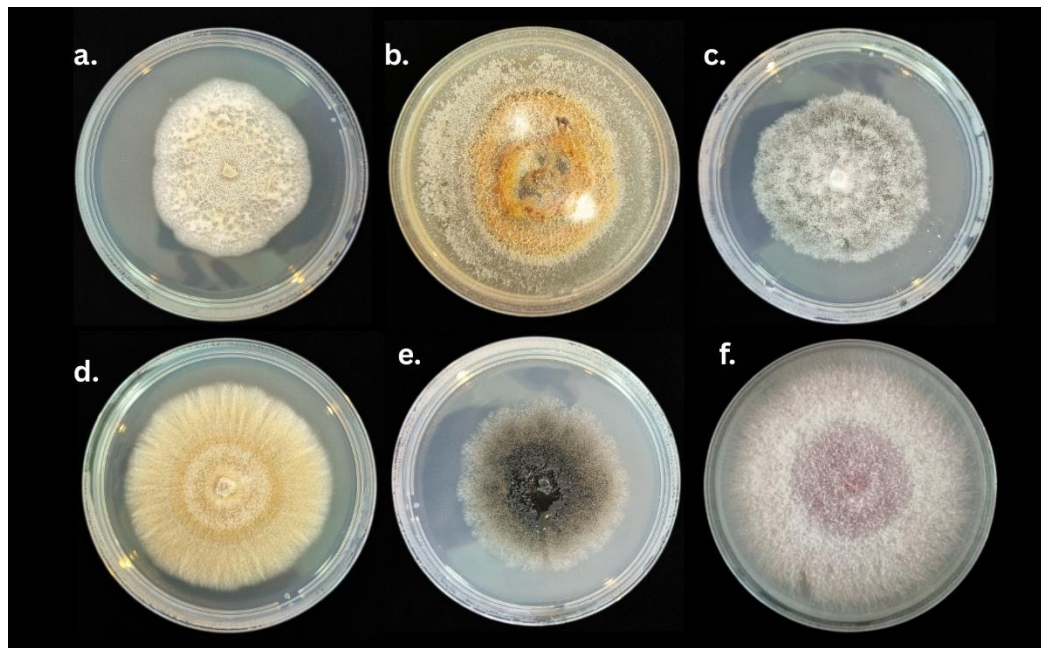
**Figura 4:** Colonias de *Pythium* spp. creciendo en medio papa dextrosa agar (PDA). Aislados obtenidos desde raíces de las plantas de *Austrocedrus chilensis* con síntomas en follaje.



**Figura 5:** Colonias y morfología de hifas y esporangios (x40) de *Phytophthora cinnamomi* obtenidos desde aislamientos realizados desde las raíces de plantas de

*Austrocedrus chilensis* en pruebas de patogenicidad (40x). a) Cepa D17 con clamidosporas y esporangio, b) Cepa Phy80 con presencia de clamidosporas y esporangio no papilado. c) Cepas Phy19 y d) Cepa Phy113 con presencia de hinchazones hifales, clamidosporas terminales y esporangio no papilado.

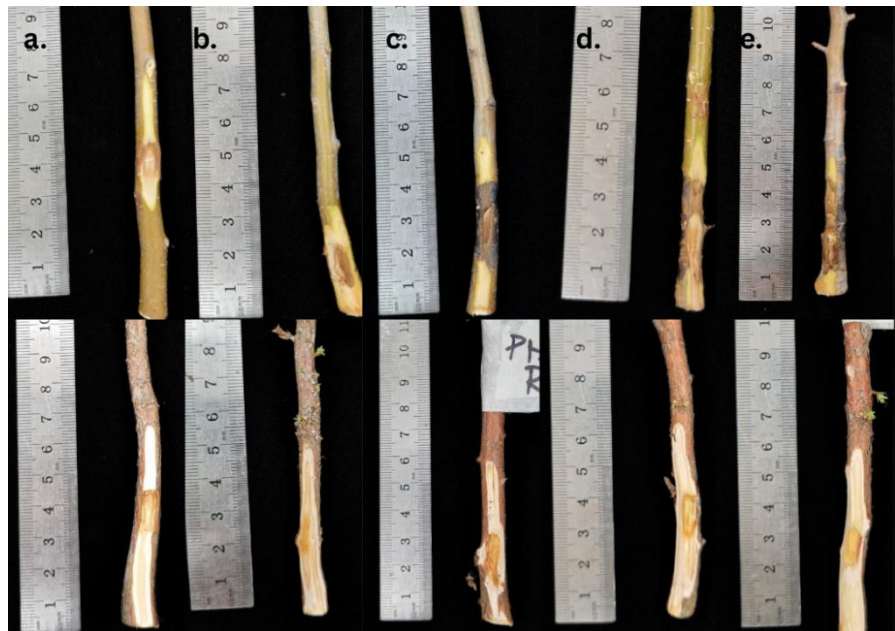
Junto con *P. cinnamomi* y especies de *Pythium*, se aislaron desde las raíces otros tipos de hongos (Anexo 2), como, por ejemplo, especies de *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Trichoderma*, *Thielaviopsis* y *Cladosporium* sp. (Figura 6).



**Figura 6:** Colonias de hongos obtenidos desde aislamientos de cuello y raíz de plantas de *Austrocedrus chilensis* en ensayos de patogenicidad utilizando infestación de substrato con aislados de *Phytophthora cinnamomi*. a-b-d) *Cylindrocarpon* spp. c-e) *Thielaviopsis* sp. y f) *Fusarium* sp.

### 5.1.2) Método de inoculación en tallo

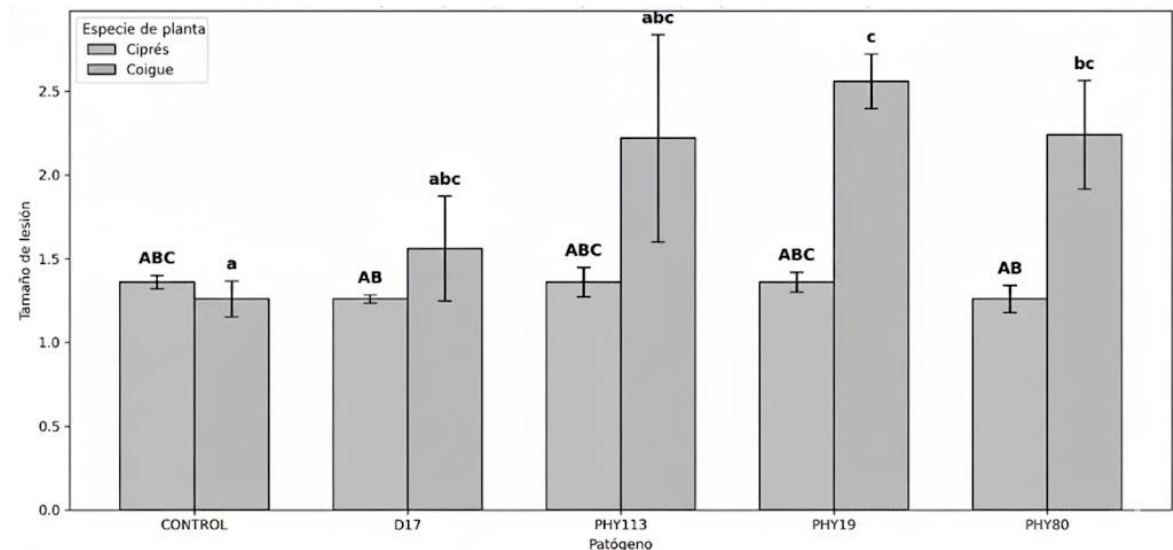
El análisis de varianza factorial indicó una interacción significativa entre especie de planta y aislado de *P. cinnamomi* ( $P=0,017$ ), por lo que las comparaciones múltiples se realizaron separadamente por especie inoculada (Figura 8). De esta forma, al final del ensayo (65 días post inoculación), no existieron diferencias significativas entre las plantas inoculadas con los aislados de *P. cinnamomi* con las plantas control. Contrariamente, en las plantas de *N. dombeyi* se verificó la formación de pequeños canchros en los tallos, constatándose diferencias significativas de los aislados Phy19 y Phy80 con las plantas del tratamiento control. Estos resultados confirman que, para este método de inoculación al tallo, la formación de canchros dependerá de la combinación específica patógeno-hospedero y en el caso de coigue dependerá del aislado específico del patógeno (Figura 7).



**Figura 7:** Inoculación en tallo de plantas de *Nothofagus dombeyi* (línea superior) y *Austrocedrus chilensis* (línea inferior). a) Plantas control. b) Plantas inoculadas con la cepa D17, c) Cepa Phy113, d) Cepa Phy19 y e) Cepa Phy80.

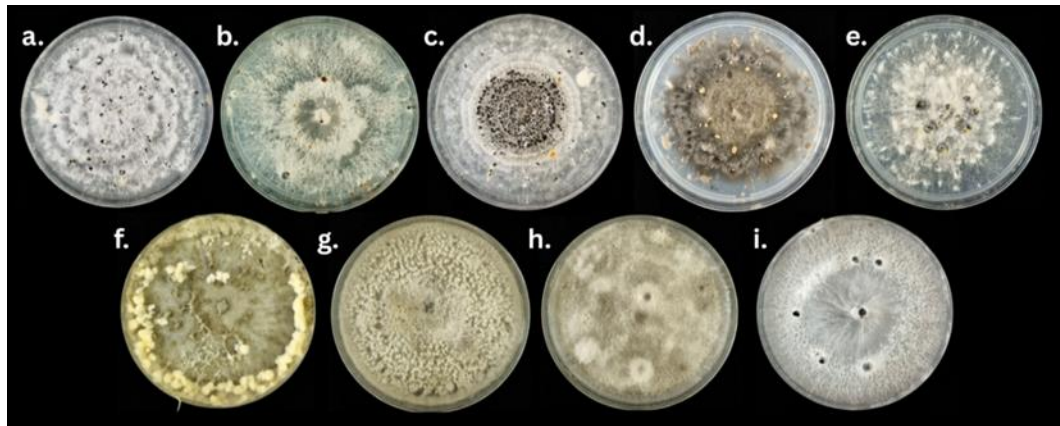
**Tabla 1:** Anova factorial para los efectos de aislados de *Phytophthora cinnamomi* (P), especie de planta inoculada (E) e interacción Px E, medidas como longitud de lesión en el tallo en plantas de *Austrocedrus chilensis* y *Nothofagus dombeyi*.

	Df	Sum Sq	MeanSq	F value	Pr(>F)
Patógeno	4	6.637	1.659	2.589	0.05115.
Tipo_de_planta	1	5.559	5.559	8.675	0.00536 **
Patógeno:Tipo_de_planta	4	8.759	2.190	3.417	0.01705 *
Residuals	40	25.635	0.641		



**Figura 8:** Longitud de lesión (cm) en tallos de *Austrocedrus chilensis* y *Nothofagus dombeyi* inoculados con aislados de *Phytophthora cinnamomi*.

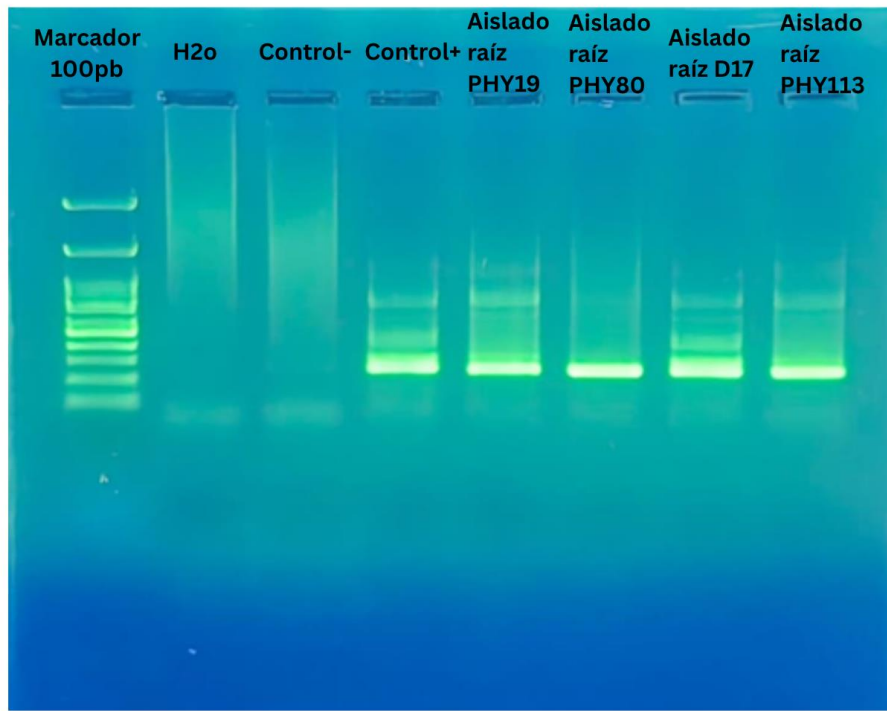
En las plantas de *A. chilensis* no se evidenció la formación de canchros en los tallos (solo necrosis en punto de inoculación) y donde no fue posible re-aislar *P. cinnamomi*. En estas plantas solo fueron aislados otros tipos de hongos (Figura 9), los que, identificados mediante morfología de estructuras somáticas y reproductivas, correspondieron preliminarmente a especies de los géneros *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Diaporthe* y *Phomopsis*.



**Figura 9:** Hongos aislados desde lesiones en tallo de plantas de *Austrocedrus chilensis* inoculadas con aislados de *Phytophthora cinnamomi*. a-b-c) *Pestalotiopsis* sp. g-h-d) Posible *Phoma* sp. e-i) Posible *Diaporthe* sp. f) Posible *Phomopsis* sp.

## 5.2) Identificación molecular

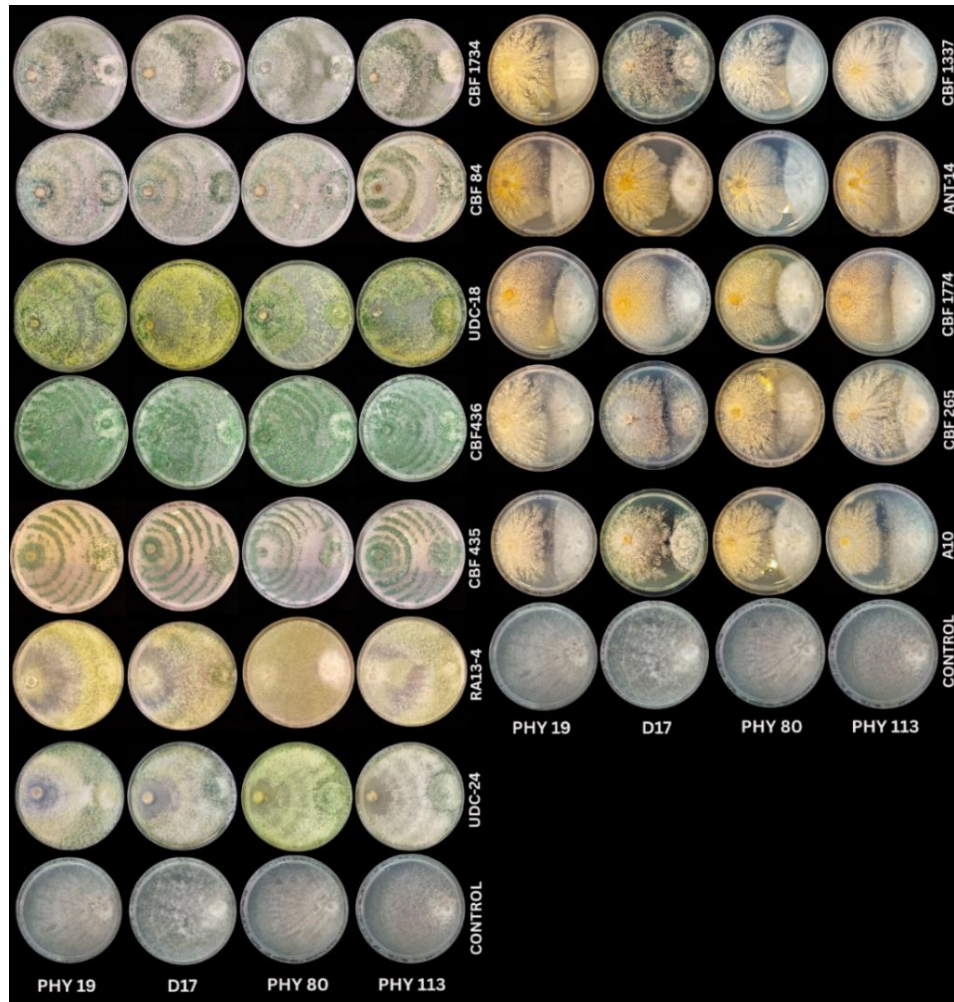
Mediante la PCR-anidada, utilizando primero los partidores género-específicos Yph1F-Yph2R, se obtuvo para los cuatro aislados probados junto con el control positivo, amplificaron un fragmento de aproximadamente 470 pb correspondiente al género *Phytophthora*. En una segunda PCR utilizando los partidores especie-específicos Ycin3F-Ycin4R, los cuatro aislados probados y el control positivo generaron fragmentos de aproximadamente 243pb, correspondiente a *P. cinnamomi*. No se detectó amplificación en el control negativo ni en el blanco (Figura 10)



**Figura 10:** Identificación de aislados de *Phytophthora cinnamomi*. Bandas visualizadas en gel de agarosa 2% con partidores Ycin3F-Ycin4R. Banda 1: Marcador de peso 100kb; Banda 2: Blanco; Banda 3: Control negativo; Banda 4: Control positivo; Banda 5: Aislado obtenido desde raíz inoculada con Phy19; Banda 6: Aislado obtenido desde raíz inoculada con Phy80; Banda 7: Aislado obtenido desde raíz inoculada con D17 Banda 8: Aislado obtenido desde raíz de planta inoculada con Phy113.

### 5.3) Ensayos *in vitro*

Los pareamientos duales realizadas entre las cepas de *Trichoderma* y *Clonostachys* revelaron distintos niveles de inhibición de crecimiento de la colonia de los aislados de *P. cinnamomi* (Figura 11).



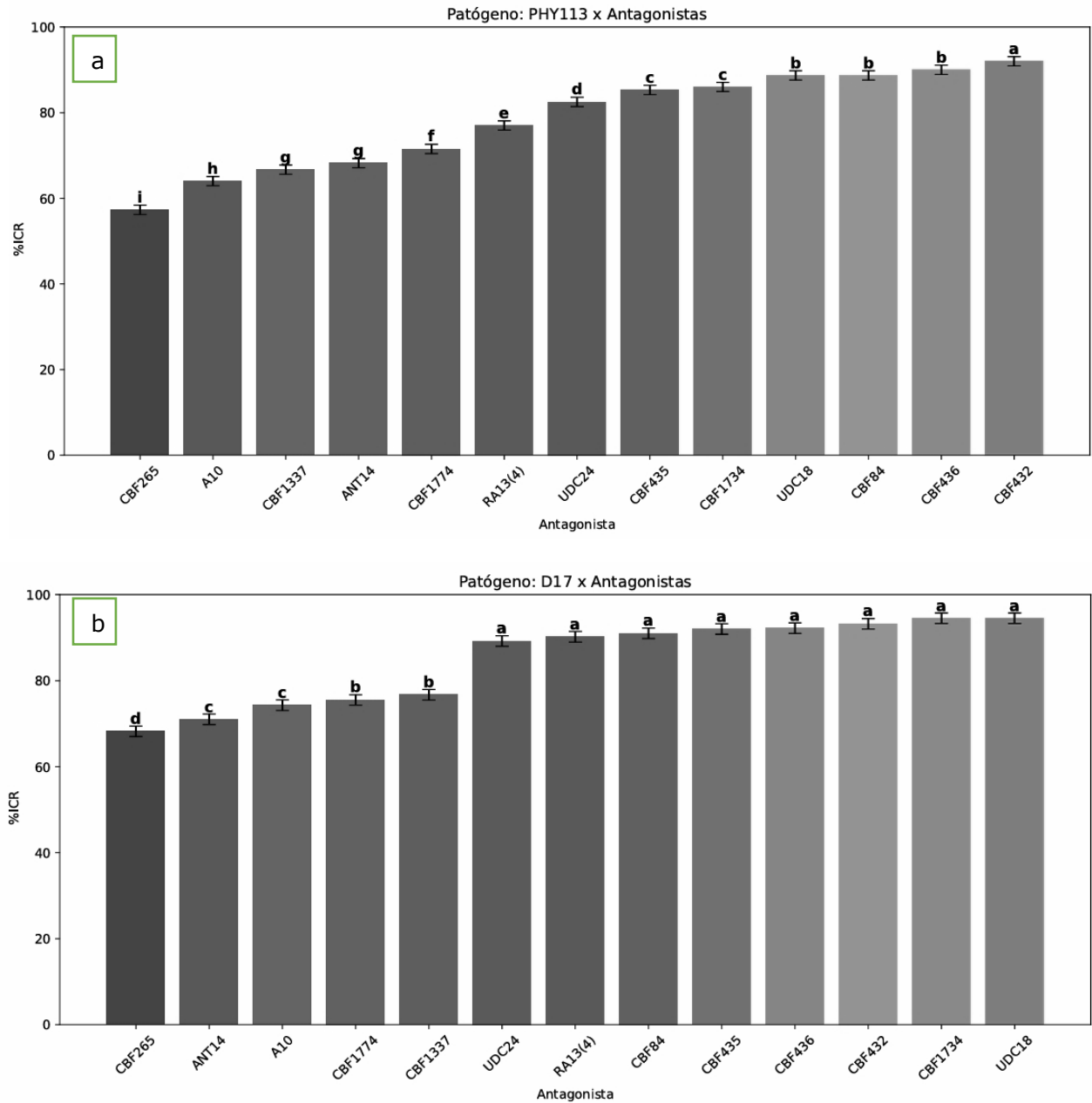
**Figura 11:** Pruebas de antagonismo *in vitro* entre cepas de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. enfrentadas en pareamientos duales con aislados de *Phytophthora cinnamomi* Phy19, D17, Phy80 y Phy113.

La competencia entre antagonista y patógeno fue evaluada mediante el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (%ICR) y a través de observaciones microscópicas en el punto de contacto entre ambas colonias (parasitismo de hifas). En el caso de la inhibición de crecimiento de *P. cinnamomi* no se cumplió el supuesto de homocedasticidad, siendo realizado un análisis de ANOVA factorial robusto basado en errores estándar. Los resultados indicaron diferencias altamente significativas para los factores evaluados (Tabla 2).

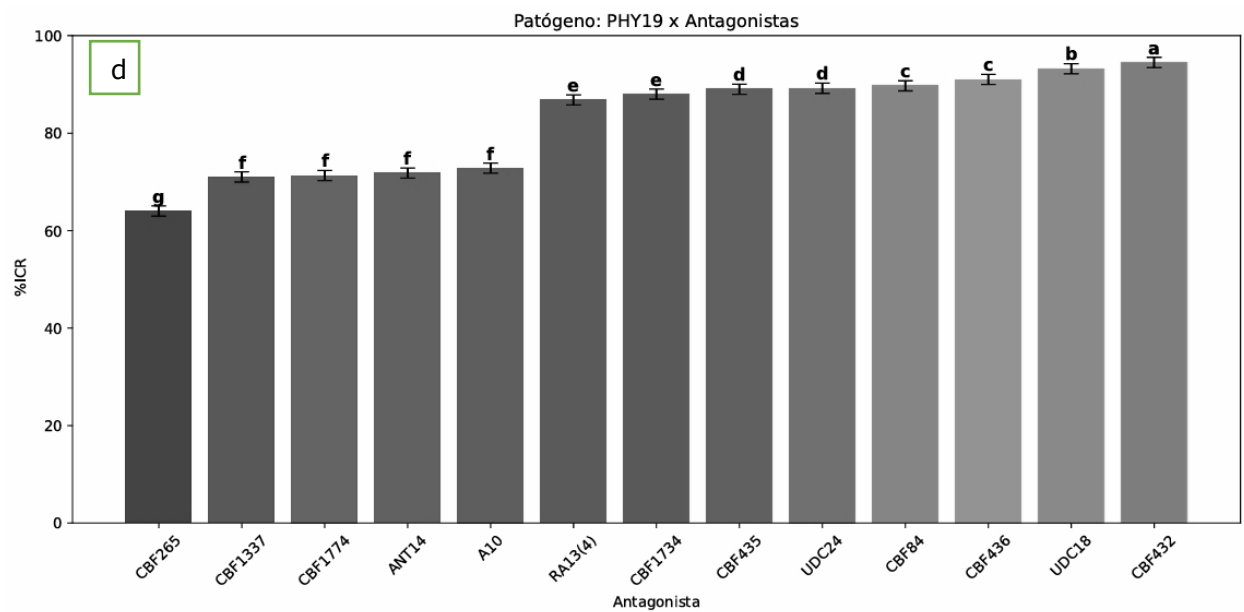
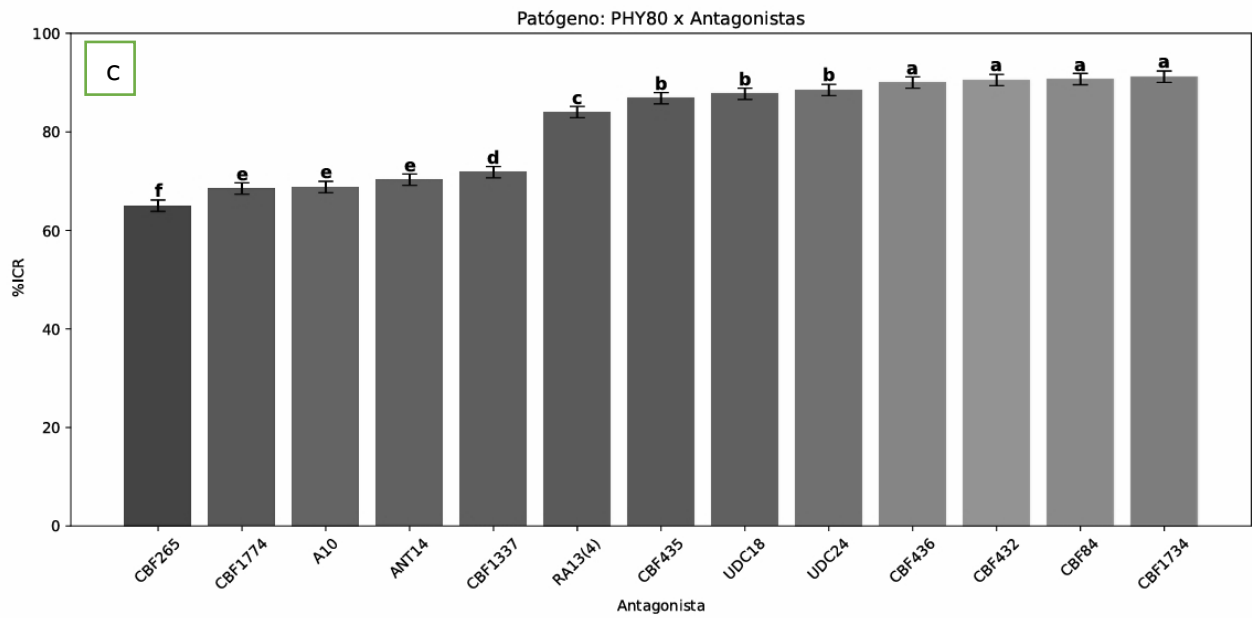
**Tabla 2:** Resultados de ANOVA factorial robusto 4x13x4, para el efecto patógeno (P), antagonista (A) y la interacción P x A, medida como porcentaje de inhibición de crecimiento radial de las colonias de los aislados de *Phytophthora cinnamomi*.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Patógeno (P)	3	0.000374	0.0001247	75.557	< 2e-16 ***
Antagonista (A)	12	0.006721	0.0005601	339.465	< 2e-16 ***
Interacción Px A	36	0.000219	0.0000061	3.694	8.26e-09 ***
Residual	156	0.000257	0.0000016		
---					

Los efectos principales del patógeno y antagonistas fueron ambos significativos ( $p < 0,005$ ), sin embargo, al verificarse una interacción significativa entre aislados de *P. cinnamomi* y aislados de hongos de los potenciales antagonistas, las comparaciones múltiples fueron realizadas independientemente para cada aislado del patógeno. Estos resultados indican que la capacidad inhibitoria (o nivel de inhibición) de los aislados de los antagonistas será dependiente del aislado del patógeno confrontado. (Figura 12).



**Figura 12:** Inhibición crecimiento radial de la colonia (%ICR) de aislados de *Phytophthora cinnamomi*. a) PHY113. b) D17. c) PHY80. d) PHY19. Frente a aislados de hongos en ensayo de confrontación dual *in vitro* (Eje x).



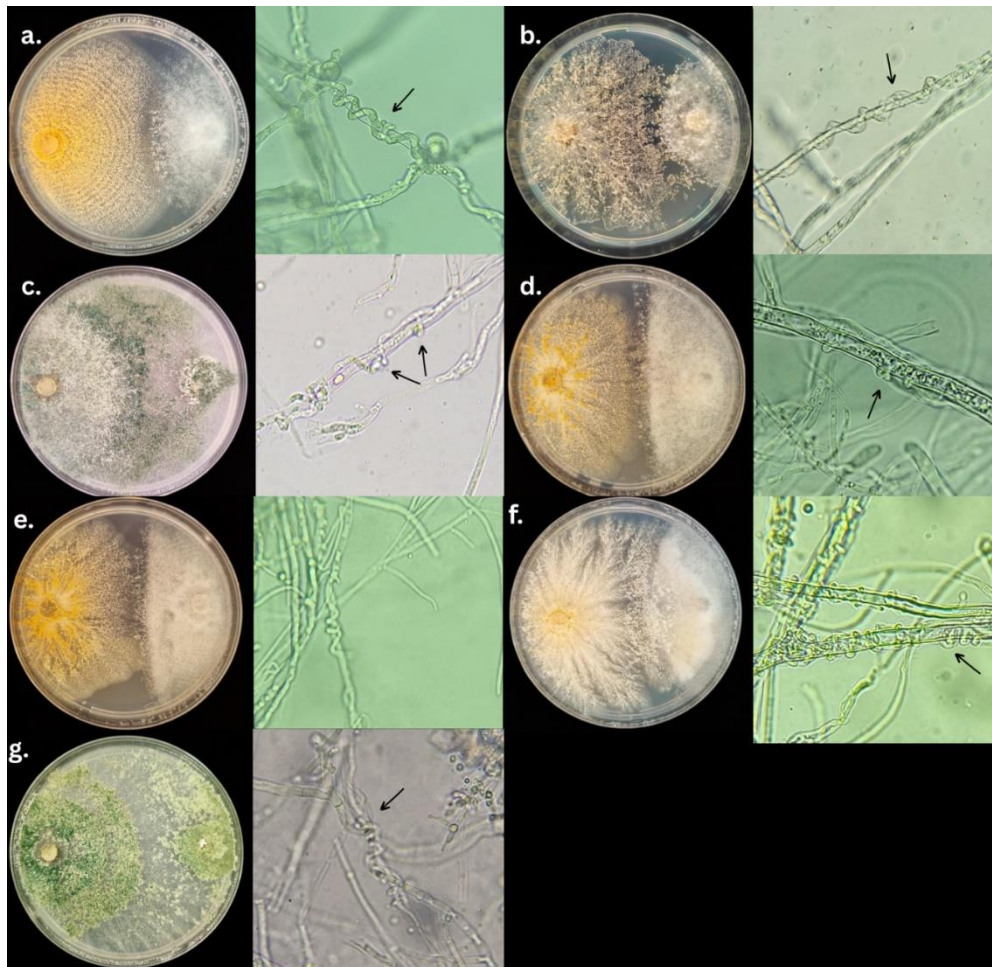
**Figura 12 (continuación):** Inhibición crecimiento radial de la colonia (%ICR) de aislados de *Phytophthora cinnamomi*. a) PHY113. b) D17. c) PHY80. d) PHY19. Frente a aislados de hongos en ensayo de confrontación dual *in vitro* (Eje x).

Referente al nivel de inhibición de los aislados de *Trichoderma* spp ensayados, el aislado CBF432 demostró la mayor eficacia, teniendo efecto sobre todos los aislados de *P. cinnamomi*. Los aislados CBF1734, CBF84 y UDC18 también presentaron una alta eficacia de control, similar a la CB432, aunque solo contra dos aislados del patógeno. Otros aislados que también tuvieron una alta eficacia (presentes en los dos grupos de mayor de significancia) fueron UDC18, UDC24, CBF435, RA13(4) y CBF1774 (Tabla 4).

**Tabla 4:** Aislados antagonistas de *Trichoderma* y *Clonostachys* con mayor eficacia de inhibición de crecimiento micelial de aislados de *Phytophthora cinnamomi*. Las letras (a) y (b) indican grupo de aislados que alcanzaron mayor significancia en cada pareamiento específico contra cepas de *P. cinnamomi*.

<b>Aislado <i>P. cinnamomi</i></b>	<b>(a)</b>	<b>(b)</b>
<b>PHY113</b>	CBF432	CBF436, CBF84, UDC18
<b>PHY19</b>	CBF432	UDC18
<b>PHY80</b>	CBF1734, CBF84, CBF432, CBF436	UDC24, UDC28, CBF435
<b>D17</b>	UDC18, CBF1734, CBF432, CBF436, CBF435, CBF84, RA13(4), UDC24	CBF1337, CBF1774

Adicionalmente, mediante las observaciones microscópicas realizadas en las zonas de contacto entre las colonias de hongos y algunos aislados de *P. cinnamomi* mostraron la ocurrencia de micoparasitismo, caracterizado por un enrollamiento de hifas y una penetración en las hifas del patógeno (Figura 13).



**Figura 13:** Evidencias de parasitismo de hifas de *Phytophthora cinnamomi* por hifas de aislados de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. A) D17 vs CBF1774, (100x), b) D17 vs CBF1337 (100x), c) D17 vs CBF1734(40x), d) PHY113 vs ANT14(40x), e) PHY19 vs. ANT14, micoparasitismo. f) PHY113 vs CBF1337 (40x) g) PHY80 vs UDC-18 (40x). Las flechas indican posibles puntos de penetración de la hifa del antagonista sobre la hifa de *P. cinnamomi*.

Los resultados de las pruebas de antagonismo revelaron que solo algunos aislados de *Trichoderma* o *Clonostachys* presentaron evidencias de micoparasitismo sobre las hifas de los aislados de *P. cinnamomi* y que correspondieron a los aislados de *Trichoderma* CBF1734 (contra D17) y *C. rosea* ANT14 (contra PHY19, PHY113 y D17),

CBF1337 (activa contra PHY113 y D17), CBF1774 (contra D17) evidenciaron esta capacidad.

## 6. DISCUSIÓN

La detección de *P. cinnamomi* en bosquetes de *A. chilensis* de la precordillera de Linares, y la posterior demostración de su patogenicidad, constituyen el primer reporte para esta especie nativa. La detección del patógeno se suma a la creciente lista de registros que confirman su presencia en ecosistemas forestales en Chile, afectando a otras especies como *A. araucana*, *N. dombeyi* y *G. avellana* (Navarro et al. 2016; Jung et al. 2018; Sanfuentes et al. 2022). Estos relatos en Chile sobre *P. cinnamomi* solo confirman que es una especie reconocida por su alta agresividad y capacidad provocar enfermedad en una gran diversidad de hospedantes de especies leñosas (De Andrade et al. 2020; Zentmyer 1983; Erwin & Ribeiro 1996; Hardham & Blackman 2018).

Los ensayos de patogenicidad confirmaron la asociación causal entre *P. cinnamomi* y *A. chilensis*. La inoculación mediante la infestación de sustrato provocó síntomas similares a los observadas en campo, como clorosis, necrosis y marchitamiento foliar seguido de la muerte de la planta. En los ensayos, el aislado *P. cinnamomi* D17, obtenido desde la rizosfera de árboles de ciprés con síntomas en la copa, fue el único capaz de provocar síntomas severos y mortalidad en las plantas, logrando re-aislarse desde las raíces de todas las plantas, con una frecuencia de 38% de las raíces muestreadas, demostrándose de esta forma la patogenicidad de *P. cinnamomi* en *A. chilensis*. Los resultados también indicaron diferencias en la agresividad de aislados de *P. cinnamomi*, siendo que los otros tres aislados de *P. cinnamomi* ensayados solo provocaron síntomas leves no diferenciándose de las plantas control. En esta línea, Dudzinski et al. (1993), constataron diferencias de agresividad entre los aislados de *P. cinnamomi* recolectados en Australia, manifestado en la severidad de síntomas e incidencia en la mortalidad de plantas de *Eucalyptus marginata*, diferencias de hasta 2 a 3 veces en la capacidad de producir la muerte de la planta. De forma similar, ensayos con *Persea americana* indican una amplia variación de agresividad entre de aislados de *P. cinnamomi* (Hüberli et al. 2001; Ochoa-Fuentes et al. 2015).

Como se mencionó previamente, los resultados de este estudio solamente confirman la patogenicidad de *P. cinnamomi* D-17. En este punto, parecería arriesgado concluir

que los otros aislados de *P. cinnamomi* no poseen rol como patógenos en *A. chilensis*. La agresividad de un patógeno también puede ser evaluada con la rapidez en la manifestación de los síntomas en las plantas, por lo tanto, subsistiría la interrogante de que, con una mayor duración del ensayo, los síntomas en follaje hubiesen continuado evolucionando. Es importante mencionar que aislados *P. cinnamomi* Phy 113 (15%), Phy 80 (13,8%) y Phy 19 (12,7%) presentaron una colonización de raíces de *A. chilensis*, sin embargo, fueron menores al 38% de colonización alcanzado por *P. cinnamomi* D-17. Considerando este factor, continuando esta colonización de raíces, hacia niveles cercanos al 40%, podría eventualmente traducirse en una expresión de síntomas más severos en el follaje de las plantas.

Adicionalmente, sería importante considerar el impacto del fenómeno de predisposición, en el cual factores ambientales como el estrés hídrico, cambios en el régimen de temperaturas o alteraciones en el microbioma del suelo, pueden debilitar al hospedero y favorecer la infección por parte de aislados de *P. cinnamomi* (Sánchez *et al.* 2002; Thompson *et al.* 2014; Sena *et al.* 2018).

Adicionalmente, en los aislamientos realizados desde el cuello y raíces de las plantas, en todos los tratamientos se detectaron otros hongos que podría tener un rol como patógenos oportunistas o sencillamente un rol como saprófitos; como fueron *Fusarium* spp. (5%), *Cladosporium* spp. (2%), *Thielaviopsis* sp. (2%), *Cylindrocarpon* spp. (2%) y *Pythium* sp. (21%). Entre estos, *Fusarium* y *Cylindrocarpon* comprenden especies con potencial como patógenos secundarios de suelo (Korniłłowicz-Kowalska *et al.* 2022). Por su parte, *Thielaviopsis* sp., se aisló solo desde una planta y su impacto es más común en cultivos agrícolas, asociándose con la pudrición negra de raíces en cultivos como tomate (Koike & Henderson 1998) y tabaco (Rao *et al.* 2006). Hasta ahora especies de este género no han sido reportadas para especies nativas en Chile.

El género *Pythium*, que se aisló con mayor frecuencia desde las raíces de las plantas, incluye tanto especies fitopatógenas como biocontroladoras (Andersen *et al.* 2024), destacándose principalmente por su presencia en el suelo y su capacidad de afectar las raíces de numerosas plantas. Al igual que *Phytophthora*, comparten características

morfológicas y ecológicas, como la formación de esporangios, zoosporas móviles y su desarrollo favorecido por condiciones de alta humedad (Martin y Loper 1999; Hardham 2007). Estas similitudes les permiten coexistir en ambientes rizosféricos, lo que puede dar lugar a interacciones sinérgicas o antagónicas entre patógenos. La coinfección entre oomicetos u otros hongos del suelo puede modificar significativamente la progresión de una enfermedad, ya sea aumentando o atenuando su severidad. Por ejemplo, la coinfección de *F. aglaonematis* y *F. elaeidis* redujo la severidad de los síntomas en *Aglaonema modestum* en China (Zhang et al. 2022), contrariamente la co-inoculación de *F. oxysporum* y *Rhizoctonia solani* agravó los síntomas y redujo el crecimiento de la alfalfa (*Medicago sativa*) (Fang et al. 2021). Comprender cómo interactúan distintos patógenos en un mismo sistema es clave para diseñar estrategias de manejo más eficaces.

En cuanto a la inoculación de los aislados de *P. cinnamomi* en el tallo de las plantas de *A. chilensis*, no se produjo formación de canchales y tampoco fue posible re-aislar a *P. cinnamomi*, similar a resultados obtenidos en ensayos anteriores realizados en el Laboratorio de Patología Forestal (Comunicación personal, Eugenio Sanfuentes, 2024). Una posible razón de estos resultados con este método de inoculación es que *P. cinnamomi* presenta una preferencia por tejido radicular y por condiciones que favorecen la movilidad, la quimiotaxis de sus zoosporas hacia exudados de raíces y la mayor susceptibilidad de las raicillas finas (Zentmyer 1961; Robin et al. 2001). En este tipo de inoculación al tallo, se ha reportado en el caso de infección por *Phytophthora* spp., la planta podría estar activando un mecanismo de defensa, como la inducción de tilosis en el xilema, que actuaría impidiendo el avance del micelio del patógeno. La formación de estas estructuras podría causar una escasez localizada de agua, limitando efectivamente la propagación de la infección (Jung y Blaschke 1996; Andrades-Hoyos 2015; Vieites-Blanco et al. 2023). Además, la biosíntesis de calosa, la que interactúa con la celulosa de la pared celular para formar una red polimerizada en el sitio de intento de penetración es una barrera eficiente para el crecimiento de hifas del patógeno (Eggert et al. 2014). La calosa es una barrera sumamente eficaz (Van den Berg et al. 2021).

Otro factor que pudo haber influido en una ausencia de infección y/o colonización de *P. cinnamomi*, manifestada también en la imposibilidad de reaislar el patógeno incluso desde el local de inoculación, podrá ser por una rápida colonización de hongos saprófitos o endófitos. Es así como, se aislaron frecuentemente desde el tallo de las plantas, hongos como *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp. y *Phoma* sp., todos con una amplia distribución y conocidos por su dualidad ecológica como endófitos o patógenos oportunistas (Udayanga *et al.* 2011). En el caso por ejemplo de *Pestalotiopsis* spp., normalmente se manifiesta como consecuencia de estrés por factores bióticos o abióticos, como eventualmente sería una necrosis inicial del sistema vascular post-inoculación con *Phytophthora*. De esta manera la presencia y rápido crecimiento de estos organismos podría haber interferido con el crecimiento y persistencia de *P. cinnamomi* en el local de inoculación y su eventual colonización hacia otros tejidos (Sánchez-Fernández *et al.* 2013).

La composición del microbiota asociado a los tejidos vegetales y al suelo podría desempeñar un papel crucial en la dinámica de los patógenos (Berendsen *et al.* 2012). Esta capacidad de competencia por nicho ecológico ha sido documentada en microorganismos con potencial biocontrolador, como *Trichoderma* spp., cuyo efecto inhibitorio sobre *P. cinnamomi* fue posible confirmar en los ensayos *in vitro* de este estudio. Estos microorganismos han sido los más estudiados por su potencial controlador, y por su gran capacidad de competir por espacio y nutrientes (Howell 2004; Sirikamonsathien *et al.* 2023). Los resultados del estudio indicaron que los aislados de *Trichoderma* lograron inhibir el crecimiento de *P. cinnamomi* entre 82% y 95%, resultados que similares a los obtenidos por Barboza-García (2022), quien reportó inhibición entre 87% y 94%, e incluso valores mayores a los registrados por Andrades-Hoyos (2020), quienes observaron una máxima de inhibición de 73%.

En cuanto a los ensayos con *Clonostachys* spp., la inhibición sobre los aislados de *P. cinnamomi* osciló entre 57% y 77%, resultados menores en comparación con *Trichoderma*, probablemente debido a la menor tasa de crecimiento de los aislados de *Clonostachys*. En este grupo, se observó micoparasitismo en tres de los cinco aislados ensayados, concordando con los resultados de Moraga-Suazo *et al.* (2011), quienes reportaron este mecanismo de antagonismo, y menor capacidad de inhibir

crecimiento micelial, en los aislados de *Clonostachys* confrontados con el patógeno *F. circinatum*.

La selección de especies para biocontrol, requiere un profundo entendimiento del mecanismo de acción específico de cada microorganismo seleccionado. En este contexto, las diferencias en la eficacia del biocontrolador pueden explicarse por la activación de mecanismos de acción involucrados. Para el caso de *Trichoderma*, se caracteriza por ser un competidor agresivo que coloniza con rapidez, permitiéndole consumir nutrientes de manera eficiente, por ejemplo, en el caso de *T. harzianum* que demostró una tasa de crecimiento en ensayos 2-4,2 veces más que *Botrytis cinerea* (You *et al.* 2016; Risoli *et al.* 2022). Por otro lado, en *Trichoderma* se destaca, su gran actividad como hiperparásito, demostrado gran eficacia contra patógenos como *Rhizoctonia solani*; *F. solani*; *F. oxysporum*, *P. parasítica* entre otros (Jarouxuk-scisel *et al.* 2019; Alejandro *et al.* 2019). Los mecanismos de acción observados el presente estudio fue principalmente competencia por espacio y nutrientes, y en algunos aislados en la forma de micoparasitismo.

El micoparasitismo por *a Clonostachys* spp. se ha reportado en variados estudios para hongos y oomicetos. Es así como, se ha confirmado este mecanismo contra *P. aphanidermatum*, *P. ultimum*, *R. solani*, *B. cinerea*, *Botryosphaeria* sp. y *Diaporthe* sp. (Jensen *et al.* 2016; Chatterton y Punja 2019; Geiger *et al.* 2022; Basha Jaffer *et al.* 2025).

Las variaciones observadas en la capacidad de inhibición de crecimiento micelial y del micoparasitismo entre los distintos aislados de antagonistas evaluados, evidenciaron que la eficacia del antagonismo es dependiente de la interacción específica entre aislados del patógeno y del antagonista utilizado (Dang *et al.* 2023). Este comportamiento refuerza la necesidad de realizar evaluaciones que consideren estas interacciones específicas (Bautista-Ortega *et al.* 2022; Villavicencio-Vásquez *et al.* 2025).

Por tanto, los mecanismos de antagonismo deben ser considerados al momento de elaborar un bioproducto, ya que, las interacciones de biocontrol efectivas pueden

involucrar múltiples modos de acción (Baker y Cook 1974; Jensen et al. 2016), sin embargo, su efectividad es variable y las condiciones ambientales pueden alterar su efectividad en campo. (Villavicencio-Vásquez et al .2025).

Los resultados obtenidos, por una parte, evidencian una potencial amenaza que representa *P. cinnamomi* para especies forestales nativas como en *A. chilensis* y surge como necesidad el de continuar explorando estrategias de manejo integrado, desde la detección temprana como a través del control biológico, considerando las interacciones microbianas presentes en el suelo. La validación del potencial de cepas nativas de *Trichoderma* y *Clonostachys* como agentes antagonistas representa un primer avance hacia el desarrollo de productos de biocontrol, en un contexto de usar variadas herramientas sostenibles para la protección sanitaria de los ecosistemas forestales de Chile.

## **7. CONCLUSIONES**

Los ensayos mediante infestación de substrato demostraron que *P. cinnamomi* es patógeno en plantas de *A. chilensis*.

Los aislados de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. presentaron la capacidad de inhibición del crecimiento micelial y micoparasitismo sobre aislados de *P. cinnamomi*, aunque la eficacia del antagonismo dependerá de la interacción específica entre aislados del patógeno y antagonistas.

## 8. ANEXOS

**Anexo 1:** Descripción de aislados de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. utilizados en ensayo *in vitro*.

Código	Investigación	Procedencia	Fecha muestreo	Especie/Zona de muestreo
A10	Control biológico de <i>Botrytis cinerea</i>	-	2010	<i>E. globulus</i> , Follaje
ANT14	Control biológico de <i>Botrytis cinerea</i>	-	2010	<i>E. globulus</i> , Follaje
CBF1337	Aislado proyecto INNOVA, LPF.	P. Pedro del Río Zañartu	2010	Zona aérea
CBF1734	Aislado proyecto INNOVA, LPF.	Parral	2010	Dilución de suelo
CBF1774	Aislado proyecto INNOVA, LPF.	Santa Juana	2010	Suelo
CBF265	Aislado proyecto INNOVA, LPF.	San Isidro	2010	Rizósfera
CBF432	Aislado proyecto INNOVA, LPF.	Los Tilos	2010	Rizósfera
CBF435	Aislado proyecto INNOVA, LPF.	Los Tilos	2010	Rizósfera
CBF436	Aislado proyecto INNOVA, LPF.	Los Tilos	2010	Rizósfera
CBF84	Aislado proyecto INNOVA, LPF.	Vivero Proplantas	2010	Rizósfera
RA13(4)	FIBN 022/2019	Fundo Norita-Sector Huife	2022	Rama viva Coigüe <i>P. radiata</i> / Raíz
UDC18	Control biológico de <i>M. phaseolina</i>	Vivero Carlos Douglas	2012	Desnuda
UDC24	Control biológico de <i>M. phaseolina</i>	Vivero Proplantas	2012	Suelo

**Anexo 2:** Principales aislamientos y su frecuencia, obtenidos desde muestras de raíces (30) y cuello (6) por tratamiento en medio selectivo CMA-PARPH

Tratamiento	Especies	Frecuencia	Zona de aislamiento
CONTROL	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	5,5%	Cuello
	<i>Pythium</i> sp.	5,5%	Raíz
	<i>Mortierella</i> sp.	1,6%	Raíz
D17	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	5,5%	Cuello
	<i>Fusarium</i> sp.	1,7%	Raíz
	<i>Pythium</i> sp.	8,3%	Raíz
	<i>Cylindrocarpon</i> sp.	1,1%	Raíz
	<i>Phytophthora</i> sp.	38,8%	Raíz
PHY 113	<i>Fusarium</i> sp.	1,1%	Raíz
	<i>Phytophthora</i> sp.	15,5%	Raíz
	<i>Pythium</i> sp.	3,8%	Raíz
PHY 19	<i>Cylindrocarpon</i> sp.	1,2%	Raíz
	<i>Thielaviopsis</i> sp.	1,2%	Raíz
	<i>Phytophthora</i> sp.	12,7%	Raíz
	<i>Pythium</i> sp.	3,3%	Raíz
PHY 80	<i>Fusarium</i> sp.	1,1%	Raíz
	<i>Phytophthora</i> sp.	13,8%	Raíz
	<i>Pythium</i> sp.	2,7%	Raíz

**Anexo 3:** Lista de partidores para género *Phytophthora* (YPh) y específicos para *Phytophthora cinnamomi* (Ycin) con sus respectivas secuencias de nucleótidos.

NOMBRE	Secuencia partidor (5' -> 3')	Referencia
Yph1F	CGACCATKGGTGTGGACTTT	Schena <i>et al.</i> 2006
Yph2R	ACGTTCTCMCAGGCGTATCT	Schena <i>et al.</i> 2006
Ycin3F	GTCCTATTCGCCTGTTGGAA	Schena <i>et al.</i> 2008
Ycin4R	GGTTTTCTCTACATAACCATCCTATAA	Schena <i>et al.</i> 2008

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abad, Z. G., Burgess, T. I., Bourret, T., Bensch, K., Cacciola, S. O., Scanu, B., Mathew, R., Kasiborski, B., Srivastava, S., Kageyama, K., Bienapfl, J. C., Verkleij, G., Broders, K., Schena, L., & Redford, A. J. (2023). *Phytophthora*: taxonomic and phylogenetic revision of the genus. *Studies in Mycology*, 106, 259–348. <https://doi.org/10.3114/sim.2023.106.05>
2. Abad, Z., Burgess, T., Bourret, T., Bensch, K., Cacciola, S., Scanu, B., Mathew, R., Kasiborski, B., Srivastava, S., Kageyama, K., Bienapf, J., Verkleij, G., Broders, K., Schena, L., & Redford, A. (2023). *Phytophthora*: taxonomic and phylogenetic revision of the genus. *Studies In Mycology*, 106(1), 259-348. <https://doi.org/10.3114/sim.2023.106.05>
3. Aguayo, J., Elegbede, F., Husson, C., Saintonge, F.-X., & Marçais, B. (2014). Modeling climate impact on an emerging disease: The decline of alder caused by *Phytophthora alni*. *Global Change Biology*, 20, 3209–3221.
4. Ahmed, A. S., Pérez-Sánchez, C., Egea, C., & Candela, M. E. (1999). Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathology*, 48(1), 58-65. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00317.x>
5. Alexander, B. J. R., & Stewart, A. (2001). Glasshouse screening for biological control agents of *Phytophthora cactorum* on apple (*Malus domestica*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29(3), 159-169.
6. Anasac. (2025). *Trichoforte: Biofungicida a base de Trichoderma atroviride y Trichoderma harzianum*. Anasac Chile S.A. <https://www.anasac.cl>
7. Andersen, C. B., Aleklett, K., Digdarshika, G., Lankinen, Å., & Grenville-Briggs, L. J. (2024). *Pythium oligandrum* induces growth promotion in starch potato without significantly altering the rhizosphere microbiome. *Applied Soil Ecology*, 199, 105423.
8. Andrade-Hoyos, P., Molina-Gayosso, E., Isidro-Cortes, J., Hernández Leal, E., Cortés-González, Y. A., & Rivera-Sosa, L. (2017). Control biológico in vitro de *Phytophthora cinnamomi* con *Trichoderma* spp. In *Memorias del V Congreso*

Latinoamericano del Aguacate. México. 7p. Recuperado de [http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias\\_VCLA/2017/Memorias\\_VCLA\\_2017\\_PG\\_147.pdf](http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias_VCLA/2017/Memorias_VCLA_2017_PG_147.pdf).

9. Ashis K. Das, Himanshu G. Pachare, Ashok Kumar. (2025). *Phytophthora* spp. Associated with citrus: diversity, diagnostics and integrated management with a focus on India. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 140, Art. 102853. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2025.102853>
10. Baker, K. F., & Cook, R. J. (1974). *Biological Control of Plant Pathogens*. W. H. Freeman.
11. Baldini, A.; Oltremari, J.; Homgren, A. (2008). Efecto de *Cinara cupressi* (Hemiptera: Aphididae) sobre el ciprés de la cordillera (*Austrocedrus chilensis*) después de aplicar control químico. *Ciencia e Investigación Agraria* 35(3): 341-350.
12. Bautista-Ortega, PI, Hernández-Hernández, I., Pérez-Pérez, R., Soria-Leal, SLLY y Chávez-Avilés, MN (2022). Modulación diferencial de la actividad enzimática lítica de la pared celular entre *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* durante el biocontrol de *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro*. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 6 (6), 732-768.
13. Becker, C. (2010). Caracterización fitosanitaria del ciprés de la cordillera (*Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Serm. et Bizz.) en Sierras de Bellavista, San Fernando, Región del Libertador Bernardo O'Higgins. Memoria Ing. Forestal. Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza, Universidad de Chile. Santiago, Chile. 63p.
14. Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478-486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
15. Bergot, M., Cloppet, E., Pérarnaud, V., Déqué, M., Marçais, B., & Desprez-Loustau, M. (s. f.). Simulation of potential range expansion of oak disease caused by *Phytophthora cinnamomi* under climate change. *Global Change Biology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2004.00824.x>

16. Bionativa. (2023). *Trichonativa: Bioproducto con cepas de Trichoderma spp.* Bionativa S.A. <https://www.bionativa.cl>
17. Bolivar-Anillo, H.J., González-Rodríguez, V. E., Reyes Almeida, G., Izquierdo-Bueno, I., Moraga, J., Carbú, M., Cantoral, M.J., & Garrido, C. (2021). Endophytic Microorganisms as an Alternative for the Biocontrol of *Phytophthora* spp. Agro-Economic Risks of *Phytophthora* and an Effective Biocontrol Approach.
18. Brasier C.M., Beales P.A., Kirk S.A., Denman S. and Rose, J. (2005). *Phytophthora kernoviae* sp.nov., an invasive pathogen causing bleeding stem lesions on forest trees and a foliar necrosis of ornamentals in the UK. Mycological Research 109 (8): 853-859.
19. Brasier, C., Scanu, B., Cooke, D., & Jung, T. (2022). *Phytophthora*: an ancient, historic, biologically and structurally cohesive and evolutionarily successful generic concept in need of preservation. IMA Fungus, 13 (1). <https://doi.org/10.1186/s43008-022-00097-z>.
20. Brown, M. S., Baysal-Gurel, F., Oliver, J. B., & Adesso, K. M. (2019). Evaluation of fungicides and biofungicide to control *Phytophthora* root rot (*Phytophthora cinnamomi* Rands) and *ambrosia beetles* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) on flowering dogwoods exposed to simulated flood events. Crop Protection, 124, 104834.
21. Butin, H.; Peredo, H. (1986). Hongos parásitos en coníferas de América del Sur con especial referencia a Chile. Ediciones J. Cramer. Berlin, Alemania. 100p.
22. Cahill, D. M., Rookes, J. E., Wilson, B. A., Gibson, L., & McDougall, K. L. (2008). *Phytophthora cinnamomi* and Australia's biodiversity: impacts, predictions and progress towards control. Australian Journal Of Botany, 56(4), 279-310. <https://doi.org/10.1071/bt07159>.
23. Castro, R. A.; Fernández, P. S. P. y Osuna, A. P. (2012). Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annum-Phytophthora capsici*. Rev. Mex. Fitopatol. 30: 49-65.
24. Chatterton, S., & Punja, Z. K. (2009). Chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. catenulata against fungal plant pathogens. Canadian journal of microbiology, 55(4), 356-367.

25. Ciampi L. (2002). Introducción a la Patología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias
26. Cidre-González, A., Ruiz-Gómez, F. J., Bonet, F. J., & González-Moreno, P. (2025). Forecasting the risk of *Phytophthora cinnamomi* related-decline in Mediterranean forest ecosystems under climate change scenarios. *Ecological Modelling*, 505, 111115. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2025.111115>
27. CONAF (2022). Catastro de bosque nativo
28. CONAMA. (2008). Clasificación de especies.
29. Corrêa, S., Mello, M., Ávila, Z. R., Braúna, L. M., Pádua, R. R., & Gomes, D. (2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 11(1), 3-9.
30. Cota, L., Maffia, L., Mizubuti, E., & Macedo, P. (2009). Biological control by *Clonostachys rosea* as a key component in the integrated management of strawberry gray mold. *Biological Control*, 50(3), 222–230.
31. Crous, P., Wingfield, M., Chooi, Y. H., Gilchrist, C., Lacey, E., Pitt, J., Roets, F., Swart, W., Cano-Lira, J., Valenzuela-Lopez, N., Hubka, V., Shivas, R., Stchigel, A., Holdom, D., Jurjević, Ž., Kachalkin, A., Lebel, T., Lock, C., Martín, M., Groenewald, J. (2020). Fungal Planet description sheets: 1042–1111. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 44(1), 301–459.
32. Cruz, G. M. & Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Forestales y de la Conservación de la Naturaleza. (2005). Ciprés de la cordillera (*Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Serm. et Bizarri). Facultad de Ciencias Forestales y de la Conservación de la Naturaleza, Universidad de Chile.
33. Dang, Q. N., Burgess, T. I., McComb, J., Pham, T. Q., Van Binh, L., Tran, T. V., Nguyen, L., & Hardy. (2023). Fungal and bacterial endophytes antagonistic to *Phytophthora* species causing root rot in *Cinnamomum cassia*. *Mycological Progress*, 22(4). <https://doi.org/10.1007/s11557-023-01878-5>
34. De Andrade Lourenço, D., Branco, I., & Choupina, A. (2020). Phytopathogenic oomycetes: a review focusing on *Phytophthora cinnamomi* and biotechnological approaches. *Molecular Biology Reports*, 47(11), 9179–9188.
35. Delgado-Oramas, B. P. (2020). Induced resistance as an alternative for pest management in crops. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. San José de las Lajas, Cuba.

36. Desprez-Loustau, M. L., Marçais, B., Nageleisen, L. M., Piou, D., & Vannini, A. (2006). Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of forest science*, 63(6), 597-612.
37. Donoso, C. (Ed.). (2006). Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Autoecología. Marisa Cúneo Ediciones. Valdivia, Chile. 678p.
38. Donoso, E., Lobos, G. A., & Rojas, N. (2008). Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. *Bosque (Valdivia)*, 29(1), 52-57.
39. Dos Santos, Á. F., Tessmann, D. J., Alves, T. C., Vida, J. B., & Harakava, R. (2011). Root and crown rot of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Journal of Phytopathology*, 159(3), 194-196.
40. Dudzinski, MJ, Old, KM y Gibbs, RJ (1993). Variabilidad patogénica en aislados australianos de *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany* , 41 (6), 721-732.
41. Durán, A., Gryzenhout, M., Slippers, B., Ahumada, R., Rotella, A., Flores, F. & Wingfield, M. J. (2008). *Phytophthora pinifolia* sp. nov. associated with a serious needle disease of *Pinus radiata* in Chile. *Plant Pathology*, 57(4), 715-727
42. Eggert D., Naumann M., Reimer R., Voigt CA (2014). Red de polímeros de glucano a nanoescala causa resistencia a patógenos. *Sci. Rep.* 4:4159. 10.1038/srep04159.
43. Enricci, J.; Massone, D. (2003). Producción de plug+0 de *Austrocedrus chilensis* en Patagonia Argentina. *Patagonia Forestal* 3: 5-8.
44. Environmental Protection Agency (EPA). (2002). *Gliocladium catenulatum* strain J1446 (pc Code 021009).
45. Environmental Protection Agency (EPA). (2010). *Trichoderma gamsii* strain icc 080
46. Environmental Protection Agency (EPA). (2010). *Trichoderma hamatum* isolate 382.
47. Environmental Protection Agency (EPA). (2011). *Trichoderma asperellum* strain T34
48. Environmental Protection Agency (EPA). (2017). Pesticides

49. Erwin, D.C. And Ribeiro, O.K. (1996). *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society, St. Paul. 592.
50. European Commission (EU). (2017). Health and food safety. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticidesdatabase/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>.
51. Ezziyyani, M., Requena, M. E., Sánchez, C. P., & Castillo, M. E. C. (2005). Efecto del sustrato y la temperatura en el control biológico de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.). In Anales de Biología, 27, 119-126. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia.
52. Fajardo, S., Valenzuela, S.; Dos Santos, A.; Gonzalez, M.; Sanfuentes, E. (2017). *Phytophthora pseudosyringae* associated with the mortality of *Nothofagus obliqua* in a pure stand in central south of Chile. Forest Pathology 47:e12361
53. Fang, W., Zuo, C., Wang, Y., & He, Q. (2021). Interaction between *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* on alfalfa and its effects on disease severity and plant growth. Plant Disease, 105(3), 692–698. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1266-RE>
54. Frankel, S.J. y Hansen E.M. (2011). Forest *Phytophthora* diseases in the Americas: 2007 – 2010. New Zealand Journal of Forestry Science 41S (2011) S159-S167
55. García, E. R. (2010). Agroecología y enfermedades de la raíz en los cultivos agrícolas. 1ª. Ed. Colegio de Posgraduados. México. D. F. 130.
56. García, N. & C. Ormazabal. (2008). Árboles Nativos de Chile. Enersis S.A. Santiago, Chile. 196.
57. Geiger, A., Karácsony, Z., Geml, J., & Váczy, K. Z. (2022). Mycoparasitism capability and growth inhibition activity of *Clonostachys rosea* isolates against fungal pathogens of grapevine trunk diseases suggest potential for biocontrol. PLoS ONE, 17(9), e0273985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273985>
58. Giachero, M.L.; Declerck, S.; Marquez, N. (2022). *Phytophthora* Root Rot: Importance of Disease, Current and Novel Methods of Control.
59. Gonthier, P., & Garbelotto, M. (2013). Reducing the threat of emerging infectious diseases of forest trees-Mini Review

60. González G., A. Opazo. 2002. Enfermedades fungosa y otras. En: Agentes de daño en el bosque nativo Baldini, A and L Pancel (Eds) Editorial Universitaria Santiago, Chile: 89-199.
61. Greslebin, A.; Hansen, E. (2007). La causa del "Mal del Ciprés". Ficha técnica. Patagonia Forestal 13(1): 5-8.
62. Greslebin, A.; Hansen, E. (2009). The decline of *Austrocedrus* forests in Patagonia (mal del ciprés): Another *Phytophthora*-caused forest disease. In: *Phytophthoras* in forests and natural ecosystems. Proceedings of the fourth meeting of the International Union of Forest Research Organizations (IUFRO) Working Party S07.02.09. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-221. Monterey, CA, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Research Station. 64-73.
63. Hansen, E. Hamm, P. (1996). Survival of *Phytophthora lateralis* in infected roots of Port Oxford Cedar. Plant Disease 80: 1075-1078
64. Hansen, E.M., Reeser, P.W., Sutton, W. (2012). *Phytophthora* beyond agriculture. Annual Review of Phytopathology 50, 359–378.
65. Hardham, A. R. (2005). *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology*, 6 (6), 589-604. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00308.x>
66. Hardham, A. R. (2007). Cell biology of *Phytophthora* infection. Australasian Plant Pathology, 36(2), 95–101. <https://doi.org/10.1071/AP07009>
67. Hardham, A. R., & Blackman, L. M. (2017). *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology*, 19(2), 260–285.
68. Hardham, A.R., Blackman, L.M. (2018). *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology* 2, 260–285
69. Harman, G., Howell, C., Viterbo, A. (2004). *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol 2, 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
70. Havrylenko, D.; Winterhalter, J. (1949). Insectos del Parque Nacional Nahuel Huapi. Administración General de Parques Nacionales y Turismo. Argentina. 53p.
71. Hechenleitner, P., Gardner, M., Thomas, P., Echeverría, C., Escobar, B., Brownles, P., Martínez, C. (2005) Plantas amenazadas del Centro-Sur de Chile. Universidad Austral de Chile. Real Jardín Botánico de Edimburgo. 187.

72. Heimpel, G. E., and Mills, N. (2017). *Biological Control - Ecology and Applications*. Cambridge: Cambridge University Press.
73. Herrera, R. (2005). Control biológico de *R. solani*, *F. oxysporum*, *F. lycopersici* y *Fusarium solani* en tomate bajo condiciones de invernaderos. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas.
74. Hetchenleitner, P.; Gardner, M.; Thomas, P.; Echeverría, C.; Escobar, B.; Brownles, B.; Martínez, C. (2005). Plantas amenazadas del Centro-Sur de Chile. Universidad Austral de Chile. Real Jardín Botánico de Edimburgo. 187p
75. Hu, J., Hong, C., Stromberg, E. L., & Moorman, G. W. (2010). *Mefenoxam sensitivity in Phytophthora cinnamomi isolates*. *Plant Disease*, 94(1), 39-44. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-1-0039>
76. Hüberli, D., Tommerup, I. C., Colquhoun, I. J., & St J Hardy, G. E. (2002). Evaluation of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in seed-grown trees and clonal lines of *Eucalyptus marginata* inoculated in lateral branches and roots. *Plant Pathology*, 51(4), 435-442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00728.x>
77. Hunter, S., McDougal, R., Williams, N. y Scott, P. (2023). Evidencia de tolerancia al fosfito en *Phytophthora cinnamomi* de huertos de aguacate de Nueva Zelanda. *Plant*, 107 (2), 393-400. Universidad de Waikato, Hamilton, Nueva Zelanda.
78. Hunter, SR (2018). Determinación del riesgo de tolerancia al fosfito en especies de *Phytophthora* en Nueva Zelanda y Estados Unidos: un estudio de caso sobre las implicaciones del uso a largo plazo de fosfito para controlar *Phytophthora cinnamomi* en aguacate (*Persea americana*) (Tesis doctoral, Universidad de Waikato).
79. Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal*, 24(1), 14-21.
80. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. (2023). Memoria Institucional 2023. <https://www.inia.cl/wp-content/uploads/2024/12/Memoria-2023-INIA.pdf>

81. Jaroszek-Ścisła, J., Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Majewska, M., Hanaka, A., Tyśkiewicz, K., Pawlik, A., & Janusz, G. (2019). Phytohormones (Auxin, Gibberellin) and ACC Deaminase In Vitro Synthesized by the Mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 Strain and Changes in the Level of Auxin and Plant Resistance Markers in Wheat Seedlings Inoculated with this Strain Conidia. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20(19), 4923. <https://doi.org/10.3390/ijms20194923>
82. Jensen, B., Lübeck, PS, y Jørgensen, HJ (2016). *Clonostachys rosea* reduce la mancha foliar en la cebada al inhibir el crecimiento prepenetrante y la esporulación de *Bipolaris sorokiniana* sin inducir resistencia. *Pest Management Science* , 72 (12), 2231-2239.
83. Jensen, D., Dubey, M., Jensen, B., & Karlsson, M. (2021). *Clonostachys rosea* to control plant diseases. *Microbial Bioprotectants for Plant Disease Management*, 429–472.
84. Jiang, H., Zhang, L., Zhang, J., Ojaghian, M. R., & Hyde, K. D. (2016). Antagonistic interaction between *Trichoderma asperellum* and *Phytophthora capsici* in vitro. *Journal Of Zhejiang University SCIENCE B*, 17(4), 271-281. <https://doi.org/10.1631/jzus.b1500243>
85. Jung T., Blaschke H., Osswald W. (2000). Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology* 49: 706–718
86. Jung, T., Blaschke, H. (1996). *Phytophthora* root rot in declining forest trees. *PHYTON-HORN-*, 36, 95-102.
87. Jung, T., Blaschke, H. y Neumann, P. (1996). Aislamiento, identificación y patogenicidad de especies de *Phytophthora* en rodales de robles en declive. *Revista Europea de Patología Forestal*, 26 (5), 253-272.
88. Jung, T., Durán, A., Sanfuentes, E., Schena, L., Mosca, S., Fajardo, S., González, M., Navarro, A., Bakonyi, J., Seress, D., Tomsovsky, M., Cravador, A., Maia, C., Jung, M. H. (2018). Diversity of *Phytophthora* species in Valdivian rainforest and association with severe dieback symptoms. *Forest Pathology*.
89. Jung, T., Jung, M., Scanu, B., Seress, D., Kovács, G., Maia, C., Pérez-Sierra, A., Chang, T., Chandelier, A., Heungens, K., Van Poucke, K., Abad-Campos, P.,

- Léon, M., Cacciola, S., & Bakonyi, J. (2016). Six new *Phytophthora* species from ITS Clade 7a including two sexually functional heterothallic hybrid species detected in natural ecosystems in Taiwan. *Persoonia - Molecular Phylogeny And Evolution Of Fungi*, 38(1), 100-135. <https://doi.org/10.3767/003158517x693615>
90. Koike, S. T. & Henderson, D. M. (1998). Black root rot, caused by *Thielaviopsis basicola*, on tomato transplants in California. *Plant Disease* 82, 447
91. Kornilowicz-Kowalska, T., Andruszczak, S., Bohacz, J., Kraska, P., Możejko, M., & Kwiecińska-Poppe, E. (2022). The effect of tillage and no-tillage system on culturable fungal communities in the rhizosphere and soil of two spelt cultivars. *Applied Soil Ecology*, 174, 104413.
92. Kroon, L. P. N. M., Brouwer, H., De Cock, A. W. A. M., & Govers, F. (2012). The *Phytophthora* genus anno 2012. *Phytopathology*, 102(4), 348-364.
93. Kroon, L. P. N. M., Brouwer, H., De Cock, A. W. A. M., & Govers, F. (2012). The *Phytophthora* genus anno 2012. *Phytopathology*, 102(4), 348-364.
94. Lahlali, R., Taoussi, M., Laasli, S., Gachara, G., Ezzougari, R., Belabess, Z., Aberkani, K., Assouguem, A., Meddich, A., Jarroudi, M. E., & Barka, E. A. (2024). Effects of climate change on plant pathogens and host-pathogen interactions. *Crop And Environment*, 3 (3), 159-170. <https://doi.org/10.1016/j.crope.2024.05.003>
95. Lamour, K. (2013). *Phytophthora*: a global perspective. En CABI eBooks. <https://doi.org/10.1079/9781780640938.0000>
96. Leiva Villanueva, D. M. (2018). Eficacia de biofungicidas frente a la caída de plántula de pepino, inducida por *Pythium aphanidermatum*. *Revista De Investigación De Agroproducción Sustentable*, 2(1), 72-78. <https://doi.org/10.25127/aps.20181.387>
97. Lolas, M., Contreras, J. M., Méndez, R., Cáceres, M., & Díaz, G. A. (2016). First Report of *Phytophthora* Fruit Rot in Apple Caused by *Phytophthora syringae* During Cold Storage in Maule Region, Chile. *Plant Disease*, 100(7), 1507. <https://doi.org/10.1094/pdis-12-15-1462-pdn>

98. Lorito, M., Mach, R. L., Sposato, P., Strauss, J., Peterbauer, C. K., Kubicek, C. P. (1996). Mycoparasitic interaction relieves binding of Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequence of ech-42 (endochitinase-encoding) gene of *Trichoderma harzianum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93
99. Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., De Poorter, M., (2004). 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. The Invasive Species Specialist Group, New Zealand.
100. Mamarabadi, M.; Jensen, D.F.; Lübeck, M. (2009). An N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase gene, cr-nag1, from the biocontrol agent *Clonostachys rosea* is upregulated in antagonistic interactions with *Fusarium culmorum*. Mycological Research 113: 33-43.
101. Martin, F. N., & Loper, J. E. (1999). Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(2), 111–181. <https://doi.org/10.1080/07352689991309209>
102. Moraga-Suazo, P., Opazo, A., Zaldúa, S., González, G., Sanfuentes, E. (2011). Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. Chilean journal of agricultural research, 71(3), 412.
103. Morandi, M. A., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S., Alfenas, A. C., & Barbosa, J. G. (2003). Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in *Botrytis* blight management in commercial greenhouses. *Biological Control*, 26(3), 311–317.
104. Navarro Ortega, A. (2016). Patogenicidad de *Phytophthora cinnamomi* Rands en especies arbóreas del bosque valdiviano. [Tesis no publicada]. Universidad de Concepción.
105. Newhook, F. J., Waterhouse, G. M., & Stamps, D. J. (1978). Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary.
106. O’Gara, E., Howard, K., McComb, J., Colquhoun, I. J., & St J Hardy, G. E. (2014). Penetration of suberized periderm of a woody host by *Phytophthora*

*cinnamomi*. Plant Pathology, 64(1), 207-215.  
<https://doi.org/10.1111/ppa.12244>

107. Ochoa, F. Y., Cerna, C. E., Gallegos, M. G., Cepeda, S. M., Landeros, F. J., & Flores, O. A. (2015). Variabilidad patogénica de *Phytophthora cinnamomi* Rands en *Persea americana* Mill. de Michoacán México. Ecosistema y Recursos Agropecuarios. 2 (5): 211-215.
108. O'gara E., G.S.J. Hardy, J. McComb. (1996). The ability of *Phytophthora cinnamomi* to infect through unwounded and wounded periderm tissue of *Eucalyptus matginata*. Plant Pathology 45(5): 955-963.
109. O'Gara, E., Howard, K., McComb, J., Colquhoun, I. J., Hardy, G. S. J. (2015). Penetration of suberized periderm of a woody host by *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathology, 64(1), 207-215.
110. Palazzini, J. M., & Sarrocco, S. (2023). Biocontrol using beneficial fungi and bacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 167(4), 423-425.  
<https://doi.org/10.1007/s10658-023-02762-4>
111. Para la Innovación Agraria, F., & Besoain, X. (2020). Manual técnico: manejo integrado para el control de especies de *Phytophthora* que afectan al nogal en Chile.
112. Pastorino M., M. Fariña, D. Bran, L. Gallo. (2006). Extremos geográficos de la distribución natural de *Austrocedrus chilensis* (Cupressaceae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 41: 307-311.
113. Paulitz, T. C. y Bélanger, R. R. (2001). Biological control in greenhouse systems. Annu. Rev. Phytopathol. 39: 103-133.
114. Peterson, R.; Oehrens, E. (1978). *Mikronegeria alba* (Uredinales). Mycologia 70: 321-331.
115. Prospero, S., Botella, L., Santini, A., & Robin, C. (2021). Biological control of emerging forest diseases: How can we move from dreams to reality?. Forest Ecology and Management, 496, 119377.
116. Rajchenberg, M.; Cwielong, P. (1993). El mal del ciprés (*Austrocedrus chilensis*): su relación con las pudriciones radiculares y el sitio. CIEFAP, Anales Volumen 1: 96-108.

117. Rajchenberg, M.; Gómez, C. (2005). Enfermedades y plagas en *Austrocedrus chilensis*. Ecociprés: Reunión sobre ecología, conservación y uso de los bosques de ciprés de la cordillera. Esquel, Argentina. 5.
118. Rao, Y. Y., Sang, W. J., Jiang, C. Y., & Wu, W. C. (2006). Occurring character and control technology of *Thielaviopsis basicola* of the mulching flue-cured tobacco in Hezhang Guizhou. *J Mountain Agricul Biol*, 25, 370-372.
119. Ribeiro, O. K. (1978). A source book of the genus *Phytophthora*. J. Cramer.
120. Risoli, S., Cotrozzi, L., Sarrocco, S., Nuzzaci, M., Pellegrini, E., and Vitti, A. (2022). Trichoderma-induced resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum* species: A meta analysis. *Plants* 11, 180. doi: 10.3390/plants11020180
121. Rizzo DM, M Garbelotto, JM Davidson, GW Slaughter and S Koike. (2002). *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease* 86: 205-214.
122. Roberti, R., Veronesi, A., Cesari, A., Cascone, A., di Bernardino, I., Bertini, L., & Caruso, C. (2008). Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science*, 175(3), 339–347.
123. Robin, C., Capron, G., & Desprez-Loustau, M. L. (2001). *Root infection by Phytophthora cinnamomi in seedlings of three oak species. Plant Pathology*, 50(6), 708–716. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00643.x>
124. Rodríguez, R. (2004). Monografía. Ciprés de la Cordillera (*Austrocedrus chilensis*). Especie con problemas de conservación en Chile. Endesa. Santiago, Chile. 71p.
125. Sanchez, A. D., Ousset, M. J., & Sosa, M. E. (2019). Biological control of *Phytophthora* collar rot of pear using regional *Trichoderma* strains with multiple mechanisms. *Biological Control*, 135, 124–134.
126. Sánchez, M. E., Caetano, P., Ferraz, J., & Trapero, A. (2002). *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in south-western Spain. *Forest Pathology*, 32(1), 5-18. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2002.00261.x>
127. Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos

secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas, 16(2), 132-146. [https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(13)72084-9)

128. Sanfuentes, E., González, M., Castillo, M., Rubilar, R., Besoain, X., Sanhueza, C., Smith, M. (2022). Detection of *Phytophthora cinnamomi* on declining Araucaria forests. Forest pathology, 50
129. Scanu, B., Jones, B. M., & Webber, J. (2012). A new disease of *Nothofagus* in Britain caused by *Phytophthora pseudosyringae*. New Disease Reports, 25(1), 27. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2012.025.027>
130. Schena L., J. Duncan, D. Cooke. 2008. Development and application of a PCR-based 'molecular tool box' for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. Plant Pathology 57(1): 64-75.
131. Segarra, G., Aviles, M., Casanova, E., Borrero, C. y Trillas, I. (2013). Eficacia del control biológico de *Phytophthora capsici* en pimiento mediante *Trichoderma asperellum* cepa T34. Phytopathologia Mediterranea, 77-83.
132. Sena, K. L., Crocker, E. V., Vincelli, P. C., & Barton, C. (2018). *Phytophthora cinnamomi* as a driver of forest change: Implications for conservation and management. Forest Ecology and Management, 409, 799-807. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.12.022>
133. Sena, K., Crocker, E., Vincelli, P. y Barton, C. (2018). *Phytophthora cinnamomi* como impulsor del cambio forestal: Implicaciones para la conservación y la gestión. Ecología y Gestión Forestal, 409, 799-807.
134. Servicio Agrícola y Ganadero. (2025). Reporte de plaguicidas autorizados.
135. Sirikamonsathien, T., Kenji, M., & Dethoup, T. (2023). Potential of endophytic *Trichoderma* in controlling *Phytophthora* leaf fall disease in rubber (*Hevea brasiliensis*). Biological Control, 179, 105175.
136. Soto, A., Rodríguez Alvarado, G., Fernández Pavía, Y. L., Pedraza Santos, M. E., López Pérez, L., Díaz Celaya, M., & Fernández Pavía, S. P. (2017). Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* Spp.: enfoque aplicado a la investigación. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 8(8), 1867-1880.

137. Stamps, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J., & Hall, G. S. (1990). Revised tabular key to the species of *Phytophthora* (No. Ed. 2, pp. v+-28).
138. Stenberg, A. J., Sundh, I., Becher, P.G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P.A., Friberg, H., Gil, J. F., Jensen, D. F., Jonsson, M., Karlsson, Sammar, K., Ninkovic, V., Rehermann, G., Vetukuri, R. R., Viketoft, M. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanism, and classifications. *Journal of Pest Science*. 94, 665-676.
139. Thompson, SE, Levin, S. y Rodriguez-Iturbe, I. (2014). Los cambios en las precipitaciones y las temperaturas tienen efectos de confusión en el riesgo de ocurrencia de *Phytophthora cinnamomi* en el suroeste de EE. UU. bajo escenarios de cambio climático. *Global Change Biology*, 20 (4), 1299-1312.
140. Töfoli, J.G., Melo, P.C.T., Domingues, R.J.,Ferrari, J.T. (2013). Controle da quequeima e pinta preta da batata por fungicidas: conceitos, evolução e uso integrado *Biológico*, 75 (1), 41-52.
141. Tucker, C. M. (1931). Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary.
142. Tyler, B. 2001. Genetics and genomics of the oomycete-host interface. *Trends Genet.* 17: 611-614. Warrior, P.; Konduru, K. y Vasudevan, P. (2002). Formulation of biological control agents for pest and disease management. En: Gnanamanickam, S. S. (Ed.). *Biological control of crop diseases*. Marcel Dekker, Inc. New York. E.U. 421-441.
143. Udayanga D, Liu XZ, McKenzie EHC, Chukeatirote E, Bahkali AHA, Hyde KD (2011) The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogenes. *Fungal Divers* 50:189–225
144. Valencia, A. L., Chorbadjian, R. A., & Latorre, B. A. (2011). First report of *Nothofagus macrocarpa* dieback caused by *Phytophthora citrophthora* and *P. nicotianae* in Chile. *Plant Disease*, 95(9), 1193-1193.
145. Van Den Berg, N., Swart, V., Backer, R., Fick, A., Wienk, R., Engelbrecht, J., & Prabhu, S. A. (2021). Advances in Understanding Defense Mechanisms in *Persea americana* Against *Phytophthora cinnamomi*. *Frontiers In Plant Science*, 12, 636339. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.636339>

146. Van Tran, Q., Ha, C. V., Vvedensky, V. V., Le, T. T. L., & Han, V. (2023). Pathogenicity and fungicide sensitivity of *Phytophthora parvispora*, a new pathogen causing gummosis and root rot disease on citrus trees. *Microbial Pathogenesis*, 175, 105986. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.105986>
147. Vannini, A. and C. Morales-Rodriguez (2022). Chapter 21 - *Phytophthora* diseases. *Forest Microbiology*. F. O. Asiegbu and A. Kovalchuk, Academic Press: 379-402.
148. Vieites-Blanco, C., Colangelo, M., Camarero, JJ, Caballol, M., García Breijo, FJ, Štraus, D. y Oliva, J. (2023). Patogenicidad de las especies *Phytophthora* y *Halophytophthora* en aliso negro y respuesta histológica del hospedador. *Mycological Progress*, 22 (10), 71.
149. Villavicencio-Vásquez, M., Espinoza-Lozano, F., Espinoza-Lozano, L., & Coronel-León, J. (2025). Biological control agents: mechanisms of action, selection, formulation and challenges in agriculture. *Frontiers In Agronomy*, 7. <https://doi.org/10.3389/fagro.2025.1578915>.
150. Waterhouse, G. M. (1963). Key to the species of *Phytophthora* de Bary
151. Weste G and GC Marks. (1987). The Biology of *Phytophthora cinnamomi* in Australasian Forests. *Annual Review of Phytopathology* 25: 207-229.
152. Wick R., N. Shishkoff, M. Daughtrey. (2016). PROTOCOL 03-03.1: Long-term storage of *Phytophthora* and *Pythium* isolates using hemp seed
153. Widmer, T. L., & Shishkoff, N. (2017). Reducing infection and secondary inoculum of *Phytophthora ramorum* on *Viburnum tinus* roots grown in potting medium amended with *Trichoderma asperellum* isolate 04-22. *Biological Control*, 107, 60-69.
154. Wilcox, W. F., & Latorre, B. A. (2002). Identities and geographic distributions of *Phytophthora* spp. causing root rot of red raspberry in Chile. *Plant disease*, 86(12), 1357-1362.
155. Yáñez-Juárez, M. G., López-Orona, C. A., Ayala-Tafoya, F., Partida-Ruvalcaba, L., Velázquez-Alcaraz, T. D. J., & Medina-López, R. (2018). Los fosfitos como alternativa para el manejo de problemas fitopatológicos. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 79-94.

156. Yang X, Tyler BM, Hong C (2017). An expanded phylogeny for the genus *Phytophthora*. IMA Fungus 8: 355–384.
157. Yao, Y., Li, Y., Huang, Z., et al. (2016). Directed selection of *Trichoderma* antagonists for the control of pepper late blight caused by *Phytophthora capsici* in China. Journal of Plant Diseases and Protection, 123, 215–223. <https://doi.org/10.1007/s41348-016-0025-0>
158. Zentmyer, G. A. (1961). Chemotaxis of Zoospores for Root Exudates. Science, 133(3464), 1595-1596. <https://doi.org/10.1126/science.133.3464.1595>
159. Zentmyer, G.A., (1983). The world of *Phytophthora*. In: Erwin, D.C., Barnicki-García, S., Hsing-tsuen, T. (Eds.), *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. American Phytopathological Society, 1–8.
160. Zhang, L., Wang, Y., Chen, H., & Xu, X. (2022). Pathogenicity and interaction of *Fusarium aglaonematis* and *Fusarium elaeidis* causing stem rot in *Aglaonema modestum*. Journal of Phytopathology, 170(3), 165–173. <https://doi.org/10.1111/jph.13104>