

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

SENSIBILIDAD *in vitro* E *in vivo* DE CEPAS DE *Botrytis cinerea* Y *Penicillium expansum* AISLADAS DE MANZANAS EN POSCOSECHA A: TIABENDAZOL, FLUDIOXONIL Y PRODUCTOS QUÍMICOS DE ORIGEN NATURAL.

JAVIERA PAZ BARCOS MUÑOZ

Santiago, Chile

2011

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

SENSIBILIDAD *in vitro* E *in vivo* DE CEPAS DE *Botrytis cinerea* Y *Penicillium expansum* AISLADAS DE MANZANAS EN POSCOSECHA A: TIABENDAZOL, FLUDIOXONIL Y PRODUCTOS QUÍMICOS DE ORIGEN NATURAL.

***In vitro* AND *in vivo* SENSITIVITY OF *Botrytis cinerea* AND *Penicillium expansum* STRAINS ISOLATED FROM APPLES IN POSTHARVEST TO: THIABENDAZOLE, FLUDIOXONIL AND NATURAL CHEMICAL PRODUCTS.**

JAVIERA PAZ BARCOS MUÑOZ

Santiago, Chile

2011

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

SENSIBILIDAD *in vitro* E *in vivo* DE CEPAS DE *Botrytis cinerea* Y *Penicillium expansum* AISLADAS DE MANZANAS EN POSCOSECHA A: TIABENDAZOL, FLUDIOXONIL Y PRODUCTOS QUÍMICOS DE ORIGEN NATURAL.

Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniera Agrónoma

JAVIERA PAZ BARCOS MUÑOZ

PROFESORES GUÍA	Calificaciones
Jaime R. Montealegre A. Ingeniero Agrónomo.	6,8
José Luis Henríquez S. Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Ph.D.	5,8
PROFESORES EVALUADORES	
Marcela Esterio G. Ingeniero Agrónomo, M.Sc.	6,5
Rodrigo Callejas R. Ingeniero Agrónomo, Dr. Sc. Agr.	6,4
COLABORADOR	
Rodrigo Herrera C. Ingeniero Agrónomo.	

Santiago, Chile

2011

A mi mamá y a mi hijo Camilo, sin ellos nada sería posible.

AGRADECIMIENTOS

A mi profesor guía el Sr. Jaime Montealegre quien me ayudo mucho durante todo este eterno proceso, enseñándome, dándome su apoyo, corrigiendo mi trabajo y siempre recibíendome de manera atenta y amable en sus tiempos disponibles.

Al profesor José Luis Henríquez por su constante manera de enseñarme, en todos los momentos de correcciones y conversaciones siempre tuvo como misión el formarme académicamente.

A la profesora Marcela Esterio por su siempre buena voluntad en todas las solicitudes de corrección de mi memoria, por su tiempo y por su excelente manera de formarme como profesional.

A todos quienes ayudaron a que esto fuera posible. A mi mamá por su inagotable paciencia y ayuda, a mis hermanos por sus palabras de apoyo y ánimo en especial a la fran, la lore y la pauli, a mi papá, a la solita por creer tanto en mi y ayudarme demasiado con mis millones de ensayos, al luisito por siempre tirarme para arriba en los momentos más pesimistas, a Gabriel, a Maureen, a González, a la pancha, el rodri y a todos quienes me dijeron que siguiera siendo constante y que no me rindiera.

Agradezco particularmente a Felipe y a mi hijo Camilo por estar siempre conmigo y por su amor incondicional, sobre todo en los momentos más difíciles de este proceso. ¡Los amo mucho!

En especial agradezco a la Sra. Ángela. ¡Que sería de mis ensayos y mi memoria sin los juguitos de papa, las papas y matraces que me convidaba para no perder el ensayo del día!, sin lugar a dudas fue mi fan número uno del departamento para que me titulara...Sra Ángela ¡mil gracias por su buena voluntad y su cariño!

A todos quienes confiaron en mí y que deben estar felices de que esto se termine...Para todos ¡gracias totales!

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
Lugar de estudio.....	7
Metodología.....	7
Origen de la cepas.....	7
Patogenicidad de las cepas fungosas recuperadas.....	8
Sensibilidad <i>in vitro</i> para micelio.....	9
Sensibilidad <i>in vitro</i> para conidias.....	10
Inhibición de las pudriciones (ensayo <i>in vivo</i>).....	11
RESULTADOS.....	13
Patogenicidad de las cepas fungosas recuperadas	13
Sensibilidad <i>in vitro</i> para micelio y conidias.....	13
Inhibición de las pudriciones (ensayo <i>in vivo</i>).....	17
DISCUSIÓN.....	20
Patogenicidad de las cepas	20
Sensibilidad <i>in vitro</i> para micelio y conidias.....	20
Inhibición de las pudriciones (ensayo <i>in vivo</i>).....	22
CONCLUSIONES.....	24
BIBLIOGRAFÍA.....	25
APÉNDICES.....	30

RESUMEN

Uno de los factores que tiene mayor incidencia en la condición de la fruta son las enfermedades de poscosecha, conocidas comúnmente como “pudriciones”. Para el caso de manzanas las más frecuentes son las causadas por *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. Las aplicaciones de fungicidas sintéticos en poscosecha son una de las estrategias más utilizadas para su control; sin embargo, su uso continuado y prolongado ha generado una disminución de su efecto protector. Tiabendazol ha sido utilizado de manera prolongada como fungicida en el control de dichas enfermedades, pero su uso ha sido limitado por el desarrollo de cepas fitopatógenas resistentes. En el año 2004 fludioxonil fue registrado en Estados Unidos de Norte América para tratamientos de poscosecha en manzanas, siendo altamente efectivo en el control de los patógenos que causan dichas pudriciones incluyendo cepas resistentes a tiabendazol. También se han propuesto otras alternativas de control, como por ejemplo los compuestos antifúngicos naturales. El objetivo del presente estudio fue evaluar la sensibilidad de cepas de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* aisladas de manzanas, a los fungicidas tiabendazol (Tecto® 500 SC), fludioxonil (Scholar® 50 WP) y productos de origen natural (BC-1000®, Lonlife plus® SC y Biorend® SC). Se determinó *in vitro* la concentración media efectiva (EC₅₀) y concentración mínima inhibitoria (CMI) la para micelio y conidias a cada fungicida, posteriormente se evaluaron las dosis comerciales de cada producto en condiciones *in vivo*. Un 10% y un 48% de las cepas de *Botrytis cinerea* y de *Penicillium expansum* respectivamente, resultaron ser resistentes a tiabendazol. Fludioxonil fue efectivo en la inhibición de ambos patógenos con valores de EC₅₀ promedio para conidias de 0,02 µg·mL⁻¹ para *Botrytis cinerea* y de 0,29 µg·mL⁻¹ para *Penicillium expansum*. Los productos de origen natural presentaron resultados intermedios inhibiendo algunas de las cepas evaluadas, excepto la formulación de BC-1000® utilizada, que no inhibió a ninguno de los dos patógenos. En los ensayos *in vivo*, el mayor efecto se obtuvo con fludioxonil, y tiabendazol resultó efectivo solo contra las cepas sensibles de ambos patógenos. Las dosis comerciales de los productos naturales utilizados ejercieron un control relativo de ambos patógenos, salvo BC-1000® que no logró efecto de control alguno sobre ambos patógenos.

Palabras claves

Pudriciones de poscosecha, resistencia a fungicidas, pudrición gris, moho azul.

ABSTRACT

One of the factors that most affect the condition of the fruit are postharvest diseases, commonly known as "fruit rots". The most common in apples are caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*. The application of synthetic fungicides in postharvest is one of the strategies used for their control; however, continued use of agrochemicals has led to a decrease in their protective effect. Thiabendazole as a fungicide has been used for a long time in the control of these diseases, but its use has been limited by the development of resistant phytopathogenic strains. In 2004 Fludioxonil was registered in United States of America for use in apples in postharvest treatments being highly effective in controlling these pathogens including resistant strains to thiabendazole. Natural antifungal compounds have also been proposed for postharvest fruit rot control. The aim of this study was to evaluate to sensitivity of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* strains isolated from apples, the fungicides thiabendazole (Tecto ® 500 SC), fludioxonil (Scholar ® 50 WP) and natural products (BC-1000 ®, Lonlife Plus® SC and Biorend® SC). EC₅₀ and MIC were *in vitro* calculated for inhibition of mycelium growth and conidial germination for each fungicide, while the commercial dose of each product was *in vivo* evaluated. 10% and 48% of strains of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* respectively, were resistant to thiabendazole. Fludioxonil was effective in both pathogens with EC₅₀ values of 0.02 average conidia µg·mL⁻¹ to *Botrytis cinerea* and 0.29 µg·mL⁻¹ for *Penicillium expansum*. The natural products showed intermediate results inhibiting some of the strains, except for the formulation of BC-1000 ® used, that did not inhibit any of the two pathogens. Fludioxonil was the most effective active ingredient reducing *in vivo* both decays, although thiabendazole was only effective against susceptible strains of both pathogens. The commercial doses of natural products used exerted a relative control of both pathogens, except BC-1000® formulation which could not achieve any control over both pathogens.

Key words

Postharvest decay, fungicide resistance, gray mold, blue mold.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas la industria frutícola chilena ha experimentado un gran desarrollo que ha llevado al país a posicionarse como un importante proveedor de frutas frescas a nivel mundial y actualmente como el principal productor de frutas de especies de hoja caduca del Hemisferio Sur (FIA, 2003), existiendo más de 35 mil hectáreas cultivadas de manzanos (ODEPA, 2009). Sin embargo, para mantener este nivel es de primordial importancia que la fruta, que pasa un período prolongado de almacenamiento y transporte hasta los puertos de destino, se conserve en óptimas condiciones el mayor tiempo posible (Zoffoli *et al.*, 2005).

En el caso de manzanas de exportación, según Pinilla *et al.* (2005), uno de los factores que mayor incide en la condición de éstas son las enfermedades de poscosecha, conocidas comúnmente como “pudriciones”. Sus síntomas generalmente sólo son visibles después que los frutos han sido sometidos a algunos meses de almacenaje refrigerado en Chile y, durante el transporte a los diferentes mercados de destino. Según estos autores, estas enfermedades causan pérdidas directas por el desecho de la fruta que no tiene valor comercial e indirectas por la necesidad de adoptar nuevas medidas de control, además de los costos de reembalaje de los frutos. Las pudriciones más comunes que afectan a las manzanas en Chile son causadas por diversos hongos, destacando entre éstos la “pudrición gris” causada por *Botrytis cinerea* Pers. y el “moho azul” causado por *Penicillium expansum* Link. (Pinilla *et al.*, 2005).

Las infecciones causadas por *Botrytis cinerea* son las más frecuentes y ciertamente este patógeno es interesante debido a su especial característica de vivir de manera patógena y saprófita siendo devastador en muchos cultivos (Rosslénbroich y Stuebler, 2000). *B. cinerea* es muy abundante y está ampliamente distribuido a nivel mundial, provocando distintos síntomas como tizones de inflorescencias, en el extremo del pedúnculo del fruto o bien en cualquier herida, hendidura o incisión de los tejidos de los órganos almacenados. Bajo condiciones de alta humedad, produce un micelio visible de color gris sobre los tejidos afectados. Las lesiones presentan un área bien definida, pardusca o acuosa, y el patógeno penetra profundamente y avanza con gran rapidez en los tejidos del órgano (Agrios, 1996).

Por otra parte, *Penicillium expansum* es un hongo muy común y es responsable de la enfermedad más frecuente en manzanas en almacenaje (Rosenberger *et al.*, 1991); los hongos pertenecientes al género *Penicillium* producen pudriciones en frutos almacenados, las que a menudo son las más destructivas de todas las enfermedades de poscosecha, siendo muy frecuentes en todo tipo de cítricos y pomáceas, entre otras especies (Agrios, 1996).

Este patógeno penetra en los tejidos de su hospedante principalmente a través de heridas (Agrios, 1996; Rosenberger *et al.*, 1991), y también puede propagarse desde frutos infectados a frutos sanos por simple contacto entre éstos. Las pudriciones por *Penicillium* al principio tienen el aspecto de manchas acuosas de consistencia blanda, ligeramente decoloradas y de tamaño variable, las cuales pueden producirse en cualquier parte del fruto. Posteriormente, un moho blanco comienza a crecer sobre la superficie de la cáscara del fruto, produciendo esporas. El área esporulante tiene un color azul, verde azulado o verde olivo y a menudo se encuentra rodeada por una banda estrecha o amplia de micelio blanco, delante del cual hay una banda de tejido acuoso (Agrios, 1996). El autor señala que aunque la mayoría de estos hongos se manifiestan en almacenamiento y en el mercado, la manipulación correcta de la fruta y una adecuada cosecha, evitando daños mecánicos, son fundamentales para evitar este grave problema.

Antes de decidir cualquier método de control de un patógeno, la identificación de éste es de máxima relevancia. Las condiciones climáticas, la nutrición de la planta, las prácticas culturales y los tratamientos con fungicidas son las principales causas que afectan el grado de desarrollo de las enfermedades en poscosecha de frutas. El control químico es una práctica fundamental para prevenir las pudriciones fungosas de poscosecha en frutas (Auger, 1988). Este autor señala que los tratamientos después de la cosecha con agroquímicos pueden favorecer la sanidad del cultivo, o bien proteger, erradicar o tener una acción terapéutica de control de las pudriciones.

Los tratamientos de poscosecha mediante el uso de fungicidas sintéticos son una de las estrategias más utilizada para controlar pudriciones en manzanas (Eckert y Ogawa, 1988; Errampalli, 2004). Entre los fungicidas más utilizados para el control de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* están los fungicidas del grupo de los benzimidazoles que han sido utilizados comercialmente para el control de enfermedades de plantas desde fines de los años 60. Estos fungicidas representaron un cambio en el uso de productos químicos, con propiedades únicas que incluyen actividad sistémica y curativa, permitiendo extender los intervalos de las aspersiones. Mundialmente, los benzimidazoles se encuentran registrados en muchos países y en más de 70 cultivos incluyendo cereales, uvas, frutas y hortalizas. (FRAC, 2009). Dentro de este grupo se encuentra el ingrediente activo tiabendazol (registrado en manzanas), el cual posee un efecto protector y erradicante que actúa bloqueando la mitosis celular, mostrando una única afinidad por la tubulina de organismos fungosos (acción unisitio o sitio-específica) (Besoain, 1989; FRAC 2009).

El tiabendazol se utiliza en plantas embaladoras de pomáceas con el fin de evitar pudriciones durante el almacenamiento refrigerado. Los fungicidas generalmente son aplicados en duchas o por inmersión (Morales 1989, Errampalli, 2004, Koffmann y Penrose, 1987), permitiendo un buen grado de protección por varios meses de la fruta refrigerada (Morales, 1989), sin embargo, el uso continuado y prolongado de ésta molécula ha generado una disminución de su efecto protector debido a la alta presión de selección de

razas resistentes, limitando su uso (Prusky *et al.*, 1985, Sholberg *et al.*, 2005a) tanto en *Botrytis cinerea* (Smith, 1988) como en *Penicillium expansum* (Eckert y Ogawa, 1988), lo que constituye un serio riesgo para el control de enfermedades (Chand-Goyal y Spotts, 1997). Para tratar de establecer la existencia de resistencia a benzimidazoles Spotts y Cervantes (1986), señalan como concentración discriminatoria $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que por el contrario Sholberg *et al.* (2005) señalan que cepas fungosas que se desarrollan en cultivos enmendados con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pueden considerarse como resistentes al fungicida.

El desarrollo de razas resistentes ofrece grandes desventajas al uso de estos fungicidas en poscosecha y a pesar de ser agroquímicos bastante eficientes, es necesario emplearlos en combinación con productos de diferentes mecanismos de acción o en casos extremos, discontinuar su uso buscando otras alternativas (Errampalli, 2004). Morales (1989), señala que esta situación puede tener especial importancia en Chile, ya que existen pocos productos de acción sistémica y sólo algunos poseen registros en los mercados de destino de la fruta. Según González (1988), citado por Morales (1989), existen limitaciones para el uso de benzimidazoles como son los bajos niveles de tolerancia en algunos países de la comunidad europea, situación que contrasta con los niveles exigidos en EE.UU. Por esto es necesario recurrir a alternativas que permitan frenar la aparición de razas resistentes y poder ingresar a mercados con niveles bajos de tolerancia. Desde el descubrimiento de cepas resistentes de *Penicillium expansum* a tiabendazol en paking de manzanas, se ha incrementado la búsqueda de estrategias alternativas de control (Errampilli, 2003). Lo mismo ha ocurrido en el caso de *Botrytis cinerea*. Corbaz y Schwarz (1995) realizando una prospección en Suiza evaluaron el grado de resistencia de este patógeno detectando que un 74% de las cepas analizadas se comportaron como resistentes a este grupo de agroquímicos.

Por otro lado, es importante señalar que el uso de fungicidas sintéticos ha sido la principal herramienta utilizada para el manejo de las enfermedades de poscosecha (Hernández *et al.*, 2008). Sin embargo, los residuos en los alimentos han generado preocupación en los consumidores, lo que sumado a la resistencia de patógenos a muchos agroquímicos actualmente en uso, ha aumentado la necesidad de buscar métodos alternativos para el control de las pudriciones de poscosecha (Tripathi y Dubey, 2004). En el año 2004 un nuevo fungicida, fludioxonil, fue registrado en Estados Unidos para el uso en poscosecha de manzanas el cual es efectivo en el control del moho azul incluyendo cepas resistentes a tiabendazol (Errampalli y Crnko, 2004; Sholberg *et al.*, 2005a). Este nuevo ingrediente activo pertenece a la clase química de los Phenylpyrroles y se clasifica como un agroquímico toxicológicamente de "riesgo reducido", por The United States Environmental Protection Agency (EPA, 1998; Olaya *et al.*, 2005). Los Phenylpyrroles derivan del antibiótico pyrrolnitrin que es producido por especies de *Pseudomonas* sp y este grupo de fungicidas constituyeron una nueva clase de fungicidas no sistémicos (Rosslenbroich y Stuebler, 2000, Errampalli y Crnko, 2004). Se ha demostrado que presentan actividad de amplio espectro contra hongos fitopatógenos actuando sobre la señal de transducción de estos (FRAC, 2009). Este ingrediente activo inhibe la germinación de esporas, inhibe la elongación del tubo germinativo y el crecimiento micelial y reduce las pudriciones

causadas por diferentes agentes patógenos en manzanas (Errampalli y Crnko, 2004), pudiendo ser utilizado en pomáceas para el control de enfermedades causadas por *Penicillium*, *Botrytis*, *Rhizopus*, entre otros (Olaya *et al.*, 2005).

Recientemente, debido a las actuales exigencias comerciales de los mercados, los compuestos antifúngicos naturales biológicamente activos han comenzado a convertirse en una alternativa eficaz a los productos sistémicos, especialmente en frutas de consumo en fresco (Bensch y Guerrero, 2000). Varios de estos compuestos son de origen vegetal y animal y reducen la incidencia de enfermedades en una variedad de productos cosechados, logrando reducir pudriciones de poscosecha en manzanas, peras, duraznos y frutillas mediante el uso de extractos de plantas, variedades de aceites esenciales y subproductos animales (El Ghaouth, 1997). Un ejemplo de ellos es el quitosano; polímero producido industrialmente por desacetilación química de la quitina que se encuentra en el exoesqueleto de artrópodos y también puede ser obtenido directamente desde la pared celular de algunos hongos fitopatógenos. El quitosano y sus derivados han demostrado inhibir el crecimiento de una amplia gama de patógenos activando mecanismos de defensa en las plantas contra las infecciones causadas por patógenos (Hernández *et al.*, 2008).

Otra herramienta de control es el ingrediente activo citrex, el cual es una mezcla de ácido ascórbico, ácido cítrico, tocoferoles, ácido palmítico, ácido esteárico, glucosa, manosa, péptidos y glicerol, los cuales son extraídos de la pulpa y semillas de cítricos y cuyo modo de acción es la alteración de la permeabilidad de las membranas, afectando también los procesos respiratorios (Mendoza, 2005). Existen otras alternativas como por ejemplo los extractos de semillas y pulpa de toronja, principalmente ácidos orgánicos más bioflavonoides cuyo modo de acción es por contacto provocando alteración de la membrana celular e inhibición de la respiración celular del patógeno, compuestos que tienen efecto “elicitador”, inductor de fitoalexinas en los tejidos de las plantas (compuestos altamente tóxicos para muchos patógenos) por (Aguirre y Pinilla, 2005).

Finalmente, es importante señalar que para planificar de una forma global la lucha contra enfermedades producidas por hongos fitopatógenos en poscosecha, los tratamientos con productos fungicidas son sólo una de las posibles alternativas a tomar en cuenta. Otras la constituyen diversas sustancias químicas que presentan una muy baja toxicidad como son los extractos de plantas, los aceites esenciales, el ácido acético, el peróxido de hidrógeno, las sales de carbonato y bicarbonato, los sorbatos, los propionatos, el cloro, etc. (Viñas *et al.*, s.a.).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la sensibilidad *in vitro* e *in vivo* de cepas de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* aisladas de manzanas, a los ingredientes activos tiabendazol (Tecto® 500 SC), fludioxonil (Scholar® 50 WP) y productos de origen natural (BC-1000®, Lonlife plus® SC y Biorend®).

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

Los ensayos *in vitro* fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, y los ensayos *in vivo* se efectuaron en la planta embaladora de frutas de Comercial Greenvic S.A. ubicada en el sector de Placilla, San Fernando, Región del Libertador General Bernardo O'Higgins.

Metodología

Origen de las cepas

Tanto las cepas de *Botrytis cinerea* como las de *Penicillium expansum* fueron recuperadas desde manzanas infectadas (Figura 1) provenientes de diferentes plantas embaladoras de la zona central de Chile, recolectándose un total de 13 cepas de *Botrytis cinerea* y 60 cepas de *Penicillium expansum* de un total de 108 frutos enfermos (Cuadro 1). Para la obtención de cada una de las cepas se extrajo tejido desde la zona de avance del síntoma de frutos desinfectados mediante flameado con alcohol al 96% y se cultivó en placas de Petri en medio de cultivo agar-papa-dextrosa (APD).



Figura 1. Frutos con síntomas de pudriciones causadas por *Penicillium expansum* (A) y *Botrytis cinerea* (B).

Cuadro 1. Origen de las muestras de frutos desde donde se obtuvieron las cepas evaluadas.

Origen	Muestras recibidas	Patógeno aislado	
		<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Penicillium expansum</i>
Del Monte Fresh Produce Chile S.A.	29	9	11
COPEFRUT Agrícola El Foso	19	1	13
COPEFRUT Agrícola El Sauce	20	1	18
COPEFRUT varios productores	40	2	18
Total	108	13	60

Las cepas se recuperaron *in vitro* en medio APD a $22 \pm 1^\circ \text{C}$ y fueron mantenidas a $5 \pm 1^\circ \text{C}$ en tubos de ensayo con APD. Posteriormente, todas las cepas recuperadas de *Penicillium* se identificaron molecularmente mediante PCR en la Facultad de Química de la Universidad de la República del Uruguay, correspondiendo la totalidad a *Penicillium expansum*.

Patogenicidad de las cepas fungosas recuperadas

Para determinar la patogenicidad cada cepa fue inoculada en manzanas del cv. Fuji (Figura 2), previamente lavadas y desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% durante tres minutos, enjuagadas en agua destilada estéril y luego secadas en papel absorbente. Se les realizaron 2 heridas de 3 mm de profundidad y 1-2 mm de diámetro mediante un clavo, en ellas se depositaron $10 \mu\text{L}$ de una suspensión de 10^5 conidias por mL de las diferentes cepas de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* determinadas mediante hemacitómetro y finalmente se observó si hubo o no desarrollo de pudrición. Se inocularon 3 frutos con 2 heridas cada uno, teniendo un total de 6 repeticiones por cepa.



Figura 2. Inoculación de manzanas sanas.

Sensibilidad *in vitro* para micelio

Los ensayos consistieron en determinar la sensibilidad de todas las cepas patogénicas de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* a los siguientes productos: tiabendazol (Tecto® 500 SC), fludioxonil (Scholar® 50 WP), extractos de semillas de cítricos (BC-1000®), citrex (Lonlife plus® SC) y poly-D-Glucosamina (Biorend® SC) a las concentraciones señaladas en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Nombre comercial, ingrediente activo y concentraciones utilizadas de los agroquímicos evaluados.

Nombre comercial	Ingrediente activo (i.a.)	Concentraciones utilizadas ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
BC-1000®	Extracto de semillas de toronja y Bioflavonoides	0, 100; 200; 400; 800; 1000; 1500
Biorend® SC	Poly-D-Glucosamina	0; 100; 200; 400; 800; 1500; 2000
Lonlife plus® SC	Citrex + Saponina	0, 100; 200; 400; 800; 1000; 1500
Scholar® 50 WP	Fludioxonil	0; 0,02; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,75; 1; 10
Tecto® 500 SC	Tiabendazol	0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 4; 8; 10; 100

Fuente: AFIPA, 2006-2007; SAG 2010.

Durante los ensayos, los cultivos puros de cada una de las cepas fúngicas se mantuvieron en APD para *Botrytis cinerea* y en agar-glucosa para *Penicillium expansum*. La sensibilidad *in vitro* para micelio se realizó utilizando el método descrito por Sakamoto (1986), empleándose discos de micelio de 5 mm de diámetro obtenidos de cultivos puros de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* de 5 y 12 días de edad, respectivamente. Estos discos fueron depositados de forma invertida en placas de Petri con APD, salvo en el caso de fludioxonil que se utilizó un medio sólido que contiene: 10 g de glucosa, 1,5 g K_2HPO_4 , 2 g KH_2PO_4 , 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g $\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 2 g de extracto de levadura y 12,5 g de agar en 1 L de agua destilada; medio específico para este ingrediente activo según el método descrito por Leroux *et al.* (1999). El medio fue enmendado con diferentes concentraciones de i.a. donde cada concentración fue repetida en cuatro oportunidades (Cuadro 2), posteriormente fueron incubadas a 22 ± 1 °C por 4 a 5 días en el caso de *Botrytis cinerea* y de 10 a 14 días para *Penicillium expansum* (Errampalli, 2004), con el fin de medir el crecimiento radial del micelio. Las mediciones se realizaron una vez que el crecimiento del micelio del testigo sin agroquímico se encontraba a no más de 1 cm del borde de la placa. Para el cálculo de la EC_{50} y la CMI se utilizó el análisis PROBIT con el programa estadístico MINITAB®. Se consideró cepa sensible a tiabendazol a aquellas cepas donde su EC_{50} fue inferior a $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y resistente a este ingrediente activo a aquellas que presentaron valores de EC_{50} superiores a dicho valor (Sholberg *et al.*, 2005).

También se evaluó al azar la sensibilidad de una muestra aleatoria de tres cepas no patogénicas de ambos patógenos con el fin de determinar la sensibilidad miceliar *in vitro* de ellas a los ingredientes activos tiabendazol y fludioxonil. En estos ensayos no se calculó la concentración efectiva mediana (EC_{50}) ni la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Sensibilidad *in vitro* para conidias

Para estos ensayos se obtuvieron conidias de cultivos esporulados en APD de 4 a 5 días de edad para *Botrytis cinerea* y de 10 a 14 días de edad en el caso de *Penicillium expansum* (Errampalli, 2004).

Los agroquímicos y las concentraciones utilizadas fueron las mismas que para crecimiento miceliar (Cuadro 2). Para estos experimentos se utilizó el método descrito por Leroux y Gredt (1981) el cual consiste en depositar una suspensión de conidias en placas de Petri con agar-glucosa, salvo en el caso de fludioxonil que se utilizó un medio sólido que contiene: 10 g de glucosa, 1,5 g K_2HPO_4 , 2 g KH_2PO_4 , 1 g $(NH_4)_2 SO_4$, 0,5 g $MgSO_4 \cdot H_2O$, 2 g de extracto de levadura y 12,5 g de agar en 1 L de agua destilada; medio específico para este ingrediente activo según el método descrito por Leroux *et al.* (1999). El medio fue enmendado con cada uno de los fungicidas antes mencionados y la suspensión de conidias fue depositada mediante una micropipeta (0,1 mL de una suspensión de 10^5 conidias/mL, ajustadas con hemacitómero). Las placas de Petri se incubaron durante 24 horas a 22 ± 1 °C en cámaras de cultivo y posteriormente se contaron 100 conidias al azar con el fin de evaluar el porcentaje de germinación conidial. Se consideró una conidia germinada cuando la longitud del tubo germinativo fue igual o superior a 3 veces el diámetro de ésta.

En ambos ensayos se consideraron 4 repeticiones por cada concentración de i.a. El agroquímico fue incorporado al medio de cultivo después de su esterilización en autoclave (121 °C por 20 minutos a $1,2$ kg·cm⁻²) cuando la temperatura del medio fue alrededor de 45 °C. Para el cálculo de los valores EC_{50} y de la CMI se utilizó el análisis PROBIT con el programa estadístico MINITAB®. Se consideró cepa sensible a tiabendazol a aquellas cepas donde su EC_{50} fue inferior a 1 μ g·mL⁻¹ y resistente a dicho ingrediente activo a aquellas que presentaron valores de EC_{50} superiores a dicho valor (Sholberg *et al.*, 2005).

Los datos de sensibilidad obtenidos, tanto para micelio como para conidias, corresponden al promedio obtenido de todas las cepas evaluadas de ambos patógenos (Apéndices I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII y XVIII).

Inhibición de las pudriciones (ensayo *in vivo*)

Con este propósito se realizaron dos ensayos en los que se utilizó un total de 1.344 manzanas del cultivar Fuji, las cuales al momento del ensayo tenían en promedio 14° Brix y una firmeza de pulpa de alrededor de 17 Lb·pulg⁻².

Previo a las inoculaciones, los frutos se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% durante tres minutos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron a temperatura ambiente.

Los frutos fueron inoculados con 10 cepas de *Botrytis cinerea* y 46 cepas de *Penicillium expansum*, todas de patogenicidad comprobada y sometidos a las dosis comerciales de los agroquímicos Tecto® 500 SC, Scholar® 50 WP, BC-1000®, Biorend® SC y Lonlife plus® SC (Cuadro 3).

Ensayo 1: Herida del fruto, aplicación del agroquímico e inoculación del patógeno.

Consistió en la inoculación de los patógenos (*Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*) en frutos a los que previamente se les realizaron dos heridas mediante un punzón, luego se aplicaron los agroquímicos en las dosis comerciales, mediante inmersión de los frutos, y finalmente se aplicó la suspensión de conidias en cada herida.

Ensayo 2: Aplicación del agroquímico, herida del fruto e inoculación del patógeno.

Este ensayo consistió en sumergir la fruta en las respectivas soluciones de agroquímicos, a continuación se realizaron dos heridas en cada fruto mediante un punzón y luego se hizo la inoculación de los patógenos *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* depositando la suspensión de conidias en cada herida.

Cada herida fue inoculada con 10 µL de una suspensión de 10⁵ conidias/mL (ajustadas con hemacitómetro) de las cepas de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*. En ambos ensayos el diseño experimental fue completamente al azar realizándose seis tratamientos, y 4 repeticiones por cada uno de éstos (Cuadro 3). Las dosis utilizadas correspondieron a las comercialmente utilizadas con idéntico propósito.

Cuadro 3. Tratamientos y dosis comerciales de ambos ensayos *in vivo*.

Tratamiento	Dosis comercial
T0: Testigo	Agua
T1: BC-1000®	150 cc·hL ⁻¹
T2: Biorend® SC	300 cc·hL ⁻¹
T3: Lonlife plus ®	150 cc·hL ⁻¹
T4: Scholar® 50 WP	90 g·hL ⁻¹
T5: Tecto® 500 SC	135 cc·hL ⁻¹

Posteriormente los frutos fueron almacenados en 36 cajas de cartón de 18 kg, ordenando 12 frutos por caja según tratamiento y repetición, estas cajas fueron distribuidas al azar en cuatro bins y mantenidas 40 días a 0 ± 1 °C en cámaras de frío de la planta embaladora de frutas de Comercial Greenvic S.A.

La evaluación consistió en medir con un pie de metro el diámetro de la lesión causada por el patógeno (en cm), se calculó la media de todos los diámetros de pudrición de las inoculaciones con las diferentes cepas, según tratamiento efectuado, y se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con el programa estadístico MINITAB® con el fin de comparar la eficacia de los diferentes agroquímicos. En los casos donde existieron diferencias estadísticamente significativas se les sometió a la prueba de comparación múltiple de Tukey, con un nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS

Patogenicidad de las cepas fungosas recuperadas

En el Cuadro 4 se presentan los resultados de las pruebas de patogenicidad para las cepas de *Botrytis cinerea* (n=13) y de *Penicillium expansum* (n=60). Un 77% de las cepas de ambos patógenos se comportaron como patogénicas (10 y 46 respectivamente) y fueron éstas las que se utilizaron posteriormente en los ensayos de sensibilidad a los cinco agroquímicos estudiados.

Cuadro 4. Patogenicidad de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*.

	Total cepas	Patogénicas	No patogénicas	% cepas patogénicas	% cepas no patogénicas
<i>Botrytis cinerea</i>	13	10	3	77%	23%
<i>Penicillium expansum</i>	60	46	14	77%	23%

Sensibilidad *in vitro* para micelio y conidias

En los ensayos para el ingrediente activo extracto de semilla de cítrico (BC-1000®), tanto las cepas de *Botrytis cinerea* como de *Penicillium expansum* se desarrollaron a la concentración más alta utilizada (1500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), obteniendo valores de EC₅₀ miceliar y conidial sobre 3000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y las CMI miceliar y conidial sobre 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 5).

Cuadro 5. Promedio de las EC₅₀ y las CMI del extracto de cítrico para micelio y conidias de *Botrytis cinerea*¹ y *Penicillium expansum*².

Patógeno	EC ₅₀ miceliar ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CMI miceliar ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	EC ₅₀ conidial ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CMI conidial ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
<i>B. cinerea</i>	> 3.000	> 5.000	> 3.000	> 5.000
<i>P. expansum</i>	> 3.000	> 5.000	> 3.000	> 5.000

¹ Promedio de 10 cepas (Apéndice I).

² Promedio de 46 cepas (Apéndice II).

Para las cepas de *Botrytis cinerea* un 60% de ellas tuvo una EC_{50} para micelio al ingrediente activo poly-D-glucosamina (Biorend® SC) entre 320 y 380 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que el 40% restante sus EC_{50} variaron entre 240 y 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ promediando 312 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que el promedio de las CMI fue de 4.082 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 6).

Las EC_{50} de poly-D-glucosamina para la inhibición de la germinación conidial de *Botrytis cinerea* fluctuaron entre 150 y 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y unas CMI entre 450 y 550 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, con un valor EC_{50} promedio de 220 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y una CMI promedio de 507 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 6).

En el caso de *Penicillium expansum* todas las EC_{50} para micelio de poly-D-glucosamina estuvieron sobre 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y las CMI sobre 3000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ promediando 2.479 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 4.952 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente (Cuadro 6). La germinación conidial para *Penicillium expansum* presentó valores de EC_{50} variables, concentrándose principalmente entre 100 y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un valor promedio de 423 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. El valor promedio de las CMI fue de 1.602 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 6).

Cuadro 6. Promedio de las EC_{50} y las CMI de poly-D-glucosamina para micelio y conidias de *Botrytis cinerea*¹ y *Penicillium expansum*².

Patógeno	EC_{50} miceliar ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CMI miceliar ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	EC_{50} conidial ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CMI conidial ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
<i>B. cinerea</i>	312	4.082	220	507
<i>P. expansum</i>	2.479	4.952	423	1.602

¹ Promedio de 10 cepas (Apéndices III y IV).

² Promedio de 46 cepas (Apéndices V y VI)

El promedio de todas las EC_{50} para crecimiento miceliar de las cepas de *Botrytis cinerea* a cítrex (Lonlife plus ®) fue de 189 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y el promedio de las CMI igual a 3.539 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 7). La EC_{50} promedio para germinación conidial superó las 2.500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y las CMI promedio las 5.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 7).

Para la mayoría de las cepas de *Penicillium expansum* la EC_{50} para micelio de cítrex fluctuó entre 100 y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un valor promedio de 423 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 7), mientras que la CMI superó los 1.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 7). En el caso de la germinación conidial las EC_{50} estuvieron bajo las 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que las CMI fluctuaron entre 50 y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ teniendo un valor promedio de 229 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 7).

Cuadro 7. Promedio de las EC₅₀ y la CMI de cítrex para micelio y conidias de *Botrytis cinerea*¹ y *Penicillium expansum*².

Patógeno	EC ₅₀ miceliar ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CMI miceliar ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	EC ₅₀ conidial ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CMI conidial ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
<i>B. cinerea</i>	189	3.539	2.824	> 5.000
<i>P. expansum</i>	423	2.855	63	229

¹ Promedio de 10 cepas (Apéndices VII y VIII).

² Promedio de 46 cepas (Apéndices IX y X).

Todas las cepas de *Botrytis cinerea* presentaron valores de EC₅₀ para micelio de fludioxonil (Scholar® 50 WP) inferiores a $0,03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un promedio de $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 8). Para el 50% de las cepas de *Botrytis cinerea*, fludioxonil presentó una CMI para micelio entre $0,1$ y $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 8), el porcentaje restante tuvo concentraciones mínimas inhibitorias sobre $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con una valor promedio de todas las CMI de $0,67 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 8).

Al igual que para micelio la germinación conidial de *Botrytis cinerea* fue similar en todas las cepas. El promedio de las EC₅₀ fue de $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, el 60% de las cepas obtuvieron concentraciones efectivas medianas entre $0,01$ y $0,03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un promedio de todas las CMI de $0,49 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 8).

Las cepas de *Penicillium expansum* presentaron un promedio de las EC₅₀ para fludioxonil de $0,13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, fluctuando las EC₅₀ entre $0,1$ y $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 8). Las CMI fueron en su mayoría sobre $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, tendiendo un valor promedio de $2,43 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 8).

Para germinación conidial los valores de EC₅₀ de fludioxonil estuvieron en un 100% entre $0,25$ y $0,35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un promedio de $0,29 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 8). Las CMI para conidias se concentraron entre $0,5$ y $0,9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un promedio de $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 8).

Las cepas no patogénicas evaluadas con el fungicida fludioxonil inhibieron su crecimiento miceliar bajo $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por lo que se consideraron sensibles al fungicida.

Cuadro 8. Promedio de las EC₅₀ y CMI de fludioxonil para micelio y conidias de las cepas de *Botrytis cinerea*¹ y *Penicillium expansum*².

Patógeno	EC ₅₀ miceliar ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CMI miceliar ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	EC ₅₀ conidial ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CMI conidial ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
<i>B. cinerea</i>	0,02	0,67	0,02	0,49
<i>P. expansum</i>	0,13	2,43	0,29	0,70

¹ Promedio de 10 cepas (Apéndices XI y XII).

² Promedio de 46 cepas (Apéndices XIII y XIV).

En el 90% de las cepas de *Botrytis cinerea* las EC₅₀ de tiabendazol (Tecto® 500 SC) para micelio fluctuaron entre 0,08 y 0,9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estas cepas fueron clasificadas como sensibles con una EC₅₀ promedio de 0,34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 9) y una sola cepa presentó una EC₅₀ superior a 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ considerándose cepa resistente con un promedio de 127 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 9). Las CMI de tiabendazol se concentraron en su mayoría entre 0,1 y 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un promedio de 0,48 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sólo un 10% de ellas presentaron una CMI sobre 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un promedio de 170 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 9).

Al igual que para el crecimiento miceliar, sólo una de las cepas de *Botrytis cinerea* fue resistente a tiabendazol con valores de EC₅₀ y CMI para germinación conidial superiores a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. El 90% restante presentó valores de EC₅₀ entre 0,05 y 0,07 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un promedio de 0,06 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, y fueron clasificadas como sensibles (Cuadro 9).

Para el caso de *Penicillium expansum* se observó que las EC₅₀ de tiabendazol para micelio en un 52% de las cepas variaron entre 0,05 y 0,45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ siendo dichas cepas clasificadas como sensibles con un valor promedio de EC₅₀ de 0,11 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Un porcentaje considerable de las cepas (48%) tuvo EC₅₀ por sobre 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, considerándose como resistentes, con un valor promedio de 1.653 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 9). La mayoría de las cepas presentó una CMI entre 0,01 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un valor promedio de 0,43 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, el resto de las cepas clasificadas como resistentes presentó valores de CMI sobre 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un valor promedio de 4.148 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 9).

Las cepas sensibles de *Penicillium expansum* a tiabendazol presentaron un valor promedio de EC₅₀ para germinación conidial de 0,11 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y las CMI promedio de estas fueron de 157,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para las cepas denominadas resistentes las EC₅₀ para germinación conidial promediaron un valor de 696 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y las CMI un promedio de 2.713 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 9).

El crecimiento miceliar de las cepas no patogénicas evaluadas con el fungicida tiabendazol fue inhibido bajo 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por lo que se les consideró cepas sensibles al fungicida.

Cuadro 9. Promedio de las EC₅₀ y CMI de tiabendazol para micelio y conidias de las cepas de *Botrytis cinerea*¹ y *Penicillium expansum*².

Patógeno	Porcentaje de cepas	EC ₅₀ miceliar (µg·mL ⁻¹)	CMI miceliar (µg·mL ⁻¹)	EC ₅₀ conidial (µg·mL ⁻¹)	CMI conidial (µg·mL ⁻¹)
<i>B. cinerea</i>	10% R	127	170	121	163
<i>B. cinerea</i>	90% S	0,34	0,48	0,06	0,09
<i>P. expansum</i>	48% R	1.653	4.148	696	2.713
<i>P. expansum</i>	52% S	0,11	0,43	0,11	157,8

¹ Promedio de 10 cepas (Apéndices XV y XVI).

² Promedio de 46 cepas (Apéndices XVII y XVIII).

Inhibición de las pudriciones (ensayo *in vivo*)

Ensayo 1 para *Botrytis cinerea*: Herida del fruto, aplicación del agroquímico y posterior inoculación del patógeno.

La dosis comercial de Scholar® 50 WP inhibió el desarrollo de pudriciones de todas las cepas de *Botrytis cinerea*. Todos los tratamientos redujeron los diámetros de pudrición observados en el testigo del ensayo 1 (Cuadro 10), determinándose que los tratamientos más efectivos correspondieron a la dosis comercial de Scholar® 50 WP y Tecto® 500 SC, seguidos la dosis comercial de Lonlife plus® SC. Finalmente las dosis comerciales de Biorend® SC y BC-1000® presentaron un menor efecto sobre el control de la pudrición (Cuadro 10).

Ensayo 2 para *Botrytis cinerea*: Aplicación del agroquímico, herida del fruto e inoculación del patógeno.

En el ensayo 2, los tratamientos más efectivos correspondieron a las dosis comerciales de Scholar® 50 WP y Lonlife plus® SC, en segundo lugar al tratamiento de Biorend® SC, luego a Tecto® 500 SC y finalmente al tratamiento de BC-1000® (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto de los diferentes agroquímicos en el diámetro promedio de pudrición en manzanas Fuji inoculadas con *Botrytis cinerea*.

Tratamiento	Diámetro promedio de la pudrición (cm)	
	Ensayo 1 ^a	Ensayo 2 ^b
Testigo	6,16a	5,91a
BC-1000®	4,66 b	4,21 b
Biorend® SC	4,15 b	2,30 d
Lonlife plus® SC	0,57 c	0,00 e
Scholar® 50 WP	0,00 d	0,00 e
Tecto® 500 SC	0,31 cd	3,01 c

a: Herida del fruto-aplicación del agroquímico-inoculación del patógeno.

b: Aplicación del agroquímico-herida del fruto-inoculación del patógeno.

Ensayo 1 para *Penicillium expansum*: Herida del fruto, aplicación del agroquímico y posterior inoculación del patógeno.

En este ensayo todas las cepas de *Penicillium expansum* fueron controladas por la dosis comercial de Scholar 50 WP (ausencia de pudrición en los frutos). Los demás tratamientos fueron similares entre sí, presentándose algún grado de pudrición en los frutos inoculados. En este caso el tratamiento más efectivo fue Scholar® 50 WP, en segundo lugar las dosis comercial de Lonlife plus® SC y Tecto® 500 SC aunque este último sin diferencias significativas con Biorend® SC y la dosis comercial de BC-1000® presentó un comportamiento similar al testigo (Cuadro 11).

Ensayo 2 para *Penicillium expansum*: Aplicación del agroquímico, herida del fruto e inoculación del patógeno.

En el ensayo 2 para *Penicillium expansum* el tratamiento más efectivo fue Scholar® 50 WP, en segundo lugar el tratamiento con Lonlife plus® SC y posteriormente las dosis comerciales de Tecto 500 SC y Biorend® SC, aunque estas últimas sin diferencias significativas con BC-1000®. El tratamiento de BC-1000® nuevamente no se diferenció estadísticamente del testigo (Cuadro 11).

Cuadro 11. Efecto de los diferentes agroquímicos en el diámetro promedio de pudrición en manzanas Fuji inoculadas con *Penicillium expansum*.

Tratamiento	Diámetro promedio de la pudrición (cm)	
	Ensayo 1^a	Ensayo 2^b
Testigo	4,11a	4,06a
BC-1000®	3,97a	3,74ab
Biorend® SC	3,46 b	3,39 b
Lonlife plus® SC	2,79 c	1,91 c
Scholar® 50 WP	0,02 d	0,38 d
Tecto® 500 SC	3,10 bc	3,65 b

a: Herida del fruto-aplicación del agroquímico-inoculación del patógeno.

b: Aplicación del agroquímico-herida del fruto-inoculación del patógeno.

DISCUSIÓN

Patogenicidad de las cepas

En el presente estudio la totalidad de las cepas recuperadas correspondieron a *P. expansum*, lo que coincide con lo planteado por Spotts y Cervantes (1986), quienes observaron que a pesar de que varias especies del género *Penicillium* afectan manzanas, sólo las cepas de *Penicillium expansum* fueron patogénicas. En años posteriores, Rosenberger *et al.*, (1991) confirmaron esta afirmación; en un estudio realizado en especies pomáceas demostraron que se pueden encontrar al menos 11 especies del género *Penicillium* causando la pudrición azul en manzanas siendo *P. expansum* la predominante.

Sensibilidad *in vitro* para micelio y conidias

De acuerdo a los resultados, la aplicación *in vitro* de la dosis recomendada de BC-1000® Líquido (150 cc·hL⁻¹) equivalente a 1500 µg·mL⁻¹ (AFIPA 2006-2007), no es capaz de controlar el crecimiento miceliar ni la germinación conidial de los dos patógenos analizados. Resultados similares fueron obtenidos en ensayos realizados en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Chile, donde la formulación de BC-1000® utilizada no ejerció un buen control sobre micelio como tampoco sobre conidias de *Botrytis* y otros patógenos. Cabe destacar que otras formulaciones como BC-1000® Dust y otras formulaciones logran resultados más efectivos que la formulación evaluada en estos ensayos (con EC₅₀ del orden de 100 µg·mL⁻¹)¹, por lo que el bajo control observado de BC-1000® se podría atribuir al tipo de formulación utilizada, más que al ingrediente activo.

En relación al ingrediente activo Poly-D-glucosamina (Biorend® SC) éste presentó menor efectividad sobre las cepas de *Penicillium expansum* que sobre las de *Botrytis cinerea*. La EC₅₀ promedio para *P. expansum* fue de 500 y de 423 µg·mL⁻¹, para micelio y conidias, respectivamente, mientras que para *B. cinerea* las EC₅₀ fueron de 312 µg·mL⁻¹ para micelio y de 220 µg·mL⁻¹ para la germinación conidial. Los mecanismos por los cuales este ingrediente activo, conocido como “quitosano”, presenta un efecto antifúngico no han sido del todo dilucidados. Sin embargo, existen hipótesis como por ejemplo que interactúa a nivel de la membrana plasmática interfiriendo en sus funciones y afectando la actividad de

¹ Profesor Jaime R. Montealegre A., Ingeniero Agrónomo, Universidad de Chile, Departamento de Sanidad Vegetal (Comunicación personal).

la quitina desacetilasa influyendo en el balance entre la biosíntesis y degradación de los componentes de la pared celular (Hernández *et al.*, 2005), lo que podría haber afectado el desarrollo de ambos patógenos en los ensayos realizados, inhibiendo su crecimiento *in vitro*.

En los ensayos *in vitro* realizados para germinación conidial de *Botrytis cinerea*, fludioxonil (Scholar® 50 WP) inhibió en un 50% este crecimiento a concentraciones inferiores a $0,03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, corroborando los resultados obtenidos en ensayos realizados por Rosslenbroich y Stuebler (2000). Por otro lado, Errampalli (2004) señala que algunas cepas de *Botrytis* han desarrollado cierto grado de resistencia a fludioxonil en condiciones de laboratorio, presumiendo posibles mutaciones, lo que no fue corroborado en los ensayos realizados durante el desarrollo de este trabajo ya que todas las cepas de *Botrytis cinerea* fueron sensibles a este fungicida. El mismo autor señala que en *Penicillium expansum* podría ocurrir lo mismo debido a la alta presión de selección que se genera al usar reiteradamente el mismo fungicida, para su control. Para evitar esto el autor recomienda una combinación de este agroquímico con otros fungicidas, con modos de acción diferente a este para ser incorporados en un programa de manejo de la enfermedad.

Para *Penicillium expansum* estudios anteriores señalan que fludioxonil ha sido efectivo en inhibir el crecimiento miceliar de este patógeno, aunque los valores de EC_{50} descritos han sido menores que en los obtenidos en este estudio, entre $0,013$ y $0,023 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Errampalli, 2004), entre $0,015$ y $0,058 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Olaya *et al.*, 2005) y entre $0,011$ y $0,068 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Li y Xiao, 2008). En ensayos similares realizados por Errampalli (2004) en Ontario, Canadá, se encontraron rangos de EC_{50} para fludioxonil en conidias menores que en el presente estudio (entre $0,079$ a $0,113 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), Li y Xiao (2008) observaron que fludioxonil inhibió eficazmente la germinación conidial señalando que ésta fue completamente inhibida a $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, valor muy inferior al obtenido en este estudio. Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran la importancia de determinar las líneas bases de un fungicida para un patógeno determinado, antes de su introducción a un país o mercado.

En relación a tiabendazol (Tecto® 500 SC) el 10% de las cepas de *B. cinerea* evaluadas en este estudio resultaron ser resistentes tanto para crecimiento miceliar como para germinación conidial. Mientras que el 48% de las cepas de *P. expansum* fueron clasificadas como cepas resistentes a este ingrediente activo, según el criterio de resistencia indicado por Sholberg *et al.* (2005) (cepas resistentes a tiabendazol cuando las $EC_{50} > 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

En estudios similares realizados por Lima *et al.* (2006) en diferentes aislados de *Botrytis cinerea* presentaron valores de EC_{50} altamente sensibles a tiabendazol (menores a $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), mientras que otros aislados se comportaron como altamente resistentes ($EC_{50} > 500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Según Prusky *et al.* (1985), los primeros hallazgos de resistencia a los benzimidazoles en cepas de *Penicillium expansum* se detectaron en Israel en 1977, hasta entonces la población de este hongo había sido uniformemente sensible a tiabendazol con una EC_{50} promedio de $5,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Después de una temporada con una alta incidencia de pudrición en cámaras de peras, cepas resistentes de este patógeno mostraron valores de EC_{50} a este ingrediente activo de $2.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en conidias aisladas del aire de dichas cámaras. Baradit *et al.* (2003) confirmaron este hallazgo realizando ensayos *in vitro* para tiabendazol en cepas de *Penicillium expansum* provenientes de peras en la región de Emilia Romagna, Italia, en el que determinaron que el 82% de ellas fueron resistentes a tiabendazol, desarrollando su micelio por sobre las $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Lo anteriormente expuesto indica que existe un alto grado de resistencia a tiabendazol en cepas de *Penicillium expansum*. Baradit *et al.* (2003) manifiestan que más del 60% de las cepas testeadas en ensayos similares, las conidias de dicho patógeno germinaron a altas concentraciones del fungicida, siendo sus EC_{50} y CMI superiores a $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Inhibición de las pudriciones (ensayo *in vivo*)

Según resultados obtenidos por Herrera *et al.* (2010), el uso de Biorend®, BC-1000® y Lonlife® en ensayos realizados en manzanas, controlaron el desarrollo de pudriciones por *Botrytis cinerea* en más de un 50%, aunque ninguno logró un 100% de control de la pudrición con respecto al testigo (aplicación de fungicida sintético) y en ensayos realizados por Montealegre *et al.* (2010) obtuvieron resultados muy similares con Biorend® y BC-1000® controlando significativamente las pudriciones causadas por *Botrytis cinerea* (en un 80% con respecto al control), con aplicaciones de estos fungicidas después de la cosecha. Estos resultados difieren con algunos de los obtenidos en este estudio, ya que BC-1000® no logró un control efectivo de la pudrición de este patógeno (independiente del momento de aplicación del fungicida) y sólo en algunos logró diferenciarse del testigo. Es importante destacar que en el presente estudio la formulación utilizada de este fungicida no fue la que comercialmente se utiliza (formulación especialmente producida para estos ensayos). Montealegre *et al.* (2010) postulan que los tratamientos de poscosecha con BC-1000® no inhiben la pudrición causada por *Botrytis cinerea* pero puede suprimir de manera significativa la podredumbre en condiciones controladas de almacenamiento.

Para el caso de Biorend® y Lonlife® si se obtuvieron resultados similares a los obtenidos por Herrera *et al.* (2010), en donde ambos fungicidas ejercieron un control de la pudrición. En el caso de Biorend® el período de aplicación influyó en los resultados ya que aplicaciones del agroquímico antes de la inoculación fueron más efectivas, diferente a lo planteado por Montealegre *et al.* (2010) quienes postulan que aplicaciones antes y después de la cosecha suprimen de igual manera la podredumbre gris en manzanas (en un 50%) comparado con otras aplicaciones de fungicidas de origen natural.

Aplicaciones de poscosecha mediante inmersión con fludioxonil en dosis de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en ensayos realizados en Ontario, Canadá, fueron efectivas para el control de *Penicillium expansum* después de 6 días a 20°C (Errampalli, 2004). Si bien en este estudio la evaluación fue inmediatamente después de un período prolongado de frío, los resultados de estos autores concuerdan con los obtenidos en esta investigación, donde las aplicaciones de la dosis comercial de $90 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ fueron las más efectivas en el control de este patógeno, independiente del momento de aplicación del fungicida.

Según Lennox *et al.* (2004), en estudios efectuados en peras, las aplicaciones de tiabendazol antes del almacenaje resultaron ser efectivas en el control de *Botrytis cinerea*, pero no presentaron efecto alguno sobre el control de *Penicillium expansum*). Para estos ensayos el momento de aplicación incidió directamente sobre el control de *Botrytis cinerea*, ya que cuando el agroquímico fue aplicado después de efectuarse la herida existió un control de la pudrición, mientras que al aplicarse antes de ésta no existió control del patógeno. En el caso de *Penicillium expansum* tiabendazol no fue efectivo contra la pudrición en ninguno de ambos casos al igual que lo señalado por Lennox *et al.* (2004).

En resumen se puede concluir que *Penicillium expansum* es el patógeno más frecuente en poscosecha de manzanas, existiendo un alto porcentaje de cepas no patogénicas las cuales se encuentran de manera saprófita afectando los frutos, y en menor proporción las cepas de *Botrytis cinera*, las que afectan a los frutos principalmente durante el crecimiento y desarrollo del cultivo.

De acuerdo al objetivo planteado en esta memoria se corroboró la existencia de una alta resistencia *in vitro* de las cepas de *Penicillium expansum* al ingrediente activo tiabendazol y sólo una cepa resistente al mismo producto en *Botrytis cinerea* de todas las cepas analizadas (con valores de EC_{50} mayores a $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). La posibilidad de usar fludioxonil frente a esas mismas cepas resultó una muy buena alternativa tanto *in vitro* como *in vivo* demostrándose en los resultados un 100% de sensibilidad de ambos patógenos a este ingrediente activo. Los productos naturales evaluados obtuvieron una eficacia intermedia entre tiabendazol (cepas resistentes) y fludioxonil, con excepción de la formulación utilizada de extracto de semilla de cítrico (BC-1000®) que no inhibió el desarrollo *in vitro* e *in vivo* de ninguna de las cepas fungosas estudiadas.

Finalmente es importante destacar que no se detectaron grandes diferencias respecto del momento de aplicación del fungicida en los ensayos realizados *in vivo*, lo relevante en estos ensayos fue el producto aplicado, resultando con la mayor eficacia fludioxonil. Estos tratamientos deben realizarse siempre en poscosecha de manzanas con el fin de disminuir la carga de inóculo del patógeno durante el almacenamiento de los frutos y evitar el desarrollo de pudriciones durante su transporte hasta los mercados de destino.

CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones en las que se realizó este estudio, permiten concluir que:

- Un bajo porcentaje de cepas de *Botrytis cinera* (10%) resultaron ser resistentes a tiabendazol, mientras que un importante número de cepas (48%) de *Penicillium expansum* fueron resistentes a este ingrediente activo.
- Fludioxonil demostró ser un fungicida eficaz para el control de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*, lográndose un 100% de eficacia en ambos patógenos.
- Los resultados con la formulación de BC-1000® tanto *in vitro* como *in vivo* fueron concordantes, siendo ineficaz en el control de *Botrytis cinera* y *Penicillium expansum*.
- Lonlife plus® SC ejerció tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo* un control relativo sobre *Botrytis cinera* y *Penicillium expansum*.
- Biorend® SC ejerció un leve control de *Botrytis cinera* y *Penicillium expansum*.

BIBLIOGRAFÍA

AFIPA, 2006-2007. Asociación Nacional de Fabricantes e Importadores de Productos Fitosanitarios A.G. Manual fitosanitario 1160 p.

Aguirre, R. y Pinilla, B. 2005. Uso de BC1000 para el control de pudrición ácida y *Botrytis cinerea* en uva de mesa, uva vinífera y otros frutales menores In: Control biológico e integrado de enfermedades y nematodos en frutales y hortalizas. Editor Jaime R. Montealegre A. Santiago, Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Disponible en: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/9.html Leído el 22 de Septiembre de 2010.

Agrios, G. 1996. Fitopatología. (2º edición) Editorial Limusa S.A. México. 838 p.

Auger, J. 1988. Enfermedades de post-cosecha en frutas In: Control de *Botrytis* con SO₂ en postcosecha en uva de mesa de exportación y residuos de pesticidas. Publicaciones misceláneas N°5. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Departamento de Sanidad Vegetal. Disponible en: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/miscelaneasagronomicas29/c10.html Leído el 02 de marzo de 2007.

Baradit, E., Mari, M., Chierici, M., Pondrelli, M., Bertoloni, P. y Pratella, G. C. 2003. Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. Plant Pathology 52: 362-370.

Bensch, E y Guerrero, J. 2000. Eficacia de benomilo+captan y BC1000 en el control de *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* en arándano alto (*Vaccinium corymbosum*) cv. Bluejay. Universidad de la Frontera Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Disponible en: http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?pid=S0304-88022001000100002&script=sci_arttext Leído el 03 de Agosto de 2010.

Besoain, X. 1989. Benzimidazoles In: Fungicidas y Nematicidas avances y aplicaciones. Colección en Agricultura. Bernardo Latorre editor. Pág. 17-28.

Chand-Goyal, T. y Spotts, R. 1997. Biological control of postharvest diseases of apple and pear Under semi-commercial and comercial conditions using three saprophytic yeast. Biological Control 10: 199-206.

Corbaz, R. y Schwarz, A. 1995. Résistance croisée entre le fludioxonil et les dicarboximides chez *Botrytis cinerea* et *Sclerotium cepivorum* In: Station fédérale de recherches agronomiques de Changins. Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic. 27 (5): 267-270.

Eckert, J.W. y Ogawa, J.M., 1988. The chemical control of post-harvest diseases: deciduous fruits, berries, vegetables and root/tuber crops. Annual Review of Phytopathology 26: 433-469.

El Ghaouth, A. 1997. Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 19: 160-162.

EPA (Environmental Protection Agency). 1998. General overview: reduced-risk pesticide program. U.S. Environmental Protection Agency off Pesticide Programs. Staff Background. pp 2-4.

Errampalli, D. 2004. Effect of fludioxonil on germination and growth of *Penicillium expansum* and decay in apple cvs. Empire and Gala. Crop Protection 23: 811-817.

Errampalli, D. y Crnko, N. 2004. Control of blue mold caused by *Penicillium expansum* on apples "Empire" with fludioxonil and cyprodinil. Canadian Journal of Plant Pathology 26: 70-75.

FRAC, 2009. Fungicide Resistance Action Committee. Disponible en: <http://www.frac.info/frac/index.htm> Leído el 03 de Agosto de 2010.

FIA (Fundación para la Innovación Agraria). 2003. Frutales de hoja caduca en Chile: situación actual y perspectivas. Fundación para la innovación Agraria. Santiago, Chile. 188p.

Hadwiger, L. y Loschke, D. 1981. Molecular communication in host-parasite interactions: Hexosamine polymers (Chitosan) as regulator compounds in Racespecific and other interactions. Phytopathology 71: 756-762.

Hernández, P., Almenar, E., Del Valle, V., Velez, D. y Gavara, R. 2008. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. Food Chemistry 110: 428-435.

Hernández, A., Bautista, S., Velásquez, M., Rodríguez, S., Corona, M., Solano, A. y Bosquez, M. 2005. Potencial del quitosano en el control de las enfermedades poscosecha. Revista Mexicana de Fitopatología 23: 198-205.

Herrera, R., Montealegre, J., Henríquez, J. L., López, C. y González, B. 2010. Evaluación de eficacia de productos alternativos en el control de pudriciones en post cosecha de manzanas. Revista Frutícola N° 2, 28-34.

Koffmann, W. y Penrose, L. J., 1987. Fungicides for the control of blue mold (*Penicillium* spp.) in pome fruits. *Scientia Horticulturae* 31: 225-232.

Lennox, C., Spotts, R. y Boysee, M. 2004. Incidence of Postharvest Decay of 'd'Anjou' Pear and Control with a Thiabendazole Drench. *Plant Disease* 88 N° 5: 474-478.

Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D. y Gredt, M. 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection* 18: 687-697.

Leroux, P. y Gredt, M. 1981. Méthode de detection de la résistance de *Botrytis cinerea* Pers. Aux fungicides, a partir d'échantillons prélevés dans les vignobles. *Phytopharmacie* 30: 57-60.

Li, H.X. y Xiao, C. L. 2008. Baseline sensitivities to fludioxonil and pyrimethanil in *Penicillium expansum* populations from apple in Washington State. *Postharvest Biology and Technology* 47: 239-245.

Lima, G., De Curtis, F., Piedimonte, D., Spina, A. y De Cicco, V. 2006. Integration of biocontrol yeast and thiabendazole protects stored apples from fungicide sensitive and resistant isolated of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology* 40: 301-307.

Mendoza, H. 2005. Lonlife (Citrex) y su uso como fungicida-bactericida para el control de pudriciones de racimos en uva de mesa y vinífera *In: Control biológico e integrado de enfermedades y nematodos en frutales y hortalizas*. Editor Jaime R. Montealegre A. Santiago, Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Disponible en: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/9.html Leído el 22 de Septiembre de 2010.

Montealegre, J., López, C., Stadnik, M., Henríquez, J.L., Herrera, R., Polanco, R., Di Piero, R., y Pérez, L.M. 2010. Control of grey rot of apple fruits by biologically active natural products. *Tropical Plant Pathology* 35 (5): 271-276.

Morales, A. 1989. Fungicidas recomendados en postcosecha *In: Fungicidas y Nematicidas avances y aplicaciones*. Colección en Agricultura. Bernardo Latorre editor. Pág. 113-124.

ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). 2009. *on line*. Disponible en: <http://www.odepa.cl/servlet/articulos.ServletMostrarDetalle;jsessionid=FFD8B29483CF1B47C46CF21D3F0DDA3B?idcla=12&idn=1736> Leído el 03 de Agosto de 2010.

Olaya, G., Heidel, T., Spotts, R., Sanderson, P., Rossenberger, D. y Tally, A. 2005. Sensitivity of *Penicillium expansum* isolates to the phenylpyrrole fungicide fluxioxonil. *Phytopathology* 95: S77 (Abstract).

Pinilla, B., Lolás, M. y Soto, S. 2005. “Ojo de Buey”: Aspectos relevantes de la pudrición que afecta a las manzanas en Chile. *Revista frutícola* Vol. 26 N° 3, Pág. 113-116.

Prusky, D., Bazak, M. y Ben-Aire, R. 1985. Development, Persistence, Survival, and Strategies for Control of Thiabendazole-Resistant Strains of *Penicillium expansum* on Pome Fruits. *Phytopathology* 75 N° 8: 877-882.

Rosenberger, D., Wicklow, D.T., Korjagin, V.A. y Rondinaro, S.M. 1991. Pathogenicity and benzimidazole resistance in *Penicillium* species recovered from flotation tanks in apple packinghouses. *Plant Disease* 75: 712-715.

Rosslénbroich, H. y Stuebler, D. 2000. *Botrytis cinerea* – history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* 95: 557-561.

Sakamoto, I. 1986. Detection of fungicide resistance strain in *B. cinerea*. In: Laboratory of the course on Pesticide Utilization for Plant Protection. Akashi, Hyogo. Prefectural Agric. Center, Div. of Plant Pathology and Entomology. Sp.

SAG (Servicio Agrícola y Ganadero). 2010. SAG *on line*. Disponible en [http://www.sag.cl/OpenDocs/asp/pagDefault.asp?boton=Doc56&argInstanciaId=56&argCarpetId=570&argTreeNodosAbiertos=\(0\)&argTreeNodoSel=570&argTreeNodoActual=570&argRegistroId=1208](http://www.sag.cl/OpenDocs/asp/pagDefault.asp?boton=Doc56&argInstanciaId=56&argCarpetId=570&argTreeNodosAbiertos=(0)&argTreeNodoSel=570&argTreeNodoActual=570&argRegistroId=1208) Leído el 03 de Agosto de 2010.

Sholberg, P., Bedford, K. y Stokes, S. 2005a. Sensivity of *Penicillium* spp. and *Botrytis cinerea* to pyrimethanil and its control of blue and gray mold of stored apples. *Crop protection* 24: 127-134.

Sholberg, P., Harlton, C., Haag, P., Lévesque, C., O’Gorman, D. y Seifert, K. 2005. Benzimidazole and diphenylamine sensivity and identity of *Penicillium* spp. that cause postharvest blue mold of apples using –tubulin gene sequences. *Postharvest Biology and Technology* 36: 41-49.

Smith, C.M. 1988. History of benzimidazole use and resistance. In: Delp, C.J (Ed.), *Fungicide Resistance in North America*, APS Press. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA, pp. 23-24

Spotts, R. y Cervantes, L. 1986. Populations, pathogenicity, and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., and *Mucor piriformis* in Packinghouses. *Plant Disease*. 70: 106-108.

Tripathi, P. y Dubey, N.K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 32: 235-245.

Viñas, I., Teixidó, M., Abadías, M., Torres, R. y Usall, J. s.a. Alternativas a los fungicidas de síntesis en el control de las enfermedades de postcosecha de frutas. Disponible en: <http://www.horticom.com/pd/imagenes/66/025/66025.pdf> Leído el 27 de Septiembre de 2010.

Zofolli, J. P., Latorre, B., Daire, N. y Viertel, S. 2005. Efectividad del dióxido de cloro, en función de la concentración, pH y tiempo de exposición, en el control de *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Rhizopus stolonifer*. Ciencia e Investigación Agraria 32 (3): 181-188.

APÉNDICES

Apéndice I. EC₅₀ y CMI del extracto de cítrico para micelio y conidias de todas las cepas de *Botrytis cinerea* evaluadas.

Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	CMI (µg·mL ⁻¹)
1	> 3.000	> 5.000
2	> 3.000	> 5.000
3	> 3.000	> 5.000
4	> 3.000	> 5.000
5	> 3.000	> 5.000
6	> 3.000	> 5.000
7	> 3.000	> 5.000
8	> 3.000	> 5.000
9	> 3.000	> 5.000
10	> 3.000	> 5.000

Apéndice II. EC₅₀ y CMI del extracto de cítrico para micelio y conidias de todas las cepas de *Penicillium expansum* evaluadas.

Cepa	EC₅₀ (µg·mL⁻¹)	CMI (µg·mL⁻¹)	Cepa	EC₅₀ (µg·mL⁻¹)	CMI (µg·mL⁻¹)
1	> 3.000	> 5.000	24	> 3.000	> 5.000
2	> 3.000	> 5.000	25	> 3.000	> 5.000
3	> 3.000	> 5.000	26	> 3.000	> 5.000
4	> 3.000	> 5.000	27	> 3.000	> 5.000
5	> 3.000	> 5.000	28	> 3.000	> 5.000
6	> 3.000	> 5.000	29	> 3.000	> 5.000
7	> 3.000	> 5.000	30	> 3.000	> 5.000
8	> 3.000	> 5.000	31	> 3.000	> 5.000
9	> 3.000	> 5.000	32	> 3.000	> 5.000
10	> 3.000	> 5.000	33	> 3.000	> 5.000
11	> 3.000	> 5.000	34	> 3.000	> 5.000
12	> 3.000	> 5.000	35	> 3.000	> 5.000
13	> 3.000	> 5.000	36	> 3.000	> 5.000
14	> 3.000	> 5.000	37	> 3.000	> 5.000
15	> 3.000	> 5.000	38	> 3.000	> 5.000
16	> 3.000	> 5.000	39	> 3.000	> 5.000
17	> 3.000	> 5.000	40	> 3.000	> 5.000
18	> 3.000	> 5.000	41	> 3.000	> 5.000
19	> 3.000	> 5.000	42	> 3.000	> 5.000
20	> 3.000	> 5.000	43	> 3.000	> 5.000
21	> 3.000	> 5.000	44	> 3.000	> 5.000
22	> 3.000	> 5.000	45	> 3.000	> 5.000
23	> 3.000	> 5000	46	> 3.000	> 5.000

Apéndice III. EC₅₀ y CMI de poly-D-glucosamina para micelio de todas las cepas de *Botrytis cinerea* evaluadas.

Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	CMI (µg·mL ⁻¹)
1	244	928
2	246	1.561
3	366	4.313
4	377	4.851
5	377	2.715
6	238	5.430
7	331	10.427
8	324	2.447
9	326	3.173
10	294	4.974
Promedio	312	4082

Apéndice IV. EC₅₀ y CMI de poly-D-glucosamina para conidias de todas las cepas de *Botrytis cinerea* evaluadas.

Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	CMI (µg·mL ⁻¹)
1	206	497
2	224	477
3	237	516
4	233	515
5	205	546
6	218	478
7	219	477
8	234	516
9	228	512
10	199	541
Promedio	220	507

Apéndice V. EC₅₀ y CMI de poly-D-glucosamina para micelio de todas las cepas de *Penicillium expansum* evaluadas.

Cepa	EC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Cepa	EC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Cepa	CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Cepa	CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	1.248	24	4.120	1	5.000	24	5.000
2	2.890	25	942	2	5.000	25	4.761
3	1.254	26	1.016	3	5.000	26	5.000
4	2.649	27	1.075	4	5.000	27	5.000
5	1.812	28	1.313	5	5.000	28	5.000
6	3.371	29	967	6	5.000	29	5.000
7	588	30	1.074	7	5.000	30	5.000
8	1.160	31	1.087	8	5.000	31	5.000
9	3.100	32	2.574	9	5.000	32	5.000
10	1.955	33	1.090	10	5.000	33	5.000
11	1.159	34	2.035	11	5.000	34	5.000
12	1.883	35	905	12	5.000	35	5.000
13	1.689	36	1.683	13	5.000	36	5.000
14	1.309	37	1.277	14	5.000	37	5.000
15	784	38	2.783	15	5.000	38	5.000
16	1.399	39	2.022	16	5.000	39	5.000
17	1.077	40	2.299	17	5.000	40	5.000
18	2.535	41	3.325	18	5.000	41	5.000
19	1.342	42	2.006	19	5.000	42	5.000
20	143	43	1.673	20	5.000	43	5.000
21	2.435	44	880	21	5.000	44	5.000
22	1.685	45	617	22	5.000	45	3.014
23	1.480	46	1.220	23	5.000	46	5.000
Promedio			2.479				4.952

Apéndice VI. EC₅₀ y CMI de poly-D-glucosamina para conidias de todas las cepas de *Penicillium expansum* evaluadas.

Cepa	EC₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Cepa	EC₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Cepa	CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Cepa	CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	161	24	216	1	222	24	371
2	159	25	849	2	227	25	5.000
3	150	26	776	3	216	26	4.909
4	157	27	518	4	234	27	5.000
5	148	28	675	5	232	28	5.000
6	160	29	749	6	220	29	5.000
7	168	30	351	7	501	30	5.000
8	172	31	352	8	253	31	3.029
9	188	32	183	9	479	32	812
10	181	33	833	10	262	33	5.000
11	215	34	226	11	1.292	34	376
12	250	35	797	12	391	35	2.398
13	173	36	207	13	263	36	393
14	221	37	242	14	378	37	371
15	209	38	216	15	319	38	389
16	211	39	312	16	335	39	1.326
17	1.758	40	219	17	5.000	40	369
18	227	41	222	18	373	41	374
19	239	42	356	19	323	42	618
20	301	43	399	20	401	43	709
21	265	44	1.489	21	978	44	5.000
22	211	45	325	22	370	45	893
23	1.013	46	1.996	23	3.064	46	5.000
Promedio			423				1.602

Apéndice VII. EC₅₀ y CMI de cítrex para micelio de todas las cepas de *Botrytis cinerea* evaluadas.

Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	CMI (µg·mL ⁻¹)
1	249	3.280
2	284	2.000
3	258	3.566
4	192	4.447
5	1	1.106
6	203	4.343
7	1	1.644
8	424	5.000
9	239	5.000
10	44	5.000
Promedio	189	3.539

Apéndice VIII. EC₅₀ y CMI de cítrex para conidias de todas las cepas de *Botrytis cinerea* evaluadas.

Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	CMI (µg·mL ⁻¹)
1	2.702	> 5.000
2	3.000	> 5.000
3	3.000	> 5.000
4	3.000	> 5.000
5	3.000	> 5.000
6	3.000	> 5.000
7	3.000	> 5.000
8	1.837	> 5.000
9	2.702	> 5.000
10	3.000	> 5.000
Promedio	2.824	> 5.000

Apéndice IX. EC₅₀ y CMI de cítrex para micelio de todas las cepas de *Penicillium expansum* evaluadas.

Cepa	EC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Cepa	EC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Cepa	CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Cepa	CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	111	24	163	1	148	24	5.000
2	943	25	88	2	5.000	25	597
3	1.306	26	244	3	5.000	26	1.517
4	997	27	15	4	4.011	27	892
5	127	28	229	5	401	28	709
6	462	29	118	6	5.000	29	361
7	701	30	306	7	5.000	30	639
8	525	31	120	8	1.430	31	387
9	528	32	441	9	5.000	32	5.000
10	1.372	33	102	10	5.000	33	399
11	283	34	507	11	723	34	1.534
12	1.179	35	302	12	5.000	35	2.010
13	303	36	501	13	5.000	36	3.481
14	655	37	1.017	14	5.000	37	5.000
15	126	38	300	15	381	38	4.586
16	525	39	243	16	1.430	39	1.451
17	97	40	943	17	136	40	5.000
18	414	41	379	18	4.557	41	5.000
19	197	42	390	19	1.737	42	5.000
20	121	43	359	20	5.000	43	5.000
21	599	44	102	21	5.000	44	142
22	180	45	603	22	5.000	45	1.803
23	131	46	106	23	741	46	145
Promedio			423				2.855

Apéndice X. EC₅₀ y CMI de cítrex para conidias de todas las cepas de *Penicillium expansum* evaluadas.

Cepa	EC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Cepa	EC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Cepa	CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Cepa	CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	108	24	14	1	226	24	115
2	67	25	14	2	213	25	114
3	79	26	15	3	237	26	107
4	109	27	35	4	224	27	440
5	27	28	19	5	125	28	212
6	109	29	36	6	235	29	395
7	118	30	35	7	299	30	326
8	102	31	15	8	220	31	107
9	104	32	110	9	202	32	233
10	81	33	17	10	179	33	99
11	25	34	96	11	223	34	219
12	101	35	19	12	206	35	397
13	14	36	97	13	115	36	242
14	98	37	94	14	208	37	245
15	25	38	83	15	257	38	289
16	25	39	84	16	115	39	255
17	27	40	101	17	78	40	244
18	37	41	79	18	247	41	267
19	33	42	91	19	138	42	287
20	101	43	80	20	206	43	282
21	101	44	55	21	244	44	760
22	25	45	85	22	113	45	238
23	25	46	80	23	84	46	270
Promedio			63				229

Apéndice XI. EC₅₀ y CMI de fludioxonil para micelio de todas las cepas de *Botrytis cinerea* evaluadas.

Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	CMI (µg·mL ⁻¹)
1	0,01	0,30
2	0,01	0,22
3	0,02	1,51
4	0,01	0,10
5	0,03	0,30
6	0,02	0,32
7	0,01	0,28
8	0,02	1,30
9	0,01	0,72
10	0,03	1,67
Promedio	0,02	0,67

Apéndice XII. EC₅₀ y CMI de fludioxonil para conidias de todas las cepas de *Botrytis cinerea* evaluadas.

Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	CMI (µg·mL ⁻¹)
1	0,01	0,25
2	0,01	0,19
3	0,02	1,51
4	0,01	0,08
5	0,03	0,26
6	0,02	0,32
7	0,01	0,28
8	0,02	0,97
9	0,01	0,23
10	0,01	0,82
Promedio	0,02	0,49

Apéndice XIII. EC₅₀ y CMI de fludioxonil para micelio de todas las cepas de *Penicillium expansum* evaluadas.

Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	Cepa	CMI (µg·mL ⁻¹)	Cepa	CMI (µg·mL ⁻¹)
1	0,17	24	0,01	1	0,65	24	1,46
2	0,14	25	0,01	2	1,98	25	2,62
3	0,16	26	0,01	3	1,23	26	1,86
4	0,16	27	0,01	4	0,71	27	2,08
5	0,27	28	0,01	5	12,47	28	8,01
6	0,15	29	0,01	6	1,02	29	7,50
7	0,13	30	0,01	7	0,42	30	5,01
8	0,15	31	0,21	8	0,80	31	1,19
9	0,18	32	0,08	9	1,27	32	0,57
10	0,36	33	0,12	10	0,85	33	8,81
11	0,36	34	0,18	11	0,85	34	4,15
12	0,14	35	0,20	12	0,43	35	3,16
13	0,15	36	0,21	13	0,94	36	0,95
14	0,16	37	0,15	14	1,58	37	0,96
15	0,21	38	0,14	15	5,30	38	1,01
16	0,01	39	0,15	16	1,50	39	0,89
17	0,01	40	0,16	17	1,77	40	1,26
18	0,01	41	0,19	18	1,48	41	0,81
19	0,01	42	0,14	19	1,00	42	1,01
20	0,01	43	0,32	20	7,69	43	0,78
21	0,01	44	0,29	21	2,30	44	5,96
22	0,01	45	0,16	22	1,17	45	1,07
23	0,01	46	0,13	23	1,72	46	1,54
Promedio			0,13				2,43

Apéndice XIV. EC₅₀ y CMI de fludioxonil para conidias de todas las cepas de *Penicillium expansum* evaluadas.

Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	Cepa	CMI (µg·mL ⁻¹)	Cepa	CMI (µg·mL ⁻¹)
1	0,25	24	0,32	1	1,04	24	0,62
2	0,27	25	0,32	2	0,67	25	0,62
3	0,28	26	0,32	3	0,70	26	0,62
4	0,27	27	0,33	4	0,75	27	0,62
5	0,28	28	0,32	5	0,78	28	0,62
6	0,27	29	0,23	6	0,78	29	0,62
7	0,32	30	0,25	7	0,62	30	0,71
8	0,27	31	0,26	8	0,73	31	0,69
9	0,26	32	0,34	9	0,68	32	0,66
10	0,27	33	0,34	10	0,78	33	0,65
11	0,27	34	0,34	11	0,90	34	0,64
12	0,26	35	0,27	12	0,86	35	0,55
13	0,29	36	0,34	13	0,65	36	0,62
14	0,25	37	0,33	14	0,62	37	0,61
15	0,26	38	0,32	15	0,76	38	0,63
16	0,27	39	0,33	16	0,61	39	0,78
17	0,24	40	0,34	17	0,57	40	0,61
18	0,20	41	0,27	18	1,08	41	0,63
19	0,30	42	0,29	19	0,66	42	0,68
20	0,26	43	0,29	20	0,73	43	0,69
21	0,27	44	0,29	21	0,73	44	0,68
22	0,29	45	0,27	22	0,62	45	0,68
23	0,24	46	0,33	23	0,69	46	0,80
Promedio			0,29				0,70

Apéndice XV. EC₅₀ y CMI de tiabendazol para micelio de todas las cepas de *Botrytis cinerea* evaluadas.

Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	CMI (µg·mL ⁻¹)
1	0,10	0,15
2	0,08	0,12
3	0,09	0,14
4	0,12	0,18
5	0,55	0,75
6	126,51	170,39
7	0,55	0,75
8	0,55	0,75
9	0,85	1,18
10	0,20	0,30
Prom. Cepa Resistente	127	170
Prom. Cepas sensibles	0,34	0,48

Apéndice XVI. EC₅₀ y CMI de tiabendazol para conidias de todas las cepas de *Botrytis cinerea* evaluadas.

Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	CMI (µg·mL ⁻¹)
1	0,07	0,10
2	0,07	0,10
3	0,05	0,08
4	0,05	0,08
5	0,07	0,10
6	121	163
7	0,05	0,08
8	0,07	0,10
9	0,07	0,10
10	0,07	0,11
Prom. Cepa Resistente	121	163
Prom. Cepas sensibles	0,06	0,09

Apéndice XVII. EC₅₀ y CMI de tiabendazol para micelio de todas las cepas de *Penicillium expansum* evaluadas.

Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	Cepa	CMI (µg·mL ⁻¹)	Cepa	CMI (µg·mL ⁻¹)
1	198	24	0,10	1	390	24	0,15
2	3.000	25	0,09	2	5.000	25	0,14
3	3.000	26	0,09	3	5.000	26	1,75
4	3.000	27	0,10	4	5.000	27	0,15
5	0,10	28	0,10	5	0,15	28	0,15
6	0,10	29	0,10	6	0,14	29	0,15
7	>3.000	30	0,05	7	5.000	30	0,08
8	590	31	0,10	8	5.000	31	0,14
9	1,74	32	3.000	9	5.000	32	5.000
10	0,09	33	0,07	10	0,14	33	0,11
11	129	34	0,46	11	324	34	5,00
12	0,05	35	0,09	12	0,08	35	0,14
13	3.000	36	123	13	5.000	36	5.000
14	1.525	37	3.000	14	5.000	37	5.000
15	1.256	38	121	15	5.000	38	5.000
16	116	39	0,07	16	181	39	0,11
17	0,05	40	>3.000	17	0,08	40	5.000
18	2.146	41	0,45	18	5.000	41	6,64
19	170	42	3.000	19	356	42	5.000
20	0,08	43	0,00	20	1,95	43	5.000
21	0,05	44	0,05	21	0,08	44	0,08
22	2.676	45	3.000	22	5.000	45	5.000
23	0,05	46	0,05	23	0,08	46	0,08
Prom. Resistentes			1.653				4.148
Prom. Sensibles			0,11				0,43

Apéndice XVIII. EC₅₀ y CMI de tiabendazol para conidias de todas las cepas de *Penicillium expansum* evaluadas.

Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	Cepa	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	Cepa	CMI (µg·mL ⁻¹)	Cepa	CMI (µg·mL ⁻¹)
1	100	24	283	1	5.000	24	476
2	1.384	25	0,10	2	5.000	25	2,54
3	3.000	26	0,10	3	5.000	26	2,26
4	78	27	0,10	4	238	27	3,52
5	0,10	28	0,10	5	9,54	28	17
6	0,10	29	0,04	6	31	29	57
7	87	30	0,10	7	5.000	30	1,70
8	160	31	0,10	8	302	31	49
9	0,10	32	41	9	1.592	32	5.000
10	0,10	33	0,10	10	22	33	91
11	17	34	0,37	11	262	34	73
12	0,05	35	0,10	12	1.513	35	13
13	101	36	0,07	13	230	36	0,10
14	3.000	37	73	14	5.000	37	205
15	133	38	44	15	5.000	38	649
16	205	39	0,10	16	5.000	39	13
17	0,10	40	3.000	17	14	40	5.000
18	312	41	0,22	18	681	41	7
19	17	42	62	19	5.000	42	813
20	3.000	43	0,07	20	5.000	43	0,11
21	0,10	44	0,10	21	42	44	2,26
22	47	45	166	22	147	45	687
23	0,10	46	0,01	23	2,54	46	228
Prom. Resistentes			696				
Prom Sensibles			0,11	157,79			