

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA BACTERIA ANTAGONISTA
SERRATIA PLYMUTHICA CEPA CCGG2742 A FUNGICIDAS DE USO COMÚN
EN VID (*VITIS VINIFERA* L.)**

DANIELA SANDRA HERNÁNDEZ TORRES

SANTIAGO, CHILE
2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA BACTERIA ANTAGONISTA
SERRATIA PLYMUTHICA CEPA CCGG2742 A FUNGICIDAS DE USO COMÚN
EN VID (*VITIS VINIFERA* L.)**

**SENSITIVITY OF *SERRATIA PLYMUTHICA* STRAIN CCGG2742 TO
FUNGICIDES COMMONLY USED ON TABLE GRAPES (*VITIS VINIFERA* L.)**

DANIELA SANDRA HERNÁNDEZ TORRES

**SANTIAGO, CHILE
2013**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA BACTERIA ANTAGONISTA
SERRATIA PLYMUTHICA CEPA CCGG2742 A FUNGICIDAS DE USO COMÚN
EN VID (*VITIS VINIFERA* L.)**

Memoria para optar al título profesional de: Ingeniero Agrónomo
Mención: Sanidad Vegetal

DANIELA SANDRA HERNÁNDEZ TORRES

	Calificaciones
PROFESOR GUÍA Sr. José Luis Henríquez S. Ingeniero Agrónomo, M.S. Ph. D.	7.0
PROFESORES EVALUADORES Sr. Erwin Aballay E. Ingeniero Agrónomo, M.S. Ph. D.	6.7
Sra. María Cecilia Peppi A Ingeniera Agrónoma M.S. Ph. D.	6.8

SANTIAGO, CHILE
2013

A mi familia...

AGRADECIMIENTOS

En esta oportunidad, quiero agradecer a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de esta memoria. En especial a mi familia por su fuerza y empuje, sin la cual habría sido imposible enfrentar cada uno de los obstáculos que se me presentaron.

A mis padres Sandra y José Miguel, por su paciencia, cariño y palabras de aliento en los buenos y malos momentos. Por demostrarme que todo es posible de resolver.

A mi hermano Gustavo, por su infinita paciencia e incondicional apoyo, no solo en esta etapa, sino que a lo largo de mi carrera universitaria.

A mi profesor guía Don José Luís Henríquez, por confiar en mí y ayudarme pacientemente durante la ejecución, desarrollo y conclusión de esta memoria.

A mis compañeras de laboratorio Patricia y Paula, por su cariño e indispensable ayuda en cada uno de los experimentos.

Y por último, agradecer a mis amigos Natalia, Marjorie, Sebastián, Felipe y Maite por su apoyo y amistad, junto a Victor, por su eterna paciencia y amor en este proceso.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Hipótesis	7
Objetivo	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Origen y multiplicación de <i>Serratia plymuthica</i> cepa CCGG2742	8
Medios de cultivo y preparación de fungicidas	8
Preparación de la suspensión de bacterias y posterior siembra	9
Determinación de la concentración de bacterias utilizadas.	10
Determinación de la inhibición	10
Diseño experimental y análisis estadístico	11
RESULTADOS	12
Sensibilidad de <i>S. plymuthica in vitro</i> a fungicidas de uso común en vid, en las concentraciones de 0, 100, 500, 1.000, 2.500 y 5.000 $\mu\text{g i.a.}\cdot\text{mL}^{-1}$.	12
DISCUSIÓN	15
CONCLUSIONES	19
BIBLIOGRAFÍA	20
APÉNDICE I	28
APÉNDICE II	29
APÉNDICE III	30
APÉNDICE IV	31

**EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA BACTERIA ANTAGONISTA
SERRATIA PLYMUTHICA CEPA CCGG2742 A FUNGICIDAS DE USO COMÚN
EN VID (*VITIS VINIFERA* L.)**

RESUMEN

La pudrición gris, causada por el hongo *Botrytis cinerea*, corresponde al principal problema fitopatológico que enfrentan los productores de uva de mesa, puesto que limita su producción y exportación al desarrollarse pudriciones incluso en almacenaje. Para su control, se integran diferentes medidas entre las cuales el uso de fungicidas específicos es la base de los programas utilizados. Actualmente, la creciente preocupación por la presencia de residuos de fungicidas en la fruta y el riesgo ambiental asociado a su uso, además del desarrollo de resistencias en *Botrytis* a estas moléculas, han complicado su empleo como estrategia de control. Ante el cual se han aplicado métodos alternativos como la intensificación de prácticas culturales que disminuyan las condiciones predisponentes de la enfermedad, junto a herramientas naturales que incluyen el uso de extractos de cítricos y controladores biológicos como *Trichoderma*. Por otro lado, recientemente se ha elaborado un biofungicida con la bacteria antagonista *Serratia plymuthica* cepa CCGG2742, un controlador biológico de *B. cinerea*, que en este ensayo se ha probado su sensibilidad frente a fungicidas de uso común en vid, con el objeto de conocer su compatibilidad en un posible programa de control que integre estas estrategias. Se evaluaron los ingredientes activos boscalid, ciprodinil + fludioxonil, fenhexamida, iprodione, kresoxim methyl, pyrimethanil, tebuconazole y extracto de cítrico en concentraciones que fluctuaron entre 0 y 5.000 $\mu\text{g i.a.} \cdot \text{mL}^{-1}$ y se calculó la EC_{50} . Los valores de EC_{50} obtenidos fueron: $6,00 \cdot 10^4$; $3,18 \cdot 10^7$; $7,04 \cdot 10^{12}$ y $1,38 \cdot 10^{18}$ $\mu\text{g i.a.} \cdot \text{mL}^{-1}$, para fenhexamida, extracto de cítrico, tebuconazole y boscalid respectivamente, mientras que con iprodione, kresoxim methyl, pyrimethanil y la mezcla de c+f, no se obtuvieron valores de EC_{50} positivos, ni indicios de inhibición *in vitro*. De acuerdo a estos resultados, el uso de dosis comerciales de fungicidas no altera el desarrollo de la cepa CCGG2742.

Palabras clave: antagonistas, control biológico, pudrición gris.

SENSITIVITY OF *SERRATIA PLYMUTHICA* STRAIN CCGG2742 TO FUNGICIDES COMMONLY USED ON TABLE GRAPES (*VITIS VINIFERA L.*)

ABSTRACT

Gray mold induced by *Botrytis cinerea*, is the most important disease of table grapes that causes significant losses to grape growers. Its ability to attack in the orchard and its ability to develop under conditions prevailing during storage, shipment and marketing make its control a challenge. Control programs have relied mainly on chemical strategies using specific fungicides. However, the growing public concern about fungicide residues in fruit, and the environmental risk associated to fungicide use, in addition to pathogen's resistance development, have created a complicated situation for the continuous use of fungicides. Therefore, alternative methods have been developed for non-chemical control, such as cultural practices, and the use of natural products including citrus extracts and biological controls agents, as *Trichoderma*. *Serratia plymuthica*, antagonistic to *B. cinerea*, is a new biocontrol agent, and in this study the sensitivity of the strain CCGG2742 to fungicides commonly used in vineyards was tested, in order to know their compatibility for possible control programs that integrate these tools. Boscalid, ciprodinil + fludioxonil, fenhexamida, iprodione, kresoxim methyl, pyrimethanil, tebuconazole and citric extract were tested at concentrations ranging between 0 and 5,000 $\mu\text{g i.a.} \cdot \text{mL}^{-1}$. EC_{50} values obtained ranged between $5.48 \cdot 10^4$ and $1.38 \cdot 10^{18}$ $\mu\text{g i.a.} \cdot \text{mL}^{-1}$. According to these results, commercial rates of the fungicides tested do not affect the development of *S. plymuthica* strain CCGG2742.

Key words: antagonists, biological control, gray mold.

INTRODUCCIÓN

Con una superficie plantada de 53.523 hectáreas, una producción estimada de 1.299.447 toneladas y un volumen exportado de 812.152 t en el año 2012, la uva de mesa (*Vitis vinífera* L.) se posiciona como la principal especie frutícola cultivada a nivel nacional, generando más de un tercio del valor total exportado por la industria frutícola. Lo anterior sitúa al país como el mayor exportador mundial de uva de mesa y el 5^{to} productor después de China, Turquía, Unión Europea y Brasil (Bravo, 2013).

Una de las enfermedades más importantes que afectan el rendimiento y la calidad final de los frutos de esta especie, es la pudrición gris causada por el hongo *Botrytis cinerea* Pers. (Esterio *et al.*, 2010), que causa principalmente pudrición blanda y acuosa de las bayas entre envero y cosecha, con desarrollo superficial de moho gris que compromete gran parte del racimo (Latorre, 2004). Este patógeno puede atacar casi todos los órganos de la planta, sin embargo el mayor daño lo causa cuando ataca el racimo antes, durante y después de floración (Auger, 1981). Los primeros síntomas se observan en prefloración o floración, en que la infección ocurre sobre la epidermis del escobajo que adquiere una coloración blanquecina por la presencia del micelio del hongo en desarrollo, desecándolo. Posterior a la floración, el hongo permanece en restos florales senescentes hasta que las bayas adquieren mayor madurez y los compuestos antifúngicos tales como ácido glicólico, taninos y fitoalexinas disminuyen, lo que ocurre desde envero en adelante. Posteriormente en la cosecha, aparecen pudriciones en las bayas con síntomas de piel suelta, pardeamientos y abundante esporulación. En el parrón, como consecuencia de un fuerte ataque al racimo durante y posterior a la cosecha, se presenta pudrición de color pardo grisáceo en brotes aun no lignificados. En estos brotes, se forman los cuerpos de resistencia del hongo, principal forma de supervivencia en Chile, aunque también puede sobrevivir como micelio en forma saprofítica en restos de tejidos en descomposición (Auger, 1981; Esterio *et al.*, 2004 y Esterio *et al.*, 2010). El desarrollo de este hongo se favorece en ambientes templados con 15 a 22 °C y con humedad relativa mayor al 95% alrededor de los racimos (Latorre, 2004).

El control de la enfermedad se basa en un manejo integrado que incluye prácticas culturales como: arreglo de racimos, manejo de la canopia y fertilización adecuada, junto a prácticas químicas preventivas con botriticidas en los estadios fenológicos más susceptibles, además del uso de anhídrido sulfuroso (SO₂) en pre y postembalaje (Esterio *et al.*, 2004). No obstante estas prácticas, la enfermedad sigue siendo un problema, principalmente por la pérdida de sensibilidad del patógeno a las moléculas fungicidas (benzimidazoles, dicarboximidias, anilino pirimidinas e hidroxianilidas), gatillada por su uso reiterado sobre poblaciones con desconocida sensibilidad a éstos (Esterio *et al.*, 2010).

A lo anterior, se suma el creciente aumento en las restricciones al uso de agroquímicos, en relación a los límites máximos de residuos fitosanitarios permitidos y al número máximo de activos residuales en la fruta, poniendo en riesgo la vida postcosecha del producto (Baeza y Espíndola, 2009; Esterio *et al.*, 2010). Esta situación, ha motivado la búsqueda de productos

de origen natural sin limitaciones toxicológicas, que tengan un bajo impacto ambiental y permitan disminuir el uso de fungicidas sintéticos. En esta búsqueda, las estrategias biológicas aplicables a postcosecha como la inducción de resistencia en el fruto, el uso de productos de origen vegetal o animal con actividad fungicida y la aplicación de microorganismos antagonistas, surgen como una nueva opción para el control de la enfermedad (Spadaro y Gullino, 2004).

El uso de productos de origen vegetal, como extractos y aceites esenciales ha sido ampliamente estudiado por su actividad antimicrobiana y antifúngica (Arif *et al.*, 2009; Burt, 2004; Dorman y Deans, 2000; Singh y Maurya, 2005), siendo los extractos de cítricos aquellos con mayor éxito en el control de patógenos (Aibinu *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2013).

Los mecanismos de acción asociados a los extractos y aceites esenciales, aun no han sido determinados debido a la variedad de compuestos y grupos funcionales presentes, no atribuyéndose la capacidad antibacteriana solo a un mecanismo sino que a un grupo de ellos (Burt, 2004). Sin embargo, el principal organelo afectado es la membrana, donde se produce disrupción, expansión, aumento de fluidez y permeabilidad, inhibición de la respiración y alteración de procesos de transporte de iones (Trombetta *et al.*, 2005).

En cuanto al control biológico, definido como “la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades inductoras de enfermedad de un patógeno o parásito en estado vivo o durmiente, por la acción de uno o más organismos” (Baker y Cook, 1974) o como “el uso de microorganismos antagonistas con el potencial de interferir en cualquiera de los procesos vitales de los patógenos vegetales (Jacas *et al.*, 2005), se han hecho estudios que demuestran el éxito de levaduras, hongos y bacterias como agentes de control biológico de enfermedades, principalmente por sus diferentes mecanismos de acción que reducen el desarrollo de resistencias y disminuyen el uso de fungicidas (Elad y Stewart, 2007; Sharma *et al.*, 2009).

Los mecanismos utilizados por la mayoría de los antagonistas no siempre son claros, y por lo general estos poseen más de uno; antibiosis, competencia por espacio o nutrientes, interacciones directas con el patógeno (parasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia en las plantas (Agrios, 2005; Janisiewicz y Korsten, 2002). Por ejemplo, *Trichoderma spp.* parasita su huésped gracias a enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, beta 1,3 glucanasas y proteasas que utiliza para romper las paredes de hifas, conidios o esclerocios (Elad *et al.*, 1982; Elad *et al.*, 1983), mientras que *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn libera compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas que actúan sobre la pared celular de los hongos (Cazorla *et al.*, 2007; Touré *et al.*, 2004). Ambos antagonistas son los que se utilizan actualmente en los productos comerciales disponibles para el biocontrol de *Botrytis* en el país.

Entre los antagonistas bacterianos, son muchos los géneros utilizados como controladores biológicos de enfermedades, sin embargo entre ellos destacan *Agrobacterium*, *Bacillus*,

Pseudomonas y *Serratia* (Weller, 1988). Este último, pertenece a la familia Enterobacteriaceae y corresponde a un grupo de bacterias Gram negativas, saprófitas, capaces algunas de producir pigmentos, biosurfactantes, ácidos grasos y enzimas del tipo quitinasas que catalizan la hidrólisis de quitina. El género incluye a *Serratia marcescens* Bizio, *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty), *Serratia proteamaculans* (Paine and Stansfield), *Serratia grimesii* Grimont, *Serratia rubidaea* Stapp, *Serratia odorifera* Grimont, *Serratia ficaria* Grimont, *Serratia entomophila* Grimont, *Serratia fonticola* Gavini y *Serratia plymuthica* (Lehmann and Neumann) (Dworkin *et al.*, 2006). Esta última ampliamente estudiada como antagonista de hongos fitopatógenos debido a su actividad quitinolítica y propiedades antifúngicas (Kurze *et al.*, 2001; Okumoto *et al.*, 2001 y De Vleeschauwer y Höfte, 2007).

Diferentes aislados de *S. plymuthica* han sido utilizados para el control de patógenos del suelo, las hojas y en algunos casos para suprimir enfermedades de postcosecha donde los mecanismos de acción asociados son: antibiosis, parasitismo con la producción de enzimas líticas, competencia por nutrientes, producción de sideróforos e inducción de mecanismos de defensa en las plantas (De Vleeschauwer y Höfte, 2007).

Por ejemplo, Benhamou *et al.* (2000) encontraron que al inocular plántulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) con *Pythium ultimum* Trow previamente tratadas con *S. plymuthica* cepa R1GC4 se desarrollaban menos lesiones en aquellas plantas tratadas, debido a una acumulación de callo y pectina en los sitios de infección, tales respuestas asociadas con la aparición de resistencia inducida. Kamensky *et al.* (2003) comprobaron que aplicaciones foliares de *S. plymuthica* cepa IC14 también protegían pepinos de infecciones por *B. cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary a través de la secreción de antibióticos, proteasas y sideróforos. En otros casos, *S. plymuthica* se ha utilizado también en tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) para el control de *Fusarium sambucinum* Fries (Gould *et al.*, 2008) y en naranjas (*Citrus sinensis* L.) para el control de *Penicillium digitatum* Sacc. y *Penicillium italicum* Wehmer (Meziane *et al.*, 2006). De Vleeschauwer y Höfte (2007) recopilan y mencionan otros casos exitosos de control por parte de esta especie.

En otros estudios, se ha visto que *S. plymuthica* cepa A30 también controla bacterias de los géneros *Pectobacterium*, *Ralstonia* y *Dickeya* que causan enfermedades en papa, llegando a disminuir en un 100% la incidencia de la enfermedad en condiciones de invernadero (Czajkowski *et al.*, 2012a; Czajkowski *et al.*, 2012b). Por otro lado, la cepa IC1270 se ha utilizado en combinación con *Pseudomonas fluorescens* cepa Q8r1-96 para el control de *Agrobacterium tumefaciens* y *A. vitis* obteniéndose resultados exitosos (Dandurishvili *et al.*, 2011).

Según Janisiewicz y Korsten (2002), la superficie de la fruta es una excelente fuente natural de antagonistas para combatir enfermedades de postcosecha. Actualmente en Chile, se ha aislado de la superficie de bayas de uvas, una cepa de *S. plymuthica* llamada CCGG2742 con la capacidad de inhibir el desarrollo de distintos aislados de *B. cinerea* y cuya capacidad fungicida estaría dada por la secreción de moléculas fungitóxicas que inhiben la germinación de conidias y la proliferación del micelio (Castillo, 2010).

Esta cepa ha sido caracterizada morfológica y metabólicamente como un bacilo móvil de 0,7 a 1,5 μm de largo y 0,6-0,8 μm de ancho con la presencia de un flagelo polar, capaz de secretar una molécula orgánica tipo fenilpirrol y una quitinasa que permite a la bacteria sobrevivir en medios de cultivo con quitina coloidal como única fuente de carbono, no produce pigmento y puede crecer en un amplio rango de temperaturas (4-37°C) y de pH (4,5-9,5) (Castillo, 2012). La secreción de más de un tipo de molécula con distinto mecanismo de acción, garantizaría su eficacia por tiempos prologados (Castillo, 2012).

Sin embargo, el uso de antagonistas microbianos como único control de enfermedades no ha sido exitoso comparado con los fungicidas sintéticos, especialmente cuando la densidad del patógeno es alta o se utilizan sobre infecciones ya desarrolladas (Budge *et al.*, 1995; Droby *et al.*, 2009; Mathre *et al.*, 1995). No obstante, la efectividad del control biológico puede ser aumentada a través de la integración de otros métodos de control, siempre y cuando éstos sean compatibles (Janisiewicz y Korsten, 2002; Janisiewicz y Conway, 2010).

Como ejemplo de lo mencionado anteriormente, la compatibilidad entre antagonistas y fungicidas sintéticos ofrece la opción de usar los agentes microbianos en combinación con niveles reducidos de fungicidas (Sharma *et al.*, 2009), mejorando la eficacia, el espectro de control y se reduce el desarrollo de resistencias (Elad y Stewart, 2007; Eshel *et al.*, 2009). Además, según Janisiewicz y Conway (2010), la aplicación de bajas dosis de fungicida junto con agentes de biocontrol permite reducir la cantidad de agente aplicado sin comprometer el control de la enfermedad, haciendo que el tratamiento sea más económico.

De acuerdo a Budge y Whipps (2001), el fenómeno sinérgico envuelto en el control de patógenos usando la aplicación integrada de fungicidas y antagonistas puede ser más eficiente y duradero que el control por parte de antagonistas y fungicidas utilizados individualmente.

Para Sharma *et al.* (2009), un antagonista ideal es aquel que además de ser genéticamente estable, efectivo en bajas concentraciones, capaz de sobrevivir bajo distintas condiciones ambientales, actuar sobre un amplio rango de patógenos, no producir metabolitos tóxicos para el ser humano, no ser patogénico con el hospedero y resistir formulaciones que puedan almacenarse, debe ser compatible con otros tratamientos y resistentes a los fungicidas.

Si bien los fungicidas no están formulados para controlar bacterias, es posible afectarlas en forma directa o indirecta al alterar sitios de acción comunes o componentes de sistemas que integran en ellos a bacterias (Yang *et al.*, 2011). Por ejemplo, los fungicidas cuyo modo de acción afectan la síntesis de ácidos nucleicos, apuntan a 4 sitios de acción diferentes, de los cuales, por lo menos uno de ellos, no solo es tóxico para hongos sino que también para organismos procariontes al afectar la enzima ADN Topoisomerasa II presente también en ellos (FRAC, 2012; Sioud *et al.*, 2009). En cuanto a los efectos indirectos, Cycon *et al.* (2010) y Monkiedje y Spiteller (2005), encontraron que los fungicidas dimethomorph, hexaconazole y metalaxyl tienen impacto en la actividad de las bacterias relacionadas con el ciclo del nitrógeno.

A causa de lo anterior, la compatibilidad de los métodos de control es un requisito para el éxito de los tratamientos combinados; el primero no debe tener ningún efecto perjudicial por el siguiente y preferentemente debe mejorarlo (Eshel *et al.*, 2009).

Al respecto, se han observado diferentes casos, por un lado Errampalli y Brubacher (2006), utilizaron la bacteria antagonista *Pseudomonas syringae* Van Hall con bajas dosis de ciprodinil y obtuvieron un efectivo control sobre *Penicillium expansum* Link en manzanas (*Malus domestica* Borkh), mientras que en otro estudio se observó que el fungicida fludioxonil inhibió la biosíntesis de pyrrolnitrin, metabolito con actividad antibacteriana y antifúngica, que afecta inevitablemente la eficacia de *Pseudomonas fluorescens* Migula como biofungicida (Keum, *et al.*, 2010). Por otro lado, Yildiz *et al.* (2007), probaron que la misma bacteria no es afectada por los fungicidas ciprodinil + fludioxonil, iprodione, imazil y fenhexamida y que además al combinar algunas cepas con el 25% de la dosis recomendada de fenhexamida, se reduce la incidencia de la enfermedad en un nivel similar o mayor que al aplicar la dosis completa del fungicida.

En base a la problemática que existe con los fungicidas sintéticos, la búsqueda de alternativas menos contaminantes y que permitan una reducción significativa y permanente del uso de fungicidas, es imprescindible para el desarrollo de una agricultura sostenible en el tiempo. Es por ello, que la utilización de microorganismos como agentes de biocontrol, ofrece una nueva oportunidad para lograr un equilibrio y sustentabilidad del ecosistema agrícola en cuestión.

Para que el uso de antagonistas microbianos sea exitoso, es fundamental conocer y comprender que el ambiente en que se introducirá debe ser favorable para su desarrollo. Como ya es conocido, su utilización es efectiva sólo cuando se complementa con otras estrategias de control, como son las bajas dosis de fungicidas, que permiten el establecimiento inicial de los agentes.

Debido a lo anterior, es necesario conocer con mayor detalle la compatibilidad y sensibilidad de *S. plymuthica* cepa CCGG2742 a los fungicidas utilizados en el control de la pudrición gris en vid para una exitosa adaptación y consiguiente establecimiento de la especie en el sistema agrícola.

Hipótesis

Los fungicidas actualmente utilizados en el control de la pudrición gris en uva de mesa no afectan el desarrollo de *Serratia plymuthica* cepa CCGG2742.

Objetivo

Determinar la sensibilidad *in vitro* de la bacteria antagonista *Serratia plymuthica* cepa CCGG2742 a fungicidas de uso común en vid.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos de sensibilidad *in vitro* se realizaron entre los meses de Septiembre y Diciembre del año 2012, en el Laboratorio de Fitopatología de Poscosecha del Departamento de Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicada en Av. Santa Rosa N° 11315, La Pintana, Santiago, Chile.

Origen y multiplicación de *Serratia plymuthica* cepa CCGG2742

Se utilizó la bacteria antagonista *Serratia plymuthica* cepa CCGG2742, proveniente del laboratorio de Virología de Hongos de la Universidad de Santiago de Chile, la cual se repicó semanalmente para disponer de bacterias frescas en cada uno los ensayos.

Para ello se preparó en un matraz 15 g de agar extracto de malta con 300 mL de agua destilada estéril, el cual se esterilizó a 121°C por 20 minutos en autoclave. Luego, dentro de una cámara de flujo vertical se procedió a vertir su contenido en diferentes placas Petri. Al enfriar y solidificarse el extracto en las placas, se sembró la bacteria con un asa metálica y se incubó a 20° +/- 1°C durante 7 días aproximadamente, para su posterior utilización (Castillo, 2010).

Medios de cultivo y preparación de fungicidas

Para los ensayos de sensibilidad se utilizaron 8 fungicidas (Cuadro 1) que fueron incorporados en el medio de cultivo Agar Mueller Hinton (AMH), excepto para Scala 400 SC y Switch 62,5 WG en que se usó el medio de cultivo para anilino pirimidinas recomendado por Leroux *et al.* (1999), que está compuesto por 10 g de glucosa, 1,5 g de K₂HPO₄, 2g de KH₂PO₄, 1 g de (NH₄)₂SO₄, 0,5 g de MgSO₄ * 7H₂O, 12,5 g de agar y 1.000 mL de agua destilada.

Al mismo tiempo, se prepararon 2 soluciones madres de 100.000 µg i.a ·mL⁻¹ en agua destilada estéril por cada fungicida, a partir de las cuales se agregó la cantidad necesaria de solución a cada uno de los matraces ya esterilizados, para obtener las concentraciones 0; 0,1; 1; 10; 50 y 100 µg i.a mL⁻¹. Realizado este ensayo, se procedió a preparar de la misma manera las concentraciones 0, 100, 500, 1.000, 2.500 y 5.000 µg i.a ·mL⁻¹.

Cuadro 1. Fungicidas utilizados en la evaluación de sensibilidad de la bacteria antagonista *S. plymuthica* cepa CCGG2742

Producto comercial	Ingrediente activo	% i.a.	Formulación
BC 1000 [®]	Extracto de cítrico	50	Concentrado emulsionable
Cantus [®]	Boscalid	50	Gránulos dispersables
Horizon 25 WP	Tebuconazole	25	Polvo mojable
Krexim 50 SC	Kresoxim methyl	50	Suspensión concentrada
Rovral 4 Flo	Iprodione	48	Suspensión concentrada
Scala [®] 400 SC	Pyrimethanil	40	Suspensión concentrada
Switch [®] 62,5 WG	Ciprodinil+fludioxonil (C+F)	62,5	Gránulos dispersables
Teldor 50 WP	Fenhexamida	50	Polvo mojable

Preparación de la suspensión de bacterias y posterior siembra

A partir de colonias frescas de *S. plymuthica* (Figura 1a), se preparó una suspensión de bacterias agregando con una micropipeta 1 mL de agua destilada a la placa Petri con desarrollo de colonias, para luego mezclar y raspar con un asa de vidrio las bacterias y el agua. Obtenida la suspensión, se trasladaron las bacterias con la micropipeta a un tubo Eppendorf, teniendo especial cuidado en no absorber el medio de cultivo de la placa Petri.

Teniendo la suspensión y las placas ya solidificadas con las distintas concentraciones de fungicidas, se procedió a sembrar con una micropipeta, 3 gotas de 5 μ L de suspensión separadas a 3,5 centímetros aprox. en cada uno de los tratamientos (Figura 1b y c) y se incubó por 48 horas a 22 +/- 1°C para su posterior evaluación, siguiendo la metodología empleada por Riquelme (2010).

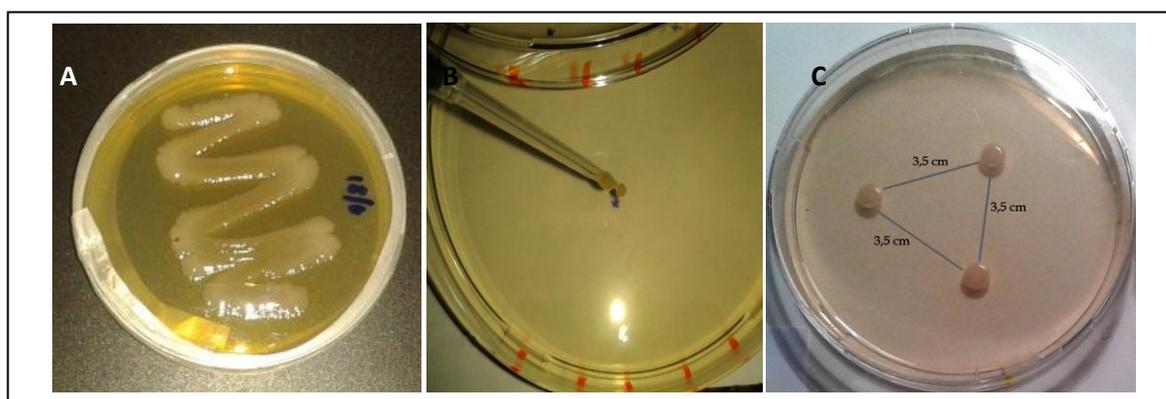


Figura 1. A) bacterias frescas, incubadas 7 días aproximadamente, B) Punta de una micropipeta expulsando una gota de 5 μ L de suspensión sobre la placa Petri con medio de cultivo, C) Desarrollo de 3 colonias de *S. plymuthica* placa testigo.

Determinación de la concentración de bacterias utilizadas.

Se determinó la cantidad de unidades formadoras de colonia por cada mL ($\text{ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$) realizando diluciones seriadas entre 10^{-2} y 10^{-16} de la misma suspensión utilizada, para luego realizar una siembra de $100\ \mu\text{L}$ de las diluciones 10^{-6} a 10^{-16} en placas de Petri con medio agar nutritivo. Al cabo de 24 horas de incubación a $22\ \pm\ 1^\circ\text{C}$ se evaluó la cantidad de colonias formadas (Figura 2) y se multiplicó tantas veces como fue diluida la suspensión original. La cantidad inicial de colonias utilizadas en los ensayos fluctuó entre $8,00\cdot 10^6$ y $3,35\cdot 10^{14}\ \text{ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 2, Apéndice I)

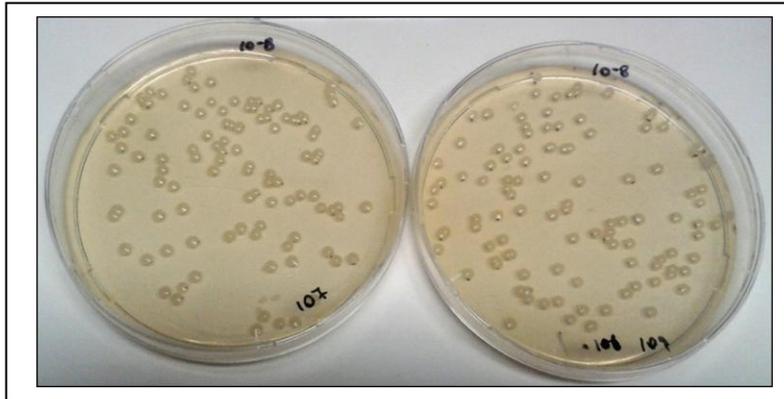


Figura 2. Desarrollo de colonias de *S. plymuthica* en dilución 10^{-8} luego de 72 horas de incubación.

Determinación de la inhibición

Pasadas las 48 horas de incubación, se evaluó la sensibilidad de la bacteria en presencia de los fungicidas a través de la medición del diámetro alcanzado por las colonias bacterianas comparado con el diámetro del testigo sin fungicida en cada uno de los tratamientos (Figura 4, Apéndice IV). Luego se determinó el porcentaje de inhibición y posteriormente la concentración efectiva media (EC_{50}), entendida como la concentración de fungicida que inhibe el crecimiento del 50% de la colonia bacteriana.

Para calcular el porcentaje de inhibición se midió con un pie de metro el diámetro de las colonias formadas en los diferentes tratamientos y se comparó con el testigo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = (1 - \text{diámetro tratamiento} / \text{diámetro testigo}) \times 100$$

Diseño experimental y análisis estadístico

Para la evaluación *in vitro* de la sensibilidad de la cepa bacteriana CCGG2742 a fungicidas, se realizó un diseño experimental completamente al azar con los 8 fungicidas mencionados anteriormente, en las concentraciones 0; 0,1; 1; 10; 50 y 100 $\mu\text{g i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$ en un primer ensayo. En este último no se obtuvo inhibición del crecimiento, por lo que se procedió a evaluar la cepa en las concentraciones de 0, 100, 500, 1.000, 2.500 y 5.000 $\mu\text{g i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$ en un segundo ensayo, con 4 repeticiones por cada tratamiento.

El análisis estadístico consistió en determinar la concentración efectiva media (EC_{50}), el cual fue calculado a partir de la ecuación de la regresión lineal entre el logaritmo de las concentraciones de fungicidas y el porcentaje de inhibición.

RESULTADOS

En un primer ensayo, al evaluar todos los fungicidas en concentraciones que fluctuaron entre 0 y 100 $\mu\text{g i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$, fue posible observar que ninguno de ellos inhibió el crecimiento de *S. plymuthica* cepa CCGG2742, por lo que se procedió a aumentar las concentraciones hasta 5.000 $\mu\text{g i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$ en un segundo ensayo, cuyos resultados se presentan a continuación.

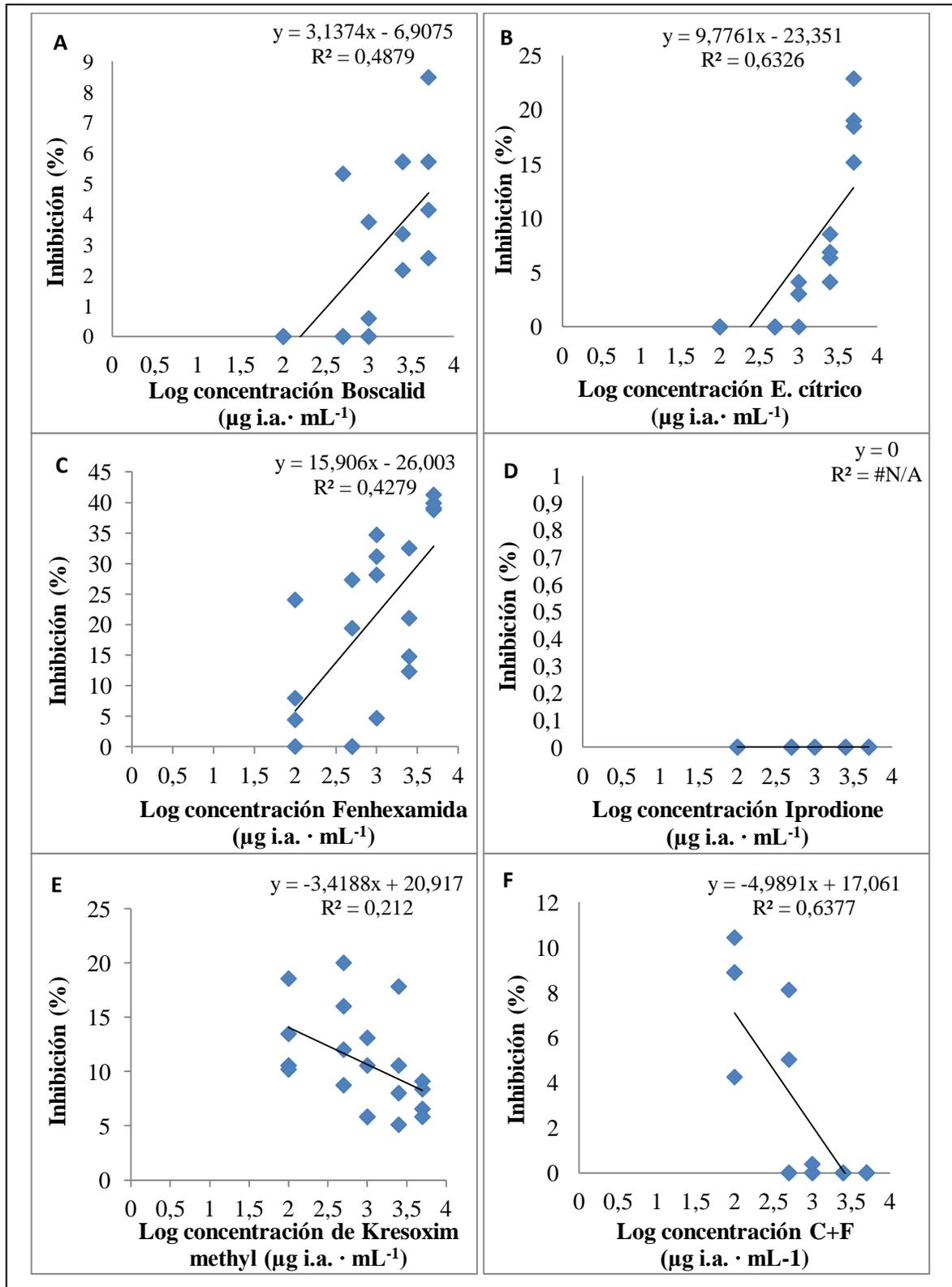
Sensibilidad de *S. plymuthica in vitro* a fungicidas de uso común en vid.

Al procesar los datos obtenidos y realizar las regresiones lineales entre los porcentajes de inhibición y el logaritmo de la concentración con cada uno de los fungicidas, se logró observar que solo 4 de ellos presentaron rectas con pendiente positiva (Figura 3), siendo además significativas ($p \leq 0,002$), las cuales permitieron calcular la concentración efectiva media de cada fungicida para *S. plymuthica* cepa CCGG2742 (Cuadro 3, Apéndice I).

Los ingredientes activos que presentaron este comportamiento, con coeficientes de determinación cercanos a 0,5 fueron boscalid, extracto de cítrico, fenhexamida y tebuconazole, con valores de EC_{50} que fluctuaron entre $6,00\cdot 10^4$ y $1,38\cdot 10^{18}$ $\mu\text{g i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$. La menor EC_{50} de $6,00\cdot 10^4$ $\mu\text{g i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$ se obtuvo con el ingrediente activo fenhexamida, seguido de $3,18\cdot 10^7$ $\mu\text{g i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$ para el extracto de cítrico, $7,04\cdot 10^{12}$ $\mu\text{g i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$ para tebuconazole y el mayor valor de $1,38\cdot 10^{18}$ $\mu\text{g i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$ correspondió a boscalid.

Las dosis recomendadas por los fabricantes para el control de *B. cinerea* en vid (Cuadro 4, Apéndice II), expresadas como concentración de ingrediente activo son de 350 $\mu\text{g i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$ para fenhexamida; 1,8 $\mu\text{L i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$ para el extracto de cítrico; 312,5 $\mu\text{g i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$ para tebuconazole y 400 $\mu\text{g i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$ para boscalid. Al comparar las EC_{50} obtenidas con las concentraciones anteriores, se puede observar que todas son muchas veces mayores a las recomendadas, lo que permite deducir que ninguno de estos fungicidas afectaría el desarrollo de la cepa CCGG2742 en la práctica.

En cuanto a los ingredientes activos kresoxim methyl, pyrimethanil y la mezcla de C + F, se observaron rectas con pendiente negativa (Figura 3) con coeficientes de determinación bajos excepto para la mezcla C+F (0,21; 0,17 y 0,64 respectivamente). Sin embargo, debido a la escasa inhibición observada con estos fungicidas, se obtuvieron valores de EC_{50} menores a 0, al observarse un eventual mayor desarrollo de las colonias con el aumento de las concentraciones. Para el caso de iprodione, no fue posible realizar una regresión al no observarse inhibición alguna con las diferentes concentraciones utilizadas (Cuadro 3, Apéndice I).



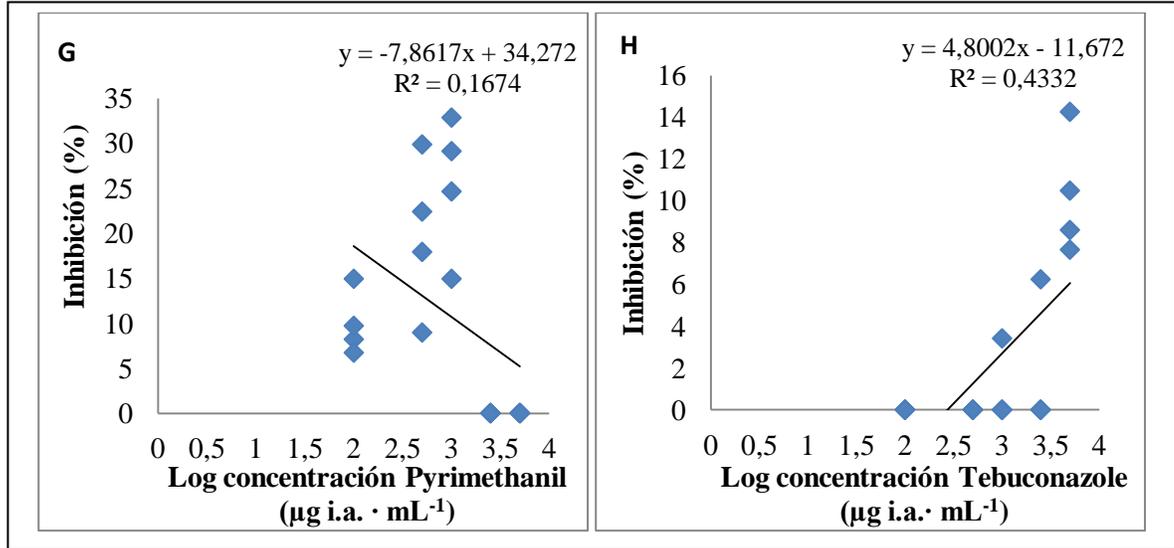


Figura 3. Regresiones entre el porcentaje de inhibición y el logaritmo de las concentraciones de los ingredientes activos: A) Boscalid, B) Extracto de cítrico, C) Fenhexamida, D) Iprodione, E) Kresoxim methyl, F) Mezcla C+F, G) Pyrimethanil, H) Tebuconazole.

DISCUSIÓN

La integración de agentes de control biológico con fungicidas, ha sido una de las estrategias propuestas para mejorar la eficacia de los antagonistas (Errampalli y Brubacher, 2006; Zhou *et al.*, 2002) y disminuir la concentración de fungicidas en el control de patógenos. De acuerdo a Keum *et al.* (2010), para una aplicación apropiada de microorganismos como agentes de biocontrol, un requisito importante es la tolerancia a pesticidas por parte del organismo en cuestión. Es por ello, que en esta investigación se evaluó la sensibilidad *in vitro* de la bacteria antagonista *S. plymuthica* cepa CCGG2742 a los ingredientes activos boscalid, ciprodinil + fludioxonil, fenhexamida, iprodione, kresoxim methyl, pyrimethanil, tebuconazole y extracto de cítrico, con el fin de comprobar la compatibilidad de la bacteria con estas moléculas, apuntando a la utilización de estrategias que combinen su uso integrado en el control de *B. cinerea* en vid.

En un primer ensayo, se evaluaron concentraciones que fluctuaron entre 0 y 100 $\mu\text{g i.a.} \cdot \text{mL}^{-1}$, no encontrándose inhibición, por lo que se procedió a aumentar las concentraciones hasta 5.000 $\mu\text{g i.a.} \cdot \text{mL}^{-1}$, en un segundo ensayo. En este último, se calculó la EC_{50} para todos los ingredientes activos, obteniéndose los valores $6,00 \cdot 10^4$; $3,18 \cdot 10^7$; $7,04 \cdot 10^{12}$ y $1,38 \cdot 10^{18}$ $\mu\text{g i.a.} \cdot \text{mL}^{-1}$, para fenhexamida, extracto de cítrico, tebuconazole y boscalid respectivamente, los cuales al compararlos con las dosis comerciales recomendadas por los fabricantes (Cuadro 4, Apéndice II) resultan ser muy altos, con lo que su uso comercial no debería afectar el desarrollo de la bacteria.

Los altos valores de EC_{50} observados, demuestran que existe escasa sensibilidad por parte de la cepa hacia los ingredientes activos evaluados, posiblemente debido a la baja relación existente entre algunos de los mecanismos de acción afectados (Cuadro 5, Apéndice III) y el metabolismo bacteriano involucrado.

En el caso de boscalid, una piridin carboxiamida conocida por inhibir la respiración de hongos al afectar el complejo II succinato deshidrogenasa, se obtuvo la menor toxicidad al obtener una mayor EC_{50} . Esta enzima transporta los electrones del FADH_2 , provenientes de la oxidación de succinato a fumarato, a la coenzima Q para integrarlos a la cadena transportadora de electrones (Berg *et al.*, 2008). De acuerdo a Avenot y Michailides (2010), boscalid bloquearía el transporte de electrones desde el grupo [3Fe-4S], perteneciente a la Subunidad B de la enzima, a la ubiquinona interrumpiendo la cadena e inhibiendo así la respiración. En la cepa estudiada no se observó inhibición del crecimiento, por lo que se esperaba que este sitio no es afectado por los fungicidas.

La ausencia de inhibición del género *Serratia*, por inhibidores de la succinato deshidrogenasa, también ha sido estudiada por otros autores como Someya *et al.* (2005), quienes estudiaron el efecto de flutolanil, ingrediente activo con igual mecanismo de acción que boscalid, sobre la especie *S. marcescens* cepa B2, encontrando ausencia de inhibición del crecimiento y la producción de quininas de la cepa. Además, observaron que al

combinar estas estrategias era posible también controlar al patógeno *Rhizoctonia solani* Kühn AG-1 IA al disminuir en un 100% la germinación de esclerocios a los $100 \mu\text{g i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$. Lo anterior confirma que especies del mismo género, además de sobrevivir en presencia de inhibidores del complejo II succinato deshidrogenasa, pueden controlar un patógeno estando en combinación con bajas dosis de boscalid o un fungicida similar.

En cuanto a los inhibidores de la biosíntesis de ergosterol en membranas de células de hongos, los ingredientes activos tebuconazole y fenhexamida tampoco afectaron el desarrollo de la cepa, ya que las EC_{50} calculadas de $3,18\cdot 10^7$ y $6,00\cdot 10^4 \mu\text{g i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente, son mayores a las concentraciones recomendadas por los fabricantes, posiblemente debido a la ausencia de ergosteroles en bacterias (Voet *et al.*, 2006; Tortora *et al.*, 2007) y sitios de acción susceptibles, aparentemente, a este tipo de moléculas. Por otro lado, la ausencia de inhibición fue también observada en estudios de Hammoudi *et al.* (2012) quienes evaluaron la efectividad de control combinado de *S. plymuthica* cepa HRO-C48 con el fungicida metconazol, un triazol de igual mecanismo de acción que tebuconazole, en el control de *Phoma lingam* (Tode). Además, Sehnem *et al.* (2010) demostraron que bacterias del mismo género eran capaces incluso de actuar sobre $42,76 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tebuconazole.

Al probar el extracto compuesto por semillas y pulpa de cítricos, también se obtuvo un valor elevado de EC_{50} ($3,18\cdot 10^7 \mu\text{g i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$) que indica escasa sensibilidad al producto comercial. Este resultado se contrapone a los estudios realizados con el extracto en bacterias (Henríquez *et al.*, 2005; Riquelme, 2010), sin embargo en estudios realizados por Aibinu *et al.* (2007) y Reddy *et al.* (2012) es posible obtener inhibición del género *Serratia* con extracto de limonero (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) y pomelo (*Citrus paradisi* L.) (Uysal *et al.*, 2011). Por otro lado, de acuerdo a Tassou *et al.* (2000) el efecto en este tipo de bacterias depende del tiempo de exposición.

De acuerdo a Okunowo *et al.*, (2013), la inhibición es dependiente del tipo de solvente utilizado, por lo que es posible que el extracto tenga efecto en *S. plymuthica*, si a este se le adiciona un aceite dispersable, tal como lo hicieron los mismos autores para inhibir el crecimiento de *E. coli* con extractos de pomelo.

Para el caso de iprodione, una dicarboxiamida cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la transducción de señales osmóticas al afectar el complejo MAP/Histidina quinasa en hongos (FRAC, 2012), se observó que la cepa tampoco fue inhibida, posiblemente debido a que los genes objetivos *os-1* y *Daf1* no están involucrados en la regulación osmótica de la especie. Lo mismo sucede con fludioxonil que también afecta la transducción de señales osmóticas, pero involucrando a los genes *os-2* y *HOG1*.

La regulación osmótica es fundamental para la adaptación y sobrevivencia de los organismos frente a fluctuaciones en la osmolaridad del medio. Los mecanismos responsables de esta adaptación, en general, se basan en la regulación de canales mecanosensitivos y acuaporinas en el caso de estrés hipo-osmótico, mientras que en estrés hiper-osmótico se producen solutos compatibles y regulación de porinas presentes en la

membrana externa de bacterias Gram negativas (Hutsul y Worobec, 1994; Sleator y Hill, 2001). En el caso de la especie *S. marcescens*, las respuestas frente a estrés osmótico involucran transcripción de los genes *ompC* y *ompF* para la síntesis de porinas OmpC y OmpF que controlan la permeabilidad de la membrana externa de acuerdo a las condiciones del medio, provocando aumento en la expresión del gen *ompC* y represión del gen *ompF* en condiciones de alta osmolaridad y viceversa (Belgic y Worobec, 2006).

Por otro lado, Wang *et al.*, (2004) estudiaron el efecto de la aplicación de iprodione, en suelos con presencia de microorganismos y observaron que a medida que la dosis aumentaba, los microorganismos no eran afectados, y muy por el contrario, tendían a aumentar a medida que la dosis era mayor, siendo la temperatura el único factor determinante en la velocidad de desarrollo de los microorganismos.

Para los fungicidas kresoxim methyl, pyrimethanil y la mezcla de c + f, no se obtuvieron valores de EC₅₀ positivos, ni indicios de inhibición *in vitro*, lo que permite deducir que ninguno de ellos afecta el desarrollo de la cepa. El primero, pertenece al grupo de los inhibidores de quinonas del complejo III que inhiben la respiración de hongos al interrumpir específicamente el gen *cyt b* (FRAC, 2012) que codifica para el citocromo b. Este último contiene el sitio de oxidación de la ubihidroquinona (Qo) por lo que su inhibición bloquea el transporte de electrones desde el citocromo b al citocromo c, interrumpiendo el ciclo energético y en consecuencia la síntesis de ATP (Xia *et al.* 1997). Sin embargo, en enterobacterias como *Serratia* no existe como terminal oxidativo el citocromo c, sino que en su lugar se utiliza una quinol oxidasa (Anraku, 1988).

De acuerdo a FRAC (2012), ciprodinil y pyrimethanil inhiben la síntesis de metionina al afectar al gen *cgs*. Este último codifica para la enzima cistationina gamma sintasa que cataliza el penúltimo paso de la síntesis, produciendo cistationina a partir de diferentes sustratos dependiendo del organismo. Sin embargo según Leroux *et al.* (2002), en *Botrytis* la enzima afectada sería la cistationina beta liasa, la cual participa en la última reacción transformando la cistationina en metionina. En bacterias, el codón iniciador corresponde a una formil metionina, una forma modificada del aminoácido metionina, además en bacterias como *E. coli*, el gen *metB* es el que codifica para ambas enzimas (Holbrook *et al.*, 1990).

A pesar de la falta de estudios que prueben la sensibilidad de bacterias a fungicidas, aun es posible encontrar investigaciones que utilizan otras especies con ingredientes activos que comparten el mismo mecanismo de acción de los que aquí han sido evaluados, lo que podría dar indicios de la sensibilidad de bacterias a este tipo de moléculas. Por ejemplo, Anand *et al.* (2009) observaron compatibilidad entre *P. fluorescens* y azoxystrobin, ingrediente con igual mecanismo de acción que kresoxim methyl, encontrando compatibilidad entre ambas estrategias incluso en la dosis de 300 µg i.a. · mL⁻¹. Por otro lado en el caso de la mezcla de fungicidas (C+F), Errampalli y Brubacher (2006) compararon la eficiencia de ciprodinil y el antagonista *Pseudomonas syringae* cepa MA-4, comprobando que el crecimiento de la cepa es inhibido solo ligeramente por ciprodinil a la concentración de 185 µg i.a. · mL⁻¹.

Estos resultados demuestran el potencial éxito del uso de *S. plymuthica* cepa CCGG2742 asociada al uso de fungicidas en un programa de manejo integrado de la pudrición gris en vid.

CONCLUSIONES

De acuerdo con las metodologías utilizadas en este estudio, se puede concluir que:

La bacteria *S. plymuthica* cepa CCGG2742, no es inhibida por los fungicidas boscalid, ciprodinil + fludioxonil, fenhexamida, iprodione, kresoxim methyl, pyrimethanil, tebuconazole y extracto de cítrico, aun cuando estos presentan variados modos de acción.

De acuerdo a lo anterior, el uso de *S. plymuthica* cepa CCGG2742 en asociación con fungicidas de uso común en vid es factible, sin embargo es necesario establecer ensayos en campo que comprueben la eficiencia y eficacia del controlador biológico en presencia de una amplia gama de patógenos y condiciones existentes en la práctica.

BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G. 2005. Plant Pathology 5th ed., Elsevier Academic Press, California, USA. 922p.
- AIBINU, I.; T. ADENIPEKUN; T. ADELOWOTAN; T. OGUNSANYA and T. ODUGBEMI. 2007, nov. Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of *Citrus aurantifolia* (lime fruit) as used locally. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 4(2): 185.
- ALVAREZ, A.; A. CARVAJAL; H. ARGUELLO; F.J. MARTINEZ; G. NAVARRO and P. RUBIO. 2013, jul. Antibacterial activity and mode of action of a commercial citrus fruit extract. *Journal of Applied microbiology*, 115(1): 50-60.
- ANAND, T.; A. CHANDRASEKARAN; S. KUTTALAM; T. RAGUCHANDER and R. SAMIYAPPAN. 2009. Management of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Mildews through Azoxystrobin-Tolerant *Pseudomonas fluorescens*. *Journal Agricultural Science Technology*, 11(2): 211-226.
- ANRAKU, Y. 1988, jul. Bacterial electron transport chains. *Annual review of biochemistry*, 57(1), 101-132.
- ARIF, T.; J.D. BHOSALE; N. KUMAR; T.K. MANDAL; R.S. BENDRE; G.S. LAVEKAR and R. DABUR. 2009, jul. Natural products–antifungal agents derived from plants. *Journal of Asian natural products research*, 11(7): 621-638.
- AUGER, J. 1981, abr. La pudrición gris de la vid. *Revista Frutícola*, 2(2): 7-9.
- AVENOT, H.F., and T.J. MICHAILIDES. 2010, july. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 29(7): 643-651.
- BAEZA, C. y L. ESPÍNDOLA. 2009, dic. Restricciones al uso de agroquímicos. *Frutícola*, (3): 4-5.
- BAKER, K.F. and R.J. COOK. 1974. Biological Control of Plant Pathogens. W.H. Freeman & Co. San Francisco, CA, EEUU. 433p.
- BELGIC, S. and A.E. WOROBEK. 2006, feb. Regulation of *Serratia marcescens ompF* and *ompC* porin genes in response to osmotic stress, salicylate, temperature and pH. *Microbiology*, 152(2): 485-91.
- BENHAMOU, N.; S. GAGNÉ; D. LE QUÉRÉ and L. DEHBI. 2000, jan. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: Beneficial effect of the endophytic bacterium

Serratia plymuthica on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 90(1): 45-56.

BERG, J.M.; S. LUBERT and J.L. TYMOCZKO. 2008. Fosforilación oxidativa (pp. 502-540) *En su*: Bioquímica. [En línea] 6^{ta} edición. Barcelona: Reverté. Recuperado en: <<http://books.google.cl/books?id=HRr4MNH2YssC&printsec=frontcover&dq=bioquimica+berg+2008&hl=es-419&sa=X&ei=yrvyUbmcAcqLqQGXkIGICw&ved=0CDAQ6wEwAA#v=onepage&q=bioquimica%20berg%202008&f=false>> Consultado el: 20 de Junio del 2013.

BRAVO, J. 2013, Jul. Uvas: superficie, producción estimada y exportaciones 2000-2012. Publicación de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, ODEPA, Ministerio de Agricultura. [En línea]. Santiago, Chile: ODEPA. 38p. Recuperado en: <<http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servicios-informacion/Boletines/BFruticola0813.pdf;jsessionid=C166AAB546E3C6F939287974782B0CE1>> Consultado el 6 de Septiembre del 2013.

BUDGE, S. P.; M. P. MCQUILKEN; J.S. FENLON and J.M. WHIPPS. 1995, dec. Use of *Coniothyrium minitans* and *Gliocladium virens* for biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse lettuce. *Biological Control*, 5(4): 513-522.

BUDGE, S. and J. WHIPPS. 2011, feb. Potencial for integrated control of *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse lettuce using *Coniothyrium minitans* and reduced fungicide application. *Phytopathology*, 91(2): 221-227.

BURT, S. 2004, aug. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3): 223–253.

CASTILLO, A. 2010. 21 de Octubre de 2010. Composición biofungicida para el control de hongos fitopatógenos. WO/2010/118548 A2. C12N1/00. En línea. 16 de Junio de 2010. 29p. Recuperado en: <<http://www.google.com/patents/WO2010118548A2?cl=es>> Consultado el: 6 de Junio del 2012.

CASTILLO, A. 2012. 3 may 2012. Biofungicidal composition for controlling phytopathogenic fungi. US 2012/0107280 A1. A01N 63/00. [En línea]. 16 april 2009. 15p. Recuperado en: <<http://www.google.com/patents/US20120107280?cl=es>> Consultado el: 5 de Diciembre del 2012.

CAZORLA, F.M.; D. ROMERO; A. PÉREZ-GARCÍA; B.J.J. LUGTENBERG; A.D. VICENTE and G. BLOEMBERG. 2007, nov. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5):1950-1959.

CYCON, M.; Z. PIOTROWSKA-SEGET, and J. KOZDROJ. 2010, jul. Responses of indigenous microorganisms to a fungicidal mixture of mancozeb and dimethomorph added to sandy soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64(4): 316–323.

CZAJKOWSKI, R.; W.J. DE BOER; J.A. VAN VEEN and J.M. VAN DER WOLF. 2012a, aug. Studies on the interaction between the biocontrol agent, *Serratia plymuthica* A30, with blackleg causing *Dickeya sp.* (biovar 3) in potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Pathology*, 61(4):677–688.

CZAJKOWSKI, R.; WJ. DE BOER; JA. VAN VEEN and JM. VAN DER WOLF. 2012b. 19 July 2012. *Serratia plymuthica* for biological control of bacterial plant pathogens. WO 2012/095431 A1. C12R 1/425. [En línea]. 11 January 2011. 55p. Recuperado en: <<http://www.google.com/patents/WO2012095431A1?cl=en>> Consultado el: 15 de Febrero del 2013.

DANDURISHVILI, N.; N. TOKLIKISHVILI; M. OVADIS; P. ELIASHVILI; N. GIORGOBIANI; R. KESHELAVA; M. TEDIASHVILI; A. VAINSTEIN; I. KHMEL; E. SZAGEDI and L. CHERNIN. 2011, jan. Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. *Journal of Applied Microbiology*, 110(1): 341-352.

DE VLEESSCHAUWER D. and M. HÖFTE. 2007, apr. Using *Serratia plymuthica* to control fungal pathogen of plants. *CAB Reviews: Perspective in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 2(46): 1-12.

DORMAN, H.J.D. and S.G. DEANS. 2000, feb. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2): 308-316.

DROBY, S.; M. WISNIEWSKI; D. MACARISIN and C. WILSON. 2009, may. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a newparadigm?. *Postharvest Biology and Technology*, 52(2):137–145.

DWORKIN, M.; S. FALKOW; E. ROSENBERG; K.H. SCHLEIFER; E. STACKEBRANDT; F. GRIMONT and P.D. GRIMONT. 2006. The genus *Serratia* (pp.219-244). *En su: The Prokaryotes*. [En línea]. Springer New York. Recuperado en: <http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F0-387-30746-X_11>. Consultado el: 2 de Diciembre del 2011.

ELAD, Y.; I. CHET and Y. HENYS. 1982, jul. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(7): 719-725.

ELAD, Y.; I. CHET; P. BOYLE and Y. HENYS. 1983, jun. Parasitism of *Trichoderma spp.* on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*, 73(1): 85–88.

ELAD, Y. and A. STEWART. 2007. Microbial control of *Botrytis spp.* (pp. 223-241). In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. [En línea]. Springer. Recuperado en: <http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4020-2626-3_13> Consultado el: 14 de Abril del 2013.

ERRAMPALLI, D. and N. BRUBACHER. 2006, jan. Biological and integrated control of postharvest blue mold (*Penicillium expansum*) of apples by *Pseudomonas syringae* and cyprodinil. *Biological control*, 36(1): 49-56.

ESHEL, D.; R. REGEV; J. ORENSTEIN; S. DROBY and S. GAN-MOR. 2009, oct. Combining physical, chemical and biological methods for synergistic control of postharvest diseases: A case study of Black Root Rot of carrot. *Postharvest Biology and Technology*, 54(1): 48-52.

ESTERIO, M.; J. AUGER y G. MUÑOZ. 2004, ene-mar. Pudriciones de uva de mesa de exportación: Botrytis y Pudrición Ácida. *ACONEX*, (82): 21-28.

ESTERIO, M.; J. AUGER; C. RAMOS y M.J. ARANEDA. 2010, dic. Botrytis en uva de mesa de exportación: PCR en tiempo real, una innovadora herramienta tecnológica para la detección oportuna de resistencia a fungicidas. *Fedefruta*, 129: 24-31.

FRAC (FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE). 2012. FRAC Code List^{®*} 2012: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). [En línea] Recuperado en: <<http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC-Code-List2011-final.pdf>> Consultado el 12 de Octubre del 2012.

GOULD, M.; L.M. NELSON; D. WATERER and R.K. HYNES. 2008, dec. Biocontrol of *Fusarium sambucinum*, dry rot of potato, by *Serratia plymuthica* 5-6. *Biocontrol Science and Technology*, 18(10): 1005-1016.

HAMMOUDI, O.; M. SALMAN; R. ABUAMSHA and R. EHLERS. 2012, jun. Effectiveness of Bacterial and Fungal Isolates to Control *Phoma lingam* on Oilseed Rape *Brassica napus*. *American Journal of Plant Sciences*, 3(6): 773-779.

HENRÍQUEZ, J.L.; J. MONTEALEGRE y G. FIGUEROA. 2005. Sensibilidad de bacterias de la bioflora natural de vides a fungicidas de uso común en uva de mesa. En: Congreso nacional de fitopatología (15^{vo}, Diciembre de 2005, Arica, Chile). Facultad de Agronomía, Universidad de Tarapacá. Recuperado en: <http://www.fitopatologiachile.cl/trabajos02/XV.html#Articulo_18> Consultado el 15 de Octubre del 2012.

HOLBROOK, E.L; R.C. GREENE and J.H KRUEGER. 1990, jan. Purification and properties of cystathionine γ -synthase from over producing strains of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 29(2): 435-442.

HUTSUL, J.A and E. WOROBEK. 1994, feb. Molecular characterization of a 40kDa OmpC-like porin from *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 140(2): 379-387.

JACAS, J.; P. CABALLERO y J, AVILLA. 2005. El control biológico de plagas y enfermedades: la sostenibilidad de la agricultura mediterránea. [En línea]. Castelló de la plana: Publicaciones de la Universitat Jaume I. 222p. Recuperado en: <<http://books.google.cl/books?id=4hZ0loEeCPUC&pg=PA6&lpg=PA6&dq=JACAS+El+control+biol%C3%B3gico+de+plagas+y+enfermedades.&source=bl&ots=KHtDOx7QG7&sig=IyuBSELA v1caEIw ow8jKMTqv20M&hl=es-419&sa=X&ei=cDH3UcijIeGviQLq24Fg&ved=0CEsQ6AEwAw#v=onepage&q=JACAS%20El%20control%20biol%C3%B3gico%20de%20plagas%20y%20enfermedades.&f=false>>. Consultado el 10 de Junio del 2013.

JANISIEWICZ, W.J. y L. KORSTEN. 2002, sept. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1): 411-441.

JANISIEWICZ, W.J.; W.S. CONWAY. 2010, mar. Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decays after harvest. *Stewart Postharvest Review*, 6(1):1-16.

KAMENSKY, M.; M. OVADIS; I. CHET and L. CHERNIN. 2003, feb. Soil borne strain IC14 *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(2): 323-331.

KEUM, Y.S.; H.R. LEE and J.H. KIM. 2010, may. Effects of pesticides on the bacterial production of pyrrolnitrin. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58(9): 5531–5537.

KURZE, S.; H. BAHL; R. DAHL and G. BERG. 2001, may. Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Plant Disease*, 85(5): 529-534.

LATORRE, B. 2004. Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas. 6^{ta} edición. Chile: Ediciones Universidad Católica de Chile. 638p.

LEROUX, P.; F. CHAPELAND; D. DESBROSSES and M. GREDET. 1999, dec. Patterns of cross- resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection*, 18(10): 687-697.

LEROUX, P; R. FRITZ; D. DEBIEU; C. ALBERTINI; C. LANEN; J. BACH; M. GREDET and F. CHAPELAND. 2002, sep. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58(9): 876-888.

MATHRE, D.E.; R.H. JOHNSTON; N.W. CALLAN; S.K. MOHAN; J.M. MARTIN and J.B. MILLER. 1995, nov. Combined biological and chemical seed treatments for control of two seedling diseases of Sh2 sweet corn. *Plant Disease*, 79(11): 1145–1148.

MEZIANE, H.; S. GAVRIEL; Z. ISMAILOV; I. CHET; L. CHERNIN and M. HÖFTE. 2006, feb. Control of green and blue mould on orange fruit by *Serratia plymuthica* strains IC14 and IC1270 and putative modes of action. *Postharvest Biology and Technology*, 39(2): 125-133.

MONKIEDJE, A. and M. SPITELLER. 2005, aug. Degradation of metalaxyl and mefenoxam and effects on the microbiological properties of tropical and temperate soils. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2(2): 272–285.

OKUMOTO, S.; E. BUSTAMANTE and A. GAMBOA. 2001, mar. Actividad de cepas de bacterias quitinolíticas antagonistas a *Alternaria solani* in vitro. *Manejo integrado de plagas*, 1(59): 58-62.

OKUNOWO, W. O.; O. OYEDEJI; L.O. AFOLABI and E. MATANMI. 2013, jul. Essential oil of Grape Fruit (*Citrus paradisi*) peels and its antimicrobial activities. *American Journal of Plant Sciences*, 4(1): 1-9.

REDDY, L.J.; R.D. JALLI; B. JOSE and S. GOPU. 2012, may. Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activities of The Leaf Essential Oil and Leaf Extracts of *Citrus aurantifolia*. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, 2(2): 346-354.

RIQUELME, D. 2010. Evaluación de la capacidad antagónica de cepas bacterianas sobre el moho gris de la uva causada por *Botrytis cinerea*. Tesis Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Sanidad Vegetal. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Chile. 35p

SEHNEM, N.T.; P. SOUZA-CRUZ; M.D.C.R. PERALBA and M.A.Z. AYUB. 2010, jan. Biodegradation of tebuconazole by bacteria isolated from contaminated soils. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 45(1): 67-72.

SHARMA, R.R.; D. SINGH and R. SINGH. 2009, sept. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50 (3): 205-221.

SINGH, G. and S. MAURYA. 2005, may-jun. Antimicrobial antifungal and insecticidal investigations on essential oils. *Natural Product Radiance*, 4(3): 179-192.

SIOUD, M.; A. BOUDABOUS and L. CEKAITE. 2009, jan. Transcriptional responses of *Bacillus subtilis* and *B. thuringiensis* to antibiotics and anti-tumour drugs. *International Journal of Molecular Medicine*, 23(1):33-39.

SLEATOR, R.D and C. HILL. 2001, oct. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(1): 49-71.

SOMEYA, N.; M. NAKAJIMA; K. WATANABE and K. AKUTSU. 2005. Synergistic antifungal activity of the culture filtrates of *Serratia marcescens* strain B2 and chemical fungicides against the sclerotial viability of the rice sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*. *Biocontrol Science*, 10(3): 97-100.

SPADARO, D. and M.L. GULLINO. 2004, mar. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 91(2):185-194.

TASSOU, C.; K. KOUTSOUMANIS and G.J.E. NYCHAS. 2000, apr. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, 33(3-4): 273-280.

TORTORA, G.J.; B.R. FUNKE and C.L. CASE. 2007. Introducción a la Microbiología. [En línea]. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. 959p. Recuperado en: <http://books.google.cl/books/about/Introducci%C3%B3n_a_la_microbiolog%C3%ADa.html?id=Nxb3iETuwpIC&redir_esc=y> Consultado el: 15 de Julio del 2013.

TOURÉ, Y.; M. ONGENA; P. JACQUES; A. GUIRO and P. THONART. 2004, may. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5):1151-1160.

TROMBETTA, D.; F. CASTELLI; M.G. SARPIETRO; V. VENUTI; M. CRISTANI; C. DANIELE; A. SAIJA; G. MAZZANTI and G. BISIGNANO. 2005, jun. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6): 2474-2478.

UYSAL, B.; F. SOZMEN; O. AKTAS; B.S. OKSAL and E.O. KOSE. 2011, jul. Essential oil composition and antibacterial activity of the grapefruit (*Citrus Paradisi*. L) peel essential oils obtained by solvent-free microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(7): 1455-1461.

VOET, D.; J.G. VOET and C.W. PRATT. 2006. Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular. [En línea] Editorial médica panamericana. Argentina 1264p. Recuperado en: <http://books.google.cl/books?id=r5bedH_aST0C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>

WANG, Y.S.; C.Y. WEN; T.C. CHIU and J.H. YEN. 2004. Effect of fungicide iprodione on soil bacterial community. *Ecotoxicology and environmental safety*, 59(1): 127-132.

WELLER, D. 1988, sept. Biological control of soilborne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. *Anual Review of Phytopathology*, 26: 379-407.

XIA, D.; C.A.YU; J.Z. KIM; A.M. KACHURIN; L. ZHANG; L. YU and J. DEISENHOFER. 1997, jul. Crystal structure of the Cytochrome bc(1) complex from bovine heart mitochondria. *Science*, 277(5322): 60–66.

YANG, C.; C. HAMEL; V. VUJANOVIC and Y. GAN. 2011, jul. Review Article. Fungicide: Modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. *International Scholarly Research Network ISRN Ecology*, 2011:1-8.

YILDIZ, F.; M. YILDIZ; N. DENLE; A. COŞKUNTUNA; P. KINAY and H. TÜRTKÜSAY. 2007, nov. The effects of biological and chemical treatment on gray mold disease in tomatoes grown under greenhouse conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31(5): 319-325.

ZHOU, T.; J. NORTHOVER; K. SCHANEIDER and X. LU. 2002, apr. Interaction between *Pseudomonas syringae* MA-4 and cyprodinil in the control of the blue mould and gray mould of apples. *Canadian Journal Plant Pathology*, 24(2): 154-161.

APÉNDICE I

Cuadro 2. Unidades formadoras de colonias UFC ($\text{ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$) utilizadas con cada ingrediente activo evaluado.

Ingrediente activo	UFC ($\text{ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$) Ensayo 2
Boscalid	$4,74\cdot 10^{13}$
Cyprodinil + Fludioxonil	$2,94\cdot 10^{11}$
Extracto de cítrico	$5,12\cdot 10^{10}$
Fenhexamida	$2,94\cdot 10^{11}$
Iprodione	$2,94\cdot 10^{11}$
Kresoxim methyl	$5,12\cdot 10^{10}$
Pyrimethanil	$2,94\cdot 10^{11}$
Tebuconazole	$8,00\cdot 10^6$

Cuadro 3. Ecuaciones, coeficientes de determinación (R^2), concentraciones efectivas medias (EC_{50}) y valor “p” correspondientes a las regresiones entre el logaritmo de las concentraciones y los porcentajes de inhibición del crecimiento de *Serratia plymuthica* frente a cada fungicida estudiado en concentraciones de 0 a $5.000\ \mu\text{g i.a}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Fungicidas	Ecuación	R^2	EC_{50}	<i>P value</i>
Boscalid	$y=3,1374x-6,9075$	0,49	$1,38\cdot 10^{18}$	0
Extracto de cítrico	$y=9,7761x-23,351$	0,63	$3,18\cdot 10^7$	0,001
Fenhexamida	$y=15,906x-26,003$	0,43	$6,00\cdot 10^4$	0,002
Iprodione	$y=0$	-	-	0
Kresoxim methyl	$y=-3,4188x+20,917$	0,21	$3,11\cdot 10^{-9}$	0,041
Mezcla C+F	$y=-4,9891x+17,061$	0,64	$2,50\cdot 10^{-7}$	0
Pyrimethanil	$y=-7,8617x+34,272$	0,17	$9,99\cdot 10^{-3}$	0,073
Tebuconazole	$y=4,8002x-11,672$	0,43	$7,04\cdot 10^{12}$	0,002

APÉNDICE II

Cuadro 4. Concentraciones y dosis de productos comerciales recomendados para el control de *Botrytis cinerea*.

Producto Comercial	Ingrediente activo	Grupo químico	Concentración de producto	Concentración Recomendada	Concentración de i.a. recomendada
BC 1000 [®] líquido	Extracto de cítrico	Ácidos carboxílicos, polifenoles y bioflavonoides	500 g·L ⁻¹	180 mL·hL ⁻¹	1,8 µL·mL ⁻¹
Cantus [®]	Boscalid	Piridin carboxamida	500 g·kg ⁻¹	1,2 kg ha ⁻¹	400 µg·mL ⁻¹
Horizon 25 WP	Tebuconazole	Triazoles	250 g·kg ⁻¹	125 g·hL ⁻¹	312,5 µg·mL ⁻¹
Krexim 50 SC	Kresoxim Methyl	Oximinoacetato	500 g·L ⁻¹	13 mL·hL ⁻¹	0,13 µL·mL ⁻¹
Rovral 4 Flo	Iprodione	Dicarboximida	480 g·L ⁻¹	125 mL·hL ⁻¹	600 µL·mL ⁻¹
Scala [®] 400 SC	Pyrimethanil	Anilinopirimidina	408 g·L ⁻¹	140 mL·hL ⁻¹	571,2 µL·mL ⁻¹
Switch [®] 62,5 WG	Ciprodinil + Fludioxonil (C+F)	Anilinopirimidina y Fenilpirrol	350 g·kg ⁻¹ 250 g·kg ⁻¹	80 g·hL ⁻¹	300 µg·mL ⁻¹ 200 µg·mL ⁻¹
Teldor 50 WP	Fenhexamida	Hidroxianilida	500 g·kg ⁻¹	70 g·hL ⁻¹	350 µg·mL ⁻¹

Fuente: Elaboración propia.

Nota: Para la conversión se utilizaron 1500 L · ha⁻¹ con el ingrediente activo Boscalid.

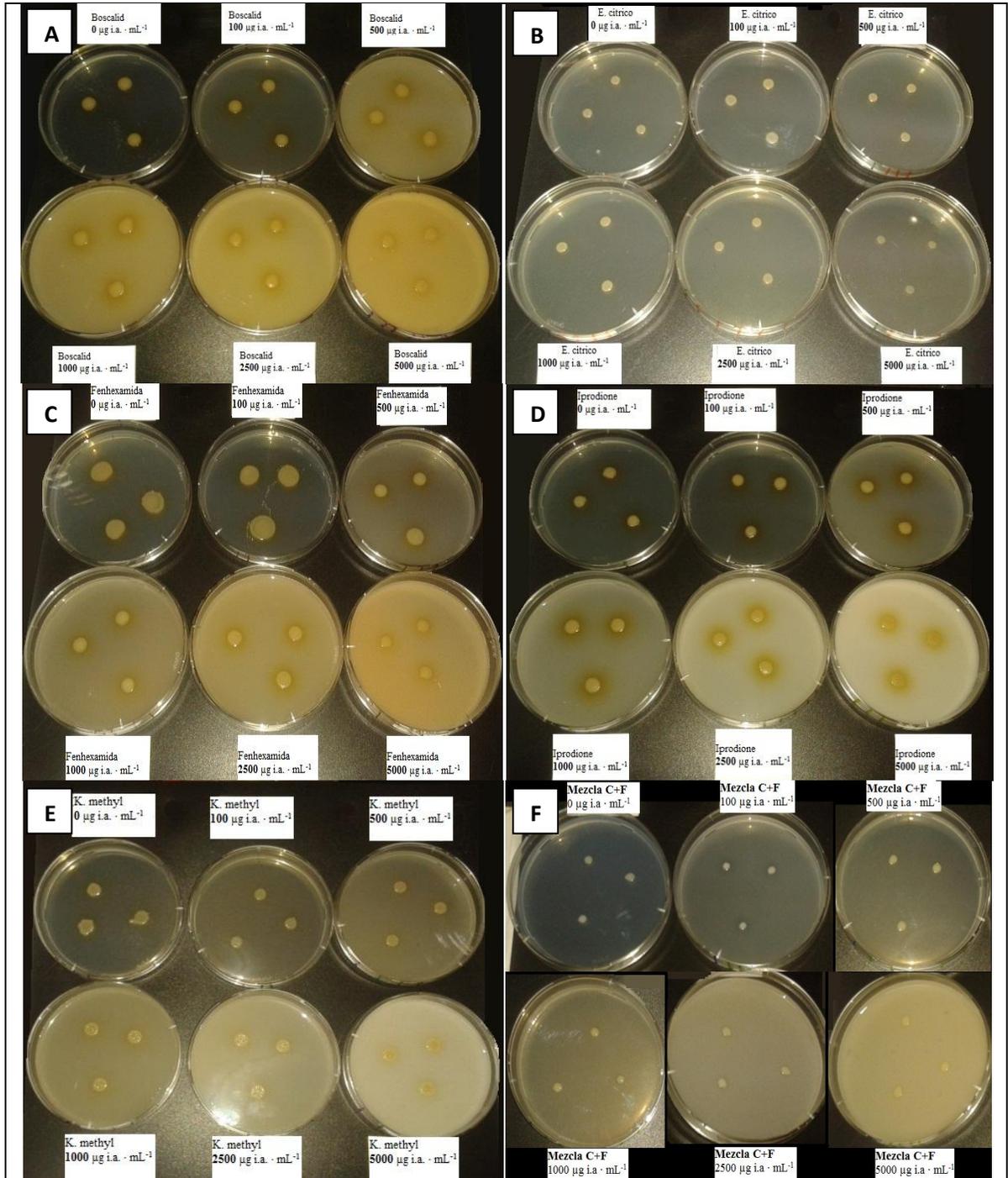
APÉNDICE III

Cuadro 5. Grupos químicos, modos, mecanismos y sitios de acción afectados por los fungicidas evaluados en este ensayo.

Producto Comercial	Ingrediente activo	Grupo químico	Modo de acción	Mecanismo de acción	Sitio de acción
BC 1000® líquido	Extracto de cítrico	Ácidos carboxílicos, polifenoles y bioflavonoides	Transporte de membrana, etc.	Múltiple	Múltiple
Cantus®	Boscalid	Piridin carboxamida	Respiración	Complejo II Succinato deshidrogenasa	Indefinido
Horizon 25 WP	Tebuconazole	Triazoles	Biosíntesis de esterol en membranas	C14-demetilasa	<i>erg11/cyp51</i>
Krexim 50 SC	Kresoxim Methyl	Oximinoacetato	Respiración	Complejo III Citocromo bc1	<i>cyt b</i>
Rovral 4 Flo	Iprodione	Dicarboximida	Señales de transducción	MAP/Histidina quinasa. Transducción osmótica	<i>os-2, HOG1</i>
Scala® 400 SC	Pyrimethanil	Anilino pirimidina	Síntesis de aminoácidos y proteínas	Síntesis de metionina	<i>cgs</i> (propuesto)
Switch® 62,5 WG (C+F)	Ciprodinil	Anilino pirimidina	Síntesis de aminoácidos y proteínas	Síntesis de metionina	<i>cgs</i> (propuesto)
	+	Fludioxonil	Fenilpirrol	Señales de transducción	MAP/Histidina quinasa. Transducción osmótica
Teldor 50 WP	Fenhexamida	Hidroxianilida	Biosíntesis de esterol en membranas	3 -ketoreductasa C4- demetilasa	<i>erg27</i>

Fuente: FRAC Code List[®] 2012.

APÉNDICE IV



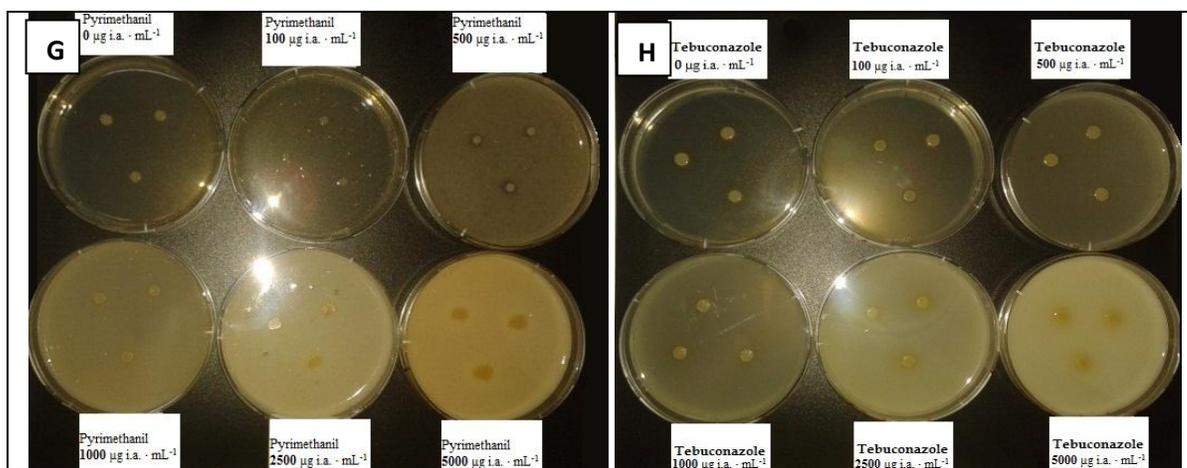


Figura 4. Ensayos de inhibición en concentraciones de 0 a 5000 $\mu\text{g i.a.} \cdot \text{mL}^{-1}$ con los ingredientes activos: A) Boscalid, B) Extracto de cítrico, C) Fenhexamida, D) Iprodione, E) Kresoxim methyl, F) Mezcla C+F, G) Pyrimethanil, H) Tebuconazole.