



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE POLIGODIAL SOBRE
EL HONGO FITOPATÓGENO *BOTRYTIS CINEREA***

CHRISTIAN GONZALO ROBLES KELLY

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión de los Directores de Tesis Dra. Evelyn Silva Moreno, y Dr. Hector Carrasco, en el laboratorio de Biotecnología y Productos Naturales, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Autónoma de Chile.
Aprobado por los miembros de la comisión de evaluación.

Dra. Evelyn Silva M.
Directora de Tesis

Dr. Hector Carrasco A.
Director de Tesis.

Dr. Ruben Polanco O.
Comisión de Tesis

Dr. Paulo Canessa A.
Comisión de Tesis

Santiago, Chile
Año 2018



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE POLIGODIAL
SOBRE EL HONGO FITOPATÓGENO *BOTRYTIS CINEREA***

Proyecto de tesis presentado como parte de los requisitos para optar al grado de
MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

Directores de Tesis: Dra. Evelyn Silva Moreno
Dr. Héctor Carrasco
Laboratorio de Biotecnología y Recursos Naturales
Instituto de Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chile

**CHRISTIAN ROBLES KELLY
SANTIAGO, CHILE
ABRIL, 2018**

Esta tesis va dedicada a mis padres, Margarita Kelly y Jaime Robles, por el apoyo incondicional, amor, comprensión brindado desde el momento de mi nacimiento y toda mi vida. A mis hermanos Lorena y Jaime por su comprensión, apoyo y consejos, en el camino que llevamos juntos como familia. A mis pequeños sobrinos Sofía y Anwar, por los momentos de relajación y risas que provocan.

A Gustavo por ser un apoyo esencial para mi Madre.

Muchas gracias a cada uno por ser un pilar fundamental en mi vida.

Los Amo.

Mamá gracias por todo

Agradecimientos.

Agradecer a la Dra. Evelyn Silva Moreno, por haberme aceptado en su laboratorio y equipo de trabajo para realizar mi práctica profesional y tesis de magister, por su guía por el mundo científico, micológico y profesional, por los conocimientos entregados durante años en el laboratorio, por el apoyo emocional, y por las constantes muestras de apoyo. Al Dr. Héctor Carrasco y Dr. Andrés Olea, por su apoyo y conocimientos entregados por la valorización de mi trabajo. Agradecer a mis compañeros y equipo de *Botrytis*, “*Botrytis team*”, Julia Rubio, Dra. Rubio, agradecer por su ayuda y apoyo durante estos años de tesis, así como los momentos de relajo y risas.

Agradecimiento y mención especial a toda mi familia, Margarita, Jaime, Lorena, Pipe, Sofía, Anwar y Gustavo, por tolerar mis enojos, rabias y apoyarme en el desarrollo de esta tesis y constante e incondicionalmente en la vida, por esos momentos difíciles que hemos vivido y momentos amenos y felices, que nos hacen más fuerte y unirnos como una gran familia. Gracias por la formación y valores entregados durante esta vida, por los consejos, por los ánimos y las ganas de siempre salir adelante y no bajar los brazos, por el constante apoyo para cumplir las metas y sueños. Que nunca se acaben.

Gracias a mi polola, Valentina Jorquera, con quien estuvimos juntos casi toda la vida universitaria como compañeros, disfrutamos de viajes, momentos de dispersión, así como días de enojos y sufrimiento por los ramos y solemnes, por el mutuo apoyo y arenga dada para cumplir todos los requisitos estudiantiles, pero ya llego al final esta vida universitaria, y hoy juntos de la mano escribimos una nueva historia sin fin... Gracias por todo lo entregado en estos últimos años pioja, eres la mejor, sin tu ayuda y constante apoyo, esto hubiera sido más difícil.

Mención aparte a mis amigos y núcleo más cercano, Pancho, Nicolás y Guille por los carretes, días de estudios y otros.

Agradecer a todo el equipo y gente del Centro de Investigaciones de la Universidad Autónoma de Chile, y a todos los que contribuyeron al desarrollo de esta tesis.

Finalmente, agradecer al proyecto Fondecyt 11140194, por el financiamiento para la realización de esta tesis.

Índice

1. Resumen	10
2 Introducción	11
2.1 <i>Botrytis cinerea</i> y ciclo biológico	12
2.2 Control de la pudrición gris	14
2.3 Fungicidas químicos y situación actual de sensibilidad en Chile	14
2.3.1 Control químico	14
2.3.2 Control biológico	17
2.4 Nuevos fungicidas obtenidos por extracción desde plantas	18
2.4.1 Tipos de metabolitos secundarios	19
2.5 Poligodial y sus propiedades	21
3 Hipótesis	24
3.1 Objetivo general	24
3.2 Objetivos específicos.	24
4 Materiales y metodología.	25
4.1 Evaluación de la actividad antifúngica de poligodial en el crecimiento de <i>B. cinerea</i>	25
4.1.2 Microorganismo y medio de cultivos	25
4.1.2 Medición de la actividad antifúngica de poligodial sobre aislados de <i>B. cinerea</i>	25
4.2 Medición de la actividad antifúngica de poligodial sobre la germinación de conidias de <i>B. cinerea</i>	26
4.3 Análisis estadístico	26
4.4 Ensayo de estabilidad de membrana plasmática por medio de tinción con Sytox® Green.	27
4.4.1 Cultivo de conidios	27

4.4.2 Ensayo de permeabilidad de membrana.	27
4.5 Determinación de daño celular por producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) por medio de ROS-GLO.	28
4.5.1 Cultivo de conidios.	28
4.5.2 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ERO).	29
4.6 Análisis de expresión por PCR cuantitativo (qPCR) de genes relacionados con daño celular.	29
4.6.1 Extracción de ARN total y Síntesis de ADNc	29
4.6.2 Determinación de los niveles de expresión mediante qPCR.	30
5 Resultados	32
5.1 Evaluación de la actividad antifúngica de poligodial en el crecimiento de <i>B. cinerea</i>	32
5.2 Evaluación de la actividad antifúngica de poligodial sobre la germinación de conidios de <i>B. cinerea</i>	34
5.3 Descripción del mecanismo de acción de poligodial en <i>B. cinerea</i>	35
5.3.1. Evaluación de la estabilidad de membrana.	36
5.3.2 Producción de especies reactivas de oxígeno de <i>B. cinerea</i> en presencia de poligodial.	38
5.3.3 Cambios de niveles de expresión de genes relacionados con daño celular de <i>B. cinerea</i> en presencia de poligodial.	39
5.4. Evaluación de la actividad de poligodial en el crecimiento micelial de cepas nativas de <i>B. cinerea</i> con diferentes fenotipos de resistencia a antifúngicos químicos comerciales.	41
6 Discusión.	44
6.1 Evaluación de la actividad de poligodial en el crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> y determinación de EC ₅₀	44
6.2 Posible mecanismo de acción de poligodial.	46

7 Conclusiones y Proyecciones.....	49
8 Referencias	50
9 Anexo	59

Índice Figuras.

Figura 1: Sintomatología de la infección de <i>Botrytis cinerea</i> .	12
Figura 2: Ciclo infectivo de <i>Botrytis cinerea</i>	13
Figura 3: Estructura química del sesquiterpeno, Poligodial.	22
Figura 4: Efecto de poligodial en el crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> .	33
Figura 5: Efecto de poligodial en el crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> a las 48 horas.	33
Figura 6: Cinética de germinación de las conidias de <i>Botrytis cinerea</i> .	34
Figura 7 : Efecto de poligodial en la germinación de conidios de <i>Botrytis cinerea</i>	36
Figura 8: Efecto del compuesto poligodial en la integridad de la membrana de <i>Botrytis cinerea</i> .	37
Figura 9: Efecto de poligodial en la producción de especies reactivas de oxígeno en <i>Botrytis cinerea</i> .	39
Figura 10: efecto de poligodial sobre a expresión de genes relacionados con daño celular en <i>Botrytis cinerea</i> .	40
Figura 11: Efecto de poligodial en el crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> cepa multiresistente PN2	42
Figura 12: Efecto de poligodial en el crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> 7AC a las 48 horas.	43
Figura 13: Efecto de poligodial en el crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> cepa B05.10.	59
Figura 14: Efecto de poligodial en el crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> cepa B05.10.	59
Figura 15: Efecto de poligodial en el crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> cepa B05.10.	60
Figura 16: Efecto de poligodial en el crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> cepa B05.10.	60

Índice Tablas

Tabla 1: secuencia de los partidores utilizados para el estudio de expresión génica.....	31
Tabla 2: Cepas nativas con diferentes tipos de fenotipos de resistencia a antifungicos comerciales.	41
Tabla 3: Efecto de poligodial en el crecimiento micelial in vitro de B. cinerea, estimación de la dosis efectiva 50%, obtenida a las 48 horas de incubación.	43

1. Resumen

El hongo *Botrytis cinerea*, causante de la pudrición gris (PG), es un patógeno capaz de afectar a una gran variedad de cultivos agrícolas. En Chile, este hongo afecta a diversas especies frutícolas entre las que se encuentra la uva de mesa, uno de los principales productos de exportación de nuestro país.

Tradicionalmente, el control de la PG se realiza mediante el uso de fungicidas químicos como benzimidazoles, fenilcarbamatos, dicarboximidas y anilino pirimidinas. Sin embargo, el uso intensivo y prolongado de estos fungicidas ha llevado a la aparición de cepas del hongo que muestran diversos niveles de resistencia. En Chile la aparición de aislados de *B. cinerea* resistentes a estos fungicidas ha ido aumentando progresivamente, alcanzando un 60% el año 2011. Estos antecedentes han impulsado la búsqueda de nuevos agentes fungicidas y/o formulaciones, eficientes y amigables con el medio ambiente, para el control de *B. cinerea*. Es por ello por lo que, como alternativa se plantea, la producción de una nueva generación de antifúngicos en base a compuestos naturales, extraídos de plantas.

El propósito de esta investigación fue evaluar la actividad antifúngica del compuesto natural, poligodial, extraído desde el árbol del canelo, sobre el hongo fitopatógeno *B. cinerea*. Para ello, se realizaron estudios sobre el efecto de inhibición del crecimiento micelial y germinación de las conidias. Además de estudiar el mecanismo de acción por el cual actúa poligodial, a través de ensayos de estabilización de membrana, acumulación de especies reactivas de oxígeno y análisis de genes relacionados con daño celular.

Se logró establecer que poligodial presenta una actividad biológica sobre la germinación de las conidias, provocando una ralentización del crecimiento micelial y el mecanismo de acción se asocia a la desestabilización de membrana.

2 Introducción

Chile es un país exportador. Dentro de los principales productos exportados por nuestro país, se encuentra la uva de mesa [ODEPA, 2017], generándose en la temporada 2017 envíos que alcanzaron las 813.000 toneladas [Odepa, 2017].

En el mundo, y en Chile en particular, se producen grandes pérdidas por infecciones en cultivos agrícolas causadas por agentes patógenos (bacterianos, virales, fúngicos, etc.). Dentro de ellos, el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, es uno de los más agresivos. En el año 2002, la presencia de este hongo causó pérdidas de un 20% de la producción de uva en EE. UU. Por otro lado, en Chile se ha reconocido que *B. cinerea* es uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta a este rubro, provocando pérdidas en la producción de frutas de gran interés comercial [Latorre *et al.*, 2015].

B. cinerea es el causante de la enfermedad denominada “*podredumbre gris*” la cual produce grandes pérdidas durante la pre y postcosecha en al menos 200 especies de cultivos como vides, tomate, berries en general, kiwis, etc. [Jarvis, 1980] (figura 1). Este hongo al ser necrótrofo induce la muerte de la célula huésped resultando en graves daños a los tejidos de las plantas que culminan en la podredumbre del tejido vegetal. De esta manera, y sumado al hecho que este patógeno tiene un amplio rango de hospederos [Fillinger, S. and Elad, Y. 2016], es que la infección por este hongo produce grandes pérdidas económicas, no sólo durante el crecimiento, sino también durante el almacenamiento y transporte de las frutas, vegetales de exportación.

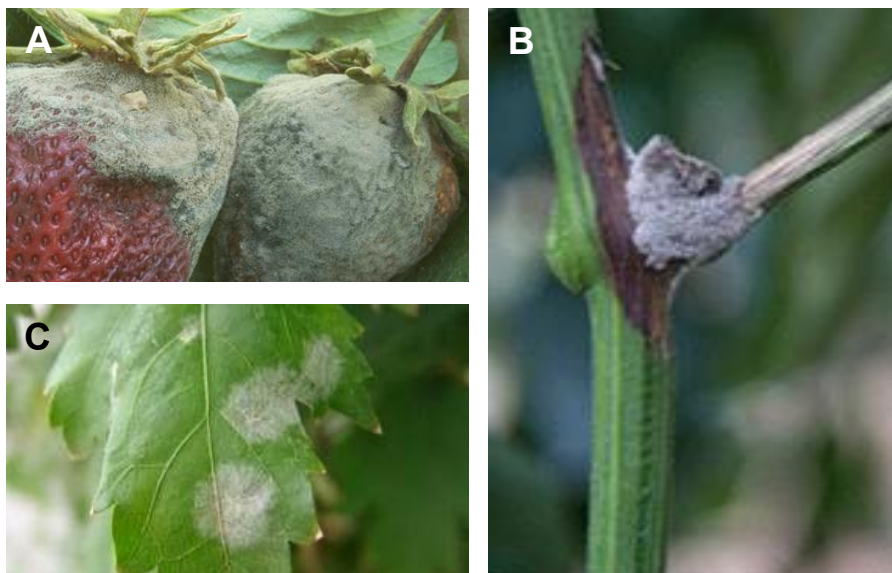


Figura 1: Sintomatología de la infección de *Botrytis cinerea*. A) Infección en fruto de frutilla, B) Infección sobre tallo de vid y C) Infección sobre hojas de vid (Fotos tomadas por Steven Koike, UCCE; ver anexo).

2.1 *Botrytis cinerea* y ciclo biológico

Botrytis Cinerea es un hongo que pertenece a la clase *Hyphomycetes*, del orden *hyphales*. Afecta a plantas de ornamento, frutales y cultivos mayores. Los síntomas de las enfermedades que produce son: tizón en flores e inflorescencia y pudrición de los frutos, canchros o pudrición del tallo, ahogamiento de plántulas, manchas foliares y pudriciones en tubérculos. En ambientes con humedad alta se observa como moho gris, afectando a las frutillas, hortalizas, produciendo tizón en las cebollas y arándanos, pudrición del tallo de los gladiolos. También puede ocasionar pudriciones blandas externas en frutos y hortalizas en post cosecha [Agrios, 2013] (figura 1). En la producción de los tizones de inflorescencias, el hongo se establece en los pétalos de la flor, manifestando la infección cuando envejece, produciendo abundante micelio. Con climas húmedos y frescos, los micelios comienzan a producir conidias que infectan rápidamente los otros tejidos senescentes mientras que los frutos y los tallos que han sido atacados por *B. cinerea*, se ponen acuosos adquiriendo más tarde una coloración parda. Al ir pudriéndose los tejidos, se produce el rompimiento de la epidermis permitiendo el

desarrollo de cuerpos fructíferos, con esto los tejidos se arrugan y deshidratan, permitiendo al hongo producir esclerocios aplanados de color negro, que actúan como estructuras de sobrevivencia [Gonzales-Domínguez *et al.*, 2015; Esterio *et al.*, 2011; Williamson *et al.*, 2007].

Respecto al ciclo infectivo, éste comienza cuando los conidios de *B. cinerea* se unen a la superficie de los tejidos vegetales y se presentan condiciones ambientales favorables para iniciar la infección, las cuales son: humedad, temperatura (18-23°C) y fuente de carbono, condiciones en las cuales los conidios comienzan a germinar. El resultado es el tubo germinativo, el cual puede penetrar el tejido vegetal de forma pasiva donde hay daño mecánico previo, formando el *apresorio*, el cual empieza a ramificarse a células vegetales vecinas provocando una infección en el fruto u hoja. Por otro lado, la penetración puede realizarse de forma activa, mediante la liberación de enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular (van Kan *et al.*, 2016). Luego, la ramificación del tubo germinativo resulta en la formación de las hifas en las células adyacentes, de las hifas aparecen los conidióforos y conidias que forman una capa gris, característica por la cual se denomina la podredumbre gris (figura 2).

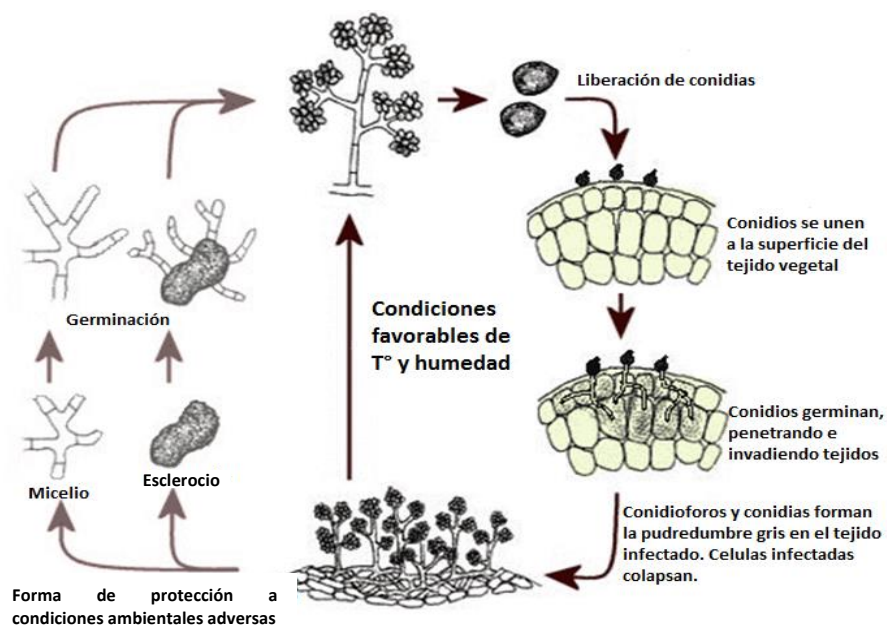


Figura 2: Ciclo infectivo de *Botrytis cinerea*

2.2 Control de la pudrición gris

El control de la pudrición gris se realiza principalmente por la aplicación de diversos fungicidas químicos.

En EE. UU. se gastaron aproximadamente US\$780 millones para el control de *B. cinerea* durante el año 2002 [University of Minnesota, 2016. *Botrytis* Bunch Rot]. Mientras que, en Europa, el costo asociado al uso de antifúngicos alcanzó los 540 millones de euros en el 2001 [Informe anual UIPP, 2002]. A nivel mundial, se estima que los costos asociados al control de este patógeno fluctúan entre \$14 billones y \$140 billones por año (*Botrytis cinerea* – Estimated Losses in Vineyards,” GenoScope web site, <http://www.cns.fr/spip/Botrytis-cinerea-estimated-losses.html>).

Actualmente, hay una gran variedad de fungicidas químicos, con diferentes blancos de acción, que son aplicados con el propósito de controlar la pudrición gris. Entre ellos, los más utilizados corresponden a iprodione (dicarboximida), fludioxonil (fenilpirrol), cyprodinil y pyrimethanil (anilinopirimidinas), fenhexamida (hidroxianilida), boscalid (carboxamida), pyraclostrobin (estrobilurina) y tebuconazole (DMI). No obstante, el uso indiscriminado de estos productos ha causado serios problemas como la aparición de cepas altamente resistentes en Europa y en Chile, lo que ha ocasionado una disminución en la efectividad de los fungicidas químicos para proteger la producción de fruta [Latorre *et al.*, 2015; Liu, *et al.*, 2007; Leroux *et al.*, 2002].

2.3 Fungicidas químicos y situación actual de sensibilidad en Chile

2.3.1 Control químico

El uso intensivo y prolongado en el tiempo de las dicarboximidias, ha llevado a la generación de selección de las poblaciones de *B. cinerea*. Es así como aislados con bajos a altos niveles de resistencia a dicarboximidias fueron detectados en el país hace varios años atrás [Latorre *et al.*, 1994; Auger and Esterio, 1997]. Hacia 1990, ya se había reportado resistencia a vinclozolin, a partir

de aislados recuperados de uva de mesa en la zona central de Chile [Ochagavía, J, 1990]. Posteriormente, Esterio y cols, analizaron aislados de *B. cinerea* obtenidos de uva de mesa cultivar *Thompson Seedless* de Punitaqui, Buin y Rengo y detectaron diferentes niveles de resistencia a iprodione, predominando los aislados con alto nivel de resistencia por sobre aquellos que presentaron resistencia leve a moderada [Esterio *et al.*, 2011]. Adicionalmente, la resistencia a iprodione fue diferencialmente distribuida en la población, siendo sólo aislados del tipo transposa los que presentaron esta resistencia. Por otro lado, para las hidroxianilidas, con su principal representante fenhexamida, se ha reportado que su utilización comenzó hacia fines de los 90s, con muy buenos resultados en el control del patógeno. Sin embargo, el primer reporte de resistencia adquirida hacia fenhexamida se realizó el año 2007 en aislados de *B. cinerea* colectados desde uva de mesa en trece localidades de la zona Central [Esterio *et al.*, 2007]. En el año 2011, se analizaron varios aislados con diversos niveles de resistencia a fenhexamida, detectándose aislados chilenos de *B. cinerea* pertenecientes a la categoría HydR3⁻ (con valores EC₅₀ entre 0,4 y 3,0 µg mL⁻¹ para crecimiento micelial) y la categoría HydR3⁺ (con valores EC₅₀ entre 2,3 y >10 µg mL⁻¹) [Esterio *et al.*, 2011]. A partir de la primera detección de resistencia, ésta ha ido en aumento, alcanzando en el año 2011 a un 60% de aislados resistentes, con valores EC₅₀ entre 0,21 y 2,0 µg mL⁻¹ [Latorre and Torres, 2012].

Los aislados de *B. cinerea*, evaluados por Esterio y cols., fueron también analizados para otros fungicidas como, benzimidazoles (carbendazim), N-fenil carbamatos (diethofencarb), dicarboximidas (iprodione, vinclozolin) y anilinopirimidinas (pyrimethanil) [Esterio *et al.*, 2011]. Los aislados con resistencia a fenhexamida presentaron adicionalmente, resistencia a benzimidazoles y dicarboximidas. La particular condición chilena, indica que la resistencia a benzimidazoles es generalizada y estable en el tiempo [Auger and Esterio, 1997], aunque el uso de este grupo de fungicidas se ha discontinuado a nivel de campo.

Por otra parte, Latorre y Torres en un estudio realizado entre 1998 y 2000 [Latorre and Torres, 2012] detectaron un 38,5% de resistencia a anilinopirimidinas

(cyprodinil y pyrimethanil), niveles que posteriormente aumentaron, sobrepasando el 50% [Esterio *et al.*, 2011, Latorre and Torres, 2012]. Aunque el mecanismo de resistencia a este grupo químico no se conoce con certeza, los aislados de *B. cinerea* con niveles de resistencia de moderados a altos, se caracterizan por tener un comportamiento inestable en laboratorio [Walker *et al.*, 2013]. Esto podría explicar por qué estos aislados no han sido seleccionados tan rápidamente como los aislados resistentes a dicarboximidas o benzimidazoles [Leroux, 2004].

A la fecha, se han detectado eventuales casos de pérdida en la sensibilidad a fludioxonil asociados al fenotipo MDR1 de resistencia multidroga [Esterio *et al.*, 2009], en contraste con los resultados obtenidos por Latorre y Torres quienes detectaron frecuencias relativamente altas (6,0 – 73,7%) de resistencia a fludioxonil, doble resistencia entre fludioxonil y anilino pirimidinas (cyprodinil o pyrimethanil), inclusive triple resistencia al sumarse a la resistencia anterior el fungicida fenhexamida [Latorre and Torres, 2012].

Adicionalmente, aislados chilenos de *B. cinerea* resistentes a tebuconazole, un fungicida DMI con acción botriticida, han sido detectados en baja frecuencia [Latorre and Torres, 2012; Esterio *et al.*, 2009]. Eventuales aislados con resistencia a azoxystrobin (estrobilurina) han sido detectados en poblaciones chilenas de *B. cinerea* [Esterio *et al.*, 2009]. Hasta el año 2009 no se habían reportado aislados resistentes a boscalid [Esterio *et al.*, 2009]; sin embargo, el primer reporte se realizó el año 2011 en aislados obtenidos en la región Metropolitana y en la región del Libertador Bernardo O'Higgins. Además de la resistencia descrita anteriormente, en el año 2009, se detectó en Chile, la existencia de poblaciones de *B. cinerea* con resistencia multidroga del fenotipo 1 (MDR1) [Esterio *et al.*, 2009].

En resumen, a pesar de los considerables progresos en el control químico de *B. cinerea*, este patógeno sigue causando grandes pérdidas económicas. Además, la generación de resistencia a fungicidas químicos y la negativa percepción pública acerca de la seguridad de los fungicidas, ha traído como

consecuencia que, en muchos países, las autoridades estén regulando el uso de estos compuestos.

2.3.2 Control biológico

Así, con el objetivo de minimizar el uso de agentes químicos sintéticos, en los últimos años se ha descrito la utilización de microorganismos como controladores de hongos (biocontrol). El control biológico incorpora microorganismos capaces de combatir al hongo fitopatógeno. Los agentes de control biológico más estudiados en el control de *B. cinerea* son hongos filamentosos de los géneros *Trichoderma*, *Ulacladium* y *Gliocladium*, bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* y levaduras de los géneros *Pichia* y *Candida* [Jacometti *et al.*, 2010; Romanazzi *et al.*, 2012]. En Chile, se ha descrito la utilización de *Trichoderma* como controlador de *B. cinerea* en cultivares de uva de mesa. Sin embargo, se ha reportado que las poblaciones de *Trichoderma* disminuyen abruptamente impidiendo un efecto biocontrolador sobre este cultivar [Latorre, 2007]. Sobre la base de éstos y otros informes, se ha concluido que el grado de control proporcionado por los biocontroladores en uva de mesa y en condiciones de campo, es de bajo a moderado [Latorre, 2007; Latorre, 2013]. Por lo tanto, el uso de este tipo de fungicida biológico representa una alternativa que podría ser mejor aceptada por los consumidores y agencias regulatorias, sin embargo, éstos no han logrado posicionarse fuertemente en el mercado debido a que han presentado diversos problemas como por ejemplo: corta vida media útil, carencia de actividad curativa, baja persistencia y una eficiencia variable, la que puede estar dada por factores como un bajo establecimiento de los microorganismos en el fruto o que éstos pueden verse afectados por los fungicidas químicos usados normalmente en los programas de control [Palou *et al.*, 2009].

Además, a diferencia del control químico, la utilización de agentes biológicos es mucho más limitada puesto que presentan una especificidad por el tipo de cultivo y están afectados por factores físicos (variaciones de temperatura o humedad) indispensables para la acción óptima de los microorganismos. Por otra

parte, las formulaciones del agente de control biológico requieren condiciones especiales de almacenamiento y aplicación y presentan una baja resistencia a la radiación solar. Estas limitaciones han demorado la aceptación de estos biofungicidas por los agricultores [Jackson, 2008]. Cabe recalcar que estas limitaciones son aún más importantes en etapas de post-cosecha y transporte, donde se destruye entre un 10-30% de la producción [Senthil *et al.*, 2011], y donde biocontroladores como *Bacillus subtilis* disminuyen su efectividad debido a las bajas temperaturas. Uno de los productos biocontroladores más prometedores del mercado nacional es Bacifruit de la empresa BIOPACIFIC, un fungicida anti - *B. cinerea* cuyo compuesto activo es una cepa nativa de *Bacillus subtilis* capaz de colonizar rápidamente las micro heridas que surgen en las plantas, lo que facilita su adaptación a las condiciones ambientales y competir eficazmente por el espacio y los nutrientes, lo que impide la proliferación de *Botrytis*, evitando así la aparición de la “pudrición gris”.

En conclusión, basado en las características mencionadas para en el control químico y el biológico, es razonable asumir que es necesario encontrar nuevas formas de control mediante la identificación de nuevos compuestos con actividad antifúngica, que sean efectivos para la población de *B. cinerea* resistente a los fungicidas químicos convencionales y amigables con el medio ambiente.

2.4 Nuevos fungicidas obtenidos por extracción desde plantas

El uso de compuestos naturales para el control de plagas ha sido utilizado desde el comienzo de la humanidad. Estos productos son extraídos desde las más diversas fuentes, desde productos de origen marino, microorganismos y especialmente de plantas [Celis *et al.*, 2008]. Debido a las propiedades y principios activos presentes en las plantas su estudio ha crecido de forma considerable, ya que cada día son más utilizados en la medicina moderna, cosmetología, farmacéutica, biotecnología y agricultura [Fonnegra and Jiménez, 2006].

Los productos de origen vegetal han sido estudiados, mayoritariamente en las últimas décadas obteniéndose un gran número de productos medicinales que

ha sido desarrollados a partir de extractos y en base a esta experiencia, se considera que éstos constituyen una fuente importante de compuestos con actividad biológica [Cragg. and Newman, 2013]. Por otro lado, a nivel químico, se ha estudiado con énfasis los metabolitos secundarios, los cuales están implicados en el control biológico contra plagas y patógenos, en ciertos casos activando los métodos de defensa en las plantas, llegando a brindar una protección efectiva de forma preventiva [Kagale *et al.*, 2004].

Estos compuestos son generalmente metabolitos secundarios, sustancias de bajo peso molecular, además de sustancias químicas no nutricionales que controlan la biología de otras especies en el entorno. En otras palabras, juegan un rol prominente en la coexistencia y evolución de las especies [Torssell, 1983]. Muchos de estos compuestos tienen propiedades como: repelentes de insectos y roedores, también pueden mostrar actividad antifúngica y antibacteriana [Sepúlveda *et al.*, 2003].

2.4.1 Tipos de metabolitos secundarios

Hay un abundante tipo de metabolitos secundarios entre los cuales podemos encontrar compuestos fenólicos sencillos (hidroxibenzoicos o hidroxicinámicos), que son metabolitos secundarios comunes en plantas con propiedades fungicidas; las cumarinas (compuesto químico orgánico perteneciente a las familias de las benzopironas) clasificadas como antifúngicas y antibacterianas [Liu *et al.*, 2011]; los conjugados de fenilpropanoides con aminas, que se incorporan a la pared celular vegetal para aumentar su rigidez e impedir las entradas de patógenos. En cuanto a las fitoalexinas, estas son sintetizadas por las plantas, después de la infección y con actividad inhibitoria de microorganismos patógenos, por ejemplo, la pisatina, el cual es un flavonoide sintetizado por un guisante (*Pisum sativum*), que actúa ante la infección de hongos, siendo esta la primera fitoalexina aislada y caracterizada [Gil, 2002]. También están aquellos metabolitos secundarios que se hacen parte en la respuesta de hipersensibilidad, como es el caso de algunos compuestos pertenecientes al grupo de los alcaloides,

terpenoides y los fenilterpenoides, que participan activamente eliminando a los microorganismos patógenos y/o restringiendo su invasión al resto de la planta. Al mismo tiempo, otros metabolitos secundarios contribuyen a eliminar las especies reactivas de oxígeno que son tóxicas para las mismas células vegetales, las cuales se sintetizan en la etapa temprana de defensa. Es así como los metabolitos secundarios constituyen una forma esencial en la respuesta de defensa de las plantas ante el ataque de microorganismo fitopatógeno [Sepúlveda *et al.*, 2003]

Así, en la búsqueda de alternativas más económicas y efectivas para el tratamiento de las enfermedades producidas por hongos en cultivos de gran importancia económica, como es el caso de la uva para nuestro país, el estudio de metabolitos secundarios se ha convertido en un área de investigación de mucha importancia. Así, en los últimos años se han aislado e identificado una serie de metabolitos secundarios que presentan actividad antifúngica. Adicionalmente, los metabolitos aislados han sido sometidos a transformaciones hemisintéticas con el fin de aumentar la bioactividad por cambios estructurales en la molécula. Entre los metabolitos estudiados destacan, terpenoides, hidroquinonas geraniladas, fenoles, y amidas [Cotoras *et al.*, 2004; Ribera *et al.*, 2008; Gurjar *et al.*, 2012; Espinoza *et al.*, 2014].

En la literatura, hay varias plantas que presentan actividad antifúngica, por ejemplo *Allium sativum*, la que contiene un aminoácido sulfurado como compuesto activo; *Lippia graveolens*, presenta fenoles timol y carvacol [Kagale *et al.*, 2004]. El aceite esencial obtenido desde hojas de limón (*Cymbopogon citratus*), que es rico en citral, myrceno, dipenteno, metilheptona, ciertos alcoholes y ácidos volátiles, los cuales presentan actividad antifúngica contra *Mycosphaella fijiensis* [Obledo *et al.*, 2004]. El ácido sálvico, es un diterpeno aislado desde la fracción extraída con diclorometano de *Eupatorium salvia* y que se ha descrito que presenta propiedades fungicidas [Mendoza *et al.*, 2009]. Esto convierte a este extracto y al ácido sálvico, así como a sus derivados, en posibles antifúngicos de origen natural para el tratamiento de *B. cinerea*.

Otro ejemplo de plantas con compuestos antifungicos presentes es el canelo, *Drymis winteri* Forst. Este es un árbol perteneciente a la familia de las Winteraceae, presente en Chile desde la zona del río Limari hasta Tierra del Fuego, desarrollándose mejor en suelos que retengan humedad. Hacia el norte la planta adopta una forma arbustiva y del río Maule hacia el sur puede llegar a medir 30 metros de altura, siendo una especie persistente [Hoffman *et al* 1992; Hoffman *et al* 1998]. Con propiedades medicinales y sagradas para el pueblo mapuche, durante años se ha utilizado con el objeto de ayudar contra las úlceras, postemas, abscesos, fiebre, además se utiliza como diurético, anti-escorbuto, contra tumores, reumatismo, dolores de muela, etc. [Hoffman *et al* 1992; Muñoz *et al* 2001]. En estudios realizados por Martínez y colaboradores, se demostró que el extracto semipolar tiene una alta actividad repelente contra roedores [Martínez and Hurtado, 1997], lo que es descrito como una “actividad allomonal”. Además, muestra actividad biológica sobre otras especies dañinas, tales como termitas, hongos patógenos (*Saprolegnia*, *Candidas*, *Dermatofitos*, *Exophiala salmonis*) y contra bacterias que provocan infecciones nosocomiales (intrahospitalarias) [Montenegro, 2006]. Recientemente, se ha reportado que compuestos naturales aislados desde *Drimys winteri* Forst y algunos de sus derivados exhiben efectos larvicidas contra *Drosophila melanogaster* *til-til*, siendo la isodrimenina el compuesto más activo [Martínez and Hurtado, 1997].

2.5 Poligodial y sus propiedades.

Entre los compuestos químicos y con actividad biológica presentes en el canelo, se encuentra el sesquiterpeno dialdehído del tipo drimano, denominado poligodial (figura 3). Además de drimendiol, isotadeonal, isodrimeninol [Rodríguez *et al.*, 2005] estos compuestos poseen una amplia variedad de actividades biológicas, incluyendo antibacterianos, antifúngicos, anti alimentaria, citotóxicos, moluscicidal, piscicidal, junto con propiedades reguladoras del crecimiento de plantas [Jansen and Groot, 2004].

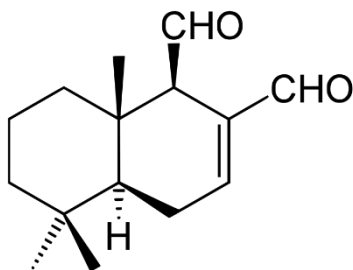


Figura 3: Estructura química del sesquiterpeno, poligodial

Este metabolito es un sesquiterpeno, derivado de la molécula de drimano, que se encuentra presente en la corteza y hojas, el cual ha presentado actividad biológica antimicrobiana contra bacterias, hongo y levaduras [Anke and Sterner, 1991; Zapata *et al.*, 2011], actividad anti hiperalgesia (antidolor) [Mendes *et al.* 1998.], antiinflamatorio y antialérgico. [Martin *et al.*, 2009; da Cunha *et al.*, 2001]. La actividad antifúngica estaría actuando principalmente en la disrupción de la membrana [Zapata *et al.*, 2011; Munoz-Concha *et al.*, 2004; Kubo *et al.*, 2001; Lunde and Kubo, 2000].

Adicionalmente, existen estudios que demuestran la actividad antifúngica tanto de los aceites esenciales de canelo, así como de sus metabolitos secundarios. Entre estos metabolitos secundarios, se ha logrado identificar una serie de drimanos sesquiterpénicos, entre los que destacan poligodial, isopoligodial y drimenol. Fujita y Kubo (2005) han descrito el mecanismo de acción de poligodial frente a *Saccharomyces cerevisiae*, dermatofitos, mostrando la versatilidad de este compuesto como un posible antifúngico de amplio espectro [Fujita and Kubo, 2005]. Además, se ha reportado el efecto antifúngico *in vitro* de diecisiete drimanos en contra de algunas levaduras (*Candida albicans*, *S. cerevisiae*), dermatofitos (*Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*) y hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*). En este trabajo, los autores describen una relación entre las características estructurales de cada compuesto y la actividad antifúngica [Derita, 2013].

Aunque poligodial, presenta actividad antifúngica, no hay estudios que establezcan la actividad contra el patógeno *B.cinerea*, principal patógeno presente en los mayores cultivos de interés económico en el país. Es por este motivo que se abre la puerta para el estudio de la capacidad botricida de este sesquiterpeno, sumado a sugerir el posible mecanismo de acción que tiene sobre el hongo.

3 Hipótesis

El compuesto poligodial presenta actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. La actividad antifúngica se asociaría a su capacidad de provocar estrés oxidativo y desestabilizar la membrana plasmática.

3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica de poligodial contra *Botrytis cinerea* y sugerir un posible mecanismo de acción.

3.2 Objetivos específicos.

- a) Evaluar la actividad de poligodial en el crecimiento micelial de *B. cinerea* (cepa B05.10) y determinación de la EC₅₀.
- b) Evaluar la actividad de poligodial en la germinación de conidias de *B. cinerea* (cepa B05.10).
- c) Sugerir un posible mecanismo de acción de poligodial a través de:
 - i) La estabilidad de la membrana de *B. cinerea* en presencia de poligodial
 - ii) La producción de especies reactivas de oxígeno de *B. cinerea* en presencia de poligodial.
 - iii) Cambios de niveles de expresión de genes relacionados con daño celular de *B. cinerea* en presencia de poligodial.
- d) Evaluar la actividad de poligodial en el crecimiento micelial de cepas nativas de *B. cinerea* con diferentes fenotipos de resistencia a antifúngicos químicos comerciales.

4 Materiales y metodología.

4.1 Evaluación de la actividad antifúngica de poligodial en el crecimiento de *B. cinerea*.

4.1.2 Microorganismo y medio de cultivos

La cepa utilizada para la evaluación de la actividad antifúngica corresponde al aislado B05.10 de *Botrytis cinerea*. 100 µL del stock de conidios de B05.10, almacenadas en solución 50% de glicerol, se inocularon en placas Petri con medio de cultivo Malta-Levadura (ML) (2% p/v extracto de malta, 0,2% p/v extracto de levadura, 1,5% p/v agar-agar) e incubadas a 20°C, en oscuridad por, al menos, 72 horas. Posteriormente, con ayuda de un sacabocado, se obtiene un disco de 5 mm de diámetro de la placa de cultivo con micelio y se transfiere a otra placa con medio ML para obtener stock de micelio fresco para los ensayos.

Las cepas con diferente grado de resistencia a antifungicos, fueron PN2 y 7AC, estas se mantuvieron almacenadas en glicerol stock, a partir de esto se inocularon 100 µL de cada una en placas con medio de cultivo ML e incubadas a 20°C, en oscuridad, subsiguientemente, con ayuda de un sacabocados se obtuvo un disco de 5 mm de diámetro, el cual fue transferido a otra placa con medio ML, se incuban por al menos 72 horas, para obtener cultivo fresco de micelio para los ensayos posteriores.

4.1.2 Medición de la actividad antifúngica de poligodial sobre aislados de *B. cinerea*

Para la medición de la actividad antifúngica de poligodial se utilizaron placas de cultivo de 50 mm de diámetro, a las cuales se les agregó 7 mL de medio ML, preparado previamente en tubos de ensayo. El poligodial se adicionó a cada tubo de tal forma que el compuesto quedara en la concentración necesaria para el ensayo (20, 40, 80 y 160 ppm) a partir de un stock de 200 ppm de poligodial, disuelto en diclorometano (Merck) (14mg/500µL). Luego, se adicionaron 50 µL de

la solución de poligodial a cada tubo y se homogenizó brevemente con vórtex. Una vez preparadas las placas, se inocularon con un disco de 5 mm de diámetro de micelio. El crecimiento del hongo se monitoreo a las 24, 48 y 72 horas de incubación. La actividad antifúngica del compuesto se expresa como porcentaje de inhibición del crecimiento y se calcula la EC_{50} (concentración efectiva para inhibir el 50% de la población).

4.2 Medición de la actividad antifúngica de poligodial sobre la germinación de conidias de *B. cinerea*

Para la medición de la actividad antifúngica de poligodial en la germinación de conidios de *Botrytis cinerea*, se adaptaron portaobjetos de vidrio con el fin de generar un pocillo “tipo barco”, en el cual se depositó medio ML blando (2% p/v extracto de malta, 0,2% p/v extracto de levadura, 0,6% p/v agar.-agar). Previo a esto, se preparó un stock de poligodial (200 ppm), disuelto en diclorometano (Merck) y luego se realizan diluciones seriadas para dejar la concentración de poligodial en el medio de 20, 40, 80 y 160 ppm respectivamente. A cada uno de los tubos se le agregó 50 μ l de la solución de poligodial. Una vez que los portaobjetos estuvieron preparados para su uso, se procedió a cortar un cuadrado de 0,5 cm² de una placa esporulada de *B. cinerea*, el cual se depositó cuidadosamente sobre el portaobjeto con el medio blando, para traspasar los conidios. Los portaobjetos, sembrados con los conidios son incubados en una cámara húmeda a 20°C, generando un ambiente húmedo adecuado para la germinación. Luego, a las 2, 4, 5 y 6 horas de incubación, se procede al conteo de conidios germinados y del total de conidos, con estos datos se procedió a obtener el porcentaje de germinación.

4.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó sacando los porcentajes de inhibición, tanto para el crecimiento como para la germinación de conidios. Para obtener este porcentaje se emplea la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{(\text{Control} - \text{Tratamiento})}{\text{Control}} \right) * 100$$

Los datos obtenidos son analizados en el programa graphPad Prism 6.01, sometiénolo a la prueba de comparación *two way anova*, para datos múltiples, análisis de Tukey ($p < 0,05$).

La determinación del EC_{50} se realizó mediante el análisis Probit, utilizando el software estadístico computacional Minitab 16.1, con los datos de crecimiento micelial a las 48 horas de cultivo.

4.4 Ensayo de estabilidad de membrana plasmática por medio de tinción con Sytox® Green.

4.4.1 Cultivo de conidios.

Se preparó un cultivo de conidios de *B. cinerea* B05.10 en placa de Petri de 100mm en medio ML, a partir de una suspensión de conidios mantenidos en glicerol a -20°C . Se incubaron por 5-7 días en oscuridad a 21°C .

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la recolección de los conidios agregando 5 ml de medio mínimo (MM) (1 g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L K_2HPO_4 , 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L KCL, 0,01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,6 g/L $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$ 25mm) y con ayuda de un asa microbiológica. La solución de conidios es recolectada en tubo de centrifuga, filtrada y cuantificada una en cámara de Neubauer. Finalmente, se prepara una suspensión de conidios de 10^6 conidios/mL.

4.4.2 Ensayo de permeabilidad de membrana.

En una placa de cultivo de 24 pocillos, donde en cada pocillo hay un cubreobjetos redondo, se agregó 1 mL de medio mínimo, suplementado con

glucosa al 20% y se inoculó con 100 μ L de la suspensión de conidios de 10^6 conidios/mL. Las placas fueron incubadas por 15 horas a 21°C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio mínimo de los pocillos, teniendo cuidado de no mover el cubreobjetos que está en el interior. Luego, se prepararon las diferentes condiciones de tratamiento: Control positivo (70% de etanol en medio mínimo), control negativo (10% de metanol en medio mínimo) y tratamiento con el compuesto poligodial, de tal forma que la concentración final de este sea 160 ppm. Se agregó 1mL de cada uno de los tratamientos a diferentes pocillos. El control positivo fue incubado por 10 min, el control negativo y el tratamiento con poligodial, por al menos 60 min. Después de la incubación, se procedió al lavado de los cubreobjetos. Este procedimiento se repitió 3 veces, para ello se retiró el medio de cultivo y con ayuda de una pinza se tomaron los cubreobjetos, los cuales fueron depositados sobre gotas de medio mínimo sin glucosa.

Inmediatamente después de los lavados, se procedió a la incubación con 5 μ L el colorante Sytox® Green (TermoFisher Scientific) por 10 min en oscuridad. Trascurrido este tiempo, se eliminó el exceso de colorante mediante un lavado con medio mínimo sin glucosa (repetirlo 3 veces). Luego, los cubreobjetos con los conidios teñidos se montaron en portaobjetos con 10 μ L de DaBCO (Sigma Aldrich) y se sellan los bordes. Finalmente, se llevó a cabo la visualización de los conidios adheridos y teñidos en un microscopio de fluorescencia, excitándolas a una longitud de onda de 450-490 nm.

4.5 Determinación de daño celular por producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) por medio de ROS-GLO.

4.5.1 Cultivo de conidios.

Se realizó un cultivo de conidios de *B. cinerea* B05.10 en placa de Petri de 100 mm en medio ML, a partir de una suspensión de conidios mantenidas en glicerol a -20°C. Se incubaron por 5-7 días en oscuridad a 21°C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la recolección de los conidios agregando 5 ml de medio mínimo (MM) (1 g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L K_2HPO_4 , 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L KCL, 0,01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,6 g/L $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$ 25 mm) y con ayuda de un asa microbiológica. La solución de conidios es recolectada en tubo centrifuga, filtrada y cuantificada una en cámara de Neubauer. Finalmente, se preparó una suspensión de conidios de 10^6 conidios/mL

4.5.2 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ERO).

La determinación de EROs se llevó a cabo con uso del kit comercial ROS-Glo™ H_2O_2 Assay (Promega). A una placa de 96 pocillos, se le agregó 79 μL de la suspensión de 10^6 conidios/mL a cada pocillo. Luego se añade 1 μL de menadiona como control positivo a un pocillo y 1 μL del compuesto ensayado (poligodial) en otro pocillo, de tal forma que la concentración final de poligodial en cada pocillo sea de 160 ppm, como control negativo se ocupó la solución de conidios y el solvente en cual se preparó la solución de poligodial. Luego, se llevó a un volumen final de 100 μL , adicionando 20 μL de buffer sustrato H_2O_2 . Se incubó por 2 horas a 21°C , en condiciones de humedad y oscuridad. Transcurrido el tiempo, se agregan 100 μL del reactivo ROS-Glo a cada pocillo, se dejó incubar por 20 minutos a temperatura ambiente. Pasada la incubación se procedió a la lectura de los parámetros lumínicos a través del equipo TECAN Infinite Pro m200.

4.6 Análisis de expresión por PCR cuantitativo (qPCR) de genes relacionados con daño celular.

4.6.1 Extracción de ARN total y Síntesis de ADNc

La extracción de ARN total se realizó a partir de conidios de *B. cinerea*, crecido en medio líquido malta levadura (2% p/v extracto de malta y 0,2 % p/v extracto de levadura) por 5-7 días a 21°C en agitación constante 150 rpm.

Cada matraz contiene un tratamiento antifúngico, poligodial a 160 ppm además de control sin tratamiento. Transcurrido el tiempo de cultivo se procedió a

moler el micelio en un mortero con nitrógeno líquido, las muestras se guardaron en tubos eppendorf independientes a -80°C.

La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando TRIzol® (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. Finalmente, se resuspendió el pellet en 30-50 µL de agua libre de nucleasas, se trató con DNasa (Life Technologies) y se cuantificó en equipo TECAN Infinite Pro m200. Para confirmar la integridad del ARN obtenido, se realizó una electroforesis en gel denaturante, utilizando 1,5% agarosa (p/v), 0,1 % MOPS (p/v). El buffer de carga contenía 65% de formamida desionizada (v/v), 22% formaldehído (v/v) y 13% MOPS (v/v).

La síntesis de ADN complementario se llevó a cabo con 1 µg de ARN total incubando con la enzima máxima H minus (Thermo), agregando 1 µL de oligo dT y 1 µL de mix de dNTP's 10 mM, llevando a un volumen final de 15 µl por reacción con agua libre de nucleasas. Se incubó por 5 minutos a 65°C, transcurrido el tiempo se paró la reacción dejando las muestras en hielo. Se agregó 4 µl de buffer RT 5X, 1 µl mix enzima maxima H minus, llegando a un volumen final de 20 µl. Incubar por 20 minutos a 50°C, terminar la reacción aumentando la temperatura a 80°C por 5 minutos. Se cuantificó la síntesis en equipo TECAN Infinite Pro m200 y se toma una alícuota para realizar PCR para amplificar tubulina, como control de la síntesis de cDNA.

4.6.2 Determinación de los niveles de expresión mediante qPCR.

Las reacciones de amplificación de PCR en tiempo real fueron realizadas en el equipo LightCycler® 96 (Roche). Utilizando 100 ng de ADNc, 10 µL de KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal (Kapa Biosystems, MA, EE. UU.) y 0,3 mM de partidores (Fermelo) en 20 µL de reacción total. Cada uno de los ADNc fue medido por triplicado, incorporando sus respectivos controles negativos y positivos. En el perfil térmico utilizado se incluyó una etapa de activación/desnaturación inicial de 3 minutos a 95°C y 40 ciclos compuestos por una desnaturación a 95°C por 3 segundos y alineamiento/extensión a 60°C por 30 segundos, siendo esta etapa donde se mide la fluorescencia en cada ciclo. Una vez finalizada esta etapa, se realizó una curva de desnaturación, donde se

determina la temperatura de desnaturalización (Tm) para todos los productos obtenidos.

Para la determinación de cambios de expresión de los genes estudiados, se utilizó el método de cuantificación relativa con el gen de expresión endógena constitutiva de *B. cinerea*, UBCe. Los genes estudiados corresponden a *Bcaox*, el cual corresponde a la oxidasa alternativa, una enzima que forma parte de la cadena transportadora de electrones [Magnani *et al.*, 2007; Honda *et al.*, 2012]; *Bchex*, que codifica para la proteína principal del cuerpo Woronin [Aguayo *et al.*, 2011]; *cas-1* y *Bcnma*, genes relacionados con la muerte celular programada (PDC): el gen *cas-1*, ortólogo a *cas-A*, corresponde a una metacaspasa y *Bcnma* es un homólogo del gen de levadura *NMA11* [Shlezinger *et al.*, 2011; Vande Walle *et al.*, 2008]. Las secuencias de los partidores utilizados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 Secuencia de los partidores utilizados para el estudio de expresión génica.

Partidor	Secuencia	Tm °C	Eficiencia primers qPCR
<i>cas-1 f</i>	5'-ATGGAGGCTATGGAGCACCA-3'	57	97
<i>cas-1 r</i>	5'-GCAACACCGCTCATATCACCT -3'		
<i>Bcaox f</i>	5'-CAATGTATGTATCAAGGGTA-3'	57	99
<i>Bcaox r</i>	5'-TCTTCATGCGATCCCTCA-3'		
<i>Bchex f</i>	5'-TCTACTTCAACGAGGCTTC-3'	57	99
<i>Bchex r</i>	5'-CACCAGATTGACCGAAAAC-3'		
<i>Bcnma f</i>	5'-ATGATCGGCACCAACGGCGT-3'	57	98
<i>Bcnma r</i>	5'-CAAAGGTCGATCGAGTGGCAA-3'		

5 Resultados

5.1 Evaluación de la actividad antifúngica de poligodial en el crecimiento de *B. cinerea*.

El compuesto poligodial fue extraído desde corteza de canelo y purificado por el Dr. Héctor Carrasco quien gentilmente lo cedió para realizar los experimentos de esta tesis. La evaluación del efecto antifúngico de poligodial sobre el crecimiento micelial fue estudiado en la cepa B05.10 de *B. cinerea*, aislado modelo del patógeno y sobre cepas nativas que presentaron diferentes características de resistencia a los fungicidas comercialmente en uso.

Se observó que a las 24 horas de incubación, poligodial produce un efecto inhibitorio cercano al 20% sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*. B05.10 Esta inhibición es dosis dependiente, logrando un máximo de inhibición a las 160 ppm del compuesto, alcanzando una inhibición de 47% respecto al control. A su vez no se observan cambios a nivel morfológico en el crecimiento del hongo. Las otras mediciones realizadas a las 48 y 72 horas mantienen la tendencia de inhibición en el crecimiento siendo dosis dependiente, teniendo un menor efecto a las 72 horas (Figura 4).

La evaluación de la dosis a la cual se logra inhibir el 50% del crecimiento de la población se llevó a cabo a las 48 horas, midiendo el radio de crecimiento de *B. cinerea* en medio sólido, y se logró calcular el valor de EC_{50} . En la figura 5 se observa el porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* en presencia de poligodial producido a las 48 horas de incubación. El resultado indica que se produjo una inhibición dosis dependiente en el crecimiento obteniendo su mejor rendimiento a una concentración de 160 ppm. Mientras tanto el valor de EC_{50} obtenido para poligodial es de 162,1 ppm. Mostrando un valor más alto que el antifúngico comercial de origen natural BC-1000 (33ppm) (Tabla 3).

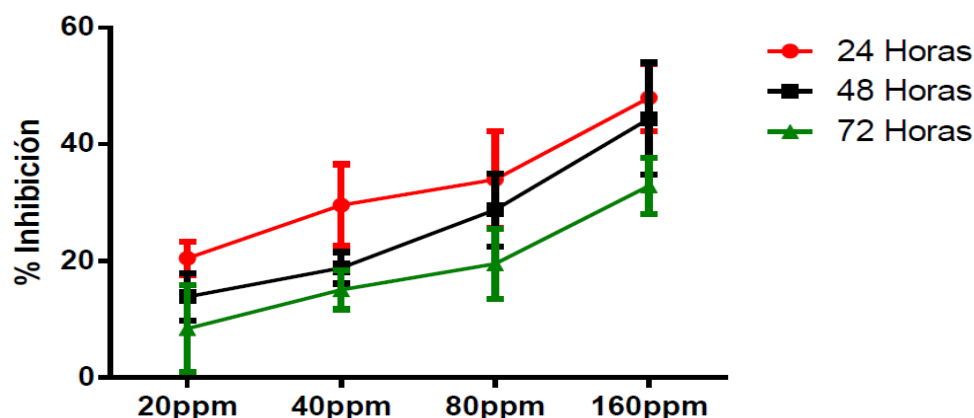


Figura 4: Efecto de poligodial en el crecimiento micelial de *B. cinerea*. Poligodial fue disuelto en diclorometano a una concentración final de 20, 40, 80 y 160 ppm. Se usaron dos controles, uno de ellos micelio crecido solo en medio ML y el otro micelio crecido en medio ML con solvente (diclorometano), cada punto representa el promedio de 3 experimentos independientes, barra de error corresponde a la desviación estándar.

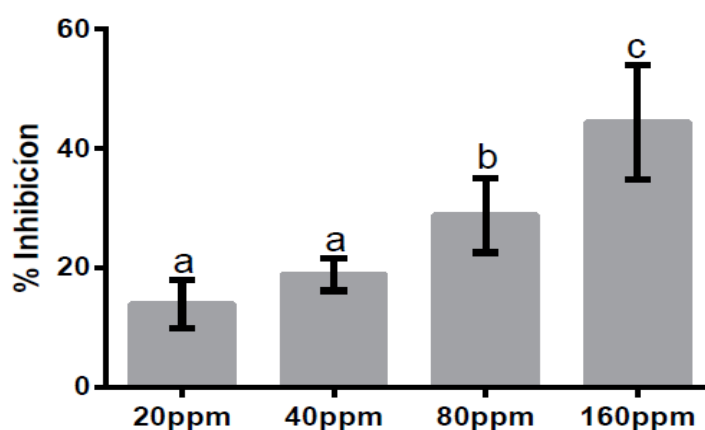


Figura 5: Efecto de poligodial en el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* a las 48 horas. Poligodial fue disuelto en diclorometano a una concentración final de 20, 40, 80 y 160 ppm. Se usaron dos controles, uno de ellos micelio crecido solo en medio ML y el otro micelio crecido en medio ML con solvente (diclorometano). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos independientes y la barra de error corresponde a la desviación estándar. Letras diferentes indican valor estadísticamente diferente según test de tukey ($p < 0,005$).

Se concluye que poligodial presentaría una actividad, afectando el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno, siendo esta dosis dependiente en el tiempo.

5.2 Evaluación de la actividad antifúngica de poligodial sobre la germinación de conidios de *B. cinerea*.

En este objetivo se evaluó el efecto que presenta el compuesto poligodial sobre la germinación de la cepa B05.10 de *B. cinerea*, aislado modelo del patógeno.

En la figura 6 se observa una gráfica de porcentaje de germinación versus tiempo de incubación en presencia de diferentes concentraciones de poligodial. Se observa una marcada disminución en la germinación de los conidios que fueron tratadas con el compuesto poligodial. Este efecto ya se observa a partir de las 2 horas y se mantiene en el tiempo (figura 6).

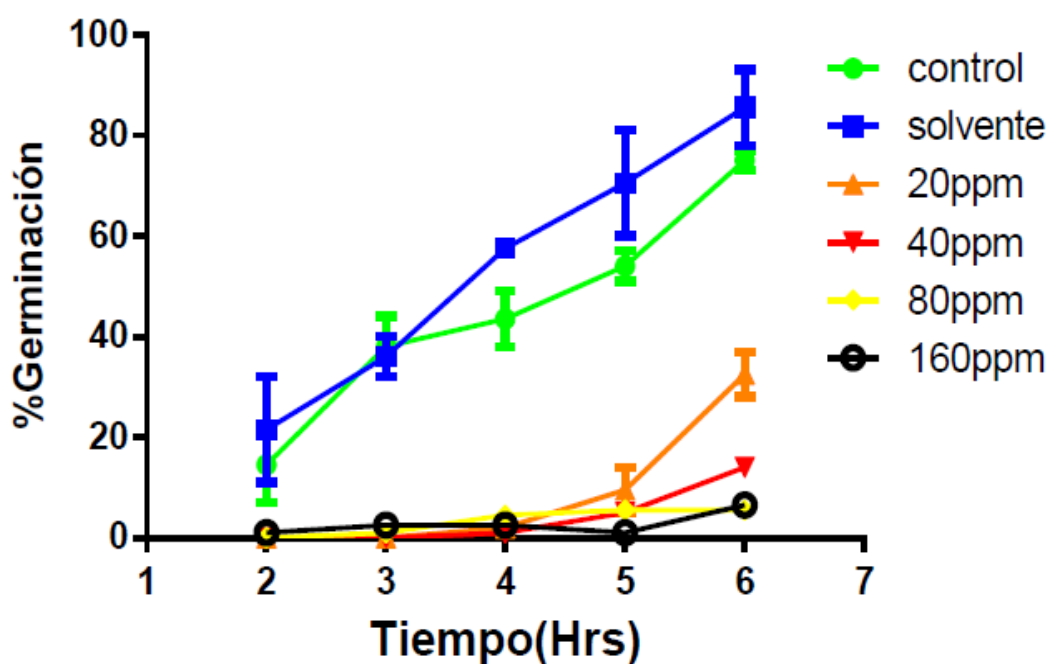


Figura 6: Cinética de germinación de las conidios de *B. cinerea*. Poligodial fue disuelto en diclorometano a una concentración final de 20, 40, 80 y 160 ppm. Se usaron dos controles, uno de ellos micelio crecido solo en medio ML y el otro micelio crecido en medio ML con solvente (diclorometano). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos independientes y la barra de error corresponde a la desviación estándar. ($p < 0,005$).

A las 3 horas de incubación de los conidios, la cepa control presenta un porcentaje de germinación de un 38% a diferencia de los conidios incubados en presencia de poligodial, donde el porcentaje de germinación es de un 2% en las dosis de 20, 40 y 80 ppm mientras que para 160 ppm hay un 1% de conidios germinados. Esta inhibición en la germinación se mantiene en las horas posteriores de incubación donde a las 4 horas el control germina un 43% mientras que los conidios tratados no superan el 5% de germinación. A las 5 horas el control alcanza un porcentaje de germinación de un 54 % de germinación y los conidios tratados van desde 9,5% a 20 ppm a 1% germinadas a 160 ppm. Finalmente, a las 6 horas post incubación se observa que el control germina un 75% de los conidios mientras que en presencia de poligodial a mayor concentración (160ppm), se logra un porcentaje de germinación de 6%.

Los resultados muestran un fuerte decaimiento en la germinación de los conidios, en presencia de poligodial a las diferentes concentraciones, indicando nuevamente que es dosis dependiente, ya que a mayor concentración del compuesto estos no germinan, siendo hasta 10 veces menor la cantidad germinada a la mayor concentración utilizada (figura 6). En la figura 7 se muestran imágenes del proceso de germinación de los conidios, en medio control y en medio con poligodial a 160 ppm, a las 2 y 6 horas de incubación. Y se observa que hay un cambio en la morfología.

5.3 Descripción del mecanismo de acción de poligodial en *B. cinerea*.

Con el objetivo de dilucidar un posible mecanismo de acción por el cual poligodial está afectando al hongo *B. cinerea*, se realizaron 3 ensayos para evaluar su efecto en la estabilidad de la membrana, la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la expresión de genes específicos relacionados con daño celular.

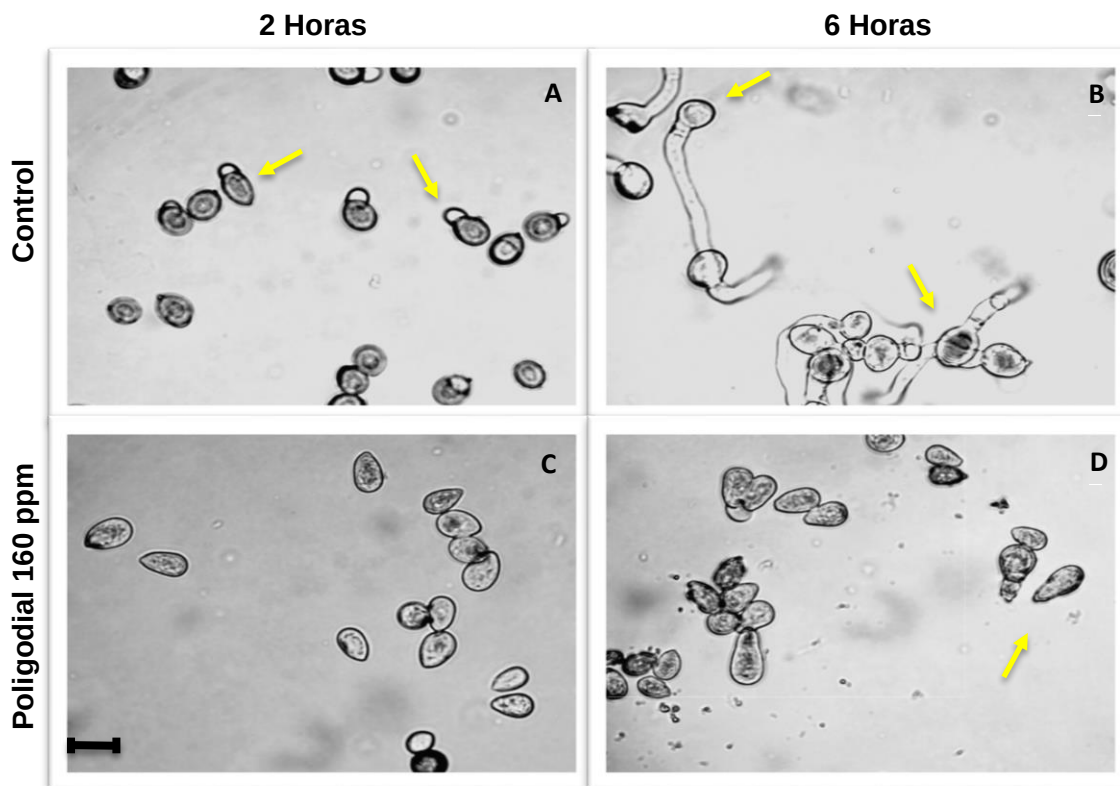


Figura 7 : Efecto de poligodial en la germinación de conidios de *B. cinerea*. Poligodial fue disuelto en diclorometano a una concentración final de 160 ppm. A y B, representan conidios de *B. cinerea* en medio control a las 2 y 6 horas de incubación. C y D, representas conidios de *B. cinerea* en medio con presencia de poligodial 160 ppm a las 2 y 6 horas de incubación respectivamente. Flechas indican conidios en proceso de germinación. La barra corresponde a 20 μ m.

5.3.1. Evaluación de la estabilidad de membrana.

Se procedió a evaluar la estabilidad de la membrana citoplasmática de *B. cinerea* en presencia de poligodial, a través de la tinción intracelular con el colorante Sytox Green. Este colorante, tiene una alta afinidad para unirse a material genético y es incapaz de penetrar las membranas de células vivas, pero cruza fácilmente las membranas que se encuentran comprometidas con algún daño [Lebaron *et al.*, 1998].

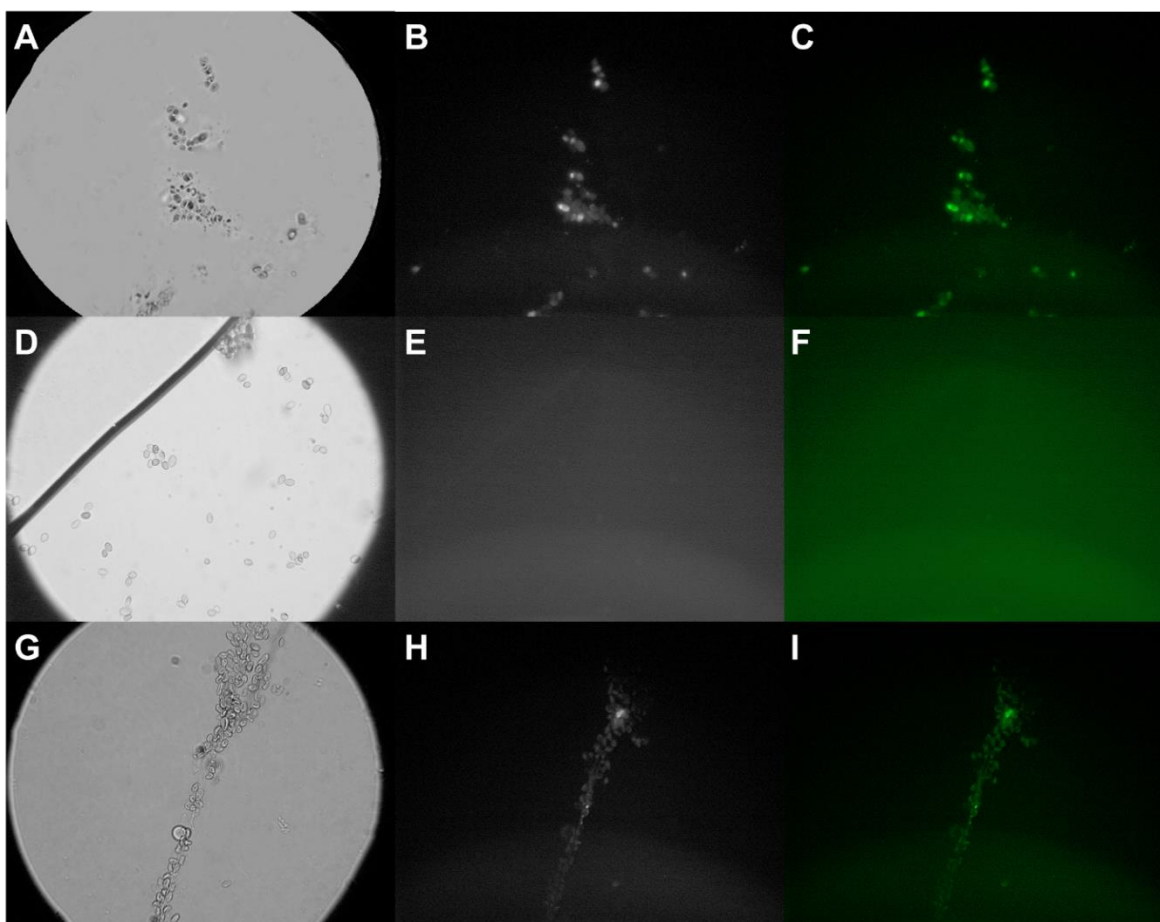


Figura 8: Efecto del compuesto poligodial en la integridad de la membrana de *B. cinerea*. Suspensión de conidios 1×10^6 conidios/mL, fueron incubados en medio mínimo en presencia de etanol 70% (v/v) como control positivo (A, B y C), metanol 10% (v/v) como control negativo (D, E y F) y poligodial a 160 ppm (G, H e I) e incubados durante 3 horas. La fluorescencia fue observada en un microscopio de fluorescencia. Las fotografías representan 3 experimentos independientes.

En la figura 8 se muestra la acción del colorante intracelular SYTOX, en presencia de etanol 70%, el cual causa deshidratación de la membrana celular, por eso es usado como control positivo. En presencia de etanol 70% (control positivo), es posible observar fluorescencia en el interior de las hifas (figura 8 A, B y C), mientras tanto metanol 10% fue usado como control negativo, el cual no causa daño al hongo, no es posible observar fluorescencia (figura 8; D, E y F). Por otra parte, al someter al hongo al tratamiento con poligodial a 160 ppm, es posible observar claramente la fluorescencia luego de 3 horas de incubación.

Estos resultados indican que poligodial estaría causando una disrupción de la membrana plasmática de *B. cinerea* permitiendo el paso del colorante SYTOX Green el cual se une al material genético.

5.3.2 Producción de especies reactivas de oxígeno de *B. cinerea* en presencia de poligodial.

Para lograr verificar si se produce daño a nivel de membrana plasmática, el efecto de poligodial en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) fue evaluado con el kit Ros-Glo Assay (Promega). Para ello se incubaron conidios de *B. cinerea* en presencia de 160 ppm poligodial por 3 horas a 21°C, en oscuridad. La producción de EROs fue medida con el kit Ros-Glo TM H₂O₂ Assay [Kelts et al., 2015].

En la figura 9, se ve el efecto de la producción de EROs en *B. cinerea* en presencia de poligodial a una concentración de 160 ppm. Para lograr discriminar si la producción de luminiscencia se debe a la acción del poligodial, se utilizó como control negativo medio mínimo con suspensión de conidios y el solvente en el cual se preparó la solución de poligodial. Además, como control positivo a la reacción, se utilizó menadiona (vitamina k3), el cual es un inductor de especies reactivas de oxígeno [Scott et al., 2005], según las especificaciones del fabricante. Se observa que el control positivo tiene un promedio de luminiscencia bastante mayor, siendo significativamente diferente al control negativo, llegando al doble que el control negativo, mientras que en presencia de poligodial a 160 ppm la producción de EROs se ve aumentada 3 veces respecto al control negativo y 0,5 veces más que el control positivo. Esto indicaría que el compuesto evaluado tiene un efecto en el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno, que estarían asociadas a daño celular.

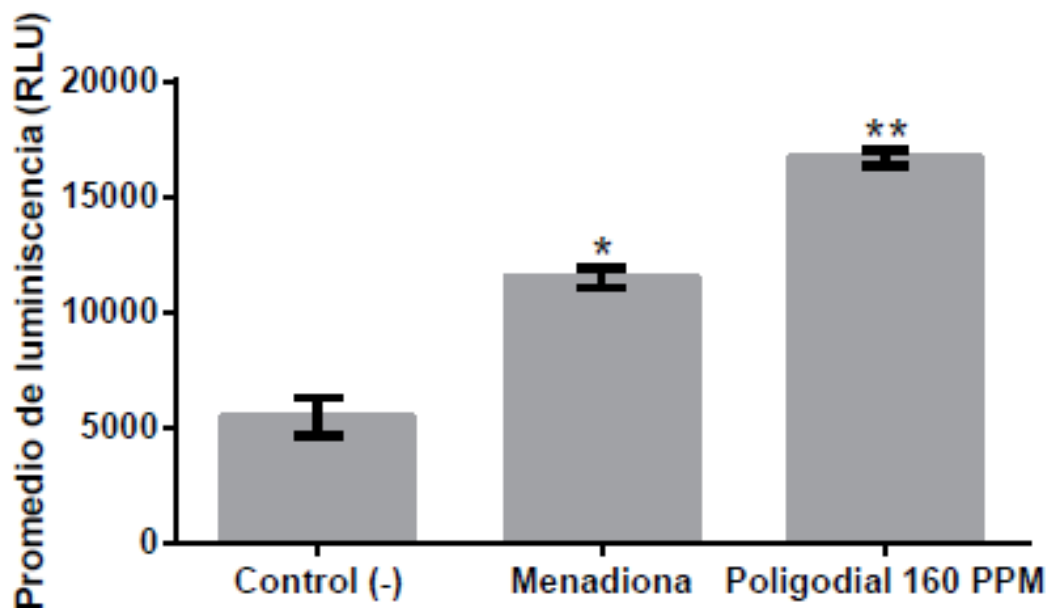


Figura 9: Efecto de poligodial en la producción de especies reactivas de oxígeno en *B. cinerea*. Se cuantificó la cantidad de EROs producidas en presencia de poligodial. Control (-), corresponde a medio con solución de esporas; Menadiona, corresponde al control positivo de EROs (inductor de especies); poligodial se ocupó a 160ppm. (*) Representa diferencia significativa entre las medias de los ensayos.

5.3.3 Cambios de niveles de expresión de genes relacionados con daño celular de *B. cinerea* en presencia de poligodial.

Con el fin de profundizar el mecanismo por el cual estaría actuando poligodial contra el hongo, se estudiaron los cambios de expresión de genes relacionados con el daño celular. Para ellos, conidios del hongo se incubaron con poligodial a 160 ppm durante 3 horas.

Los resultados sugieren que los genes relacionados con la muerte celular programada (MCP), *Bcnma* y *cas-1*, no exhiben un cambio en los niveles de expresión cuando *B. cinerea* está expuesta al tratamiento con poligodial. Ocurre lo mismo con los niveles de expresión del gen *Bcaox*, la cual corresponde a una oxidasa alternativa, ya que tampoco hay una diferencia en la expresión respecto al control. Mientras tanto el gen *Bchex*, el cual codifica la proteína principal del

cuerpo de Woronin, presenta una disminución en los niveles de expresión de transcrito en la muestra tratada con poligodial a 160 ppm, en comparación con la muestra control (figura 10).

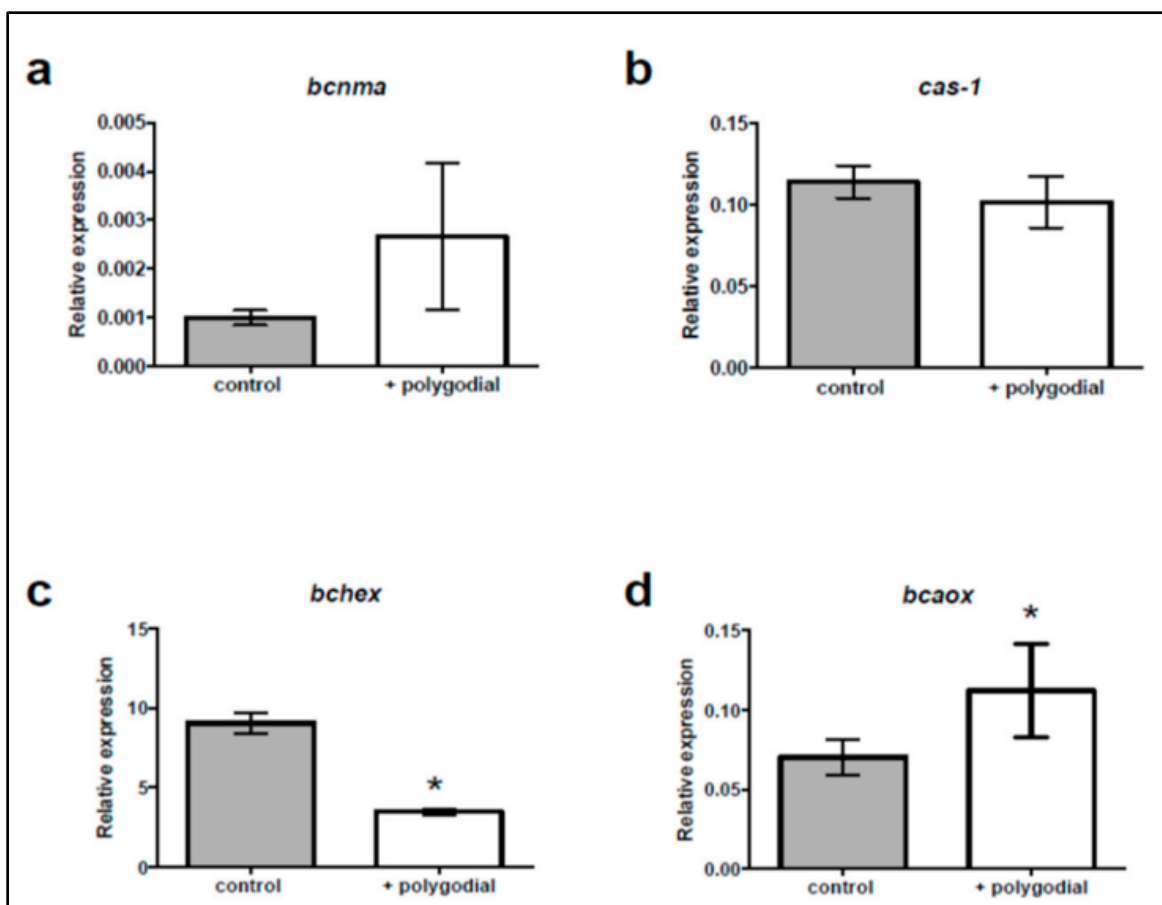


Figura 10: Efecto de poligodial sobre a expresión de genes relacionados con daño celular en *B. cinerea*. Efecto de poligodial en los niveles de RNAm de *Bcnma*, *cas-1*, *Bchex*, y *Bcaox*. Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno. (*) Representa diferencia significativa $p < 0,05$ student *t*-test.

Estos resultados indicarían que poligodial estaría produciendo un daño celular en el hongo, ya que los niveles de expresión del gen *Bchex* se ven disminuidos. por lo cual habría una modulación negativa de este gen.

5.4 Evaluación de la actividad de poligodial en el crecimiento micelial de cepas nativas de *B. cinerea* con diferentes fenotipos de resistencia a antifúngicos químicos comerciales.

Con el propósito de evaluar la capacidad antifungica del compuesto poligodial sobre cepas nativas chilenas que presentan diferentes fenotipos de sensibilidad a fungicidas comerciales, se realizaron ensayos de inhibición. A continuación, se describe las características de las cepas nativas chilenas en cuanto a su sensibilidad a los fungicidas (tabla 2).

Tabla 2 Cepas nativas con diferentes tipos de fenotipos de resistencia a antifungicos comerciales.

ID Cepa Nativa	PROCEDENCIA	FENOTIPO	ANTIFÚNGICO QUÍMICO SINTÉTICO
PN2	Cereza	Resistente	Iprodione / Pyrimethanil Fenhexamida / Boscalid
7AC	Pera	Resistente	Fenhexamida

Los resultados se muestran en la figura 11. El poligodial mantiene su actividad antifúngica en el crecimiento micelial en aislados nativos de *B. cinerea* con diferentes grados de resistencia a antifungicos comerciales. Como se observa en la figura 11a, para el aislado PN2, aislado multiresistente, la inhibición del crecimiento fue independiente del tiempo de incubación y la concentración de poligodial (figura 11 A y B).

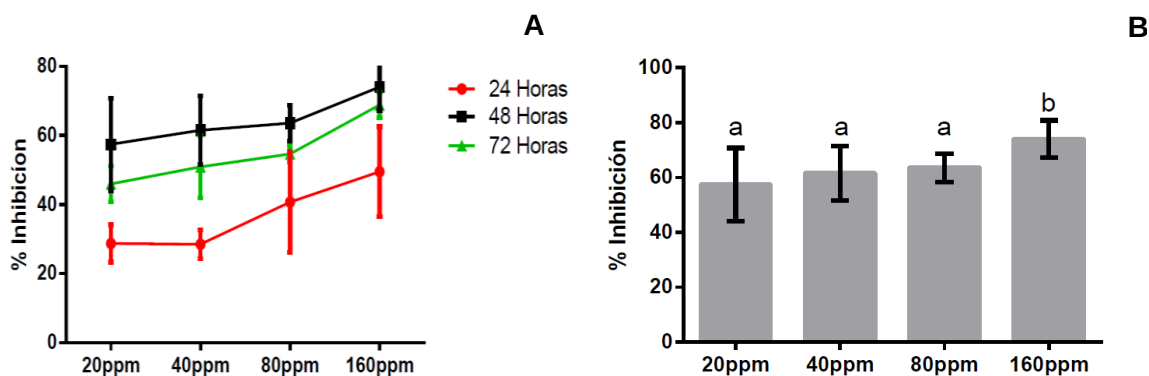


Figura 11: Efecto de poligodial en el crecimiento micelial de *B. cinerea* cepa multiresistente PN2. Poligodial fue disuelto en diclorometano a una concentración final de 20, 40, 80 y 160 ppm. Se usaron dos controles, uno de ellos micelio crecido solo en medio ML y el otro micelio crecido en medio ML con solvente (diclorometano). A) cinética de crecimiento de *B. cinerea* aislado PN2, en presencia de poligodial, B) Efecto de poligodial sobre el crecimiento de *B. cinerea* a las 48 horas de tratamiento. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos independientes. Barra de error corresponde a la desviación estándar.

Por otro lado, el aislado nativo 7AC, muestra inhibición concordante con los resultados obtenidos con el aislado B05.10, mostrando un efecto inhibitorio del crecimiento micelial dependiente del tiempo de incubación y de la concentración de poligodial (figura 12; A y B). No obstante, los porcentajes de inhibición son menores que los obtenidos con el aislado PN2. Los valores de inhibición van desde un 20% a 20 ppm, hasta 55% a 160 ppm a las 24 horas, manteniendo la cinética, con valores similares a las 48 y 72 horas del tratamiento (figura 12 A).

En la figura 12B, se observa el efecto inhibitorio a las 48 horas de incubación, en donde se establece que el efecto inhibitorio va desde un 20% a las 20 ppm hasta un 70% de inhibición del crecimiento con 160 ppm.

En base a los valores de EC_{50} , encontramos que tanto para la cepa PN2 y 7AC tienen valores más bajo que con la cepa de laboratorio B05.10, siendo estos valores de 62 y 72,6 ppm respectivamente, siendo entre 55% y 62% menos que la cepa de laboratorio (tabla 3).

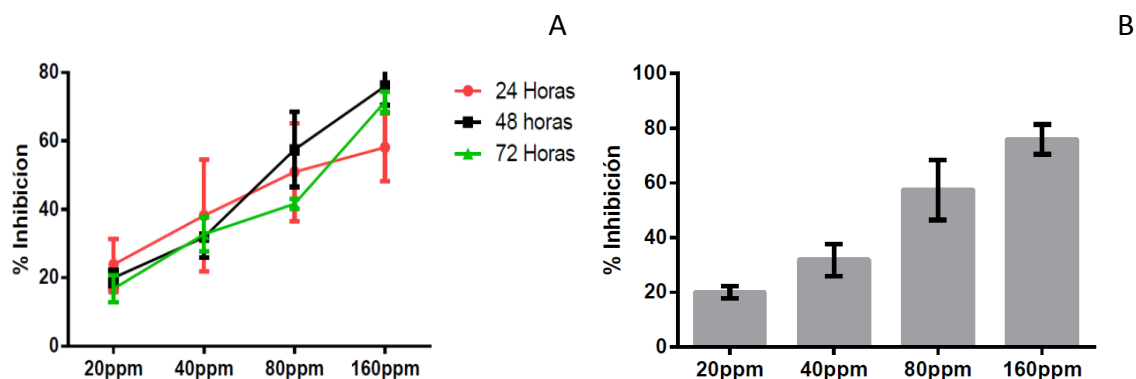


Figura 12: Efecto de poligodial en el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* 7AC a las 48 horas. Poligodial fue disuelto en diclorometano a una concentración final de 20, 40, 80 y 160 ppm. Se usaron dos controles, uno de ellos micelio crecido solo en medio ML y el otro micelio crecido en medio ML con solvente (diclorometano). A) cinetica de crecimiento de *B. cinerea* aislado 7AC, en presencia de poligodial, B) Efecto de poligodial sobre el crecimiento de *B. cinerea* a las 48 horas de tratamiento. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos independientes. Barra de error corresponde a la desviación estándar.

Tabla 3 Efecto de poligodial en el crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea*, estimación de la dosis efectiva 50%, obtenida a las 48 horas de incubación.

Compuesto	Cepa	EC ₅₀ (ppm)
Poligodial	B05.10	162,1
BC-1000	B05.10	33

6 Discusión.

6.1 Evaluación de la actividad de poligodial en el crecimiento micelial de *B. cinerea* y determinación de EC₅₀.

En base a los resultados obtenidos, se logró establecer que el sesquiterpeno poligodial, presenta un efecto antifúngico sobre el crecimiento de *B. cinerea* en medio de cultivo ML, ya que hubo una disminución en el crecimiento micelial dependiente del tiempo de incubación alcanzando una inhibición del 50% a 160 ppm del compuesto. No obstante, el efecto de la presencia de poligodial sobre la germinación de los conidios de *B. cinerea*, demostró ser mucho más eficiente que la inhibición en el crecimiento micelial. Este efecto quedó claramente demostrado en la cinética de germinación, obteniéndose una gran diferencia entre las muestras control y las muestras tratadas.

Este resultado se ve soportado en el hecho de que se ha descrito que varios sesquiterpenos presentan actividad contra *B. cinerea*, por ejemplo, el 7-hidroxi-calamenene y drimenal, aislado de *Bazzania trilobata* y los diterpenoides, ácido kolavenico y ácido 2-oxokolavenico obtenido a partir de extractos *monandra Macaranga* [Salah *et al.*, 2003; Jochen y Speakan, 2004]. Además, también se ha descrito que otros diterpenoides naturales tienen un efecto similar sobre *B. cinerea*. Mendoza y colaboradores reportaron que el ácido sálvico, ácido acetilsálvico y algunos diterpenos hemisintéticos también son capaces de inhibir el crecimiento del micelio en este patógeno [Mendoza *et al.*, 2009]. En otros hongos se ha informado que ácido kaurenoico, extraído de las hojas de *Mikania hirsutissima*, mostró que la actividad fungistática contra *Aspergillus nidulans* con el alargamiento visible de la hifa y daños morfológica [Rafael *et al.*, 2013].

Al comparar el efecto de poligodial contra drimenol, otro metabolito aislado desde canelo, el poligodial presenta un efecto antifúngico a mayor a concentración que Drimenol (80 ppm) [Robles-Kelly *et al.*, 2017]. Esta variación se debería a la diferencia estructural de estos compuestos, ya que poligodial cuenta con un doble

enlace conjugado con un grupo aldehído en la posición 9C, mientras que drimenol presenta un doble enlace con un grupo metilo [Carrasco *et al.*, 2017].

El efecto que pueden presentar los terpenoides como antifúngicos está relacionado con la estructura que presente el compuesto [Mendoza *et al.*, 2009]. Demostrando que diterpenos que cuentan con una cadena lateral más corta son más eficaces que los de cadena lateral más larga en la inhibición del crecimiento. Asimismo, derivados semisintéticos de poligodial, fueron evaluados en actividad citotóxica en líneas celulares cancerígenas *in vitro* [Montenegro *et al.*, 2013]. Los autores describieron que poligodial y algunos derivados tenían efecto inhibitor sobre el crecimiento de las células cancerígenas. Esto sugiere que la presencia de sistemas insaturados y grupos de dialdehídos en la estructura de los compuestos es de gran relevancia para la actividad biológica sobre células cancerígenas. La obtención del valor de EC₅₀, que nos permite conocer la cantidad necesaria para poder inhibir el 50% de la población es de 160 ppm, nos permite comparar la eficiencia frente a otros compuestos. Por ejemplo, el EC₅₀ de poligodial es 5 veces más alto que el antifúngico natural BC-1000, producto comercial, el cual corresponde a un extracto de semilla y pulpa de cítricos asociados a bioflavonoides, que tiene un valor de EC₅₀ bastante menor, por lo cual no es competitivo, pero aun así puede ser fuente de uso en campos que no deseen generar residuos de fungicidas sintéticos. Sin embargo, tiene un efecto mejor que aceites esenciales y extractos de algunas plantas como por ejemplo: el extracto de lavanda tiene un EC₅₀ de 223 ppm y el extracto de romero un EC₅₀ 606 ppm [Daferera *et al.*, 2003].

Respecto a la germinación de los conidios, poligodial estaría retrasando el proceso de germinación, el cual termina afectando el desarrollo de las hifas. Otros metabolitos secundarios que afectan la germinación de conidias en *B. cinerea*, son los flavonoides, es el caso de sakuranetina, un flavonoide aislado de la superficie de *Ribes nigrum* [Grayer and Harborne, 1994].

En cuanto al uso de este compuesto en las cepas nativas con diferentes fenotipos de resistencia a antifúngicos comerciales, se determinó que actúa de

mejor forma, bajando los valores de EC₅₀ siendo entre 2 y 3 veces más baja la dosis para las cepas 7AC y PN2, respectivamente. Esto es un resultado bastante prometedor debido a que este producto podría ser aplicado en campo, en combinación con otros agentes fungicidas, para lograr un efecto complementario sobre la inhibición *B. cinerea*; además de tratarse de un producto de origen natural, los efectos sobre el medio ambiente son bastante menores, evitando así la contaminación de suelos y/o aguas.

6.2 Posible mecanismo de acción de poligodial

A partir de los ensayos de estabilidad de membrana, producción de especies reactivas de oxígeno y análisis de expresión génica en presencia de poligodial, es posible concluir que este compuesto estaría actuando a nivel de membrana produciendo una inestabilidad de ésta, lo cual afectaría la germinación de conidios y retrasaría el crecimiento de las hifas.

En cuanto a la estabilidad de la membrana plasmática del hongo, ésta se vió alterada, debido a que el colorante logró penetrarla y unirse al núcleo. Estudio realizado por Lebaron *et al* (1998), establecieron que el colorante SYTOX Green, es incompetente de unirse a los núcleos de las células que no presenten daño celular, ya que es incapaz de penetrar membranas de células vivas. Por lo que el resultado indica que poligodial produce una disrupción de la membrana plasmática.

Este resultado se ve apoyado por lo comunicado por Cotoras *et al.*, (2015), quienes reportaron otros diterpenos que también permeabilizaron la membrana en la germinación de conidias de *B. cinerea*, permitiendo el paso del colorante. Con esto se establece que la causa del daño en la membrana es realizada por diterpenos, en este caso el poligodial.

Para comprobar el daño celular, en específico el daño en la membrana plasmática, se midieron los niveles de EROs, producidos por conidios del hongo en presencia de poligodial, donde se observó producción de estas especies al

estar en incubadas con poligodial, siendo 3 veces mayor que el control sin tratamiento, siendo incluso mayor que el control positivo (menadiona), por lo que se estable una correlación con el daño de membrana, puesto que estudios anteriores ha establecido que un aumento en la producción de EROs es evidencia de daño celular, en respuesta a defensa [Benezer *et al.*, 2008]. Además, se ha descrito la función de EROs en la regulación de inmunidad, proliferación celular, diferenciación, transducción de señales y transporte [Finkel, 2003; Kwak *et al.*, 2003; Lambeth, 2004].

Existen otros compuestos que promueven la producción de EROs, por ejemplo, el miconazol produce un aumento en la producción de EROs, en el hongo *Candida albicans* a baja concentración del antifúngico, siendo dosis dependiente ya que al aumentar la concentración aumentan los niveles de EROs, este aumento afecta la viabilidad celular del hongo [Kobayashi *et al.*, 2002]

Con la idea de profundizar el mecanismo por el cual actúa poligodial como antifúngico contra *B. cinerea*, se realizaron estudios de cambios en la expresión de genes candidatos asociados con el daño celular. En el estudio hubo un cambio significativo en la expresión de genes, en el caso de gen *Bchex*, el cual codifica la proteína principal del cuerpo de Woronin, el cual presentó una disminución en la expresión. Un aumento en la expresión de este gen indica que los cuerpos de Woronin se esta produciendo, para tapar los poros generados por el daño en las hifas. [Collinge and Markham, 1985; Aguayo *et al.*, 2011]. En este caso al verse disminuido, indica que hay una regulación negativa de este gen, por lo cual no estarían apareciendo los cuerpos necesarios para reparar el daño producido a nivel de membrana, por lo cual no se estarían tapando los poros producidos, provocando un gran daño a nivel de membrana.

Los otros genes analizados, *Bcnma* y *cas-1*, relacionados con muerte celular programada, no presentaron diferencias, por lo cual sería indicativo que poligodial estaría actuando como fungistático, ya que no provoca la muerte del hongo pero si inhibe su crecimiento.

En el caso de la expresión de *Bcaox*, una oxidasa alternativa, la cual está descrita que su expresión es alterada bajo condiciones de estrés oxidativo [Magnani *et al.*, 2007; Honda *et al.*, 2012], se observa un aumento en presencia de poligodial, lo que sugiere una disfunción mitocondrial, debido al daño en los complejos formadores de ATP localizados en la membrana interna.

Basado en los resultados obtenidos en este estudio, es posible decir que el aldehído sesquiterpeno poligodial produce daño a nivel de membrana, pero no es tan fuerte el deterioro de ésta como para producir disfunciones en la cadena transportadora de electrones. Por lo cual, poligodial estaría actuando como un mecanismo de acción fungistático, inhibiendo fuertemente la germinación de los conidios de *Botrytis cinerea* y afectando su crecimiento micelial.

7 Conclusiones y Proyecciones

La evaluación realizada de la actividad antifúngica de poligodial sobre el crecimiento micelial y la germinación de los conidios de *B. cinerea*, nos permite sugerir que poligodial afecta el crecimiento micelial, ralentizando el proceso, y por otro lado, inhibe fuertemente el proceso de germinación de *B. cinerea*.

El mecanismo de acción de este metabolito secundario involucra la desestabilización de la integridad de la membrana, la producción de EROs y la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, como la modulación negativa de la expresión de genes relacionados con la reparación de daño celular en el hongo fitopatógeno.

Las proyecciones de este trabajo, están relacionadas a mejorar la actividad de este compuesto, a través de procesos fisicoquímicos, o relacionarlo con otro metabolito que presente actividad, por ejemplo el drimenol, el cual también se obtiene a partir de la corteza del canelo, que también presenta actividad antifúngica contra *B. cinerea*, pero teniendo un comportamiento distinto, ya que drimenol, inhibe fuertemente el crecimiento micelial, pero no afecta a gran escala la germinación de los conidios, por lo cual se podría hacer una terapia combinada para mejorar la efectividad en el control del hongo fitopatógeno. A su vez también es interesante mejorar la extracción de este compuesto o la posibilidad de poder realizar producción *in-vitro*, para así aumentar su disponibilidad para el control. Finalmente, realizar ensayo directo sobre frutos, para así evaluar una posible fitotoxicidad, la vida media del compuesto en el campo, la biodisponibilidad del mismo y la degradación en el tiempo que pudiese presentar.

8 Referencias

- Agrios, G. (2013). Fitopatología. Elsevier Academic Press, USA. 741
- Aguayo, C., Riquelme, J., Urrejola, C., Valenzuela, PDT. and Silva, E. (2011). Bchex a virulence gen of *Botrytis cinerea*: characterization and functional analyses. Journal of General Plant Pathology. 77(4): 230-238.
- Anke, H. and Sterner, O. (1991). Comparison of the antimicrobial and cytotoxic activities of twenty unsaturated sesquiterpene dialdehydes from plants and mushrooms. Planta Medica. 57(4): 344-346.
- Auger, J. and Esterio, M. (1997) "Nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa", Esterio, M. and Auger, J., Ed., Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Santiago, Chile.
- Benezer-Benezer, M; Castro-Mercado, E; Garcia-Pineda, E. (2008). Production of reactive oxygen species during the resistance expression of plants to diseases. Revista Mexicana de Fitopatología. 26 (1) 56-61.
- Carrasco, H; Robles-Kelly, C; Rubio, J; Olea, AF; Martinez, R; Silva-Moreno, E. (2017). Antifungal effect of polygodial on *Botrytis cinerea*, a fungal pathogen affecting table grapes. International journal of molecular science. 18(11) 2251-2261.
- Celis, A; Mendoza, C; Pachon, M; Cardona, J; Delgado, W; Cuca LE. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. Agronomía colombiana. 26 (1) 97-106
- Cotoras, M.; Folch, C.; Mendoza, L (2004). Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3 beta-hydroxy-kaurenoic acid. Journal of Agricultural Food Chemistry. 52(10) 2821-2826.
- Cotoras, M., Ribera, A., Saavedra, A., Silva-Moreno, E., Araya-Maturana, R., Mendoza, L. (2015). Action mechanism for 3 β -hydroxykaurenoic acid and 4,4-dimethylanthracene-1,9,10(4H)-trione on *Botrytis cinerea*. Mycologia. 107(4) 661-666.

- Cragg, G. M. and Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1830, 3670-3695.
- Da Cunha, F.M., Fröde TS, Mendes GL, Malheiros A, Cechinel Filho V, Yunes RA, Calixto JB. (2001). Additional evidence for the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. *Life Sciences*.; 70(2) 159-169.
- Daferera, D; Ziogas, B; Polissiou, M. (2003). The effectiveness of plant essential oil on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. And *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *Crop protection*, 22 (1) 39-44.
- Derita, M.; Montenegro, I.; Garibotto, F.; Enriz, R.; Cuellar, M.; Zacchino, S. (2013). Structural requirements for the antifungal activities of natural drimane sesquiterpenes and analogues, supported by conformational and electronic studies. *Molecules*. 18(2) 2029-2051.
- Espinoza, L.; Taborga, L.; Diaz, K.; Olea, A. F. and Peña-Cortes, H. (2014). Synthesis of Linear Geranylphenols and their effect on mycelial growth of plant pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecules* 19(2) 1512-1526.
- Esterio, M.; Ramos, C.; Walker, A. S.; Fillinger, S.; Auger, J. and Leroux, P. (2009). Situación actual de sensibilidad a botriticida en Chile: Resistencia multidroga (MdR1). *Fitopatologia*. 44 18-19.
- Esterio, M.; Ramos, C.; Walker, A. S.; Fillinger, S.; Leroux, P.; Auger, J. (2011). Phenotypic and genetic characterization of Chilean isolates of *Botrytis cinerea* with different levels of sensitivity to fenhexamid. *Phytopathologia Mediterranea*. 50, 414-420.
- Esterio, M.; Auger, J.; Ramos, C.; Garcia, H. (2007) First report of fenhexamid resistant isolates of *Botrytis cinerea* on grapevine in Chile. *Plant. Dis.*, 91, 768-768.
- Esterio, M.; Munoz, G.; Ramos, C.; Cofre, G.; Estevez, R.; Salinas, A.; Auger, J. (2011). Characterization of *Botrytis cinerea* Isolates Present in Thompson Seedless Table Grapes in the Central Valley of Chile. *Plant. Dis.*, 95, 683-690.

- Fillinger, S; Elad, Y. (2016). *Botrytis*- the fungus, the pathogen and its management in agricultural system. ED Springer, Switzerland. Cap 1, pp1-3
- Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Current opinion in cell biology.*, vol 15, issue 2, 247-254.
- Fonnegra. R y Jimenez. S. (2006) Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Editorial universitaria de Antioquia. 2da edición, Medellín, Colombia. Pp
- Fujita, K. and Kubo, I. (2005). Multifunctional action of antifungal polygodial against *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of pyrrole formation on cell surface in antifungal action. *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 6742-6747.
- Grayer, R.J and Harborne. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plant. 37 (1), 19-42.
- Gil, P. (2002) Productos naturales. Universidad Pública de Navarra, España.
- Gonzáles-Domínguez E, Caffi T, Ciliberti N, Rossi V. (2015). A mechanistic model of *Botrytis cinerea* on grapesvines that includes weather, vine growth stage, and the main infection pathways. *PLoS One*, 10(10).
- Gurjar, M. S.; Ali, S.; Akthar, M.; Singh, A. S. (2012) Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences*, 3, 425-433.
- Hoffmann, A; Farga, C; Lastra, J; Veghasi, E. (1992) plantas medicinales de uso común en Chile. *Fundacion Claudio Gay*. 273p
- Hoffmann, A; Arroyo, M; Liberona, F; Muñoz, M; Watson, J. (1998) Plantas altoandinas en la flora silvestre de Chile. *Fundacion Claudio Gay*. Editorial Salecianos S.A Chile. 176p
- Honda Y., Hattori, T., Kirimura, K. (2012). Visual expression analysis of the responses of the alternative oxidase gene (*aox1*) to heat shock, oxidative, and osmotic stresses in conidia of citric acid-producing *Aspergillus niger*. *J Biosci Bioeng* 113: 338–342
- Jackson, R. S., (2008). "Wine Science: Principles and Applications", Academic Press, London.

- Jacometti, M. A.; Wratten, S. D.; Walter, M. (2010). Review: Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. Australian J. Grape Wine Res. 2010, 16, 154-172.
- Jarvis, W. R., "The Biology of *Botrytis*", Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K., and Jarvis, W. R., Ed. (1980), Academic Press, London, UK.
- Jansen, B., & Groot, A. (2004). Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. Natural Product Reports, 21, 449–477.
- Jochen, M., Speakman, J-B. (2004). Bioactivity guided isolation of antifungal compounds from the liverwort *Bazzania trilobata* (L.) S.F. Gray. Phytochemistry 65: 2583-2588
- Kagale, S.; Marimuthu, T; Thayumanavan, B.; Nandakuman, R y Samiyappan, R. (2004) physiological and molecular plant pathology. 65. 91-100 p.
- Kelts, J.L., Cali, J., Duellman, S., Shultz, J. (2015). Altered cytotoxicity of ROS-inducing compounds by sodium pyruvate in cell culture medium depends on the location of ROS generation. SpringerPlus 4:269
- Kobayashi, D., Kondo, K., Uehara, N., Otokozawa, S., Tsuji, N., Yagihashi, A., and Watanabe N. (2002). Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. Antimicrobial agents and Chemotherapy, 46(10) 3113-3117.
- Kubo, I. and Fujita, K., (2001). Naturally occurring anti-*Salmonella* agents. J. Agric. Food Chem, 49(12): 5750-4.
- Kwak, J., Mori, I., Pei, Z., Leonhardt, N., Torres, M., Dangel, J., Bloom, R., Bodde, S., Jones, J and Schroeder, J. (2003). NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. The EMBO journal 22, 2623-2633.
- Lambeth, J (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. Nature reviews immunology 4, 181-189.
- Latorre, B. A.; Elfar, K.; Ferrada, E. (2015). Gray mold caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile. Ciencia Inv. Agrícola, 42, 305-330.

- Latorre, B. A.; Flores, V.; Sara, A. M.; Roco, A. (1994). Dicarboximide-Resistant Isolates of *Botrytis cinerea* from Table Grape in Chile - Survey and Characterization. Plant. Dis., 78, 990-994.
- Latorre, B. A. and Torres, R. (2012). Prevalence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards. Crop Prot., 40, 49-52.
- Latorre, B. A. (2007). Gray mold (*Botrytis cinerea*), a limiting factor for table grape production in Chile. Fitopatologia, 42, 9-20.
- Latorre, B. A., (2013). "Control Biológico de Enfermedades de las Plantas en Chile", Montealegre, J. R. and Pérez, L. M., Ed., Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Lee, S; Lee, J; Lunde, C; Kubo, I. (1999) In vitro antifungal susceptibilities of *Candida albicans* and other fungal pathogen to poligodial, a sesquiterpeno dialdehyde. Medic Plant 65. 204-208
- Leroux, P.; Fritz, R.; Debieu, D.; Albertini, C.; Lanen, C.; Bach, J.; Gredt, M.; Chapeland, F. (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. Pest Management Science 2002, 58, 876-888.
- Leroux, P., (2004)"Botrytis: Biology, Pathology and Control", Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., and Delen, N., Ed., Kluwer: Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Liu, X.; Wang, J.; Gou, P.; Mao, C.; Zhu, Z. R.; Li, H. (2007). In vitro inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold of strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A. Int. J. Food Microbiol., 119, 223-229.
- Liu, Y., Lili, H., Mustapha, A., and Lin, M. (2011). Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. Microbiological Research, 166 (3) 207-215.
- Loeffler, J. and Steven, D. (2003). Antifungal drugs resistance. Clinical infectious diseases. 36, S31- 41.

- Lunde, CS. And Kubo, I. (2000). Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 44(7):1943-1953.
- Mc Callion, R; Cole, A; Walker, J; Blunt, J; Munro, M. (1982) Antibiotic substance from New Zealand plant. *Medic Plant* 44, 134-138p.
- Magnani, T., Soriani, FM., Martins, VP., Nascimento, AM., Tudella, VG., et al. (2007). Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. *FEMS Microbiol Lett* 271: 230–238
- Martin WJ, Herst PM, Chia EW, Harper JL. (2009). Sesquiterpene dialdehydes inhibit MSU crystal-induced superoxide production by infiltrating neutrophils in an in vivo model of gouty inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(5), 616-621.
- Martinez, R and Hurtado, F, (1997). Solicitud de patente N° 12644-97. Método de obtención de un extracto natural repelente contra ratas y fabricación de barnices, pinturas y ceras repelentes.
- Mendes GL, Santos AR, Campos MM, Tratsk KS, Yunes RA, Cechinel Filho V, Calixto JB. (1998). Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks of *Drymis winteri* (Winteraceae). *Life Sci.*; 63(5):369-81.
- Mendoza, L.; Espinoza, P.; Urzua, A.; Vivanco, M.; Cotoras, M. (2009). In Vitro Antifungal Activity of the Diterpenoid 7a-Hydroxy-8(17)-labden-15-oic Acid and Its Derivatives against *Botrytis cinerea*. *Molecules*, 14, 1966-1979.
- Montealegre, J. R. and Pérez, L. M. (2014). "Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe", Bettiol, W., Rivera, M. C., Mondino, P., Montealegre, J. R., and Colmenarez, Y. C., Ed., Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.
- Montenegro, I. (2006) Estudio Preliminar del Efecto Biológico de Productos Naturales en Termitas, Bacterias y Hongos. 2006 universidad Austral,
- Montenegro, I.; Pino, L.; Werner, E.; Madrid, A.; Espinoza, L.; Moreno, L.; Villena, J.; Cuellar, M. (2013). Comparative Study on the larvicidal activity of

drimane sesquiterpenes and nordrimane compounds against *Drosophila melanogaster* *til-til*. *Molecules*, 18, 4192-4208.

- Munoz-Concha, D., Vogel H y Razmilic. (2004). Variación de compuestos químicos en hojas de poblaciones de *Drimys* *spp.* (Magnoliophyta: Winteraceae) en Chile *Revista Chilena de Historia Natural* 77: 43-50.
- Muñoz, O; Montes, M; Wilkomirsky, T. (2001) Plantas medicinales de uso en Chile, Química y Farmacéutica. Editorial Universitaria.
- Obledo, E.; Hernández-Rosales, A. y Lopez-Orué, M. (2004) Extractos vegetales, una opción en el control de la Sigatoka Negra. XVI Reunión internacional. ACORBAT. Oaxaca, México, 184p
- ODEPA, 2014. Mercados Agropecuarios. Fecha de acceso: 22 de marzo de 2015: <http://www.odepa.gob.cl/>
- Ochagavía, J. (1990). Resistencia a dicarboximidas: respuesta de *Botrytis cinerea* a vinclozolina. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía.
- Palou, L; Smilanick, JL; Crisosto, Ch. (2009). Evaluation of food additives as alternative or complementary chemicals to conventional fungicides for the control of major postharvest diseases of stone fruit. *Journal protection* 72 (5), 1037-1046.
- Rafael, J., Arakawa, N., Ambrosio, S., Da Costa, F., and Said, S. (2013). Hyphal morphology and elongation alterations in *Aspergillus nidulans* provoked by the diterpene kaurenoic acid. *Advances in microbiology*. 3, 438-441.
- Ribera, A.; Cotoras, M.; Zuniga, G. E. (2008). Effect of extracts from in vitro-grown shoots of *Quillaja saponaria* Mol. on *Botrytis cinerea* Pers. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24, 1803-1811.
- Robles-Kelly, C; Rubio, J; Thomas, M; Sedan, C; Martinez, R; Olea, A; Carrasco, H; Taborga, L; Silva, E. (2016) Effect of drimenol, structure-antifungal activity of synthetic derivates and consequences into plasmatic membrane of *Botrytis cinerea*. *Pesticide biochemistry and physiology*. 141, 50-56.

- Rodríguez, B., Zapata, N., Medina, P., & Viñuela, E. (2005). A complete ^1H and ^{13}C NMR data assignment for four drimane sesquiterpenoids isolated from *Drimys winterii*. *Magnetic Resonance Chemistry*, 43, 82–84.
- Romanazzi, G.; Lichter, A.; Gabler, F. M.; Smilanick, J. L. (2012). Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biol. Technol.*, 63, 141-147.
- Salah, M.A.; Bedir, E.; Toyang, N.J.; Khan, I.A.; Harries, M.D.; Wedge, D.E. (2003). Antifungal clerodane diterpenes from *Macaranga monandra* (L.) Muell. Et Arg (*Euphorbiaceae*). *J.Agric. Food Chem.* 51, 7607-7610.
- Scott, GK., Atsriku, C., Kaminker, P., Held, J., Gibson, B., Baldwin, Ma., and Benz, CC. (2005). Vitamin K3 (menadione)- induced oncosis associated with keratine 8 phosphorylation and histone H3 arylation. *Molecular Pharmacology*. 68, 606-615.
- Senthil, R; Prabakar, K; Rajendran, L; Karthikeyan, G. (2011). *Phytopathologia Mediterranea*. 50, 55-65.
- Sepúlveda, G.; Porta, H; y Rocha, M. (2003) La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de Fitopatología*. Vol. 21. No 1. 355-363pp.
- Shlezinger, N., Minz, A., Gur, Y., Hatam, I., Dagdas, Y.F., Talbot, N.J., Sharon, A. (2011). Anti-apoptotic machinery protects the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* from host-induced apoptotic-like cell death during plant infection. *PLoS Pathog.* 7: e1002185.
- SimFruit, 2016. Exportaciones chilenas de uva de mesa se recuperan. Fecha de acceso: 22 de marzo de 2015: <http://simfruit.cl/noticias-destacadas/1137-exportaciones-de-uvas-de-mesa-se-recuperan.html>
- Torssell, K. B. G. (1983) *Natural Products Chemistry: A Mechanistic and Biosynthetic Approach to Secondary Metabolism*, John Wiley, Somerset, NJ, USA.

- University of Minnesota, 2016. *Botrytis* Bunch Rot. Fecha de acceso: 16 de abril de 2016: <http://fruit.cfans.umn.edu/files/2012/08/BunchRot.pdf>, <http://fruit.cfans.umn.edu/files/2012/08/BunchRot.pdf>
- Vande Walle, L., Lamkanfi, M. and Vandenabeele, P. (2008). The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death and differentiation* 15:453-460.
- Walker, A. S.; Micoud, A.; Remuson, F.; Grosman, J.; Gredt, M.; Leroux, P. (2013). French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Management Science*, 69, 667-678.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P. y Van Kan J. (2007). Pathogen profile *Botrytis cinerea*: the cause of the mould grey disease. *Mol Plant Pathol*, 8(5):561-580.
- Zapata N, Budia F, Viñuela E, Medina P. (1996) Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *Industrial Crops and Products*, 30(1):119-125.
- Zapata N, Vargas M, Monsálvez M, Ceballos R. (2011) Crude extracts of *Drimys winteri* bark to inhibit growth of *Gaeumannomyces graminis* VAR. *Triciti*. *Chil. J. Agr. Res*, 71(1):45-51.

9 Anexo

Poligodial 0 horas

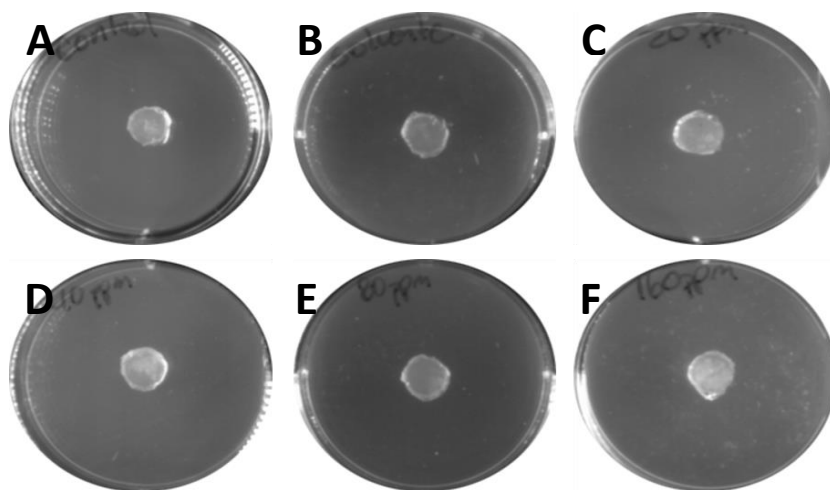


Figura 13: Efecto de poligodial en el crecimiento de *Botrytis cinerea* cepa B05.10. Inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* a distintas concentraciones de poligodial a tiempo 0 horas. A) Control sin tratamiento; B) Control solvente (Diclorometano); C) Poligodial 20 ppm; D) Poligodial 40 ppm; E) Poligodial 80 ppm; F) Poligodial 160 ppm.

Poligodial 24 horas

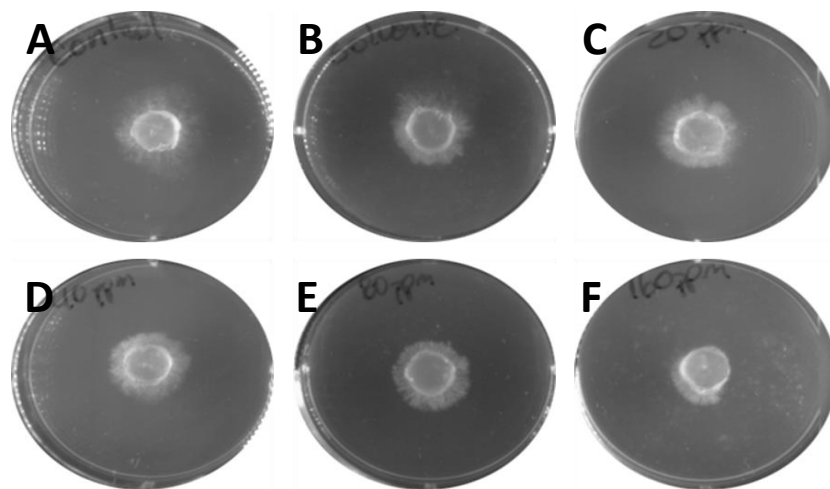


Figura 14: Efecto de poligodial en el crecimiento de *Botrytis cinerea* cepa B05.10. Inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* a distintas concentraciones de poligodial a tiempo 24 horas. A) Control sin tratamiento; B) Control solvente (Diclorometano); C) Poligodial 20 ppm; D) Poligodial 40 ppm; E) Poligodial 80 ppm; F) Poligodial 160 ppm.

Poligodial 48 horas

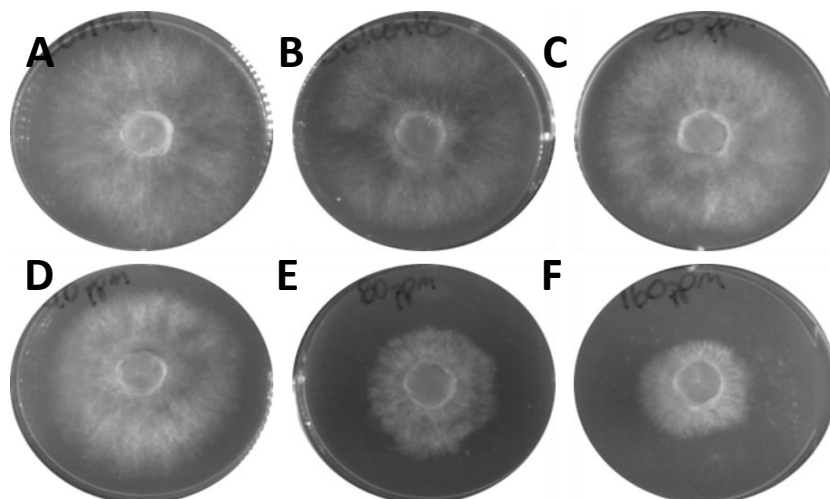


Figura 15: Efecto de poligodial en el crecimiento de *Botrytis cinerea* cepa B05.10. Inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* a distintas concentraciones de poligodial a tiempo 48 horas. A) Control sin tratamiento; B) Control solvente (Diclorometano); C) Poligodial 20 ppm; D) Poligodial 40 ppm; E) Poligodial 80 ppm; F) Poligodial 160 ppm.

Poligodial 72 horas

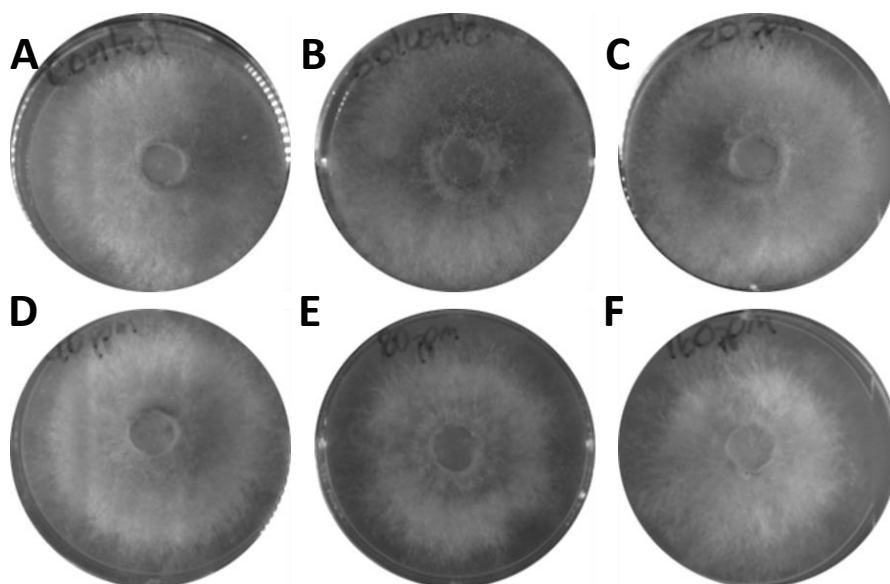


Figura 16: Efecto de poligodial en el crecimiento de *Botrytis cinerea* cepa B05.10. Inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* a distintas concentraciones de poligodial a tiempo 72 horas. A) Control sin tratamiento; B) Control solvente (Diclorometano); C) Poligodial 20 ppm; D) Poligodial 40 ppm; E) Poligodial 80 ppm; F) Poligodial 160 ppm