



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

**Memoria de Título**

**EFECTO DE FUNGICIDAS DE ACCION BOTRITICIDA EN LA FOTOSINTESIS  
DE *Vitis vinifera* L. CVS THOMPSON SEEDLESS Y CHARDONNAY**

**Paula Francisca Valdés Quiñones**

**Santiago, Chile**

**2013**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**ESCUELA DE PREGRADO**

**Memoria de Título**

**Título**

**EFFECTO DE FUNGICIDAS DE ACCION BOTRITICIDA EN LA FOTOSINTESIS  
DE *Vitis vinifera* L. CVS THOMPSON SEEDLESS Y CHARDONNAY**

**FUNGICIDE EFFECTS OF BOTRITICIDE ACTIVITY ON PHOTOSYNTHESIS  
OF *Vitis vinifera* L. CVS. THOMPSON SEEDLESS AND CHARDONNAY**

**Paula Francisca Valdés Quiñones**

**Santiago, Chile**

**2013**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

**Memoria de Título**

**EFECTO DE FUNGICIDAS DE ACCION BOTRITICIDA EN LA FOTOSINTESIS  
DE *Vitis vinifera* L. CVS THOMPSON SEEDLESS Y CHARDONNAY**

Memoria para optar al título profesional de:

Ingeniero Agrónomo

**Paula Francisca Valdés Quiñones**

Profesores Guías	Calificaciones
Claudio Pastenes V. Ingeniero Agrónomo, Ph D.	6,8
Jaime Auger S. Ingeniero Agrónomo, M.S., Ph D.	6,9
Profesores Evaluadores	
Marcela Esterio G. Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc.	6,4
Eduardo Loyola M. Ingeniero Agrónomo, Enólogo, Dr.	6,4

**Santiago, Chile**

**2013**



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN .....	9
MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
Lugar del estudio.....	12
Materiales .....	12
Metodología.....	12
Evaluaciones.....	13
Fotoinhibición por medio de Fluorescencia de clorofila.....	13
Contenido de clorofila.....	14
Tasa de asimilación CO <sub>2</sub> .....	14
Permeabilidad Relativa de Membranas (TPR) .....	15
Diseño experimental y análisis estadístico .....	15
RESULTADOS.....	16
Datos climáticos.....	16
Radiación fotosintéticamente activa (PAR) .....	16
Temperatura del aire .....	16
Ensayo Chardonnay.....	17
Tasa de asimilación de CO <sub>2</sub> .....	17
Ensayo Thompson Seedless .....	18
Tasa de asimilación de CO <sub>2</sub> .....	19
ÍNDICE DE FIGURAS.....	21
DISCUSIÓN .....	31
CONCLUSIONES .....	35
BIBLIOGRAFIA .....	36

## RESUMEN

El control químico para la pudrición gris es la principal herramienta para reducir su incidencia que puede ser lograda por medio de diversos compuestos fungicidas. El fludioxonil, ciprodinil y fenhexamid son moléculas con actividad bottriticida y fueron desarrolladas a partir de los años 90. Sin embargo su eficacia se ha visto fuertemente afectada por la aparición de resistencia debido a su uso reiterado. Por otro lado algunos ingredientes activos utilizados en determinadas concentraciones suelen alterar el metabolismo de las plantas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos fungicidas aplicados al follaje de plantas jóvenes de *Vitis vinifera*, variedades Thompson Seedless y Chardonay sobre la actividad fotosintética. Las mediciones fueron realizadas 5 veces a lo largo del día durante 5 días. Se evaluaron los parámetros de fotoinhibición de la fotosíntesis, contenido de clorofilas, tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> y permeabilidad relativa de membranas. Para ello se realizaron dos ensayos consistentes en 4 tratamientos más un testigo (T1= ciprodinil (375g/kg) & fludioxonil (250g/kg), 60gr/hL; T2= ciprodinil (375g/kg) & fludioxonil (250g/kg), 120gr/hL agua; T3= fenhexamid (500g/L) 72,5cc/hL; T4= fenhexamid (500g/L) 145cc/hL agua). Los resultados no mostraron diferencias significativas entre tratamientos a lo largo del ensayo, indicando que los fungicidas no alteraron los parámetros fisiológicos registrados de las plantas.

**Palabras claves:** ciprodinil & fludioxonil, fenhexamid, fotoinhibición, clorofilas

## ABSTRACT

Chemical control for gray mold is the principal tool to reduce its occurrence and it can be achieved with a number of different fungicide compounds. Fludioxonil, ciprodinil and fenhexamid are molecules with botriticide activity and were developed from the '90s. However their efficacy has been seen to be markedly affected by the development of resistance due to repeated use. Moreover some active ingredients used in certain concentrations often alter plants' metabolism. The aim of this study was to assess the effects of two fungicides applied to the leaves of young plants from *Vitis vinifera* varieties Thompson Seedless and Chardonnay on their photosynthetic activity. The measurements were carried out five times a day for five days. The variables that were tested were photoinhibition of photosynthesis; Chlorophylls content; Carbon dioxide assimilation and Membrane permeability. Two experiments were performed, consisting of four treatments and a control (T1= ciprodinil (375g/kg) & fludioxonil (250g/kg), 60gr/hL; T2= ciprodinil (375g/kg) & fludioxonil (250g/kg), 120gr/hL agua; T3= fenhexamid (500g/L) 72,5cc/hL; T4= fenhexamid (500g/L) 145cc/hL agua). The results did not show differences between plants subject to the different treatments over the course of the experiments, suggesting that fungicides do not affect the plants physiology.

**Key Words:** ciprodinil & fludioxonil, fenhexamid, photoinhibition, chlorophylls.



## INTRODUCCIÓN

Una agricultura eficiente, económicamente viable y limpia es esencial en la producción sustentable de alimentos. Para garantizar esto, el control de malezas, hongos patógenos e insectos debe hacerse de forma responsable e intrépida, compatibilizando la producción de alimentos inocuos y reduciendo pérdidas de rendimiento (Kramer y Schirmer, 2007). Lo anterior, obliga a realizar manejos rigurosos y controles exigentes de manera de prevenir o controlar posibles problemas en el transcurso del desarrollo de un cultivo. Las enfermedades constituyen uno de los problemas más difíciles de controlar a nivel de campo y que pueden afectar fuertemente la productividad de los cultivos. Aunque esas pérdidas pueden ser atenuadas por el uso de cultivares tolerantes a la enfermedad, rotación de cultivos, los fungicidas son generalmente esenciales para maximizar el rendimiento de los cultivos (Knight *et al.*, 1997).

La pudrición gris, causada por *Botrytis cinerea* Pers., es una seria enfermedad fungosa en el cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.), que afecta tanto la cantidad como la calidad de la producción. El control químico es la principal herramienta para reducir la incidencia de la pudrición gris y puede ser lograda por muchas familias de fungicidas. La intervención más común consiste en asperjar la parte aérea de las plantas con fungicidas (Elad *et al.*, 2007; Vaillant-Gaveau, 2008), de los cuales, actualmente, se dispone de una amplia gama.

Desde mediados de la década del '90, se han desarrollado nuevas moléculas con acción botriticida, entre las que se destacan: anilino pirimidinas (cyprodinil), fenilpirroles (fludioxonil) y las hydroxianilidas (fenhexamid), (Rosslenbroich y Stuebler, 2000).

El ciprodinil, pertenece al grupo químico de las anilino pirimidinas, inhibe la elongación del tubo germinativo y el crecimiento inicial del micelio de *Botrytis cinerea*. El modo de acción de las anilino pirimidinas es de tipo sistémico y consiste en la inhibición de la biosíntesis de metionina en el hongo y el bloqueo de la secreción de proteínas extracelulares asociadas a la patogénesis (Rosslenbroich y Stuebler, 2000). Las anilino pirimidinas exhiben una fuerte actividad preventiva que se basa en la inhibición de la elongación del tubo germinativo durante la germinación de la espora, la formación del apresorio y el crecimiento miceliar. También, el proceso de penetración e infección del patógeno en el tejido hospedador. Es un fungicida sistémico, traslocado vía apoplasto en la hoja, que resulta en la inhibición de estados tardíos en la patogénesis, como la formación de haustorios, crecimiento intercelular de micelio y esporulación. (Kramer y Schirmer, 2007).

El fludioxonil corresponde a una molécula del grupo químico de los Fenilpirroles. Inhibe la germinación de esporas (conidias), la elongación del tubo germinativo y el crecimiento del

micelio. El sitio de acción se encuentra en la transmisión de la señal en la vía osmorregulatoria (Rosselenbroich y Stuebler, 2000). Carece de acción sistémica y actúa en forma preventiva. Para ampliar su espectro de actividad y manejo de la resistencia, es principalmente usado en mezclas con anilino pirimidinas como el cyprodinil.

Por otra parte, fenhexamid pertenece a la familia de las hydroxianilidas, es el primer miembro de una nueva clase de los fungicidas SBI (Kramer y Schirmer, 2007); actúa inhibiendo el complejo enzimático 3-ketoreductasa de la *dimetilación* del carbono 4 durante la biosíntesis del esterol, afectando el desarrollo de los tubos germinativos, evitando el proceso de penetración al tejido vegetal (Debieu *et al.*, 2001). Posee una gran eficacia preventiva sobre la pudrición gris, con un espectro de acción bastante específico (Kramer y Schirmer, 2007)

Mediante el uso de botryticidas es posible proteger la uva de mesa en Chile contra *Botrytis spp.* Los programas de control químico que permiten controlar la enfermedad en vides, recomiendan tratar el cultivo en cinco estados fenológicos susceptibles: preflor, plena floración, preverano, verano y precosecha (Auger y Esterio, 1997).

Sin embargo, su eficacia en el control de la enfermedad se ha visto gravemente afectada en algunos casos por el desarrollo de resistencia como resultado del uso repetitivo de fungicidas de similar modo de acción o bien por el uso de dosis inadecuadas, provocando la selección de cepas resistentes de *Botrytis*. (Brent y Hollomon, 2007). En efecto, este hongo es un patógeno de alto riesgo por su habilidad para desarrollar resistencia contra los fungicidas (Kramer y Schirmer, 2007). Por lo mismo se recomienda recurrir al uso de mezclas y rotación de productos a base de diferentes ingredientes activos, práctica común en el manejo anti resistencia (De Waard *et al.*, 2006). Por lo tanto, el uso de diferentes fungicidas y sus combinaciones son recomendadas para reducir el desarrollo y establecimiento de cepas resistentes (Agrios, 2005).

Por otro lado, se ha detectado que ciertos ingredientes activos, además de afectar el crecimiento o desarrollo de los patógenos, también alteran el metabolismo de las plantas (Story, 2003). Así, el uso de fungicidas en mezcla con otros pesticidas reducen la asimilación de CO<sub>2</sub>, mientras que ocurre un explosivo aumento en la respiración nocturna después de la aplicación (Untiedt and Blanke, 2004). La reducción de la fotosíntesis de la hoja implica un serio riesgo para el metabolismo del carbono, el rendimiento y el vigor de la vid (Vaillant-Gaveau, 2008). Tales efectos ya han sido revelados por modificaciones de la actividad fotosintética, fluorescencia de la clorofila y contenido de pigmentos entre otros (Saladin *et al.*, 2003; Story *et al.*, 2003; Vaillant-Gaveau, 2008).

En el caso de fludioxonil y fenhexamid, se ha comprobado que inhiben el proceso de la fotosíntesis, sin inducir a reacciones de defensa en la planta, contrario a otros tipos de estrés

oxidativos (Vaillant-Gaveau, 2008). Se ha comprobado que frente a aplicaciones de fludioxonil ocurre una disminución de la fijación de CO<sub>2</sub>, que se puede atribuir al cierre de los estomas, a la ruptura en la capacidad de carboxilación de la Rubisco y/o su regeneración, y pérdidas en la actividad del fotosistema II (Petit *et al.*, 2009).

En Chile, no existe información disponible en relación a los efectos que producen estos ingredientes activos en plantas y variedades de vid cultivadas bajo nuestras condiciones de cultivo. Por lo que se han planteado las siguientes hipótesis y objetivos.

Hipótesis:

Los ingredientes activos con acción fungicida: ciprodinil & fludioxonil y fenhexamid, aplicados al follaje de plantas jóvenes de vid cvs. Thompson Seedless y Chardonnay, afectan su actividad fotosintética.

Objetivo General:

Determinar el efecto de dos concentraciones comerciales de ciprodinil & fludioxonil y fenhexamid sobre la actividad fotosintética de plantas jóvenes cvs. Thompson Seedless y Chardonnay.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar del estudio

El estudio se realizó durante la temporada 2011/2012 en el laboratorio de Fisiología del Estrés Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicada en la Región Metropolitana.

### Materiales

Se utilizaron plantas de *Vitis vinifera* L. cvs. Chardonnay y var. Thompson Seedless de una temporada de crecimiento, obtenidas desde el vivero “Univiveros”, las que fueron transplantadas en macetas de 20 L, con tierra de hoja y con suelo del Campus Antumapu de la Universidad de Chile, correspondiente a la serie Mapocho (CIREN, 1996), en una proporción 4:1. El estado de las plantas al momento de ser trasplantadas a las macetas de 20L, fue de plantas sanas, con follaje expuesto y bajo sombreadero durante enero 2011.

Los fungicidas a evaluar fueron la formulación de ciprodinil (375g/kg), & fludioxonil (250g/kg) (SWITCH®), y fenhexamid (500g/L), (Teldor®); más un surfactante TWEEN®20.

### Metodología

Se implementaron dos ensayos independientes correspondientes a cada variedad. El tratamiento testigo correspondió a la aplicación de agua más surfactante, los tratamientos T1 y T3 a las concentraciones de Switch y Teldor recomendadas por el fabricante; T2 y T4 corresponden doble de la concentración utilizadas en T1 y T3 (Cuadro 1).

Las plantas fueron mantenidas durante el periodo del ensayo en el sector de invernaderos del Campus Antumapu. Las aplicaciones se realizaron una vez para cada ensayo. El momento de la aplicación se realizó una vez que las plantas alcanzaron brotes con 10 nudos de largo. Los tratamientos fueron aplicados con un rociador manual hasta el punto de goteo y las mediciones fueron realizadas sobre hojas adultas sanas un día antes de aplicar fungicida y a los 1, 5, 10 y 20 días después de efectuadas las aplicaciones en cada ensayo.

Cuadro 1. Tratamientos

---

Ensayo No.1 Cv. Thompson Seedless	
Tratamiento	Concentración
T0: Testigo	Agua+ Tween20 0,1%
T1: ciprodinil (375g/kg) & fludioxonil (250g/kg)	60gr/hL agua+ Tween20 0,1%
T2: ciprodinil (375g/kg) & fludioxonil (250g/kg)	120gr/hL agua+ Tween20 0,1%
T3: fenhexamid (500g/L)	72,5cc/hL agua+ Tween20 0,1%
T4: fenhexamid (500g/L)	145cc/hL agua+ Tween20 0,1%

Ensayo No.2 Cv. Chardonnay	
Tratamiento	Concentración
T0: Testigo	Agua+ Tween20 0,1%
T1: ciprodinil (375g/kg) & fludioxonil (250g/kg)	60gr/hL agua+ Tween20 0,1%
T2: ciprodinil (375g/kg) & fludioxonil (250g/kg)	120gr/hL agua+ Tween20 0,1%
T3: fenhexamid (500g/L)	72,5cc/hL agua+ Tween20 0,1%
T4: fenhexamid (500g/L)	145cc/hL agua+ Tween20 0,1%

### Evaluaciones:

#### Fotoinhibición por medio de Fluorescencia de clorofila:

Este parámetro se determinó con un fluorómetro no modulado portátil (Hansatech, UK), en secciones de hoja oscurecidas por 30 minutos, para obtener parámetros de fluorescencia inicial ( $F_o$ ), fluorescencia máxima ( $F_m$ ) y fluorescencia variable ( $F_v$ ) que corresponde a  $F_m - F_o$  y la relación  $F_v/F_m$  (Maxwell & Giles, 2000). El parámetro  $F_v/F_m$  luego de someter las hojas a media hora de oscuridad es un indicador del nivel de fotoinhibición de las plantas.

La medición se realizó sobre una hoja de cada planta, 5 veces en el día, a las 9:45 h, 11:45 h, 13:45 h, 15:45 h y 17:45 h.

### **Contenido de clorofila:**

A una hoja por planta (de cada tratamiento y repetición) se le determinó el contenido de clorofilas. A la hoja se le extrajo un disco de 1,2 cm de diámetro, el que fue almacenado en un freezer de ultra baja temperatura a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de su determinación. Al momento de la evaluación los discos fueron macerados con un mortero de porcelana mantenido en hielo con 500  $\mu\text{L}$  de etanol 80%, arena de cuarzo y 1 mL de acetona al 80%. El macerado fue transferido a un tubo Eppendorf y se diluyó con etanol 80% hasta alcanzar 1 mL de solución.

Esta solución se centrifugó durante 3 min a 12.000 g, luego se extrajo una alícuota de 1 mL del sobrenadante y se diluyó en 2,5 mL de etanol al 80% y sobre esta nueva solución se leyó la absorbancia a 633 nm y a 646 nm en un espectrofotómetro (SHIMADZU, Japan; Modelo UV-1601).

El cálculo de los contenidos de clorofila *a*, *b* y total se realizó de acuerdo a las siguientes ecuaciones (Ni, et al. 2009):

$$Ca \text{ (mg/g)} = [12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}] \times V / 1000 \times W \text{ (Clorofila } a\text{)}$$

$$Cb \text{ (mg/g)} = [22.9 \times A_{645} - 4.86 \times A_{663}] \times V / 1000 \times W \text{ (Clorofila } b\text{)}$$

$$Ca+b \text{ (mg/g)} = [8.02 \times A_{663} + 20.20 \times A_{645}] \times V / 1000 \times W \text{ (Clorofila } a+b\text{)}$$

Donde, V = volume del extracto (ml); W = peso de las hojas frescas (g).

### **Tasa de asimilación CO<sub>2</sub>:**

La asimilación neta de CO<sub>2</sub> fue determinada en una hoja adulta de cada planta, utilizando un analizador infrarrojo de gases (IRGA, CIRAS 2, PP Systems, U.S.A.). Se utilizó una concentración fija de 350 mL/L de CO<sub>2</sub> y a una temperatura de 25°C (Hunt S. 2003). Las determinaciones se realizaron en hojas expuestas a la luz 5 veces en el día, a las 9:30 h, 11:30 h, 13:30 h, 15:30 h y 17:30 h.

**Permeabilidad Relativa de Membranas (TPR):**

Se realizó sobre 4 discos de hojas de 1 cm de diámetro de una hoja por cada repetición. Los discos de hoja se lavaron con agua destilada y se dejaron en remojo en 25 mL de agua destilada en vasos de precipitado por 5 horas, midiéndose la conductividad eléctrica (CE) del agua al final del período. Esta medición corresponde a la CE inicial ( $CE_i$ ). Luego, se colocaron a 80° C en baño maría por 15 minutos y se dejaron enfriar por 1 hora, determinándose la CE del efluente de remojo. Esta última lectura corresponde a la CE final ( $CE_f$ ). Para medir la CE se utilizó un conductivímetro (Oakton-con, SING.). La TPR (%) se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$TPR = (CE_i / CE_f) \times 100$$

**Diseño experimental y análisis estadístico:**

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 5 tratamientos y 4 repeticiones por tratamiento (Cuadro 2). La unidad experimental correspondió a una planta y la unidad muestral correspondió a una hoja adulta sana. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) y al test de comparación múltiple Tukey con un nivel de significancia del 5% cuando se detectaron diferencias significativas.

## RESULTADOS

### Datos climáticos

#### Radiación fotosintéticamente activa (PAR):

Los datos de radiación PAR medidos durante el ensayo de Thompson Seedless, se presentan en la figura 1A y los registrados durante el ensayo en Chardonnay, en la figura 1B. Los valores se incrementan durante las primeras horas del día, hasta las 13:00 h aproximadamente para disminuir en la tarde. Esto es más notorio en el ensayo de Chardonnay, ya que, en el ensayo de Thompson Seedless existió una mayor variación de la radiación PAR en las mediciones realizadas a las 15:30 h y 17:30 h. En los datos registrados a las 15:30 h, la medición PAR fue entre 1512  $\mu\text{mol PAR m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y 2160  $\mu\text{mol PAR m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Mientras que, la radiación PAR registrada a las 17:30 h, va desde los 1136  $\mu\text{mol PAR m}^{-2}\text{s}^{-1}$  hasta 1700  $\mu\text{mol PAR m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

#### Temperatura del aire:

Cuadro de temperaturas mínimas y máximas durante el periodo de medición de ambos ensayos:

Cuadro 2.

Thompson Seedless					
	28-nov	30-nov	05-dic	09-dic	19-dic
MIN (°C)	8,9	11,8	10,1	12,3	13,3
MAX (°C)	30,4	32,4	28,9	30	31,3
Chardonnay					
	06-dic	08-dic	13-dic	17-dic	27-dic
MIN (°C)	11,3	12,6	12,3	11,1	14,4
MAX (°C)	27	31,2	28,7	28,5	31,3

Fuente: [www.Agroclima.cl](http://www.Agroclima.cl), informes agroclimáticos, estación La Platina INIA.

Los registros de temperaturas durante el ensayo de Thompson Seedless indicaron temperaturas máximas entre 28,9° C y 32,4°C. Las temperaturas mínimas a su vez



variaron entre 8,9°C y 13,3°C. Para el ensayo en Chardonnay las temperaturas máximas oscilaron entre 27°C y 31,3°C. Y las temperaturas mínimas variaron entre 11,1°C y 14,4°C.

### **Ensayo Chardonnay**

Los valores de  $F_v/F_m$  (Fig. 2A-E), obtenidos durante el ensayo no presentaron diferencias entre tratamientos. Estos se mantuvieron sobre 0,8 para todos los tratamientos evaluados durante los días de medición. Excepcionalmente el día veinte después de la aplicación de fungicidas (Fig. 2E), a las 15:45 h, en el tratamiento T4 (fenhexamid de dosis elevada) promedió 0,78 para este parámetro sin diferencias significativas entre tratamientos.

En relación a los contenidos de clorofila los resultados no presentaron diferencias entre tratamientos en ninguno de los días de evaluación (Fig. 3A). Los valores promedios de clorofila *a* variaron entre los 5,81 mg m<sup>-2</sup> y 6,19 mg m<sup>-2</sup>. Los valores de clorofila *b* (Fig. 3B), en las respectivas fechas de medición variaron entre 9,31 mg m<sup>-2</sup> y 10,79 mg m<sup>-2</sup>. Finalmente los valores promedios de clorofila total (Fig. 3C), resultaron entre 14,72 mg m<sup>-2</sup> y 17,25 mg m<sup>-2</sup>.

### **Tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>:**

El parámetro de fotosíntesis neta, expresado como  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , no presentó diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tratamientos durante el periodo evaluado (Fig. 4A-E). En general, todos los tratamientos mantuvieron una tasa de asimilación baja previo a la aplicación de los fungicidas. La evaluación realizada un día después de las aplicaciones, presenta valores de asimilación variables en cada hora de medición. Al sexto día luego de la aplicación, se presentaron los niveles de asimilación más altos de todo el ensayo, con un valor promedio máximo de 9,75  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$  registrado a las 11:30 h. Finalmente, al último día de mediciones, los valores de asimilación de CO<sub>2</sub> son bajos en comparación a la tasa de fotosíntesis de los días anteriores. Excepcionalmente, se registró que T3 alcanzó una tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> de 0,87  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , mayor al resto de los tratamientos (Fig. 4E), mientras que durante el resto del día no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

Los valores obtenidos para el parámetro de la actividad transpiratoria fueron muy similares entre sí (Fig. 5A-E), sin diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en

ningún día de medición. El comportamiento de la curva diaria de la tasa transpiratoria sigue el patrón de temperatura ambiental.

Los niveles de la conductancia estomatal tampoco presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos a lo largo de del ensayo (Fig. 6A-E), y se puede apreciar que la conductancia estomática sigue el mismo comportamiento que el observado en la Tasa transpiratoria (Fig. 5A-E).

En cuanto al parámetro de temperatura foliar, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tratamientos a lo largo del ensayo (Fig. 7A-E). Las temperaturas más bajas fueron registradas a las 9:30 h, en cambio las temperaturas más altas se registran durante la tarde entre las 13:30 h y 15:30 h, alcanzando un promedio máximo de 38°C a los veinte días después de la aplicación (Fig. 7E).

Los resultados obtenidos en la medición de Permeabilidad de Membranas, presentan el mismo comportamiento durante el periodo del ensayo, no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Figura 8A-E). Los valores obtenidos aumentan durante el transcurso del tiempo. El mayor incremento entre una medición y la siguiente ocurrió durante la primera media hora.

### **Ensayo Thompson Seedless**

Los valores de Fv/Fm obtenidos un día previo a la aplicación muestran diferencias significativas entre tratamientos a las 11:45 h (Fig. 2F), donde T2, T4, T1 y T3 alcanzaron valores sobre 0,8 y más altos que el testigo, el cual alcanzo un valor Fv/Fm de 0,77. Esta situación se vuelve a repetir a las 15:45 h. El resto de las mediciones del día no registró diferencias. Un día después de la aplicación a las 11:45 h (Fig. 2G), los tratamientos T4, T0, T1, T3 alcanzaron valores cercanos a 0,8, estadísticamente superiores a T2, con un valor Fv/Fm de 0,69. A las 15:30 h también se detectaron diferencias significativas entre tratamientos en que T2 alcanzó un nivel menor al de los tratamientos restantes, pero sólo en ese momento del día. Al sexto día luego de la aplicación (Fig. 2H), a las 9:30 h se detectaron diferencias estadísticas entre tratamientos pero esta vez el tratamiento testigo alcanzó un valor Fv/Fm de 0,78 diferenciándose del resto de los tratamientos que alcanzaron valores sobre 0,8. Para las siguientes mediciones realizadas durante el ensayo no se detectaron diferencias entre tratamientos.

Respecto a los niveles de pigmentos fotosintéticos, los valores de clorofila *a* obtenidos un día antes de la aplicación (Fig. 3D) no muestran diferencias estadísticamente significativas

entre tratamientos. Un día después de las aplicaciones el tratamiento testigo alcanzó un mayor valor respecto al resto de los tratamientos alcanzando  $6,7 \text{ mg cm}^{-2}$ . T3 y T2 fueron los tratamientos con valores de clorofila *a* más bajos con valores de  $5,87$  y  $5,73 \text{ mg cm}^{-2}$  respectivamente. En los siguientes días de mediciones no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. El contenido de clorofila *b*, fue similar en los distintos tratamientos (Fig. 3E) a lo largo del ensayo, excepto en el día veinte luego de la aplicación en que el tratamiento. T4 presentó el valor más alto, correspondiente a  $9,6 \text{ mg cm}^{-2}$ , y T1 el más bajo con un valor de  $8,37 \text{ mg cm}^{-2}$ . Al analizar el contenido de clorofila total (fig. 3F), un día antes de las aplicaciones, T0 fue el tratamiento que presentó los niveles de clorofila total más bajos respecto a los otros tratamientos, alcanzando valores de  $11,3 \text{ mg cm}^{-2}$ , mientras que T2 y T4 tuvieron los niveles más altos de clorofila total, con valores de  $14,25 \text{ mg cm}^{-2}$  y  $13,75 \text{ mg cm}^{-2}$  respectivamente, con diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ). Durante el resto del ensayo, no se presentaron diferencias entre tratamientos. El comportamiento de la curva fue el mismo que tienen los contenido de clorofila *a* y *b* graficados.

#### **Tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>:**

La fotosíntesis neta, previo al inicio del ensayo, registró diferencias entre tratamientos a las 11:30 h, donde el tratamiento testigo presentó el valor más alto correspondiente a  $5,5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$  en comparación al resto de los tratamientos, cuyos valores de fotosíntesis neta fueron de  $2,25 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para T3;  $1,96 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para T1 y  $1,07 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para T2 (Fig. 4F). Luego, a las 15:30 h se volvieron a detectar diferencias significativas entre tratamientos, pero esta vez T3 fue el tratamiento con mayor tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> alcanzando un valor de  $4,2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , mientras que T0, T4, T1 y T2 fueron significativamente menores. En las mediciones realizadas el día 10, se registraron los mayores niveles de tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>, sin embargo a las 11:30 h, los tratamientos T4 con  $10,63 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y T2 con  $10,17 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , alcanzaron los valores más altos respecto a al testigo que registró  $5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . A las 13:30 h nuevamente hay diferencias entre tratamientos, donde T2 fue el tratamiento que alcanzó una mayor fotosíntesis con  $7,5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y T0 fue el tratamiento más bajo, con un valor de  $3,87 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Finalmente el último día del ensayo se encontraron diferencias entre tratamientos a las 13:30 h en que, el tratamiento T1 alcanzó en valor más alto, de  $5,1 \text{ CO}_2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , mientras que T0 fue el tratamiento con el valor más bajo alcanzando  $0,9 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

En cuanto a la transpiración (fig. 5F-J), en las mediciones realizadas un día después de la aplicación, a las 13:30 h, T2 fue el tratamiento que alcanza el valor más alto con respecto al

testigo con  $2,36 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y  $0,75 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$  respectivamente. Más tarde ese mismo día a las 15:30 h, el tratamiento testigo fue el que alcanzó el valor más alto de transpiración junto a T2 alcanzando valores de  $2,9 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y  $2,6 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$  respectivamente, y T3 el valor más bajo correspondiente a  $0,78 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Al sexto día luego de las aplicaciones (fig. 5H), se detectaron diferencias entre tratamientos a las 9:30 h, donde T4 alcanzó la mayor tasa transpiratoria, de  $3,07 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y T3 resultó con el menor valor alcanzando  $1,17 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . En los días siguientes lecturas a lo largo del ensayo, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

Los valores de Conductancia estomática a las 15:30 h, un día previo a las aplicaciones (Fig. 6F), el tratamiento T3 mostró una mayor conductancia estomática que el resto de los tratamientos alcanzando un valor de  $24 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Un día después de la aplicación a partir de las 13:30 h se detectaron diferencias significativas, donde el tratamiento T2 alcanzó el valor más alto, de  $33,25 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  respecto al resto de los tratamientos y en que T0 presentó los menores valores de conductancia estomática, de  $8 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  aproximadamente. La situación cambia completamente a las 15:30 h, donde T0 alcanza el mayor valor de conductancia junto a T2 con valores de  $46 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y  $42,5 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , respectivamente, mientras que, T3 pasa a ser el tratamiento más bajo de todos. A las 17:30 h los tratamientos vuelven a cambiar su comportamiento siendo T4 el tratamiento con un valor de  $44,6 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  en cambio T1 y T0 pasan a ser los más bajos alcanzando valores de  $21,2 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y  $17,5 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  respectivamente. Al sexto día después de las aplicaciones a las 9:30h (Fig.6H), T4 alcanzó un valor de conductancia estomática de  $95,7 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , siendo el más alto respecto a los demás tratamientos. Para las siguientes mediciones no se detectaron diferencias entre tratamientos.

En los datos de temperatura foliar no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tratamientos para cada hora medida, como en ninguno de los días en los cuales se registraron los datos (fig. 7F-J). Las temperaturas más altas se registraron entre las 13:30 h y las 15:30 h, alcanzando un valor máximo de  $40,4^\circ\text{C}$  al sexto día después de las aplicaciones. En cambio las temperaturas más bajas se registraron a las 9:30 h, alcanzando un valor mínimo de  $29,1^\circ\text{C}$ .

En cuanto a la permeabilidad de membranas (RLR), los resultados obtenidos un día previo a las aplicaciones solo se encontraron diferencias entre los tratamientos a las 0h y 1/2h. Posterior a ello, no se volvieron a detectar diferencias significativas entre tratamientos durante el ensayo (fig. 8F-J). Los valores obtenidos aumentaron en el transcurso de las mediciones. El mayor incremento entre una medición y la siguiente ocurrió durante la primera media hora.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Radiación solar fotosintéticamente activa (PAR) durante el día de medición, en el ensayo Thompson Seedless (A) y ensayo Chardonnay (B).

Figura 2. Fluorescencia de la clorofila, medidas a las 9:30h, 11:30h, 13:30h, 15:30h y 17:30h. Desde 1 día antes de las aplicaciones y 1, 6, 10, 20 días después de las aplicaciones. En plantas tratadas con ciprodinil & fludioxonil 60gr/hL (T1), ciprodinil & fludioxonil 120gr/hL (T2), fenhexamid 72,5cc/hL (T3), fenhexamid 145cc/hL (T4) y Testigo (T0). Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticas entre tratamientos ( $P < 0,05$ ).

Figura 3. Contenido de clorofilas, medidas a las 9:30h, 11:30h, 13:30h, 15:30h y 17:30h. Desde 1 día antes de las aplicaciones y 1, 6, 10, 20 días después de las aplicaciones. En plantas tratadas con ciprodinil & fludioxonil 60gr/hL (T1), ciprodinil & fludioxonil 120gr/hL (T2), fenhexamid 72,5cc/hL (T3), fenhexamid 145cc/hL (T4) y Testigo (T0). No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$ ).

Figura 4. Tasa fotosintética, medidas a las 9:30h, 11:30h, 13:30h, 15:30h y 17:30h. Desde 1 día antes de las aplicaciones y 1, 6, 10, 20 días después de las aplicaciones. En plantas tratadas con ciprodinil & fludioxonil 60gr/hL (T1), ciprodinil & fludioxonil 120gr/hL (T2), fenhexamid 72,5cc/hL (T3), fenhexamid 145cc/hL (T4) y Testigo (T0). Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticas entre tratamientos ( $P < 0,05$ ).

Figura 5. Tasa transpiratoria, medidas a las 9:30h, 11:30h, 13:30h, 15:30h y 17:30h. Desde 1 día antes de las aplicaciones y 1, 6, 10, 20 días después de las aplicaciones. En plantas tratadas con ciprodinil & fludioxonil 60gr/hL (T1), ciprodinil & fludioxonil 120gr/hL (T2), fenhexamid 72,5cc/hL (T3), fenhexamid 145cc/hL (T4) y Testigo (T0). No se detectaron diferencias entre tratamientos ( $P < 0,05$ ).

Figura 6. Conductancia estomática, medidas a las 9:30h, 11:30h, 13:30h, 15:30h y 17:30h. Desde 1 día antes de las aplicaciones y 1, 6, 10, 20 días después de las aplicaciones. En plantas tratadas con ciprodinil & fludioxonil 60gr/hL (T1), ciprodinil & fludioxonil 120gr/hL (T2), fenhexamid 72,5cc/hL (T3), fenhexamid 145cc/hL (T4) y Testigo (T0). No se detectaron diferencias entre tratamientos ( $P < 0,05$ ).

Figura 7. Temperatura foliar, medidas a las 9:30h, 11:30h, 13:30h, 15:30h y 17:30h. Desde 1 día antes de las aplicaciones y 1, 6, 10, 20 días después de las aplicaciones. En plantas tratadas con ciprodinil & fludioxonil 60gr/hL (T1), ciprodinil & fludioxonil 120gr/hL (T2), fenhexamid 72,5cc/hL (T3), fenhexamid 145cc/hL (T4) y Testigo (T0). No se detectaron diferencias entre tratamientos ( $P < 0,05$ ).

Figura 8. Tasa de permeabilidad relativa de membranas, medidas a las 9:30h, 11:30h, 13:30h, 15:30h y 17:30h. Desde 1 día antes de las aplicaciones y 1, 6, 10, 20 días después de las aplicaciones. En plantas tratadas con ciprodinil & fludioxonil 60gr/hL (T1), ciprodinil & fludioxonil 120gr/hL (T2), fenhexamid 72,5cc/hL (T3), fenhexamid 145cc/hL (T4) y Testigo (T0). No se detectaron diferencias entre tratamientos ( $P < 0,05$ ).

Figura 1.

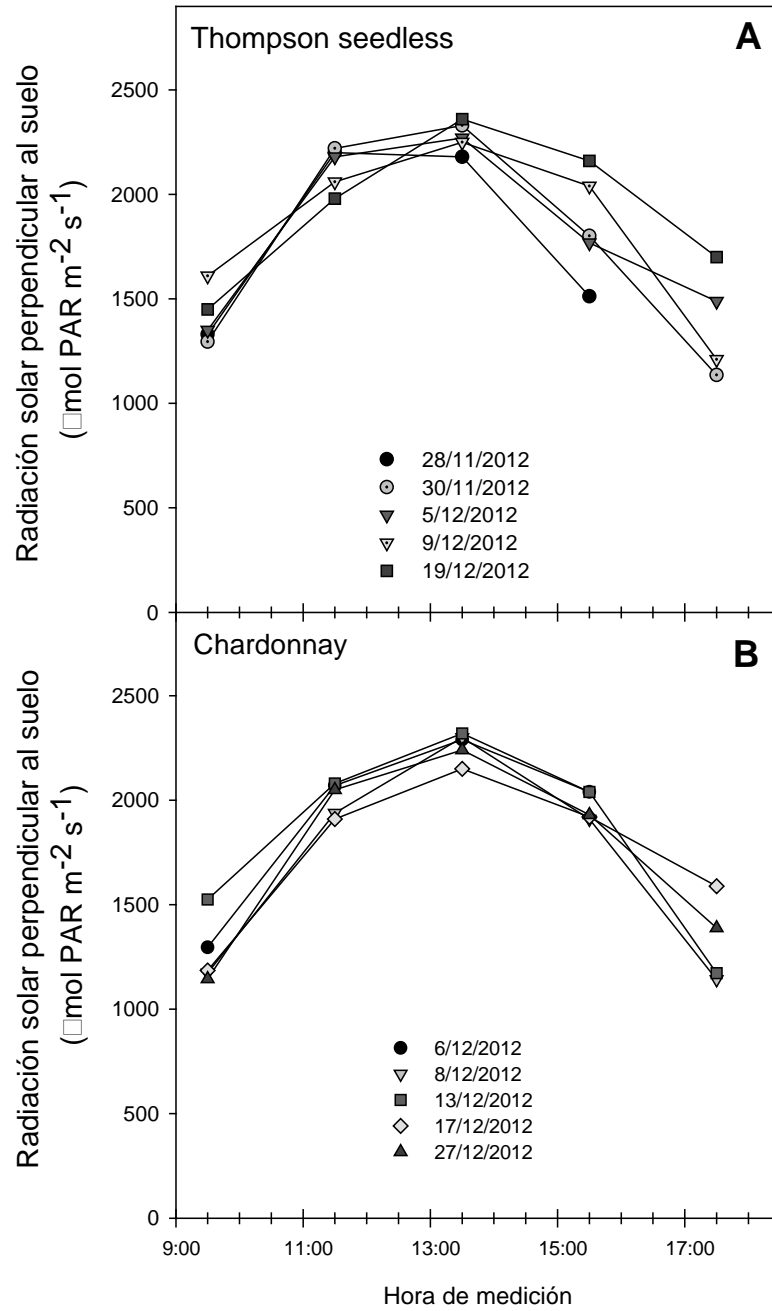


Figura 2.

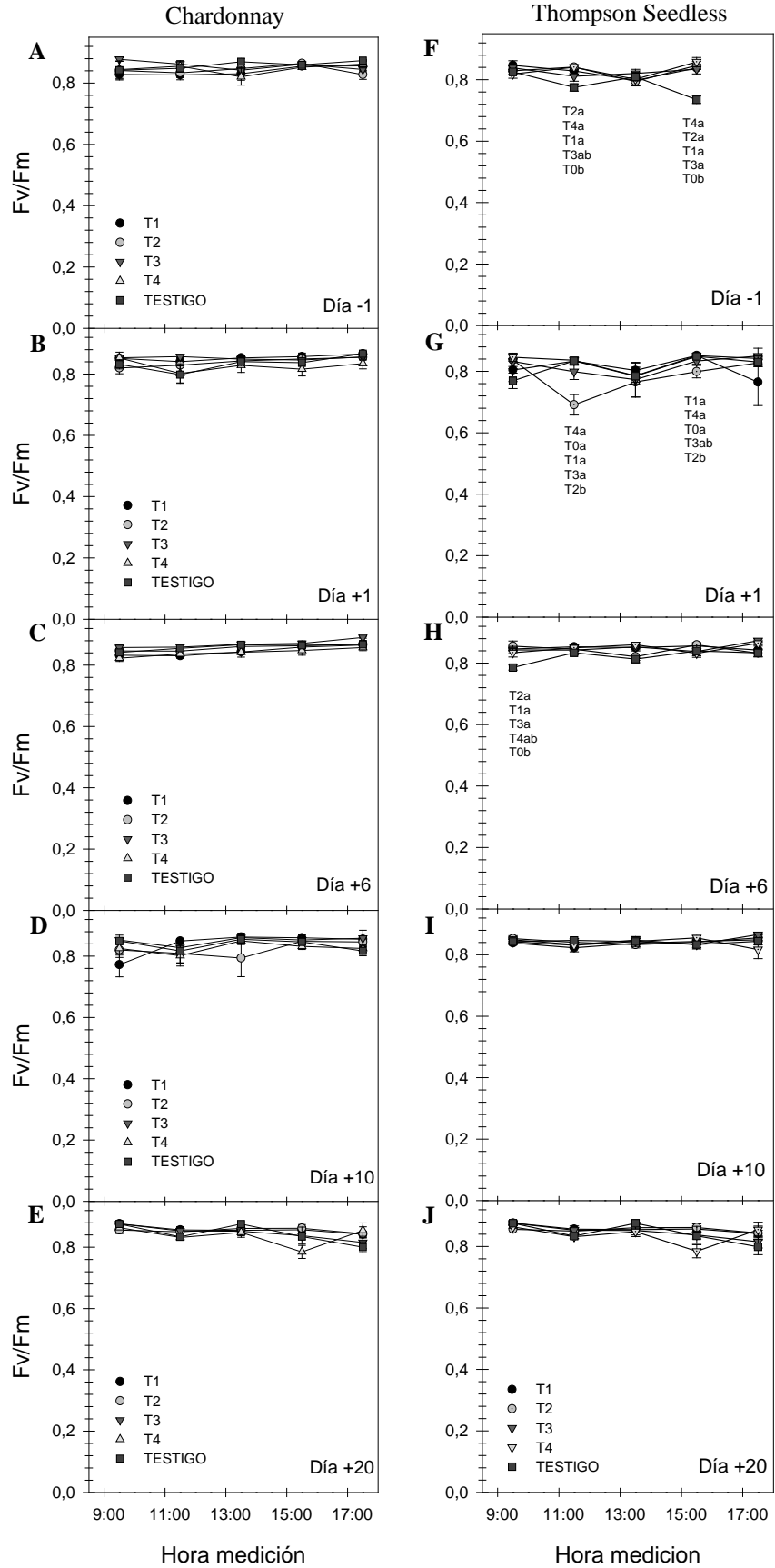




Figura 3.

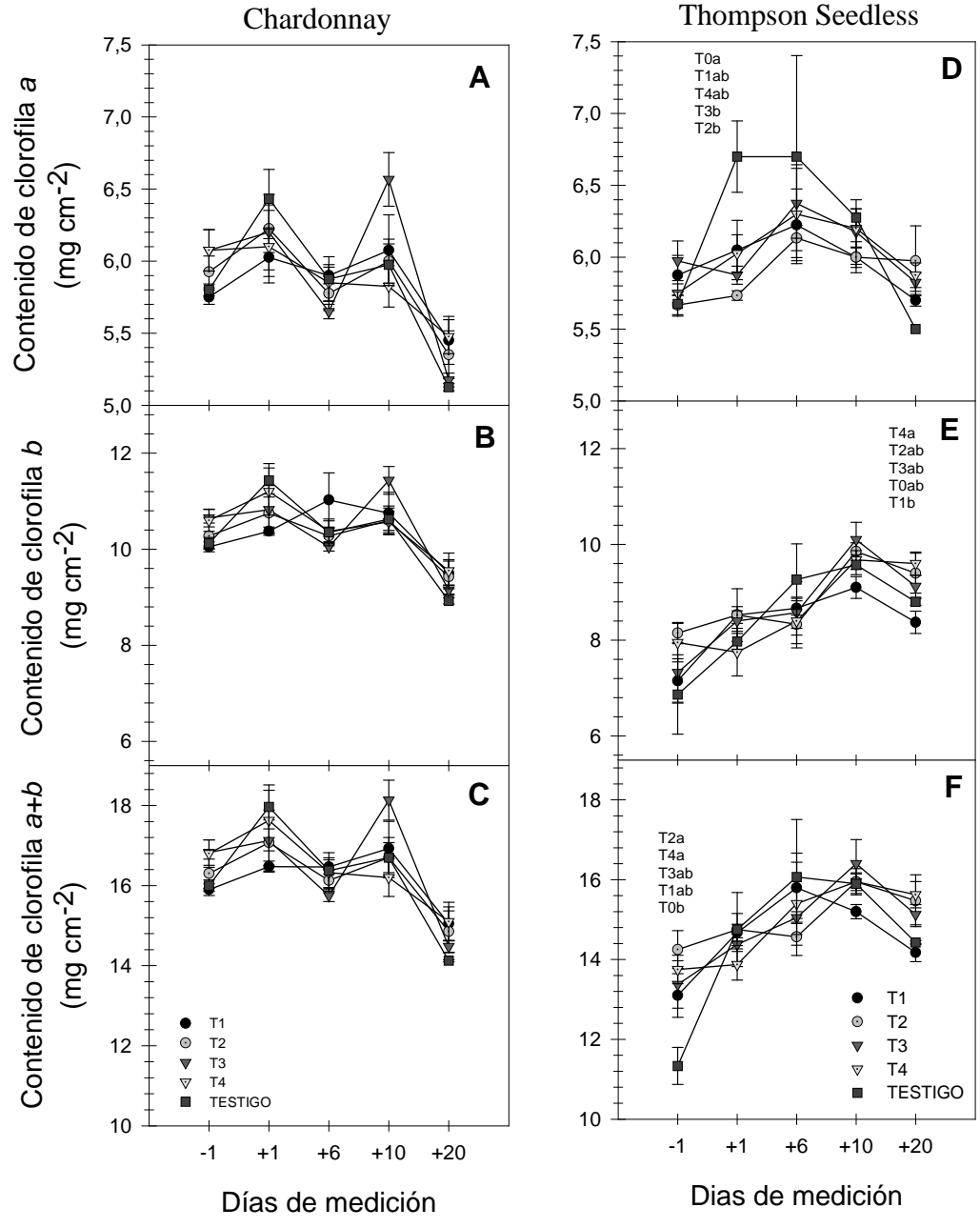


Figura 4.

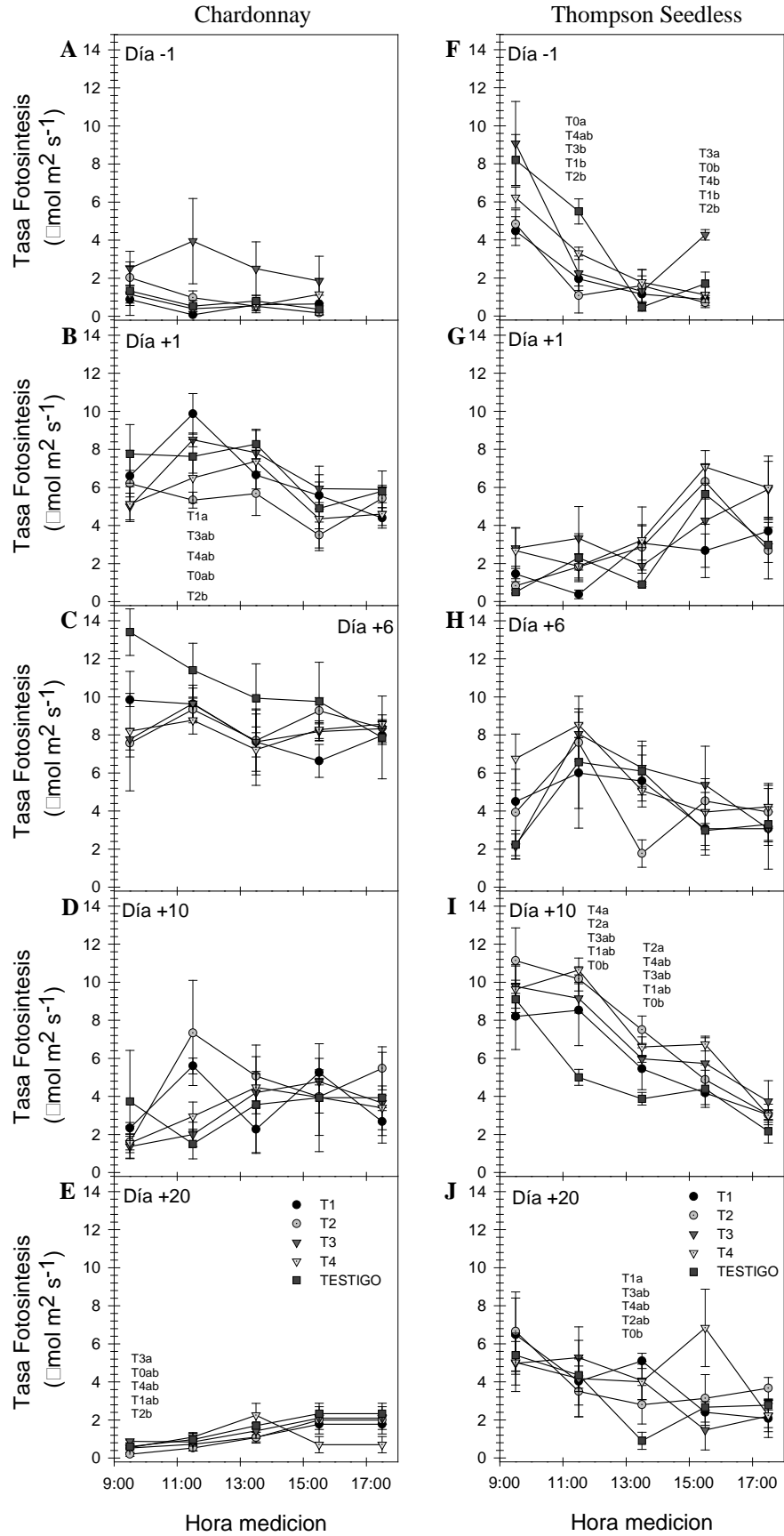


Figura 5.

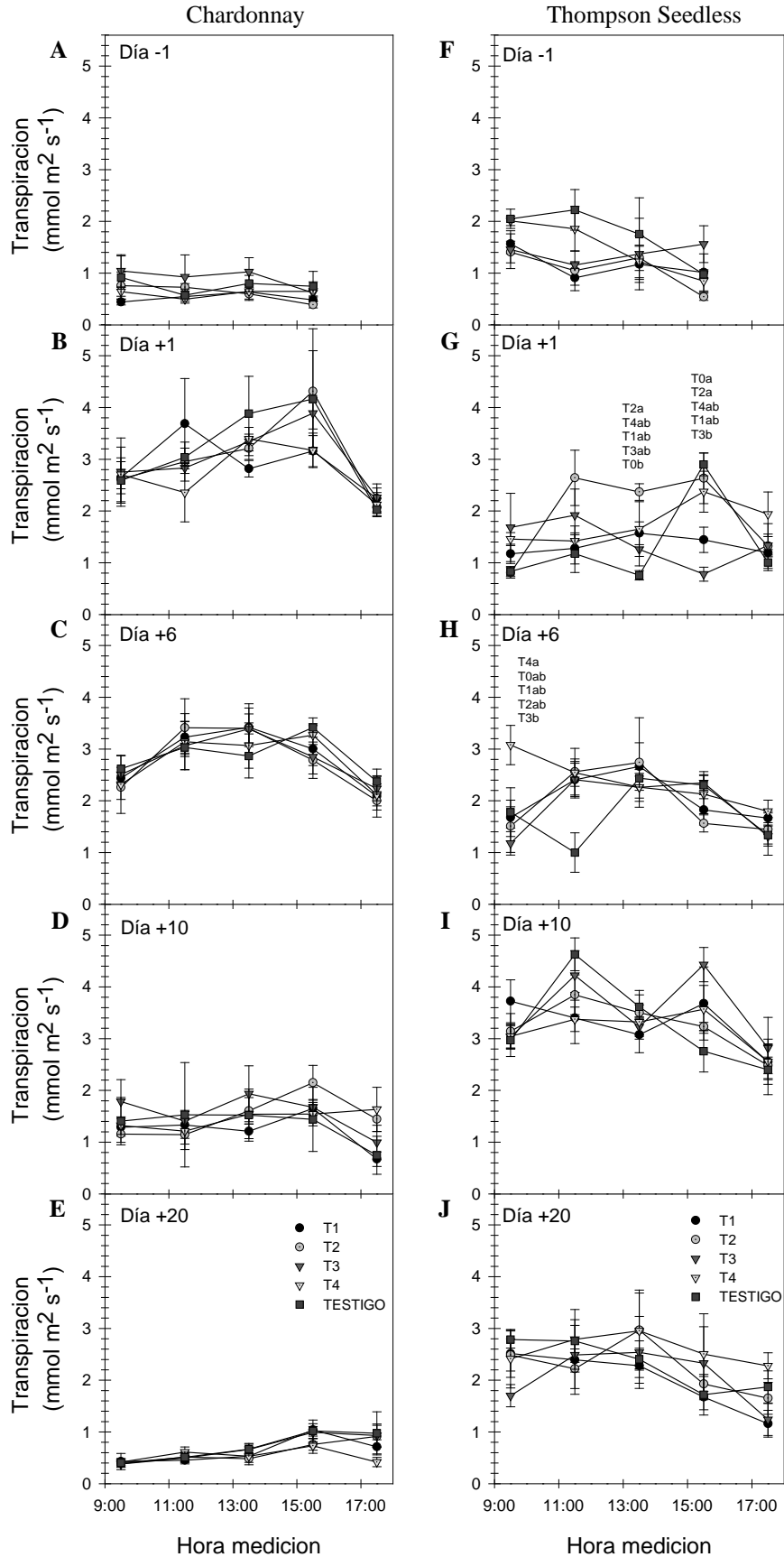


Figura 6.

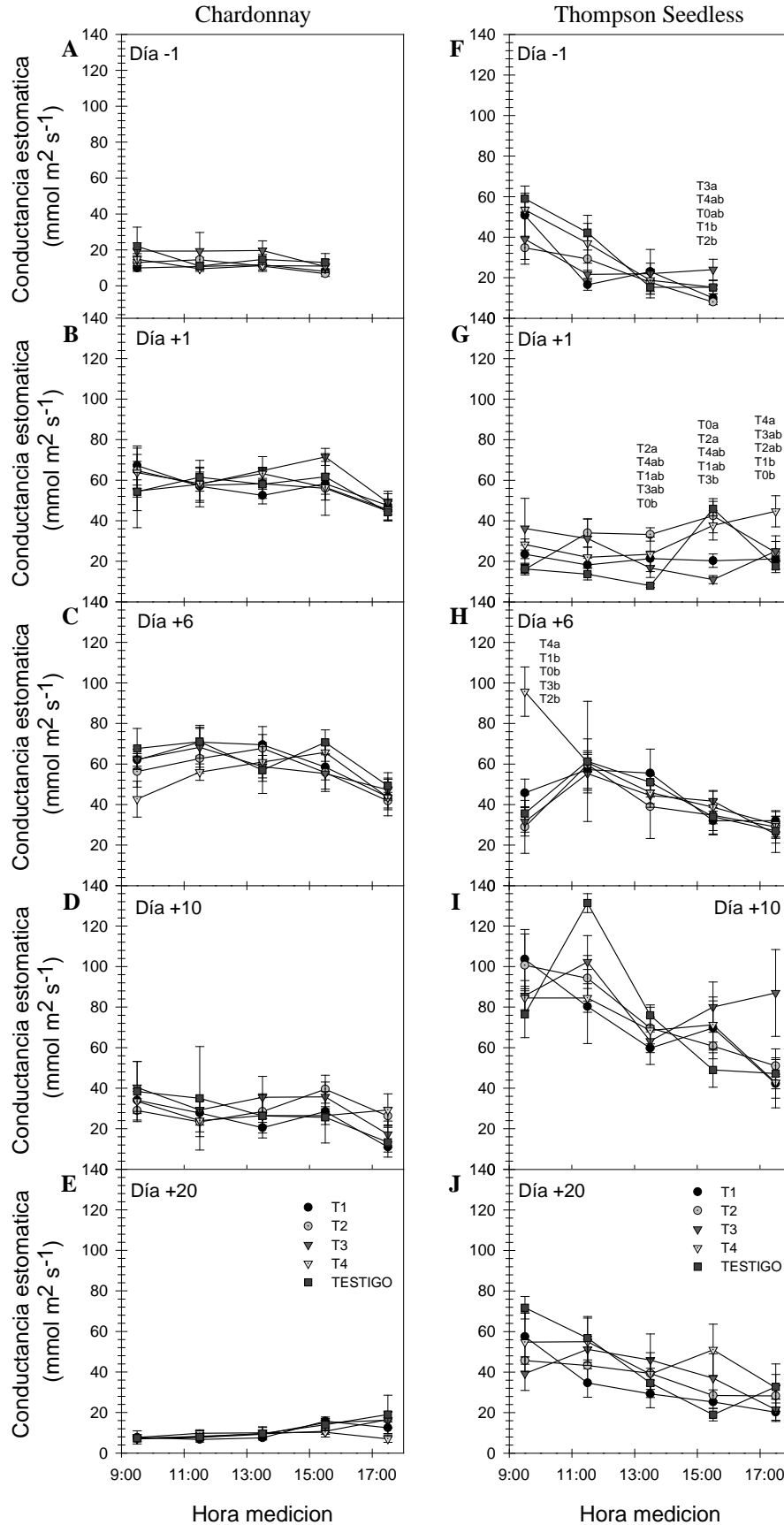


Figura 7.

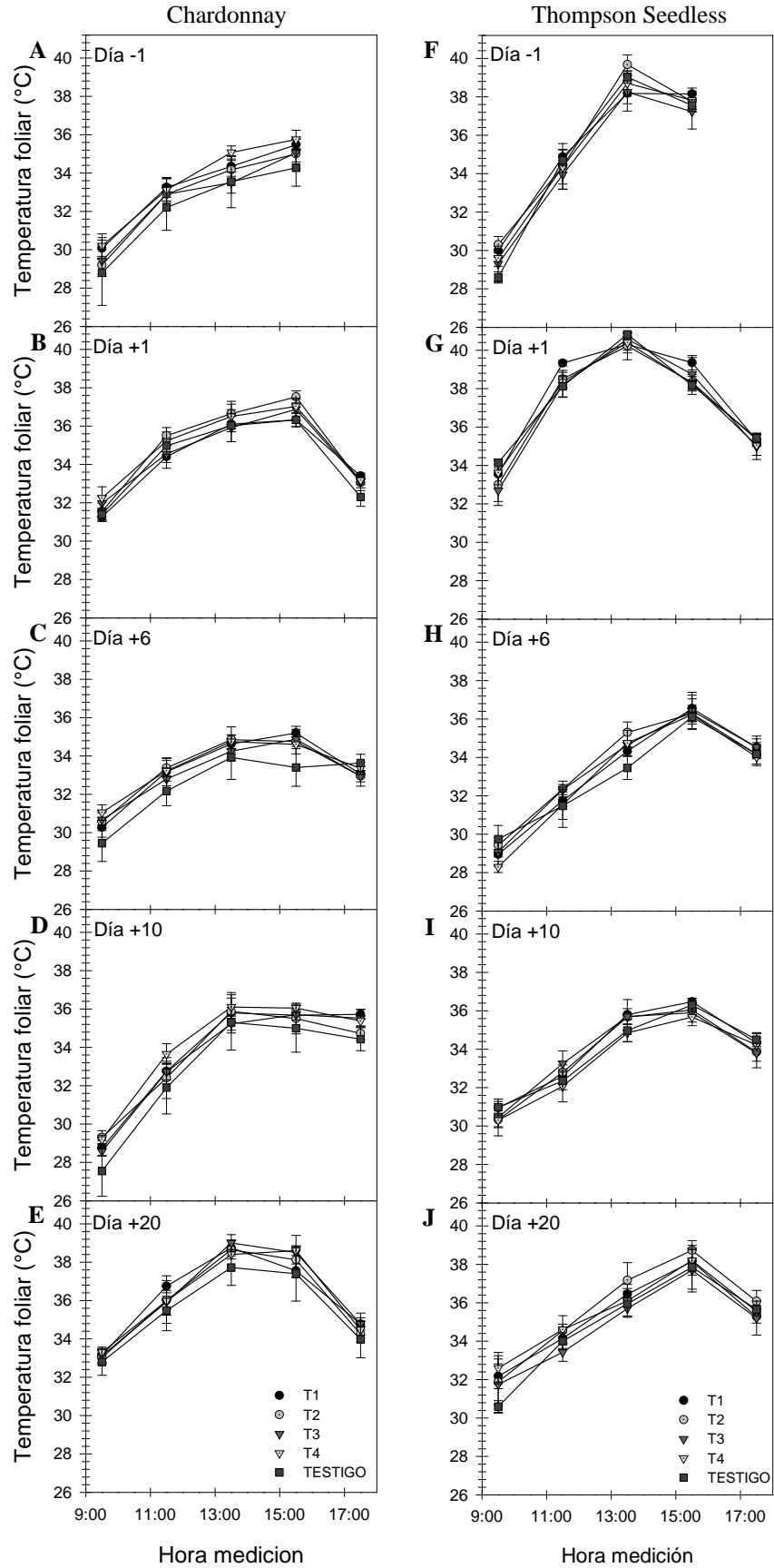
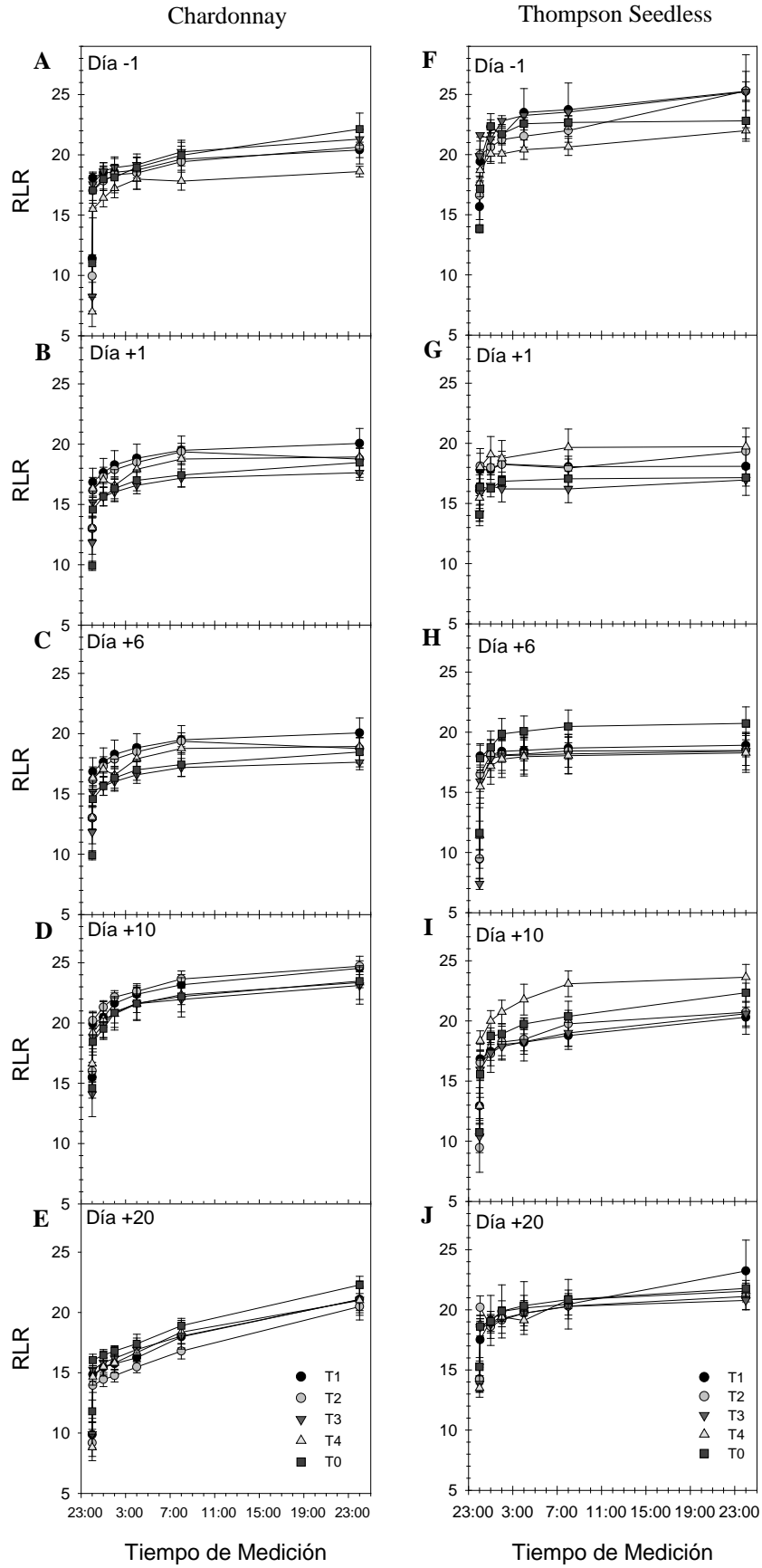


Figura 8.



## DISCUSIÓN

La determinación de la recuperación del rendimiento cuántico es un excelente indicador cuantitativo del efecto del estrés sobre el sistema fotosintético, provocado por el exceso de radiación absorbida y la fotoinhibición (Börkman y Demmig, 1987). En el ensayo realizado en cv. Chardonnay los resultados indican que la aplicación de los fungicidas no afecta a las plantas puesto que no induce disminuciones de los valores Fv/Fm (Baker, 2008). Los valores de este parámetro durante el ensayo no disminuyeron a niveles menores a 0,8, que es un nivel definido como sin estrés aparente (Börkman y Demmig, 1987). Sin embargo en el ensayo realizado por Vaillant-Gaveau *et al.*, (2008) evaluando el efecto del fludioxonil en el parámetro Fv/Fm, demostró que este parámetro fue reducido por el fungicida, provocando una disminución de este valor. Los resultados obtenidos en Thompson Seedless evidenciaron una gran variabilidad de este parámetro pudiendo interpretarse como algún grado de fotoinhibición con valores Fv/Fm por debajo del umbral señalado. Tales bajos valores se registraron a las 11:45 h y 15:45 h, momento en el que la temperatura y luz incidente son máximos permitiendo una reducción temporal en la asimilación de CO<sub>2</sub> (Keller, 2010). Sin embargo, esta situación se observó un día antes de la aplicación en el testigo que presentó el valor más bajo de Fv/Fm, aunque también alcanzó la mayor tasa fotosintética respecto a los otros tratamientos en ese mismo momento. Baker (2008) señala que las plantas estresadas, con disminuciones en el valor Fv/Fm, indican que la eficiencia de la fotosíntesis se encuentra comprometida. Un día después de la aplicación, las plantas del tratamiento con ciprodinil & fludioxonil en dosis elevada (T2) presentaron algún grado de fotoinhibición a las 11:45 h y a las 15:45 h, sin embargo, al final del día los niveles de Fv/Fm se recuperaban completamente, lo que indica que cualquier eventual problema que haya inducido a disminuciones de Fv/Fm fueron muy puntuales y transitorios. Sólo una vez fue detectado un valor Fv/Fm bajo 0,8 en la primera medición del día.

En relación a la tasa fotosintética, como captura neta de CO<sub>2</sub>, ambos ensayos mostraron distintos resultados. Previo a la aplicación de los fungicidas, las plantas de Thompson Seedless presentaron diferencias y una alta variabilidad, sin una consistencia a los largo del tiempo respecto de los tratamientos. Sin embargo en otros estudios se ha observado que los fungicidas fludioxonil y pirimetanil, promueven una mayor tasa fotosintética (Saladin *et al.*, 2003), en este estudio la elevada variabilidad de los resultados sugiere que plantas jóvenes de la variedad Thompson Seedless son fuertemente influidas por condiciones ambientales, el estado de desarrollo, lo que imposibilita o dificulta estudios como los aquí realizados. En el cv. Chardonnay, al contrario, la fotosíntesis no fue afectada con los fungicidas, excepto a las 11:30 h un día después de la aplicación en que se detectaron diferencias (Fig. 4B), pero sin relación entre los fungicidas y sus concentraciones, y sin involucrar a los otros

parámetros fisiológicos evaluados. Estos resultados no concuerdan con los resultados obtenidos por Vaillant-Gaveau *et al.*, (2008), en que plantas de vid expuestas a fungicidas sufren disminuciones en la fotosíntesis neta después de siete días de la aplicación de fludioxonil, variación que no se relacionó con cambios en la conductancia estomática ni en la concentración interna de CO<sub>2</sub>, sugiriendo limitaciones no estomáticas. No obstante, la recuperación de la fotosíntesis neta de plantas de vid expuestas a fungicidas fue observada por Vaillant Gaveau *et al.*, (2008) a los 10 días después, indicando en este caso que el fungicida fludioxonil no persiste por más tiempo. Ni tampoco con los resultados de Xia *et al.*, (2006) que encontró que algunos pesticidas como cuproxat y abamectina, ambos fungicidas, provocan disminuciones en la fotosíntesis neta asociados a factores estomáticos, mientras que el fungicida cyazofamid, causa el mismo efecto pero asociado a limitaciones no estomáticas. Por otro lado, Frankart *et al.*, (2002), reportó que fungicidas antibotriticidas como el fludioxonil y pirimetanil, no tienen efecto en el aparato fotosintético de *Lemna minor* L., similar a los resultados obtenidos en el ensayo de Chardonnay. Los datos obtenidos el día 20 (Fig. 4) en Chardonnay demuestran que otros factores ambientales pueden estar afectando a las plantas, aunque las diferencias en la asimilación fotosintética ocurrió excepcionalmente, solo en la mañana.

El cierre de estomas es, generalmente, considerado como una respuesta fisiológica temprana al estrés (Keller, 2010). La conductancia estomática de las plantas de Chardonnay no fue afectada durante el ensayo y su comportamiento siguió los cambios de luminosidad del día cuyo máximo se registra normalmente al mediodía (Keller, 2010). Por el contrario, en el ensayo en Thompson Seedless las diferencias entre tratamientos se observaron principalmente un día después de la exposición a los fungicidas desde las 13:30 h, situación también observada por Correia (1990), quien señaló que los parámetros de conductancia estomática y fotosíntesis neta son considerablemente reducidos durante la tarde en plantas de *Vitis vinífera* cultivadas en campo. Este comportamiento se repitió a lo largo del ensayo en Thompson seedless, en que los valores de conductancia estomática disminuyeron en todos los tratamientos durante la tarde, mostrando una mayor sensibilidad que el cv. Chardonnay. Estos cambios en la conductancia estomática no están controlados solamente por la disponibilidad de agua en el suelo, sino por una compleja interacción de factores internos y externos de la hoja (Medrano *et al.*, 2001), como podrían eventualmente ser los fungicidas.

Los niveles de luz y temperaturas del aire pueden influir en características de la hoja y en los componentes bioquímicos de la maquinaria fotosintética (Palliotti, 2009). Keller (2010) observó que la temperatura dentro de las hojas es comúnmente 2 a 3°C mayor que la temperatura ambiente pero que puede llegar incluso a 10° de temperatura, al igual que en los ensayos, en que la temperatura de las hojas expuestas a la luz, la fluctuación fue de 7°C. Lo anterior pudo afectar algunos parámetros fisiológicos dadas las altas temperaturas



registradas durante el periodo del ensayo, sugiriendo que las temperaturas diarias durante el periodo de estudio estuvieron ligeramente más altas de lo normal (Santibañez, 2011). Esta situación, según Kadir (2006), pueden afectar a algunos cultivares de *Vitis vinifera* en los parámetros de asimilación de CO<sub>2</sub>, conductancia estomática, contenido de clorofila y tasa transpiratoria, relacionadas con disminuciones de Fv/Fm. Pero como ya se discutió, los valores de Fv/Fm no se vieron afectados a lo largo del ensayo.

En cuanto, a los pigmentos fotosintéticos la mayoría de ellos sirven como un “complejo antena”, captando la luz y transfiriendo la energía a los complejos de centros de reacción. La clorofila *a* y la clorofila *b*, son los pigmentos de las proteínas antenas, más abundantes (Taiz, 2010). En el ensayo de Thompson Seedless, las curvas de los contenidos de clorofila *a*, *b* y total, aumentaron luego de la aplicación de los fungicidas y sólo disminuyeron en la última fecha de muestreo. Un día después de la aplicación de los fungicidas, el contenido de clorofila *a* fue mayor en el testigo, pero según Fanizza (1991) las diferencias en el contenido de clorofilas no se manifiestan al inicio de una inducción de estrés, como podrían haber sido los fungicidas. Las diferencias en Thompson Seedless se manifestaron después de dos semanas, en el contenido de clorofila *b*, donde los tratamientos expuestos a mayor concentración de fungicidas fueron aquellos que presentaron los mayores niveles de clorofila *b* (T2 y T4) sin afectar los contenidos de clorofilas *a* y total. En el ensayo realizado en Chardonnay, los contenidos de clorofila *a*, *b* y total, disminuyeron el día 20 después de las aplicaciones indicando un efecto en el tiempo en todas las plantas, sin distinción de tratamientos. Por otro lado, Fletcher (1986) evaluó fungicidas derivados de los triazoles y encontró que estos pueden ser igualmente potentes como fungicidas o reguladores de crecimiento, donde pueden incrementar significativamente los niveles de clorofila en plantas tratadas. Sin embargo, Saladin *et al.*, (2003) concluyeron en sus resultados que los cambios en los niveles de clorofilas pueden ser dependientes de la dosis y el modelo de planta que se estudie, pero que en plantas adultas bajo condiciones de campo sus resultados indicaron un incremento de los pigmentos fotosintéticos dependiendo de la variedad.

Bajo condiciones de estrés, las membranas de las plantas están sujetas a cambios usualmente asociados a incrementos en la permeabilidad y pérdidas en la integridad de las membranas, por lo tanto la habilidad de la membrana celular de controlar la tasa de movimiento de iones dentro y fuera de la célula es usado como una prueba de daño en un amplio rango de tejidos (Farkhondeh, 2012). Sin embargo, este parámetro no fue afectado por la aplicación de los fungicidas en ninguno de los dos ensayos, indicando que no hay modificaciones en la composición o la estructura de las membranas luego de la aplicación de los fungicidas. Adicionalmente la evolución en el tiempo del parámetro RLR en ambos tratamientos fue mayor durante la primera media hora de medición, coincidiendo con lo

señalado por Simon (1974) quien señala que la fuga de iones se produce más rápidamente durante la primera hora de inmersión del tejido evaluado en el agua.

Por último, Saladin *et al.*, (2003) concluye en sus resultados que los fungicidas no solo actúan como agentes fungistáticos, sino que también tienen efectos secundarios que pueden permitir la capacidad de la planta a defenderse por sí sola contra patógenos, por medio de la estimulación de la actividad fotosintética, que es determinante en la ocurrencia de mecanismos de defensa. En ese mismo sentido Wolfram (1987) señala que los fungicidas de la familia de las pirimidinas, que actúan en la biosíntesis del esterol en hongos, tendrían efectos secundarios no fitotóxicos en el proceso de la inhibición de la síntesis de giberelinas. Los efectos de las aplicaciones de fungicidas pueden afectar la fisiología del cultivo por interrupciones en el desarrollo de órganos reproductivos, alteraciones del metabolismo del nitrógeno y/o carbono llevando a una menor disponibilidad de nutrientes para el crecimiento de la planta (Petit *et al.*, 2012). Vaillant-Gaveau *et al.*, (2008), sostiene que cada pesticida contiene un ingrediente activo que es responsable de su efecto. Este debe ser formulado con otros compuestos no pesticidas antes de estar listo para su uso. Estos otros compuestos tales como los surfactantes podrían inhibir el proceso de la fotosíntesis. Este ensayo se realizó sin un testigo absoluto (solamente agua), ya que todas las plantas fueron asperjadas con agua más un surfactante, incluyendo los controles. Los estudios disponibles en la literatura han demostrado que en algunas situaciones, las aplicaciones de fungicidas afectan la fotosíntesis. Vaillant-Gaveau *et al.*, (2008), sin embargo, los informes disponibles están basados en pocos parámetros fisiológicos, usando una gran variedad de especies de plantas y de diferentes fungicidas. Esto lleva, en algunos casos, a resultados controversiales que dificultan el aprendizaje comprensivo del impacto de los fungicidas en la fotosíntesis (Dias, 2012). Lo anterior se desprende del ensayo realizado en Chardonnay, cuyos resultados sugieren que no fue afectada por los fungicidas contrario a los resultados obtenidos por Saladin *et al.*, 2003, donde se señala a este cultivar como el más sensible a los fungicidas fludioxonil y pirimetanil.

## CONCLUSIONES

La actividad fotosintética de las plantas evaluadas no fue alterada por los fungicidas ciprodinil & fludioxonil y fenhexamid. Las variaciones encontradas en este estudio se deben a que las plantas jóvenes de vid, cultivares Thompson Seedles y Chardonnay muestreadas, fueron altamente sensibles a parámetros ambientales, debido a que las alteraciones detectadas en los ensayos correspondieron a situaciones excepcionales que no presentaron un comportamiento reiterado en el tiempo, sino más bien a una compleja interacción entre factores internos de cada planta y a factores medioambientales, que adicionalmente parecieron ser influenciados por diferencias varietales.

Las dos concentraciones utilizadas en ambos ensayos, no fueron suficientes para demostrar algún cambio en la planta, ensayos realizados por autores de pruebas similares a las realizadas, utilizaron al menos 3 concentraciones distintas de un mismo ingrediente activo o la utilización de la concentración efectiva media o la concentración media inhibitoria de los productos utilizados.

Otros resultados de autores mencionados en este estudio son diversos y presentan diferencias en sus resultados. Sugiriendo que este tipo de ensayos debiera realizarse en condiciones ambientales estrictamente controladas que no puedan ser afectadas por factores externos y así evitar variaciones que puedan llevar a resultados erróneos.

Finalmente cada ingrediente activo de una formulación química debiese ser evaluado individualmente y en presencia de un testigo absoluto al cual no le sea aplicada ninguna sustancia inclusive agua, para evitar que productos tales como surfactantes, sales u otros puedan alterar los resultados del ensayo.

Por lo anteriormente indicado y dado los resultados obtenidos, la hipótesis planteada al inicio del ensayo, en la cual se plantea que los fungicidas ciprodinil & fludioxonil y fenhexamid no demostraron afectar la actividad fotosintética de las plantas, bajo las condiciones de este estudio es rechazada.

**BIBLIOGRAFIA**

- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. 5<sup>th</sup> ed. Elsevier Academic Press. Burlington, USA. 922p.
- Auger, J. y M. Esterio. 1997. Botrytis: nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Santiago, Chile. 125p.
- Baker, N. 2008. Chlorophyll Fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. Annual Review of Plant Biology. 59:89-113.
- Börkman, O. and B. Demmig. 1987. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and Chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. Planta. 170:489-504.
- Brent, K. J. and D. W. Hollomon. 2007. Monografía: Fungicide resistance: the assessment of the risk. 2<sup>nd</sup> ed. Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). Brussels, Belgium. 56p.
- CIREN. 1996. Descripción de suelos. Materiales y símbolos. Estudio agrologico Región Metropolitana. Publicación CIREN N°115. 431p.
- Correia, M. J., M. M. Chaves and J.S. Pereira. 1990. Afternoon depression in photosynthesis in grapevine leaves –evidence for a high light stress effect. Journal of Experimental Botany. 41:417-426.
- De Waard, M., A. Andrade, K. Hayashi, H. J. Schoonbeek, I. Stergiopoulos and L. H. Zwiars. 2006. Review: Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. Pest Management Science. 62: 195-207.
- Debieu, D., J. Bach, M. Hugon, C. Malosse and P. Leroux. 2001. The hydroxyanilide fenhexamid, a new sterol biosynthesis inhibitor fungicide efficient against the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). Pest Management Science. 57: 1060-1067.
- Dias, M. C. 2012. Phytotoxicity: an overview of the physiological responses of plants exposed to fungicides. Journal of Botany. Volume 2012 (2012), Article ID 135479, 4 pages.
- Elad, Y., B. Williamson, P. Tdzynski and N. Delen. 2007. Botrytis: Biology, Pathology and Control. Springer. Dordrecht, Netherlands. 403p.

- Fanizza, G., L. Ricciardi and C. Bagnulo. 1991. Leaf greenness measurements to evaluate water stressed genotypes in *Vitis vinifera*. *Euphytica*. 55:27-31.
- Fletcher, R. A., G. Hofstra and J. Gao. 1986. Comparative fungitoxic and plant growth regulating properties of triazole derivatives. *Plan Cell Physiology*. 27(2): 367-371.
- Frankart, C., P.Eullaffroy and G. Vernet. 2002. Photosynthetic responses of *Lemma minor* exposed to xenobiotics, copper, and their combinations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 53:439-445.
- Hunt, S. 2003. Measurements of photosynthesis and respiration in plants. *Physiologia Plantarum*. 117: 314–325.
- Kadir, S. 2006. Thermostability of photosynthesis of *Vitis aestivalis* and *V. vinifera*. *Journal –American Society for Horticultural Science*. 131(4): 476-483.
- Keller, M. 2010. *The science of grapevines : Anatomy and physiology*. Elsevier Academic Press. Burlington, USA. 377p.
- Knight, S.C., V. M. Anthony, A. M. Brady, A. J. Greenland, S. P. Heaney, D. C. Murray, K. A. Powell, M. A. Schulz, C. A. Spinks, P. A. Worthington and D. Youle. 1997. Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annual Review of Phytopathology*. 35:349-72.
- Kramer, W. and U. Schirmer. 2007. *Modern Crop Protection Compounds*. Verlag Chemie. Weinheim, Germany. 1394p.
- Maxwell, K. & G. N. Johnson. 2000. Review Article Chlorophyll fluorescence –a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51(345): 659-668.
- Medrano, H., J. M. Escalona, J. Bota, J. Gulías and J. Flexas. 2002. Regulation of photosynthesis of C3 plants in responses to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany*. 89:895-905.
- Ni, Z., E-O. Kim, & Z.J. Chen. 2009. Chlorophyll and starch assays. *Protocol Exchange*. 10: 1038.
- Palliotti, A., O. Silvestroni and D. Petoumenou. 2009. Photosynthetic and photoinhibition behavior of two field-grown grapevine cultivars under multiple summer stresses. *American Journal of Enology and Viticulture*. 60:189-198.

- Petit, A.N., G. Wojnarowicz, M. L. Panon, F. Baillieul, C. Clement, F. Fontaine, N. Vaillant-Gaveau. 2009. Botryticides affect grapevine leaf photosynthesis without inducing defense mechanisms. *Planta*. 229:497-506.
- Petit, A.N., F. Fontaine, P. Vatsa, C. Clément, N. Vaillant-Gaveau. 2012. Fungicide impacts on photosynthesis in crop plants. *Photosynthesis Research*. 111(3):315-326.
- Rosslénbroich, H. J. and D. Stuebler. 2000. *Botrytis cinerea* –history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*. 19:557-561.
- Saladin, G., C. Magne and C. Clement. 2003. Effects of fludioxonil and pyrimethanil, two fungicides used against *Botrytis cinerea*, on carbohydrates physiology in *Vitis vinifera* L. *Pest Management Science*. 59:1083-1092.
- Santibañez, P. y R. Adonis. 2011. Boletín Agroclimático Regional. Disponible en: [http://www.agroclima.cl/descargas/Boletin\\_RM\\_Diciembre11.pdf](http://www.agroclima.cl/descargas/Boletin_RM_Diciembre11.pdf) . Leído el 12 de diciembre 2012.
- Simon, E. W. 1974. Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytologist*. 73(3): 377-420.
- Story, W., M. Tavares, E. Begliomini and N. Luiz de Souza. 2003. Physiological effects of strobilurins fungicide on plants. *Publ. UEPG Exact Soil Science*. 3: 59-68.
- Untiedt, R. and M. Blanke. 2004. Effects of fungicide and insecticide mixture on apple tree canopy photosynthesis, dark respiration and carbon economy. *Crop Protection*. 23: 1001-1006.
- Vaillant-Gaveau, N., A. N. Petit, F. Fontaine and C. Clement. 2008. Photosynthesis limitation of grapevine after treatment with fungicide fludioxonil. *Agricultural and Food Chemistry*. 56: 6761-6767.
- Wolfram, K. 1987. Isomers of sterol synthesis inhibitors: Fungicidal effects and plant growth regulator activities. *Pesticide Science*. 18(2):129-147.
- Xia, X. J., Y. Y. Huang, L. Wang, L. F. Huang, Y. L. Yu, Y. H. Zhou, J. Q. Yu. 2006. Pesticides-induced depression of photosynthesis was alleviated by 24-epibrassinolide pretreatment in *Cucumis sativus* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 86:42–48.