

**“Sistemas alternativos a los fungicidas químicos
para el control de *Penicillium digitatum* (Pers.)
Sacc. en limón.”**

*Tesis presentada para optar al título de Magíster de la Universidad de
Buenos Aires,
Área PRODUCCIÓN VEGETAL, Orientación Protección vegetal.*

María Soledad Carbajo Romero
Ing. Agrónoma
Universidad Nacional de Tucumán
2004

Beca de postgrado otorgada
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

CONSEJERO PRINCIPAL:

Juan Carlos Díaz Ricci
Ing. Químico
Doctor

CONSEJERO DE ESTUDIOS:

Guillermo José Torres Leal
Ing. Agrónomo
Magíster Scientae

CONSEJERO DE ESTUDIOS:

Gabriel Oscar Sozzi
Ing. Agrónomo
Doctor

JURADO DE TESIS

Juan Carlos Díaz Ricci

Ing. Químico
Doctor

María Gabriela Calvo

Ing. Agrónoma
Magíster Scientae

Vilma Cecilia Conci

Biol.
Doctora

Este trabajo de tesis está dedicado:

A Dios, a quien le debo mi vida y “todo”.

A mis dos amores Marcelo y Sofía, por estar siempre a mi lado, apoyándome y dándome fuerzas.

A mi mamá Ana María y a mi papá Nino (mi ángel).

A mis hermanos, familia y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a INTA por haberme dado, a través de esta beca, la oportunidad de perfeccionarme y realizar mi formación de posgrado.

A mi director de tesis Juan Carlos Díaz Ricci por guiarme académicamente, por su valioso tiempo, esfuerzo, entusiasmo y por su excelente predisposición para ayudarme siempre en todo.

A mi director de beca Guillermo Torres Leal por todos sus aportes brindados y por haberme facilitado los medios necesarios para realizar los trabajos experimentales.

A mi consejero de estudios Gabriel Sozzi por su incondicional apoyo y permanente amabilidad.

A todos mis compañeros de INTA de la sección Fruticultura, en especial a Pablo Velázquez y a Fernanda Farias por estar siempre dispuestos a colaborar.

Al CERELA por su cooperación y contribución en el proyecto INTA-CERELA. En especial quiero agradecer a Luciana Geréz por brindarme desinteresadamente su experiencia, conocimiento y ayuda.

AL INSIBIO por permitirme realizar partes experimentales de mi tesis y a su grupo de profesionales de frutilla, por enseñarme el manejo de los equipos.

A la Escuela de Postgrado de la Facultad de Agronomía de la UBA, prestigiosa institución, que me permitió realizar mi formación de posgrado y a todo su personal que siempre tuvo muy buena predisposición en todos los aspectos académicos y administrativos.

También quiero agradecer a las empresas citrícolas del medio (San Miguel S.A. y Martínez Navarro) por haberme facilitado frutas para los ensayos y a las empresas Chemie S.A. y Rodhia S.A. por la provisión de los productos.

Finalmente a todos los que compartieron conmigo estos años de maestría, a mis amigos INTA (a “todas” por estar a mi lado durante este tiempo), a compañeros con los que compartí cursos y a los que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme o simplemente escucharme.

	AGRADECIMIENTOS	IV
	ÍNDICE GENERAL	V
	ÍNDICE DE TABLAS	XIII
	ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
	NOMENCLATURA	XX
	DECLARACIÓN	XXII
	RESUMEN	XXIII
	ABSTRACT	XXIV
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL		
1.1.	Origen e historia de los cítricos	1
1.2.	Importancia económica de la actividad cítrica en Argentina	1
1.2.1.	Importancia económica y social de la producción de limones en Tucumán	3
1.2.2.	Ubicación geográfica del cultivo de cítricos en Argentina y en Tucumán	4
1.3.	Fisiología y morfología de los frutos cítricos	7
1.4.	Causas e importancia de las pérdidas de poscosecha en cítricos	8
1.4.1.	Enfermedades patológicas de poscosecha	9
1.5.	Manejo de poscosecha	10
1.5.1.	Prevención y manejo de poscosecha	10
1.5.2.	Control de enfermedades patológicas de poscosecha	10
1.5.3.	Métodos alternativos de control de enfermedades patológicas en poscosecha	11
1.5.3.1.	Métodos biológicos	11
1.5.3.1.1.	Uso de microorganismos antagónicos	11

1.5.3.1.2.	Empleo de productos naturales (extractos vegetales) y/o sustancias GRAS	12
1.5.3.1.3.	Inducción de mecanismos de defensa de los frutos	12
1.5.3.2.	Métodos físicos	12
1.5.3.2.1.	Sistemas de conservación en frío y atmósferas controladas	13
1.5.3.2.2.	Tratamientos térmicos (curado y termoterapia)	13
1.5.3.2.3.	Tratamientos con irradiaciones	13
1.5.3.3.	Estrategias combinadas de manejo de poscosecha	14
1.6.	Fundamentos de la elección del tema de investigación	14
1.7.	Hipótesis de investigación	15
1.8.	Objetivo general	15
1.9.	Objetivos específicos	15
CAPÍTULO 2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS PATÓGENAS DE <i>Penicillium digitatum</i> (Pers.) Sacc.		
2.1.	Introducción	17
2.1.1.	Descripción de la enfermedad	17
2.1.1.1.	Ubicación taxonómica y descripción del género <i>Penicillium</i> spp. y <i>P. digitatum</i> (Pers.) Sacc.	17
2.1.1.2.	Ciclo de la enfermedad y sintomatología	18
2.1.2.	Cuantificación de la intensidad de enfermedad	19
2.2.	Objetivos	19
2.3.	Materiales y Métodos	19
2.3.1.	Medios y condiciones de cultivo para las cepas de <i>P. digitatum</i>	19
2.3.1.1	Medio sólido: agar papa glucosado 2 %	19
2.3.1.2.	Medio semisólido: agar 0,8 %	20
2.3.2.	Aislamiento e identificación de las cepas	20

2.3.2.1.	Pruebas de patogenicidad	20
2.3.3.	Selección de las cepas patógenas frente al fungicida químico imazalil	21
2.3.3.1.	Suspensiones del fungicida químico	21
2.3.3.2.	Metodología de difusión en placa para la determinación de la efectividad del fungicida imazalil	21
2.3.3.2.1.	Cálculo del porcentaje de inhibición (PI)	22
2.3.4.	Evolución de los síntomas de podredumbre verde en fruta y construcción de una escala de severidad de la enfermedad	22
2.3.5.	Resistencia <i>in vivo</i> de las cepas de <i>P. digitatum</i> al fungicida imazalil	23
2.3.6.	Análisis estadístico	23
2.4.	Resultados y discusión	24
2.4.1.	Aislamiento e identificación de las cepas	24
2.4.1.1.	Pruebas de patogenicidad	25
2.4.2.	Efectividad <i>in vitro</i> del fungicida químico imazalil frente a cepas de <i>P. digitatum</i> .	26
2.4.3.	Evolución de los síntomas de “moho verde de los cítricos” en frutos de limón y construcción de una escala de severidad	28
2.4.4.	Resistencia <i>in vivo</i> de las cepas de <i>P. digitatum</i> al fungicida imazalil	31
2.5.	Conclusiones	33
CAPÍTULO 3. SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS ANTAGONISTAS FRENTE A <i>Penicillium digitatum</i> (Pers.) Sacc.		
3.1.	Introducción	34
3.1.1.	Características generales de las bacterias lácticas, hábitats y clasificación	34
3.1.2.	Actividad antifúngica de las BAL	35

3.2.	Objetivo	35
3.3.	Materiales y Métodos	36
3.3.1.	Medios y condiciones de cultivo	36
3.3.1.1.	Cepas de <i>P. digitatum</i>	36
3.3.1.2.	Cepas de bacterias lácticas y condiciones de cultivo	36
3.3.2.	Determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de las BAL	36
3.3.3.	Identificación de la naturaleza química de los metabolitos inhibitorios	37
3.3.4.	Determinación de ácidos orgánicos para los SE	37
3.3.5.	Actividad antifúngica de ácidos orgánicos	37
3.4.	Resultados y discusión	38
3.4.1.	Selección de BAL con actividad antifúngica	38
3.4.2.	Identificación de la naturaleza química de los metabolitos bioactivos	40
3.4.2.1.	Ácidos orgánicos presentes en los SE de BAL	42
3.4.3.	Actividad antifúngica de los ácidos orgánicos	43
3.5.	Conclusiones	44
 CAPÍTULO 4. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> DE EXTRACTOS VEGETALES, UN BIOFUNGICIDA Y SOLUCIONES DE BICARBONATO DE SODIO FRENTE A <i>Penicillium digitatum</i> (Pers.) Sacc.		
4.1.	Introducción	46
4.1.1.	Biopesticidas. Usos de extractos vegetales y biofungicidas en el control de enfermedades de poscosecha	46
4.2.	Objetivo	47
4.3.	Materiales y Métodos	47
4.3.1.	Medios y condiciones de cultivo para las cepas de <i>P. digitatum</i>	47

4.3.2.	Preparación de las suspensiones de los productos biológicos y soluciones de bicarbonato de sodio	48
4.3.2.1.	Extractos vegetales	48
4.3.2.2.	Serenade®	48
4.3.2.3.	Bicarbonato de sodio	48
4.3.3.	Determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los biocontroladores y el bicarbonato de sodio	48
4.4.	Resultados y discusión	49
4.4.1.	Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los biocontroladores y el bicarbonato de sodio	49
4.5.	Conclusiones	53
CAPÍTULO 5. EFECTO DE LOS PRODUCTOS BIOLÓGICOS, SALES DE BICARBONATO Y ÁCIDOS ORGÁNICOS FRENTE <i>Penicillium digitatum</i> (Pers.) Sacc., EN FRUTOS DE LIMÓN.		
5.1.	Introducción	54
5.1.1.	Situación actual del control biológico en poscosecha de frutas cítricas	54
5.2.	Objetivo	56
5.3.	Materiales y Métodos	56
5.3.1.	Material vegetal	56
5.3.2.	Inoculación artificial del patógeno a frutos de limón	56
5.3.2.1.	Preparación de la suspensión de conidios del patógeno	56
5.3.2.2.	Inoculación por herida	56
5.3.3.	Preparación de las suspensiones de los productos alternativos y el fungicida químico	57
5.3.3.1.	Extractos vegetales	57
5.3.3.2.	Serenade®	57
5.3.3.3.	Bicarbonato de sodio	57

5.3.3.4.	Mezcla de ácidos orgánicos	57
5.3.3.5.	Fungicida químico	57
5.3.4.	Aplicación de los productos alternativos en los frutos de limón	58
5.3.4.1.	Ensayos de control directo (curativos) con aplicación de tratamientos: simultáneo (t 0h) y posterior a la inoculación (t 18 h)	58
5.3.4.2.	Ensayo de inducción de defensa con tratamientos y posterior inoculación a las 48 h	58
5.3.4.2.1.	Selección de metodología apropiada para posteriores tratamientos de inducción de defensa	58
5.3.4.2.2.	Ensayo de inducción de defensa o tratamientos preventivos sobre frutos de limón (t 48h)	59
5.3.4.3.	Incubación de los tratamientos	60
5.3.4.4.	Evaluación de la intensidad de la enfermedad en el tiempo	60
5.3.4.5.	Diseño y análisis estadístico	61
5.4.	Resultados y discusión	61
5.4.1.	Ensayos de control directo (curativos)	61
5.4.1.1.	Ensayo con inoculación y tratamiento simultáneo (t 0h)	61
5.4.1.2.	Ensayo con inoculación y tratamiento posterior a las 18 h	66
5.4.2.	Ensayo de inducción de defensa con tratamientos y posterior inoculación a las 48 h	71
5.4.2.1.	Selección de metodología apropiada para posteriores tratamientos de inducción de defensa	71
5.4.2.2.	Ensayo de inducción de defensa o tratamientos preventivos sobre frutos de limón (t 48h)	73
5.5.	Conclusiones	83
CAPÍTULO 6. DETERMINACIÓN DE FITOALEXINAS		
6.1.	Introducción	84

6.1.1.	Mecanismos de defensa en las plantas y frutos	84
6.2.	Objetivos	85
6.3.	Materiales y Métodos	86
6.3.1.	Obtención del extracto de flavedo	86
6.3.2.	Estándares empleados y medios de solubilización	87
6.3.3.	Determinación por cromatografía de capa fina (TLC)	87
6.3.3.1.	Selección de los solventes orgánicos para la cromatografía	87
6.3.3.2.	Cromatofolios y fase móvil utilizada	87
6.3.3.3.	Determinación de las fitoalexinas en el extracto de flavedo y condiciones de la cromatografía	88
6.3.4.	Determinación por medición en fluorómetro	88
6.3.4.1.	Espectro patrón de los estándares y estimación de las pérdidas por TLC	88
6.3.4.2.	Determinación de las fitoalexinas en los extractos de flavedo	88
6.3.5.	Análisis y estimación del error experimental	89
6.4.	Resultados y discusión	89
6.4.1.	Cromatografía de capa fina	89
6.4.1.1.	Selección de la mezcla de solventes	89
6.4.1.2.	Determinación de las fitoalexinas en el extracto de flavedo	90
6.4.2.	Medición en fluorómetro	92
6.4.2.1.	Espectro patrón de los estándares	92
6.4.2.1.1.	Espectro patrón para el estándar escoparona	93
6.4.2.1.1.1.	Espectro de excitación	93
6.4.2.1.1.2.	Espectro de emisión	94
6.4.2.1.1.3.	Cálculo de la concentración de escoparona	95

6.4.2.1.1.4.	Estimación de la pérdida de escoparona sometida a TLC	96
6.4.2.1.2.	Espectro patrón para el estándar umbeliferona	97
6.4.2.1.2.1.	Espectro de excitación	97
6.4.2.1.2.2.	Espectro de emisión	98
6.4.2.1.2.3.	Cálculo de la concentración de umbeliferona	99
6.4.2.1.2.4.	Estimación de la pérdida de umbeliferona sometida a TLC	99
6.4.2.2.	Determinación de las fitoalexinas en los extractos de flavedo por emisión de fluorescencia	100
6.5.	Conclusiones	108
	CAPÍTULO 7. DISCUSION GENERAL	109
	CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES GENERALES	112
	CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA	114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Valores de porcentajes de inhibición (PI) obtenidos para las distintas cepas de <i>P. digitatum</i> frente al fungicida imazalil a diferentes concentraciones.	26
Tabla 3.1. Combinaciones de los distintos ácidos orgánicos: ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico y ácido fenil láctico; mediante el diseño de Superficie de respuesta.	38
Tabla 3.2. Porcentajes de inhibición (PI) obtenidos con las distintas cepas de BAL frente PD1, PD2 y PD5.	39
Tabla 3.3. Porcentajes de inhibición de los sobrenadantes de cultivo (SE) de BAL, sometidos a calentamiento (SE Ø) y neutralización (SE Neutr.) frente a <i>P. digitatum</i> (PD2).	41
Tabla 3.4. Producción de ácidos orgánicos (mM): ac. láctico (AL), ac. acético (AC) y ac. fenil láctico (FL); por las cepas de BAL después de 24 h de cultivo en medio MRS.	42
Tabla 3.5. Coeficientes del modelo estimados por regresión lineal múltiple.	44
Tabla 6.1. Máxima absorbancia (U.A.) (picos) para escoparona y umbeliferona (0,1 mM) a diferentes longitudes de onda, medidos por espectrofotometría.	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Principales destinos del volumen total de producción cítrica de Argentina, por especie.	2
Figura 1.2. Evolución de la producción de limón (millones de tn) en la provincia de Tucumán, durante los últimos 15 años.	4
Figura. 1.3. Provincias productoras de frutas cítricas en Argentina.	5
Figura 1.4. Distribución por región de la superficie implantada con cítricos.	5
Figura 1.5. Distribución geográfica en Argentina de la producción de cítricos discriminada por especie.	6
Figura 1.6. Zona productora de cítricos en la provincia de Tucumán (representada por la franja de puntos azules en el mapa).	7
Figura 1.7. Partes constitutivas de un fruto cítrico.	7
Figura 2.1. Síntomas ocasionados por <i>P. italicum</i> (moho azul) (A) y <i>P. digitatum</i> (moho verde) (B) en limones.	19
Figura 2.2. Técnica de inoculación por herida en frutos de limones.	21
Figura 2.3. Esquema de los diámetros de la caja de Petri y los halos de inhibición para el cálculo de porcentaje de inhibición.	22
Figura 2.4. Colonias de <i>P. digitatum</i> aisladas de frutos de limón. A) anverso y B) reverso de la colonia.	24
Figura 2.5. Conidióforos, fiálides y conidios de <i>P. digitatum</i> , en observación microscópica. A) Conidióforos (conidf), fiálides (fia) y conidios (co), B) conidios en cadena sobre las fiálides y C) conjunto de conidios.	25
Figura 2.6. Patogenicidad de las cepas de <i>Penicillium digitatum</i> inoculadas en limones no tratados, luego de 7 días de incubación a 20 °C.	26
Figura 2.7. Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento de PD5 y PD6 frente al fungicida imazalil.	27
Figura 2.8. Evolución de los síntomas de "moho verde" en limones inoculados artificialmente con <i>P. digitatum</i> (cepa PD2) e incubados a 25 °C durante 6 días.	28
Figura 2.9. Evolución de los síntomas de las cepas PD1, PD2 y PD5 de <i>P. digitatum</i> sobre frutos de limón, en el tiempo (días). Los valores	29

corresponden a los promedios del diámetro (mm) de las lesiones.

- Figura. 2.10.** Valores promedios obtenidos de los diámetros de las lesiones (mm) a los 6 días para cada cepa de *P. digitatum*, en frutos de limón. 30
- Figura. 2.11.** Escala de severidad de la enfermedad “moho verde de los cítricos”. 30
- Figura 2.12.** Valores promedios de incidencia (%) de cepas de “moho verde de los cítricos” frente al fungicida imazalil (a diferentes concentraciones) en limones artificialmente inoculados con PD, a los 7 días e incubados a 20 °C. 31
- Figura 2.13.** Valores de severidad de cepas de “moho verde de los cítricos”, frente al fungicida imazalil (a diferentes dosis), en limones artificialmente inoculados, a los 7 días e incubados a 20 °C. 32
- Figura 3.1.** Halos de inhibición producidos por los SE de cepas de BAL, mostrando el efecto antifúngico sobre *P. digitatum* (cepa PD2). 40
- Figura 3.2.** Efecto de sobrenadantes estériles de *L. plantarum* CRL1081 (calentados y neutralizados) sobre *P. digitatum* (PD2). 41
- Figura 3.3.** Superficie de respuesta para la mezcla de ácidos orgánicos. 45
 a) Función de deseabilidad para las variables acetato y lactato, b) Función de deseabilidad para las variables propionato vs. lactato, c) Función de deseabilidad para las variables fenil lactato y lactato, d) Función de deseabilidad para las variables propionato vs. acetato, e) Función de deseabilidad para las variables fenil lactato vs. acetato y f) Función de deseabilidad para las variables fenil lactato vs. propionato.
- Figura 4.1.** Halos de inhibición producidos por dos biocontroladores mostrando el efecto antifúngico sobre *P. digitatum* (cepa PD2). A) Serenade® (1 ppm equivale a 1×10^{-4} %) y B) Insibiox. 49
- Figura 4.2.** Efecto antifúngico de diferentes concentraciones de Serenade® frente a distintas cepas de *P. digitatum*. 50
- Figura 4.3.** Efecto antifúngico de Biocitrus® frente a distintas cepas de *P. digitatum*. 51
- Figura 4.4.** Efecto antifúngico de Insibiox frente a distintas cepas de *P. digitatum*. 52
- Figura 4.5.** Efecto antifúngico de bicarbonato de sodio frente a distintas cepas de *P. digitatum*. 52
- Figura 5.1.** Cámara de incubación: A) Vista de la cámara de incubación, B) Cajas de cartón utilizadas para cada tratamiento y C) Disposición de los limones en el interior de la caja. 60
- Figura 5.2.** Evaluación de los tratamientos a través de los parámetros 61

incidencia y severidad (mediante una escala visual) de la enfermedad en los frutos de limón.

Figura 5.3. Incidencia (%) de “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón, con distintos tratamientos de biocontrol, imazalil y controles; en t 0h, a los 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. (s/i) Sin inocular. 62

Figura 5.4. Severidad de “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón, con distintos tratamientos de biocontrol, imazalil y controles, en t 0h, a los 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. (s/i) Sin inocular. 63

Figura 5.5. Evolución temporal de la enfermedad “moho verde de los cítricos” con distintos tratamientos de biocontrol (t 0h), imazalil y controles. (s/i) Sin inocular. 64

Figura 5.6. Efecto del tratamiento Biocitrus® (4 %), aplicado a t 0h, en distintos intervalos de tiempo, sobre la evolución de *P. digitatum* en limones artificialmente inoculados e incubados a 20 °C comparada con el testigo absoluto. A) Biocitrus® con 3 días post-inoculación, B) Biocitrus® con 5 días post-inoculación, C) Biocitrus® con 7 días post-inoculación D) Testigo con 3 días post-inoculación, E) Testigo con 5 días post-inoculación y F) Testigo con 7 días post-inoculación. 65

Figura 5.7. Severidad de la enfermedad “moho verde” sobre frutos de limón alcanzada con dos tratamientos de biocontrol en t 0h y el testigo, a los 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. A) Testigo, B) Biocitrus® 4 % y C) Insibiox 20 %. 66

Figura 5.8. Incidencia (%) de “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón, con distintos tratamientos de biocontrol, imazalil y controles en t 18h, a los 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. (s/i) Sin inocular. 67

Figura 5.9. Severidad de “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón, con distintos tratamientos de biocontrol, imazalil y controles en t 18h, a los 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. (s/i) Sin inocular. 68

Figura 5.10. Evolución de la enfermedad “moho verde de los cítricos” en el tiempo con distintos tratamientos de biocontrol (t 18h), imazalil y controles. (s/i) Sin inocular. 69

Figura 5.11. Efecto del tratamiento con Biocitrus® (4 %) en el tiempo (t 18h), sobre la evolución de *P. digitatum* en limones artificialmente inoculados e incubados a 20 °C comparado con el testigo absoluto tratado con agua. A) Biocitrus® 3 días post-inoculación, B) Biocitrus® 5 días post-inoculación, C) Biocitrus® 7 días post-inoculación D) Testigo a los 3 días post-inoculación, E) Testigo a los 5 días post-inoculación y F) Testigo a los 7 días post-inoculación. 70

Figura 5.12. Severidad del “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón para los distintos tratamientos de biocontrol en t 18h, luego de 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. A) Testigo, B) Mezcla de ácidos orgánicos, C) Insibiox 20 %, D) Biocitrus® 4 %, E) Biocitrus® 2 % 71

y F) Bicarbonato de sodio 3 %.

Figura 5.13. Incidencia (%) de “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón con tratamientos inductivos, a los 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. A) Control fruta sana sin inocular, B) Control fruta sana, tratada con agua e inoculada a las 48 h, C) Control fruta herida, tratada con agua e inoculada a las 48 h (testigo absoluto), D) Fruta sana, tratada con bicarbonato de sodio 3 % e inoculada a las 48 h y E) Fruta herida, tratada con bicarbonato de sodio 3 % e inoculada a las 48 h. 72

Figura 5.14. Evolución temporal de “moho verde de los cítricos” con tratamientos inductivos: A) Control fruta sana sin inocular, B) Control fruta sana, tratada con agua e inoculada a las 48 h, C) Control fruta herida, tratada con agua e inoculada a las 48 h (testigo absoluto), D) Fruta sana, tratada con bicarbonato de sodio 3 % e inoculada a las 48 h y E) Fruta herida, tratada con bicarbonato de sodio 3 % e inoculada a las 48 h. 73

Figura 5.15. Incidencia (%) de “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón, con distintos tratamientos de inducción, imazalil y controles en t 48h, a los 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. (s/i) Sin inocular, (c/il) con inóculo desde el inicio. 74

Figura 5.16. Severidad de “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón, con diferentes tratamientos de inducción, imazalil y controles en t 48h, a los 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. (s/i) Sin inocular, (c/il) con inóculo desde el inicio. 75

Figura 5.17. Evolución temporal del “moho verde de los cítricos” con diferentes tratamientos inductivos (t 48h), imazalil y controles. (s/i) Sin inocular, (c/il) con inóculo desde el inicio. 76

Figura 5.18. Efecto del tratamiento con bicarbonato de sodio (3 %) en el tiempo (t 48h), sobre la evolución de *P. digitatum* en limones artificialmente inoculados e incubados a 20 °C comparados con el Testigo absoluto tratado con agua. A) Bicarbonato de sodio, 3 días post-inoculación, B) Bicarbonato de sodio, 5 días post-inoculación, C) Bicarbonato de sodio, 7 días post-inoculación, D) Testigo, 3 días post-inoculación, E) Testigo, 5 días post-inoculación y F) Testigo, 7 días post-inoculación. 77

Figura 5.19. Grados de severidad alcanzados en los distintos tratamientos de inducción a los 7 días desde inoculación. A) Control fruta herida con inóculo desde el inicio, B) Testigo absoluto (fruta herida inoculada a las 48 h), C) Fruta tratada con bicarbonato de sodio 3 % y D) Fruta tratada con Serenade® 1 %. 78

Figura 6.1. Cromatografía de capa fina para los estándares escoparona (E) y umbeliferona (U) en distintos solventes: A) Acetonitrilo, B) Cloroformo y C) Tolueno/acetato de etilo (6:1). Las flechas indican el sentido de la corrida. 89

Figura 6.2. Detección de las fitoalexinas por TLC para los controles: 90

fruta herida (sin inocular e inoculada inicialmente), testigo absoluto y fruta sana y el tratamiento Biocitrus® (sin inocular), a distintos intervalos de tiempo: 2dpt, 4dpt y 6 dpt. Las flechas indican las bandas detectadas. A cada lado y en el centro de la placa se observan las bandas de los estándares: E (escoparona) y U (umbeliferona). Las flechas gruesas indican el sentido de la corrida.

Figura 6.3. Detección de fitoalexinas por TLC para los tratamientos: Biocitrus® (con inóculo), Insibiox (sin inocular y con inóculo) y bicarbonato de sodio (sin inocular y con inóculo), a diferentes intervalos de tiempo: 2 dpt, 4 dpt y 6 dpt. Las flechas indican las bandas detectadas. A cada lado y en el centro de la placa se observan las bandas de los estándares: E (escoparona) y U (umbeliferona). Las flechas gruesas indican el sentido de corrida. 91

Figura 6.4. Detección de fitoalexinas en TLC para los tratamientos: Serenade® (sin inocular y con inóculo), imazalil 0,05 % (sin inocular y con inóculo) e imazalil 0,001% (sin inocular y con inóculo), a distintos intervalos de tiempo: 2 dpt, 4 dpt y 6 dpt. Las flechas indican las bandas detectadas. A cada lado y en el centro de la placa se observan las bandas de los estándares: E (escoparona) y U (umbeliferona). Las flechas gruesas indican la dirección de corrida. 92

Figura 6.5. Espectro de excitación de la escoparona (0,2 mM) a λ_{emi} 424 nm. Las flechas indican las longitudes de excitación máximas alcanzadas. 94

Figura 6.6. Espectro de emisión para la escoparona 0,1 mM, excitando a las longitudes de onda de 342 nm y 229 nm. Las flechas indican las máximas intensidades emitidas. 95

Figura 6.7. Gráfico de intensidad de fluorescencia de escoparona (fotones/seg.) en función de la concentración (mM). 96

Figura 6.8. Espectro de emisión a λ_{exci} 342 nm de la escoparona pura (0,002 mM), escoparona por TLC y escoparona TLC corregida y ajustada por fórmula. Las flechas indican los máximos de intensidad de fluorescencia. 97

Figura 6.9. Espectro de excitación a λ_{emi} 393 nm para la umbeliferona (0,02 mM). La flecha indica la longitud de onda de mayor excitación. 98

Figura 6.10. Espectro de emisión para la umbeliferona (0,01 mM) a λ_{exci} 324 nm. La flecha indica la longitud de onda de mayor emisión. 98

Figura 6.11. Intensidad de fluorescencia (fotones/seg.) de la umbeliferona en función de de la concentración (mM). 99

Figura 6.12. Espectro de emisión a λ_{exci} 324 nm la de umbeliferona pura (0,04 mM), umbeliferona por TLC (0,04 mM) y umbeliferona en TLC corregida y ajustada por fórmula. Las flechas indican los máximos de intensidad de fluorescencia y el círculo rojo el hombro en la curva. 100

- Figura 6.13.** Espectros de emisión de la escoparona (λ_{exci} 342 nm), contenidos en el flavedo de frutos tratados con Serenade® 1 % (sin inocular). La flecha indica la intensidad máxima de fluorescencia. 101
- Figura 6.14.** Espectros de emisión de la umbeliferona (λ_{exci} 324 nm), contenidos en el flavedo de frutos tratados con Serenade® 1 % (sin inocular). La flecha indica la intensidad máxima de fluorescencia. 102
- Figura 6.15.** Intensidad de fluorescencia de escoparona (λ_{exci} 342 nm) en el control fruta sana, comparado con el espectro patrón del estándar. La flecha indica la intensidad máxima de fluorescencia. 102
- Figura 6.16.** Concentración de escoparona ($\mu\text{g/g Pf}$) en el flavedo de los frutos para los controles de fruta sana sin inocular, fruta herida sin inocular y fruta herida inoculada a las 48 h (testigo absoluto), y para los diferentes tratamientos elicitores sin inocular: Biocitrus® 2 %, Insibiox 10 %, bicarbonato de sodio 3 %, Serenade® 1 %, imazalil 0,05 % e imazalil 0,001 %; en los tiempos 2 dpt, 4 dpt y 6 dpt. (s/i) Sin inocular. Las barras representan el error experimental ($\pm 1,2 \mu\text{g/g Pf}$). 103
- Figura 6.17.** Concentración de escoparona ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) para los controles de fruta sana sin inocular, fruta herida inoculada inicialmente y fruta herida inoculada a las 48 h (testigo absoluto), y para los diferentes tratamientos elicitores inoculados a las 48 h: Biocitrus® 2 %, Insibiox 10 %, bicarbonato de sodio 3 %, Serenade® 1 %, imazalil 0,05 % e imazalil 0,001 %; en los tiempos 2 dpt, 4 dpt y 6 dpt. (s/i) Sin inocular, (c/il) con inóculo desde el inicio y (c/i) con inóculo. Las barras representan el error experimental ($\pm 1,2 \mu\text{g/g Pf}$). 104
- Figura 6.18.** Variación de la concentración de la escoparona, en el tiempo, luego del tratamiento con Serenade® 1% (inoculado a las 48 h y sin inocular) y en los controles: fruta sana, fruta herida sin inocular, fruta herida inoculada desde el inicio y testigo absoluto (fruta inoculada a las 48 h). (s/i) Sin inocular, (c/il) con inóculo desde el inicio y (c/i) con inóculo. Las barras representan el error experimental ($\pm 1,2 \mu\text{g/g Pf}$). 105

NOMENCLATURA

APG: agar papa glucosado
BAL: bacterias lácticas
conidios/ml: conidios por mililitros
cm: centímetros
CRL: Centro de Referencia para Lactobacilos
E: escoparona
Fotones/seg: fotones por segundo
g: fuerza centrífuga relativa a la gravedad
GRAS: "Generally recognize as safe"
g: gramos
g/l: gramos por litro
g/mol: gramos por mol de sustancia
h: hora
HPLC: "High performance liquid chromatography"
I: incidencia
i.a: ingrediente activo
IEp: intensidad de escoparona pura
IEpc: intensidad de escoparona pura corregida
IE_{TLC}: intensidad escoparona por TLC
IE_{TLC}c: intensidad de escoparona TLC corregida
IMp: intensidad de metanol puro
IM_{TLC}: intensidad metanol por TLC
IUp: intensidad umbeliferona pura
IUpc: intensidad umbeliferona pura corregida
IU_{TLC}: intensidad umbeliferona por TLC
IU_{TLC}c: intensidad umbeliferona TLC corregida
mg: miligramos
MIC: manejo integrado del cultivo
min: minutos
ml: mililitros
ml/l: mililitros por litro
mm: milímetros
mM: milimolar
MRS: medio de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe

MS: materia seca

nm: nanómetros

PD: *Penicillium digitatum*

PD1: *Penicillium digitatum* 1

PD2: *Penicillium digitatum* 2

PD3: *Penicillium digitatum* 3

PD4: *Penicillium digitatum* 4

PD5: *Penicillium digitatum* 5

PD6: *Penicillium digitatum* 6

PE_{TLC}: pérdida escoparona por TLC

Pf: peso fresco

PI: porcentaje de inhibición

PM: peso molecular

ppm: partes por millón

PU_{TLC}: pérdida umbeliferona por TLC

p/v: relación entre el peso del soluto y el volumen de la solución

S: severidad

SE: sobrenadantes estériles

seg: segundos

tn: toneladas

t 0h: inoculación con el patógeno y tratamiento simultáneo

t 18h: inoculación con el patógeno y 18 h posteriores aplicación del tratamiento

t 48h: aplicación del tratamiento y 48 h posteriores inoculación con el patógeno

TLC: cromatografía de capa fina

UA: unidades de absorbancia

µg: microgramos

µm: micras o micrones

µg/g Pf: microgramos por gramos de peso fresco

v/v: relación entre el volumen del soluto y el volumen de la solución

2 dpt: dos días posteriores a la aplicación del tratamientos

4 dpt: cuatro días posteriores a la aplicación de los tratamientos

6 dpt: seis días posteriores a la aplicación del tratamiento

λ: longitud de onda (nm)

λ_{emi}: longitud de onda de emisión en nm

λ_{exci}: longitud de onda de excitación en nm

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no ha sido presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución”.

María Soledad Carbajo

Sistemas alternativos a los fungicidas químicos para el control de *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. en limón

Argentina es el principal productor mundial de limones en el mundo y el 90 % de esta producción se sitúa en la provincia de Tucumán. Las pérdidas económicas ocasionadas por las enfermedades de poscosecha representan uno de los principales problemas de la citricultura mundial, siendo el 80 % atribuibles a infecciones fúngicas. El “moho verde” causado por *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. (PD), es la enfermedad de mayor incidencia y severidad durante la exportación de frutos de limón. Actualmente el control de estas enfermedades se realiza con el uso de fungicidas de síntesis química. Debido a las severas restricciones impuestas a estos productos, por regulaciones ambientales y de la salud, hay una fuerte necesidad de métodos alternativos de control. El objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar alternativas de bajo impacto ambiental: bacterias lácticas, extractos vegetales, Serenade® (*Bacillus subtilis* QST 713) y bicarbonato de sodio; con actividad antifúngica directa o a través de la inducción de mecanismos de defensa, para el control de PD en condiciones *in vitro* e *in vivo* (frutos de limón). De un total de 33 cepas de bacterias lácticas evaluadas, se seleccionaron ocho con propiedades antifúngicas frente a PD. Se identificaron los metabolitos antifúngicos como ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético y ácido fenil láctico) y se determinó la combinación óptima con mayor actividad inhibitoria. Los productos alternativos: extractos vegetales, Serenade® y bicarbonato de sodio, presentaron actividad antifúngica *in vitro* frente a PD con porcentajes de inhibición entre 2,1 - 16 %. En los frutos de limón, los tratamientos alternativos no fueron efectivos por sí solos para controlar en forma directa la enfermedad. Estos tratamientos redujeron significativamente la severidad de la enfermedad, excepto el Serenade® cuando fue aplicado simultáneamente con el inóculo. Esta reducción fue más marcada cuando se dejaron transcurrir 18 h entre inoculación y aplicación de los tratamientos. El bicarbonato de sodio al 3 % y en menor medida el Serenade® al 1% indujeron una respuesta de defensa de los frutos y controlaron la enfermedad en un 96,7 % y 56,7 %, respectivamente. En cromatografía de capa fina y fluorometría se detectó un aumento de la fitoalexina escoparona, sugiriendo que este efecto se produciría como resultado de la inducción de mecanismos de defensa, mientras que la umbeliferona no fue detectada. Estos resultados indican que los productos biológicos actuaron como una barrera al avance de la enfermedad, retrasando la severidad de la misma e induciendo de una respuesta de defensa en los frutos.

Palabras claves: *Penicillium digitatum*, incidencia, severidad, control biológico, inducción de mecanismos de defensa.

Alternative systems of chemical fungicides to control *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. in lemon

Argentina is the main world lemon producer and 90 % of its production comes from the province of Tucumán. The economic losses caused by postharvest diseases represent one of the main problems in citrus industry worldwide, being 80% of them due to infections produced by fungus. The “green mold” caused by *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. (PD), is the disease with the greatest incidence and severity during lemon exportation. Currently, PD control is carried out with synthetic chemical fungicides. Due to the severe restrictions imposed on these chemicals, based on health and environmental regulations, there is a strong need for alternative methods of control. The objective of this thesis was to evaluate different low environmental impact alternatives: lactic acid bacteria, plant extracts, Serenade® (*Bacillus subtilis* QST 713) and sodium bicarbonate, with direct anti-fungal activity or through the induction of defense mechanisms, to control PD in *in vitro* and *in vivo* (lemon fruit) conditions. From 33 strains of lactic acid bacteria tested, we have selected eight with anti-fungal properties against PD. Anti-fungal metabolites were identified as organic acids (lactic acid, acetic acid and phenyl-lactic acid) and the optimal combination with the highest inhibitory activity was determined. Plant extracts, Serenade® and sodium bicarbonate showed anti-fungal activity *in vitro* against PD with percentages of inhibition between 2.1-16%. In lemon fruit, alternative treatments were not effective by themselves on controlling PD. These treatments, except Serenade®, significantly reduced disease severity when applied simultaneously with the inoculum. This reduction was more evident when the treatment was applied 18 hours after inoculation. Sodium bicarbonate 3% and, to a lesser extent Serenade® at 1%, induced a defense response in fruits and controlled the disease by 96.7% and 56.7% respectively. An increase of the phytoalexin scoparone was detected by thin layer chromatography and fluorometry, suggesting that these treatments would cause the induction of defense mechanisms, whereas umbeliferone was not detected. These results indicate that biological products functioned as a barrier against the advancement of the disease, delaying disease severity and inducing defense responses in the fruit.

Key words: *Penicillium digitatum*, incidence, severity, biological control, induction of defense mechanisms.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Origen e historia de los cítricos

Los cítricos son originarios del sudeste asiático, en una vasta área ocupada por el sur y sudeste de China, India, Myanmar, Tailandia, Filipinas, Borneo y Sumatra. El limonero [*Citrus limon* (L.) Burm.], también se considera que fue originario de esas regiones y aparentemente se comenzó a cultivar hacia el año 900 a.C. en Irak, introducido posteriormente en Persia y Palestina, y desde allí se habría distribuido al resto del mundo (García, 1996; Palacios, 2005).

En 1493, en su segundo viaje, Cristóbal Colon llevó semillas de citrus desde España hasta Haití, que posteriormente se difundieron por Cuba y Florida y de allí a California, desde donde se propagaron por el Caribe y a lo largo del Pacífico hasta lo que hoy es México, Perú, Chile, Argentina y Uruguay (García, 1996; Palacios, 2005).

En la provincia de Tucumán los cítricos fueron introducidos desde Chile, en 1556, por los conquistadores. Las primeras plantaciones de semilla se realizaron en Ibatín (departamento Monteros) (Toll Joubes *et al.*, 1971; García, 1996). Durante muchos años las plantaciones cítricas permanecieron en estado silvestre, hasta el momento de la introducción de variedades cítricas y más tarde de portainjertos. A partir de allí comenzó a perfilarse la importante actividad citrícola de Tucumán, impulsada por inmigrantes italianos y españoles. Entre los años 1896 y 1905 se iniciaron las plantaciones comerciales de naranjas [*Citrus sinensis*, (L.) Obs.] y mandarinas (*C. reticulata*, Blanco), injertadas sobre el portainjerto de naranjo agrio [*Citrus aurantium* (L.) var. "amara"]. Las zonas elegidas inicialmente para estas plantaciones fueron Tafí Viejo y Yerba Buena (Asociación Tucumana del Citrus, 2009).

Entre los años 1920 y 1955, una enfermedad producida por un virus, la tristeza de los cítricos, hizo sucumbir a las plantaciones citrícolas de naranjas, mandarinas y pomelos (*Citrus paradisi*, Macf.), que se encontraban sobre el portainjerto de naranjo agrio. Las únicas plantaciones que resistieron esta epidemia fueron los limoneros injertados sobre el pie de naranjo agrio. Así fue que comenzó a cultivarse únicamente esta especie citrícola en Tucumán (Toll Joubes *et al.*, 1971).

En los años posteriores se introdujo material genético (portainjertos y variedades) para obtener mayores rendimientos y calidad de fruta. Además se invirtió en nuevas tecnologías, como ser plantas procesadoras de empaques y fábricas para la obtención de derivados industrializados. A partir de 1971 comenzaron las primeras exportaciones de frutas cítricas a Europa y desde allí la actividad continuó en crecimiento hasta el presente (Asociación Tucumana del Citrus, 2009).

1.2. Importancia económica de la actividad citrícola en Argentina

Argentina ocupa el 6º lugar en la producción mundial de frutas cítricas frescas con una producción total de 3.000.000 tn durante la campaña 2008 (Federcitrus, 2009). De este total, el 46,1 % corresponde a la producción de

limones, el 31,8 % a la de naranjas, el 13,9 % a la de mandarinas y el 8,2 % restante a la de pomelos. Dicha producción está en contraestación con respecto al Hemisferio Norte, ya que Argentina se encuentra en plena producción cuando los principales productores y consumidores de cítricos, que son los países del Hemisferio Norte, están en la estación opuesta. Esta situación otorga a nuestra producción cítrica una ventaja competitiva y comercial muy importante, especialmente para la del limón, ubicando al país como primer productor mundial de este cítrico, primer exportador de productos derivados de la industria y segundo de fruta fresca.

Considerando el Hemisferio Sur, Argentina se ubica en segundo lugar en el volumen total de producción cítrica luego de Brasil. Sin embargo, nuestro país concentra el 74 % de la producción de limón y el 88,7 % de la industrialización de esta especie ubicándolo en primer lugar a este nivel (Federcitrus, 2009).

En cuanto al nivel nacional, la producción de fruta fresca cítrica (limones, naranjas, mandarinas y pomelos), es la de mayor importancia y ocupa el primer lugar en los volúmenes de producción frutícola de Argentina, de los cuales se exporta como fruta fresca un 22,1 %, se industrializa un 43,4 % y el volumen restante se comercializa en el mercado interno (27,5 %). El volumen exportable de cítricos ocupa en el país el segundo lugar en las exportaciones de fruta fresca después de la pera.

La distribución de los principales destinos, considerando el volumen total de la producción cítrica del país y discriminado por especie se muestra en la Figura 1.1. En la misma puede apreciarse que la producción de limón tiene un 69 % del total industrializado, un 61 % de la fruta fresca exportable y sólo un 5 % de lo comercializado en el mercado interno. En cambio, las producciones de naranjas, mandarinas y pomelos en su conjunto, representan un 39 % del volumen exportable como fruta fresca, un 31 % de lo industrializado y casi la totalidad (95 %) de comercializado en el mercado interno (Fig. 1.1). Es por esto que el complejo agro-industrial limonero es el de mayor importancia económica y el que otorga a la Argentina el perfil exportador e industrializador de cítricos.

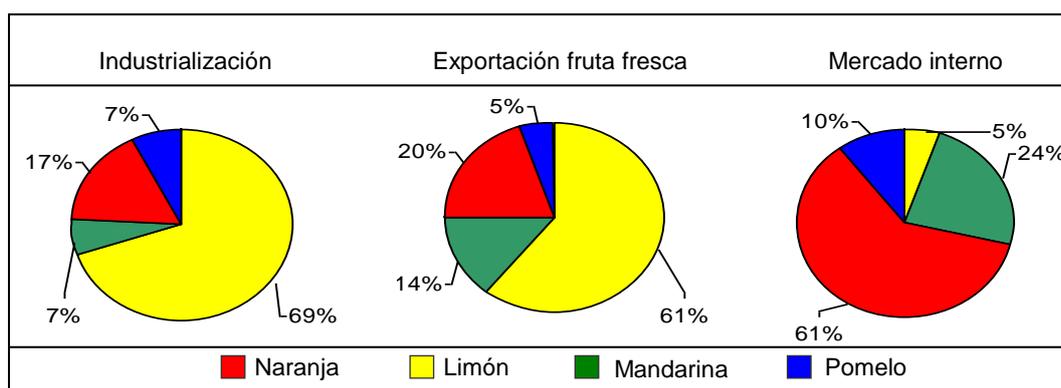


Figura 1.1. Principales destinos del volumen total de producción cítrica de Argentina, por especie.

Rusia fue el principal destino de exportación de la fruta cítrica, durante la campaña 2008, representando un 20 % del volumen total exportado en el país. Por otra parte, el bloque de la Unión Europea (UE), constituido por: Holanda, España, Italia, Bélgica, Ucrania, Grecia, Reino Unido, Portugal y Polonia, en su conjunto representó el 60 % del volumen total exportado. Otros destinos de importancia fueron Canadá, Serbia, Filipinas, Indonesia y Hong Kong (Federcitrus, 2009).

En relación a los derivados cítricos industrializados, los volúmenes producidos durante el 2008, fueron de: 4.000 tn métricas de aceite esencial de limón, 50.000 tn métricas de cáscara deshidratada y 70.600 tn métricas de jugos cítricos concentrados. Del volumen total de los jugos cítricos, el 70 % corresponde al jugo concentrado de limón. Estos volúmenes posicionaron a la Argentina como el principal productor mundial de jugo concentrado de limón (Federcitrus, 2009).

Los productos cítricos industrializados también se destinan al mercado externo. El 80 % se exporta (UE, Países Bajos, EEUU, México, Medio Oriente y Japón) y el 20 % se comercializa en el mercado interno principalmente para la elaboración de bebidas sin alcohol, industria alimenticia, farmacéutica y cosmética (Asociación Tucumana del Citrus, 2009).

1.2.1. Importancia económica y social de la producción de limones en Tucumán

En la provincia de Tucumán se ha constituido un verdadero “cluster de limones”, conformando un polo productivo especializado en la región, con ventajas competitivas a nivel mundial. La producción nacional de limones cuenta con la más alta tecnología internacional. En la actualidad funcionan 7 plantas fabriles, que industrializan aproximadamente el 64 % de la producción, existiendo además 35 plantas de empaque que procesan la fruta fresca con destino a la exportación (30 %) y al mercado interno (4 %).

La evolución del cultivo de limón se refleja en la tasa de incremento que experimentó esta actividad en cuanto a superficie implantada y volúmenes de producción y exportación de fruta fresca. Este aumento fue acompañado y estimulado por las condiciones de los mercados y las mejoras de los precios internacionales, como así también por la tecnología invertida en el sector. Si bien se produjo un incremento continuo de esta actividad a través de los años, en las últimas campañas hubo una caída en la producción y exportación (Fig. 1.2) debida a condiciones climáticas desfavorables (heladas intensas y sequías) y de mercado.

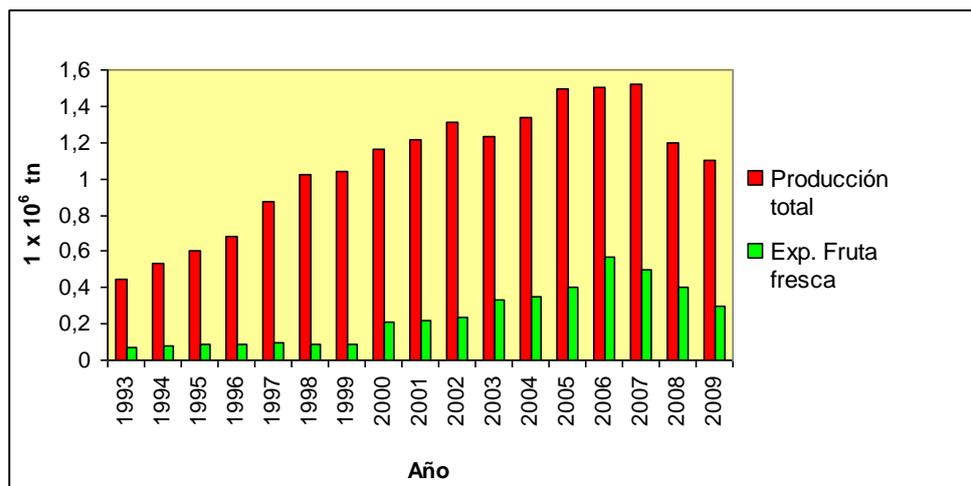


Figura 1.2. Evolución de la producción de limón (millones de tn) en la provincia de Tucumán, durante los últimos 15 años. Fuente: Asociación Tucumana del Citrus (2009).

La producción de limones en Tucumán constituye la segunda actividad económica y social, luego del cultivo de caña de azúcar (*Sacharum officinarum* L.). Absorbe cerca de 50.000 trabajadores durante el pico de cosecha, generando una gran demanda de mano de obra a lo largo de toda su cadena productiva. Esto crea un fuerte impacto socio-económico en la región. Por otra parte, durante el 2008, las exportaciones de limones y sus derivados generaron alrededor de 800 millones de dólares (SENASA, 2009).

Por todo esto, la producción de limones de Tucumán adquiere un papel muy importante, además, concentra casi la totalidad de esta actividad en Argentina, como ya se mencionó, posicionando al país como primer productor, industrializador y segundo exportador de fruta fresca.

1.2.2. Ubicación geográfica del cultivo de cítricos en Argentina y en Tucumán

Las plantaciones cítricas de Argentina cubren una superficie total de 140.000 ha. Las principales zonas productoras de cítricos son la región noroeste (NOA), integrada por las provincias de Salta, Jujuy, Tucumán y Catamarca y que reúne el 63,8 % de la producción cítrica nacional, y la región noreste (NEA) constituida por Misiones, Entre Ríos, Corrientes y norte de Buenos Aires, la cual produce el 35,1 % del volumen total. En el resto del país (Chaco y Formosa) el aporte a la producción nacional, es poco significativo (1,1 %) y sólo toma relevancia en el cultivo de pomelo (Fig. 1.3 y Fig. 1.4).



Figura. 1.3. Provincias productoras de frutas cítricas en Argentina. Fuente: Federcitrus (2009)

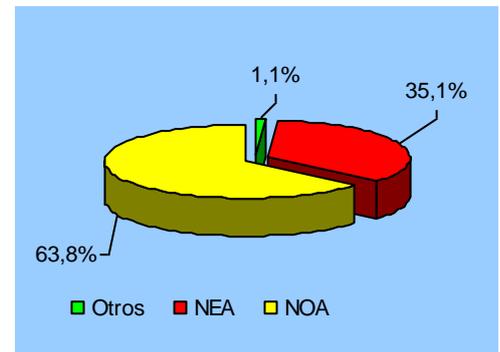


Figura 1.4. Distribución por región de la superficie implantada con cítricos. Fuente: Federcitrus (2009)

Si se analizan los volúmenes producidos en cada región, por especie citrícola, en el NEA se cultiva el 64 % de la producción de naranjas, el 87 % de las mandarinas, el 6 % de pomelos y el 4 % de limones del país (Fig. 1.5). En el NOA se producen casi la totalidad de las producciones de limón (96 %, de los cuales un 90 % se sitúa en la provincia de Tucumán) y de pomelos (82 %). Los menores porcentajes corresponden a las producciones de naranjas (36 %) y mandarinas (13 %). En las provincias de Chaco y Formosa (resto del país) sólo es importante la producción de pomelos con un 12,4 % del total producido de esta especie en el país (Federcitrus, 2009) (Fig. 1.5).

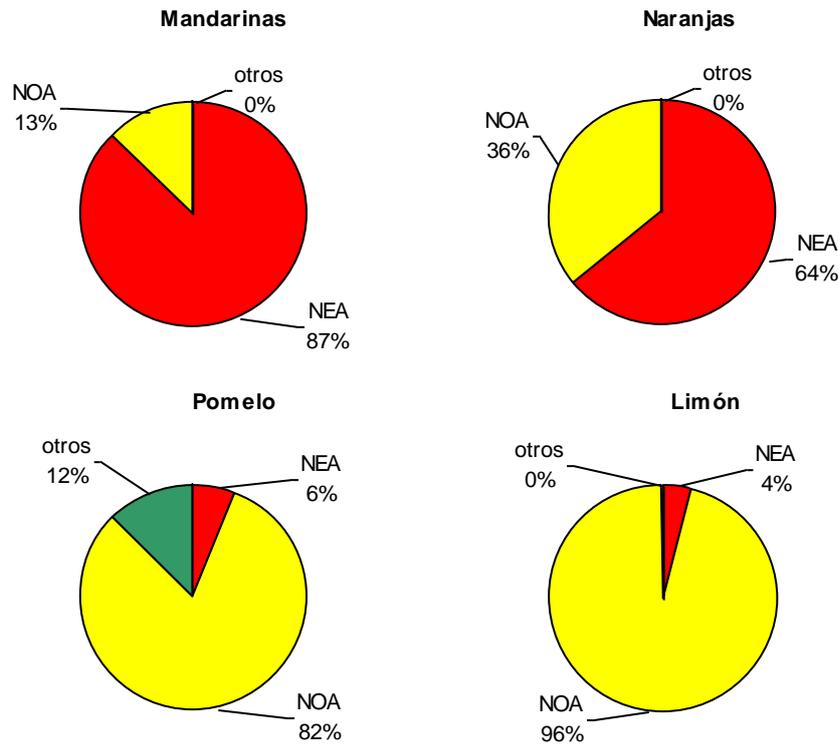


Figura 1.5. Distribución geográfica en Argentina de la producción de cítricos discriminada por especie.

Tucumán cuenta con 35.800 ha plantadas con limones que produjeron un total de 1.200.000 tn en 2009 (Asociación Tucumana del Citrus, 2009). Esta producción se localiza en una franja central orientada de norte a sur que abarca los departamentos de Tafí Viejo, Capital, Cruz Alta, Burruyacú, Lules, Famaillá, Monteros, Chicligasta, Río Chico, Alberdi y La Cocha (Fig. 1.6). Dicha franja corresponde a la zona pedemontana que bordea la región fitogeográfica de Las Yungas. Es una zona de transición de temperaturas y precipitaciones, que han definido suelos con vegetación del tipo selvática subtropical. El límite occidental de la zona cítrica está marcado por la topografía excesivamente ondulada al acercarse a la montaña, donde la pendiente dificulta el cultivo. El límite oriental está fijado por las condiciones edáficas y climáticas que limitan el cultivo de estos árboles frutales (Palacios, 2005).

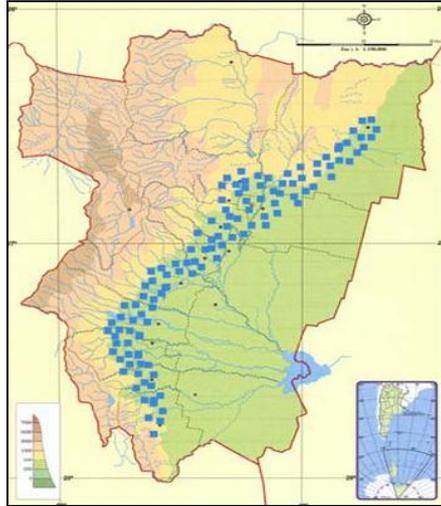


Figura 1.6. Zona productora de cítricos en la provincia de Tucumán (representada por la franja de puntos azules en el mapa).

1.3. Fisiología y morfología de los frutos cítricos

En los frutos cítricos se distinguen dos partes o secciones: la cáscara o corteza y el endocarpo. La corteza a su vez está constituida por el epicarpo, denominado también flavedo (parte externa y coloreada del fruto) y el mesocarpo, que es de constitución esponjosa de color blanco, llamado albedo (Fig. 1.7). El flavedo está cubierto con cera y contiene numerosas glándulas de aceite, contiene además clorofila y pigmentos carotenoides. El endocarpo constituye la parte interna del fruto y está conformado por la pulpa carnosa con las vesículas de jugo y las semillas en su interior (Whiteside *et al.*, 1988).

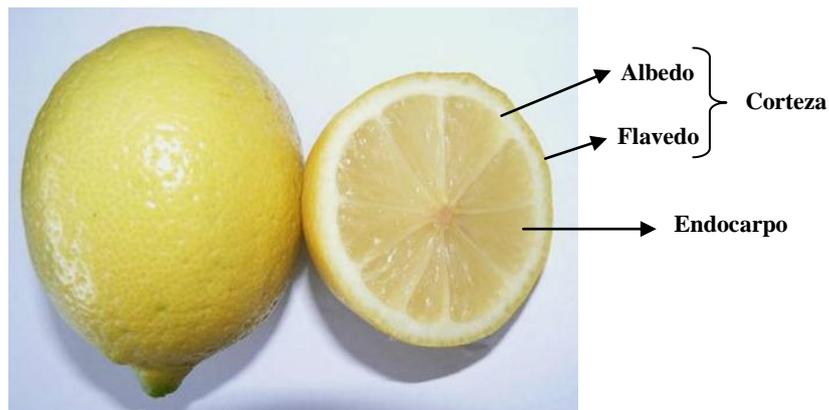


Figura 1.7. Partes constitutivas de un fruto cítrico.

Los cítricos se agrupan dentro de los frutos no climatéricos, es decir que el proceso de maduración no está mediado por la producción autocatalítica de etileno. La madurez de consumo se alcanza cuando la fruta está en la planta y no continúa una vez desprendida de la misma (Sozzi, 2007).

Cuando la fruta permanece en la planta, es provista de agua, nutrientes y fotoasimilados provenientes de las hojas fotosintéticamente activas y de las reservas de la raíz (en los frutales de hojas caducas). También en algunos casos (por ejemplo, en guindo) la fotosíntesis realizada por los mismos frutos contribuye a su desarrollo (Sozzi, 2007). Los fotoasimilados se acumulan en los frutos durante el crecimiento hasta alcanzar el tamaño definitivo. Particularmente, en cítricos el suministro de hidratos de carbono constituye un factor limitante en el aumento de tamaño del fruto en las etapas finales. Se cree que éstos tendrían un efecto fitoregulador además de su conocida función de llenado de los frutos (Sozzi, 2007).

Posteriormente, durante la maduración, tiene lugar una serie de procesos bioquímicos y físicos que otorgan al fruto sus características organolépticas. En frutos jóvenes la clorofila es el pigmento dominante y enmascara a los otros (carotenoides, xantofilas, licopenos, etc.) por lo que el color predominante es el verde (Sozzi, 2007). Cuando la fruta madura y las temperaturas son bajas, se destruye la clorofila y los otros pigmentos incrementan su intensidad (Whiteside *et al.*, 1988). Otros cambios que ocurren durante este proceso son: la reducción de la firmeza, el incremento en los sólidos solubles, las disminuciones de almidón y acidez y los cambios organolépticos en el sabor y el aroma (Sinclair, 1984; Sozzi, 2007).

Cuando la fruta es desprendida del árbol, la respiración se incrementa para producir la energía celular necesaria para mantener los tejidos de la fruta. En este momento los sustratos respirables provienen de las reservas almacenadas en la fruta. Estas comienzan progresivamente a disminuir llegando finalmente a la senescencia y al deterioro de la fruta. Conociendo estos procesos, los ambientes de poscosecha están diseñados con el fin de disminuir la tasa respiratoria, para mantener los procesos vitales a un nivel mínimo, y de esta manera, reducir las pérdidas de agua y de reservas, a fin de extender lo máximo posible la vida de poscosecha de la fruta (Adaskaveg *et al.*, 2007).

Cuando la fruta está dañada por acción de heridas mecánicas y/o patógenos, los procesos respiratorios y la pérdida de agua se inician abruptamente. También se estimula la producción de etileno que lleva rápidamente al deterioro y senescencia de la fruta (Sommer *et al.*, 2007). En consecuencia, es de fundamental importancia realizar un adecuado manejo de poscosecha a fin de evitar heridas en el manipuleo de la fruta y el ataque de patógenos.

1.4. Causas e importancia de las pérdidas de poscosecha en cítricos

Las pérdidas de poscosecha de los frutos, son aquellas ocasionadas por alguna alteración en la normal apariencia de los frutos, lo que lleva al descarte y eliminación de los mismos y como consecuencia origina mermas económicas. El origen y las causas de las pérdidas de poscosecha son diversas. Por un lado ocurre la senescencia y el deterioro fisiológico normal del desarrollo de cada fruto, pero también puede ser causada por factores bióticos (microorganismos, insectos, ácaros, etc.), abióticos (viento, sequía, quemaduras de sol, heladas, granizo, etc.), fisiológicos (daños por frío, déficits nutricionales y/o hormonales) y por condiciones de mal manejo (aplicación de agroquímicos, fertilización, poda, etc.). Todos estos factores influyen en la calidad de la fruta y por lo tanto en su aptitud o no, para ser comercializada y llegar al consumidor (Torres Leal, 1996).

En cítricos, las pérdidas de poscosecha están estimadas entre un 5 y 8 % del total de la fruta manipulada (Viñas *et al.*, 2006). Particularmente, en Argentina las pérdidas de pre y poscosecha estimadas son de 10 % para naranjas y mandarinas, 15 % para pomelos y 2,5 % para limones (Federcitrus, 2009). Estas pérdidas varían según la zona de producción, especie, variedad, condiciones ambientales y tecnologías de recolección y de poscosecha (Viñas *et al.*, 2006).

En general, no existen a nivel mundial estadísticas de la estimación de las pérdidas de poscosecha. La problemática es diferente en cada región, por lo cual no se puede generalizar sobre la incidencia de las enfermedades ni en su manejo y control, sino que es necesario un estudio y análisis local de cada situación (Ochoa *et al.*, 2007). Si bien existen investigaciones sobre métodos de control alternativos para cítricos en Argentina, (Visintin *et al.*, 1998; 2000; 2005; 2006; 2007a; 2007b; 2008; 2009; Benítez Ahrendts y Carrillo, 2004; Sendín, 2004; Sendín *et al.*, 2004; Cocco *et al.*, 2008), se necesita generar información local y evaluar la efectividad de las distintas medidas de control en cada patosistema, en condiciones locales.

1.4.1. Enfermedades patológicas de poscosecha

Las pérdidas económicas ocasionadas por las enfermedades patológicas de poscosecha representan uno de los principales problemas de la citricultura mundial, por lo cual su control constituye un aspecto importante a considerar en la comercialización de fruta fresca. Esto adquiere mayor relevancia cuando las distancias que separan los centros productores de los principales mercados consumidores son considerables, como es el caso de la provincia de Tucumán, por ésto, las enfermedades de poscosecha y su manejo representan una de las principales preocupaciones de los exportadores.

Las infecciones por patógenos pueden ocurrir en cualquier etapa de la producción y comercialización: en el cultivo, en el momento de la cosecha, en el procesamiento y empaquetado, en almacenamiento, transporte y mercado, e incluso después de ser adquirido por el consumidor (Amiri y Bompeix, 2005). Entre las pérdidas de poscosecha, el 80 % son atribuibles a infecciones fúngicas y que fundamentalmente producen podredumbres en los frutos (Palou, 2002). Entre éstas, el “moho verde” o “podredumbre verde”, causada por *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc., es la enfermedad de mayor incidencia y severidad a lo largo de la campaña de exportación de frutas cítricas (Fogliata *et al.*, 2000) y en menor medida *Penicillium italicum* Whemer. Estos hongos son los responsables del 60 a 80 % del total de las podredumbres fúngicas (Ballester, 2007).

Otras especies fúngicas, pertenecientes a los géneros: *Geotrichum spp.*, *Phytophthora spp.*, *Alternaria spp.*, *Colletotrichum spp.*, *Aspergillus spp.*, *Phomopsis spp.*, *Fusarium spp.*, *Diplodia spp.*, *Pleospora spp.*, *Botrytis spp.*, *Sclerotinia spp.* y *Trichoderma spp.*; causan inconvenientes menores y ocasionalmente pueden originar grandes pérdidas en función de las condiciones ambientales de la campaña cítrica, estado vegetativo de las plantas y del manejo cultural (Whiteside *et al.*, 1988).

A pesar que existen investigaciones del comportamiento del patógeno *P. digitatum* sobre frutas cítricas (Whiteside *et al.*, 1988; Fajardo *et al.*, 1998; Plaza *et al.*, 2004; Kinay *et al.*, 2007; Sommer *et al.*, 2007), es fundamental generar información específica de la virulencia o agresividad, velocidad de crecimiento y

desarrollo sobre los frutos, como así también del comportamiento frente a fungicidas químicos. Esto tiene implicancia directa sobre la efectividad de las medidas de control local.

1.5. Manejo de poscosecha

1.5.1. Prevención y manejo de poscosecha

Un buen manejo de poscosecha consiste fundamentalmente en realizar una cosecha cuidadosa, evitando golpes y heridas, y es un factor determinante para la vida de poscosecha de la fruta puesto que evita la entrada de patógenos. La recolección no debe realizarse en días con exceso de humedad, ya que se incrementan los daños de oleocelosis (ruptura de las glándulas de aceite). Deben utilizarse los implementos adecuados (tijeras, maletas, etc.) y la fruta cosechada debe ser transportada lo más rápido posible al empaque (Torres Leal, 2005). Asimismo, el volcado de las frutas debe realizarse con cuidado para evitar lesiones. Una mala operación de cosecha, agravada por deficientes prácticas de transporte y dejar las frutas en el empaque sin procesamiento más de 24 h, aumentan considerablemente los problemas de poscosecha. Por lo tanto, es necesario programar la cosecha incluyendo la debida capacitación de todo el personal que interviene en la misma (FAO, 2007).

Las operaciones en el empaque (volcado, lavado, clasificado, aplicación de fungicidas y ceras) tienen por objeto acondicionar la fruta y mantener la calidad durante la vida de poscosecha. Es necesario realizar estas operaciones de manera correcta y evitando los golpes y las heridas (Torres Leal, 1996). También es indispensable desinfectar periódicamente las instalaciones del empaque, donde suele estar la mayor presión de inóculo (FAO, 2007). Según la FAO, es necesario evaluar periódicamente la contaminación de los ambientes del empaque y las recomendaciones indican que se debe desinfectar el local cuando en el medio de cultivo agarizado se desarrollan 10 colonias de *Penicillium spp.* Sin embargo, Palou *et al.* (2001a) mencionan que si bien la cantidad de inóculo fúngico influye decisivamente en la incidencia de enfermedades, la importancia de otros factores como son la susceptibilidad intrínseca de los frutos a la infección o las condiciones ambientales, dificulta el establecimiento de una relación directa entre los niveles de población fúngica en los empaques y la incidencia de las podredumbres. Es por esto que no se pueden establecer límites críticos confiables.

1.5.2. Control de enfermedades patológicas de poscosecha

El control convencional de las enfermedades patológicas de poscosecha se realiza a través del uso de fungicidas de síntesis química. Estos productos tienen inconvenientes, porque no solo impactan negativamente sobre la salud y el ambiente, sino que además cada vez son mayores las restricciones impuestas por los mercados internacionales en cuanto a límites máximos de residuos químicos en productos agrícolas.

Por otro lado, la resistencia de los patógenos a los fungicidas es otro problema que se presenta cada vez con mayor gravedad por el uso continuo de los mismos productos químicos a través de los años, favoreciendo una alta presión de selección en la población del patógeno (Holmes y Eckert, 1999). Cuando se inició la exportación de limones en Tucumán (1971) se utilizaban los

fungicidas del grupo de los bencimidazoles (benomil y tiabendazol) que luego, en la década del '80, tuvieron que ser remplazados por el fungicida imazalil debido a la aparición de cepas resistentes de *Penicillium spp.* y consecuentemente, la pérdida de eficiencia de control de estos productos (Fogliata *et al.*, 2000). Sin embargo, a partir de 1997, se detectaron cepas de *Penicillium spp.* resistentes al fungicida imazalil en varias plantas de empaque de la provincia de Tucumán (Fogliata *et al.*, 1998). En la actualidad, dicho fungicida continúa siendo el más utilizado para el control de las podredumbres en cítricos, pero debido a la aparición de las cepas resistentes antes mencionada y a las restricciones que imponen los países en cuanto a residuos, tanto en fruta fresca como en los derivados industrializados, se hizo necesario buscar nuevas alternativas de control.

1.5.3. Métodos alternativos de control de enfermedades patológicas en poscosecha

Entre los métodos alternativos de poscosecha se encuentran aquellas técnicas que contemplan el reemplazo o la reducción del uso de agroquímicos a fin de lograr frutas de calidad, sanas y seguras para los consumidores y el ambiente. Dentro de los métodos alternativos se encuentran el control biológico, los métodos físicos y químicos (Usall *et al.*, 2005).

1.5.3.1. Métodos biológicos

El control biológico es una alternativa al control convencional de los patógenos y consiste en el empleo de microorganismos antagónicos, la aplicación de sustancias naturales antimicrobianas, la inducción de defensa, y el empleo de productos sanitizantes o sustancias llamadas GRAS ("Generally recognized as safe") (Mari *et al.*, 2003; Spadaro y Gullino, 2004). La etapa de poscosecha es adecuada para la aplicación de estos métodos de control (Umaña-Rojas, 1996; Vero y Mondino, 1999; Janisiewicz y Korsten, 2002; Mari *et al.*, 2003; Spadaro y Gullino, 2004; Viñas *et al.*, 2006; Tripathi y Shukla, 2007; Sharma *et al.*, 2009).

1.5.3.1.1. Uso de microorganismos antagónicos

El empleo de microorganismos antagonistas está recibiendo una mayor atención como una alternativa promisorio al control químico (Teixidó *et al.*, 2001). Los mecanismos más usuales por lo que estos microorganismos ejercen su actividad de control son: antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, inducción de defensa e interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) (Spadaro y Gullino, 2004; Vero *et al.*, 2004; Arras y Arru, 1997).

Numerosos microorganismos con capacidad de controlar de manera efectiva los patógenos de poscosecha han sido identificados sobre diferentes frutas (Janisiewicz y Korsten, 2002; Torres *et al.*, 2005). La cepa CPA-2 de *Pantoea agglomerans*, en combinación con un tratamiento de bicarbonato de sodio, logró controlar el desarrollo del "moho verde" causado por *P. digitatum* y del "moho azul" causado por *P. italicum* en naranjas (Teixidó *et al.*, 2000; 2001; Usall *et al.*, 2005; 2008; Viñas *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2007). Asimismo una cepa avirulenta de *Galactomyces citri-aurantii* fue efectiva en el control de *P.*

digitatum en naranjas y pomelos (Eayre *et al.*, 2003). También diferentes aislamientos de *Bacillus subtilis*, utilizados en combinación con bicarbonato de sodio o con tratamientos térmicos de altas temperaturas, permitieron un control efectivo de *P. digitatum* y *P. italicum* en naranjas (Obagwu y Korsten, 2003). Las levaduras *Candida catenulata* y una cepa de *Pichia subpelliculosa* redujeron la incidencia del “moho verde” en cítricos en Jujuy (Benítez Ahrendts y Carrillo, 2004).

1.5.3.1.2. Empleo de productos naturales (extractos vegetales) y/o sustancias GRAS

El uso de sustancias vegetales (extractos o aceites esenciales) para el control de enfermedades también puede ser una alternativa al uso de fungicidas químicos.

De igual forma se han evaluado la eficacia de distintas sustancias químicas consideradas de muy baja toxicidad (sustancias GRAS), como las sales de carbonatos, bicarbonatos, molibdatos, formatos, benzoatos, fosfatos, etc. (Usall *et al.*, 2005). Entre éstas, las soluciones de bicarbonato y carbonato sódico resultaron ser las más eficientes para el control de las podredumbres verde y azul en cítricos (Smilanick *et al.*, 1997; 1999; Müller y Bernal, 2001; Palou *et al.*, 2001b; Usall *et al.*, 2005; Cocco *et al.*, 2008).

1.5.3.1.3. Inducción de mecanismos de defensa de los frutos

Otra alternativa promisorio es aquella que utiliza la inducción de los mecanismos de defensa de las plantas a través de la aplicación de agentes inductores o “elicitores” (bióticos o abióticos), y ha adquirido considerable atención como potencial tratamiento para el control de enfermedades de poscosecha en frutas y vegetales (El-Ghaouth, 1997; Sharma *et al.*, 2009).

En la actualidad existen numerosos productos comerciales basados en la inducción de la defensa de la planta al ataque de fitopatógenos (Bettioli, 2006). La inducción de la defensa fue propuesta como una posible herramienta biológica para reducir las enfermedades de poscosecha en frutas y vegetales. Esta inducción puede ser mediada a través de elicitores biológicos, químicos o físicos (Terry y Joyce, 2004).

La identificación de microorganismos con altos niveles de actividad antagonista, con capacidad de inhibir la enfermedad y estimular en la fruta la biosíntesis de fitoalexinas, se ha convertido en un tema de particular interés científico (Arras, 1996).

1.5.3.2. Métodos físicos

Los métodos físicos son aquellos en los que se emplean factores físicos para detener o eliminar el desarrollo de los organismos patógenos, como ser: la temperatura, que puede ser baja (conservación) o alta (curado y termoterapia), las atmósferas modificadas y las radiaciones (radiaciones UV, gamma, rayos X, etc.).

1.5.3.2.1. Sistemas de conservación en frío y atmósferas controladas

El manejo de la temperatura es la herramienta más efectiva para extender la vida de poscosecha de los frutos (Sozzi, 2007). Los sistemas de conservación en frío utilizan bajas temperaturas y alta humedad relativa (85-95 %) a los fines de retrasar la tasa respiratoria, minimizar las pérdidas de agua y retardar el ataque de patógenos (Sozzi, 2007).

Sin embargo, se considera que este sistema es complementario a otros ya que por sí solo no garantiza la baja incidencia de las podredumbres (Palou, 2002). Las temperaturas de conservación varían según las especies cítricas; así por ejemplo, para naranjas suele utilizarse 2-7 °C, 10-15 °C para limones y pomelos, 9-10 °C para limas y 4-7 °C para mandarinas (Sozzi, 2007). Para el enfriamiento de los cítricos se recomienda el sistema de aire forzado que permite bajar rápidamente la temperatura de la fruta (FAO, 2007).

El uso de atmósferas modificadas o controladas también contribuye a prolongar la vida de almacenamiento de los cítricos y es otro sistema complementario a los tratamientos de poscosecha. Las diferentes concentraciones de gases recomendadas para las distintas especies cítricas son 5 % O₂ y 0-5 % CO₂ para naranjas y limones, y 5 % O₂ y 5-10 % CO₂ para pomelos y limas (Palou, 2002). Las investigaciones realizadas por Porat *et al.* (2004) mostraron que además de mantener y extender la frescura de la fruta, las atmósferas controladas en cítricos reducen significativamente el desarrollo de desórdenes fisiológicos en el epicarpo, por lo cual puede ser una práctica comercial útil para mantener la calidad de la fruta.

1.5.3.2.2. Tratamientos térmicos (curado y termoterapia)

El curado (aire caliente) es un procedimiento por el que los frutos se almacenan a altas temperaturas (> 30 °C) y alta humedad ambiente (> 90 %) durante períodos de tiempo variable (1-3 días). Estos tratamientos resultaron efectivos para reducir las podredumbres causadas por *Penicillium* pero tienen la limitante de ser muy costosos existiendo además el riesgo de dañar a la fruta cuando no se aplican correctamente. Los tratamientos con agua caliente (baños térmicos) consisten en la inmersión de la fruta durante 1 a 3 min en agua a temperaturas mayores a 50 °C. Si bien estos tratamientos son más simples, sencillos y económicos que el curado, es necesario conocer correctamente la temperatura que puede soportar la fruta sin sufrir daños (Palou, 2002).

1.5.3.2.3. Tratamientos con irradiaciones

Los tratamientos por irradiación consisten en aplicar algún tipo de radiación (rayos gamma, rayos UV, rayos X, etc.) sobre los frutos, para controlar las enfermedades de poscosecha. Estos tratamientos comenzaron a tomar importancia por su conocida y efectiva acción sobre la mosca mediterránea de los frutos (*Ceratitis capitata*). El problema de estos métodos es que son muy caros y que las dosis de control resultan muchas veces fitotóxicas para los frutos (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992; Palou, 2002).

1.5.3.3. Estrategias combinadas de manejo de poscosecha

En la actualidad, existe una tendencia a implementar los sistemas de producción integrados, combinando todas las técnicas de manejo disponibles a fin de reducir el uso de pesticidas y residuos químicos en frutas. Así por ejemplo, se consideran como medidas factibles la combinación de agentes de biocontrol con fungicidas y/o ceras (Spadaro y Gullino, 2004). Además, para optimizar el sistema deben considerarse medidas como las de posibilitar una separación física efectiva entre la fruta que llega del campo y la empacada, como así también mejorar las labores de higiene. Una correcta desinfección es mucho más eficaz y eficiente económicamente que el incremento del uso de fungicidas (Fischer *et al.*, 2009).

1.6. Fundamentos de la elección del tema de investigación

Como se expresó en el presente capítulo, el cultivo de limón en Argentina representa una importante actividad productiva, económica y de gran impacto social. La comercialización se realiza en mercados distantes de los centros de producción, posibilitando el desarrollo de enfermedades patológicas. Estas enfermedades afectan la calidad de los frutos, por lo cual es necesario realizar medidas de control y prevención. Actualmente solo se disponen de fungicidas de síntesis química para el manejo de las enfermedades de poscosecha. Sin embargo, cada vez las regulaciones internacionales son más estrictas para reducir el nivel residual e incluso contemplan la prohibición de estos fungicidas por diversas causas, como por ejemplo; riesgo en la salud de los aplicadores y consumidores, efectos cancerígenos y teratogénicos, contaminación ambiental, alta residualidad, altos períodos de degradación y aparición de cepas patógenas resistentes a los fungicidas. Por todo esto, es fundamental contar con métodos alternativos de bajo impacto ambiental, seguros e inocuos para la salud humana.

Si bien existen numerosas investigaciones a nivel mundial en esta temática, es imprescindible el desarrollo y evaluación local de las mismas dado que el comportamiento de cada patosistema es variable y dependiente de condiciones ecológicas locales, modalidad del manejo de poscosecha, tipos de cepas patógenas, microflora antagonista, etc.

En esta tesis se evaluaron distintos productos biológicos y bicarbonato de sodio como potenciales métodos alternativos para el control de las enfermedades patológicas de poscosecha. Se evaluaron los productos Serenade® y Bicocitrus® que son biofungicidas comerciales desarrollados en otros países pero que no fueron evaluados en Argentina para poscosecha de cítricos. Por otra parte se evaluó en nuestra investigación, como un desarrollo local e innovador, el comportamiento de las bacterias lácticas y sus metabolitos antifúngicos como posibles biocontroladores, ya que estos mostraron efectos antifúngicos en mohos de panificación y no existían reportes previos de su uso para el control de patógenos de poscosecha. Mientras que para bicarbonato de sodio e Insibiox (extracto vegetal en desarrollo) a pesar que existen evidencias científicas de su efecto, en esta tesis se los incorporó para evaluarlos en condiciones locales y además como posibles inductores de mecanismos de defensa de los frutos.

1.7. Hipótesis de investigación

El trabajo de investigación de esta tesis se sustenta en las siguientes hipótesis:

- Las bacterias lácticas (BAL) producen una gran variedad de metabolitos, algunos de los cuales tendrían propiedades antifúngicas por lo que podrían ejercer control o inducir la respuesta de defensa en los frutos frente a *Penicillium digitatum*.
- Los extractos vegetales (Insibiox y Biocitrus®) poseen diferentes compuestos antifúngicos que serían efectivos para controlar *Penicillium digitatum* y además podrían actuar como “elicitores”, facilitando la defensa propia de la fruta frente al patógeno.
- El biofungicida Serenade® posee actividad antifúngica que podría inhibir el desarrollo de *Penicillium digitatum* y también activar el sistema de defensa natural de la fruta.
- El bicarbonato de sodio permitiría controlar a *Penicillium digitatum* en poscosecha, a través de la inducción en los mecanismos de defensa de los frutos y por acción antifúngica directa.
- La síntesis de fitoalexinas se inducirían como respuesta a la aplicación de los “elicitores” y, por lo tanto, sería observado un incremento de las mismas en el tejido del epicarpo (flavedo) del fruto.

1.8. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de tesis fue evaluar diferentes alternativas de control de enfermedades patológicas de poscosecha, mediante compuestos biológicos y químicos de baja toxicidad, con actividad antifúngica directa o a través de la inducción de los mecanismos de defensa frente a cepas patógenas de *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. aisladas a partir de frutos de limón, en diferentes empaques cítricos de la provincia de Tucumán.

1.9. Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar cepas patógenas de *Penicillium digitatum*, a partir de frutas recolectadas en distintos empaques cítricos de la provincia de Tucumán, y evaluar su comportamiento frente al fungicida químico imazalil.
- Evaluar la velocidad de desarrollo de la enfermedad “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón, artificialmente inoculados con *P. digitatum* y construir una escala para medir el parámetro de severidad de la enfermedad.
- Evaluar la acción antifúngica *in vitro* de metabolitos de bacterias lácticas, dos extractos vegetales (Insibiox y Biocitrus®), una cepa (QST 713) de *Bacillus subtilis* (Serenade®) y bicarbonato de sodio, para el control de *Penicillium digitatum*.
- Evaluar la acción antifúngica directa de metabolitos de bacterias lácticas, dos extractos vegetales (Insibiox y Biocitrus®), una cepa (QST 713) de

Bacillus subtilis (Serenade®) y bicarbonato de sodio, para el control directo de *Penicillium digitatum* sobre frutos de limones.

- Determinar la potencialidad de metabolitos de bacterias lácticas, extractos vegetales (Insibiox y Biocitrus®), *Bacillus subtilis* (cepa QST 713) y bicarbonato de sodio, para el control de *Penicillium digitatum*, indirectamente, a través de la inducción de respuestas de defensa en los frutos de limón.
- Puesta apunto y optimización de la detección de fitoalexinas a partir de un extracto de flavedo de limón, a través de las técnicas de TLC y fluorometría.
- Evaluar la inducción de una respuesta de defensa a través de la acumulación de fitoalexinas involucradas en los mecanismos de defensas de los frutos cítricos (escoparona y umbeliferona) en el tejido del epicarpo (flavedo), después de la aplicación de los agentes inductores.

CAPÍTULO 2

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS PATÓGENAS DE *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc.

2.1. Introducción

2.1.1. Descripción de la enfermedad

Los penicilios son mohos comunes que se desarrollan sobre distintos y variados sustratos como por ejemplo granos, cueros, pan, queso, frutas, etc. Su importancia radica en que causan deterioro a los alimentos e incluso algunos producen micotoxinas (Carrillo, 2003). Dentro de estos mohos se encuentra *Penicillium digitatum*, que es el agente causal de la enfermedad “moho verde de los cítricos”.

El patosistema “moho verde de los cítricos” es altamente específico, es decir que existe una fuerte asociación entre el patógeno *P. digitatum* con las frutas cítricas. Esta especie ha sido asociada únicamente a podredumbres desarrolladas sobre frutas cítricas (Frisvad y Samson, 2004). Eckert y Wild (1983) reportaron que *P. digitatum* sólo completa su ciclo de vida sobre frutas cítricas. Una característica común del género *Penicillium* es estar asociados a sustratos o hábitat específicos, así también por ejemplo *P. expansum* Link se encuentra generalmente asociado a frutos de manzanos y *P. aurantiogriseum* Diercx a cereales. Se cree que esta asociación está relacionada con la producción de enzimas específicas y esta característica sería un buen método promisorio para identificar las especies de *Penicillium*. Los factores bióticos también jugarían un rol en esta asociación pero todavía no se conoce fehacientemente como actúan en ellas (Frisvad y Samson, 2004).

2.1.1.1. Ubicación taxonómica y descripción del género *Penicillium* spp. y *P. digitatum* (Pers.) Sacc.

El género *Penicillium* pertenece a los hongos superiores, a la clase Deuteromycetes, también llamados hongos imperfectos, y que desarrollan la mayor parte del ciclo vital en su fase asexual o anamórfica e incluso a algunos no se les conoce aún la fase sexual o teleomórfica. Este género esta agrupado dentro de la familia Monilliaceae por tener los conidios libres, no contenidos dentro de estructuras y formado directamente a partir del micelio (Barnet y Hunter, 1998).

Este género se caracteriza por formar conidios o fialoconidios, sobre estructuras semejantes a un pincel o escoba llamadas fiálides que a su vez están sostenidas por el conidióforo. Estas estructuras en su conjunto reciben el nombre de verticilos; la forma y número de los mismos tienen importancia taxonómica y se utiliza para clasificar las especies. Las fiálides pueden ser en forma cilíndrica con la base ensanchada y el extremo apical aguzado (semejante a una botella). Las hifas pueden alcanzar un diámetro de 2-3 μm y poseen septos. Los conidios son esféricos o elipsoidales, unicelulares, hialinos, con pared lisa o rugosa, según las especies (Barnet y Hunter, 1998; Carrillo, 2003; Frisvad y Samson, 2004).

Las colonias de *Penicillium* pueden ser aterciopeladas, granuladas, fasciculadas, algodonosas o costrosas, con o sin exudado y con diferentes

colores en el reverso. En cultivos maduros, los conidios se producen en colonias de 5 a 7 días de crecimiento (Frisvad y Samson, 2004). La especie *P. digitatum* se caracteriza por formar conidióforos ramificados, con paredes lisas, a menudo complejos y sólo biverticilados. Las fiálides son también muy características en esta especie siendo cilíndricas, con la base ensanchada y más largas que el resto de las especies. Los conidios son grandes, cilíndricos a elipsoidales, de paredes lisas y de color verde oliva (Barnet y Hunter, 1998; Carrillo, 2003; Frisvad y Samson, 2004).

2.1.1.2. Ciclo de la enfermedad y sintomatología

El ciclo de la enfermedad puede iniciarse a partir de conidios producidos sobre las frutas infectadas presentes en el campo, en el empaque, en las cámaras de conservación o durante el transporte e incluso en los mercados. Los ciclos de infección y esporulación pueden repetirse muchas veces y de esta manera la presión del inóculo se incrementa a medida que avanza la campaña. Esto ocurre principalmente en el empaque donde está la mayor fuente de inóculo de la enfermedad durante la campaña (Whiteside *et al.*, 1988).

Todas las especies cítricas son susceptibles a *P. digitatum*, pero para que se inicie el proceso de infección es necesaria la presencia de una herida, permitiendo así que el conidio entre en contacto con el hospedero. La enfermedad se desarrolla muy rápidamente a temperaturas cercanas a 24 °C y humedad relativa superior al 80 %, mientras que con temperaturas por sobre los 30° C y por debajo de los 10 °C, lo hace más lentamente. La enfermedad es completamente inhibida a temperaturas de 1 °C. El “moho azul”, producido por *P. italicum*, se desarrolla más lentamente que el “moho verde”, está más adaptado a las bajas temperaturas y adquiere mayor importancia en frutas conservadas en cámaras de frío (Whiteside *et al.*, 1988).

Los síntomas de la enfermedad, como en toda podredumbre, aparecen primero como un ablandamiento del tejido y un cambio de color alrededor del punto de infección. Posteriormente, con el transcurrir de los días ésta decoloración y ablandamiento aumentan de tamaño y aparece el micelio blanco y sobre éste, los conidios de color verde oliva (Whiteside *et al.*, 1988). La infección comienza con una lesión inicial de 0,6 a 1,3 cm de diámetro, que bajo condiciones favorables de temperatura y humedad, puede crecer de 3,8 hasta 5 cm entre las 24 y 36 h posteriores. En este estado se puede formar sobre la superficie del fruto un micelio hialino (Sommer *et al.*, 2007).

En la Figura 2.1 se muestran los síntomas distintivos entre “moho verde” (*P. digitatum*) y “moho azul” (*P. italicum*). *P. digitatum* se distingue fácilmente porque tiene conidios de color verde oliva, mientras que *P. italicum* forma conidios de color azulado, con un crecimiento lento del micelio y produce una lesión más pequeña sobre el fruto (Sommer *et al.*, 2007).



Figura 2.1. Síntomas ocasionados por *P. italicum* (moho azul) (A) y *P. digitatum* (moho verde) (B) en limones.

2.1.2. Cuantificación de la intensidad de la enfermedad

A los efectos de conocer el impacto de una enfermedad, evaluar las medidas de control, o conocer la distribución y frecuencia, es necesario tener algún sistema para medir la cantidad de enfermedad presente en un momento dado. Para ésto y dependiendo de los objetivos de estudio se pueden cuantificar dos parámetros, incidencia (I) y/o severidad (S), los cuales en conjunto constituyen la intensidad de la enfermedad.

Incidencia es el porcentaje ($0 < \text{ y } \leq 100 \%$) o proporción ($0 < \text{ y } \leq 1$) de individuos enfermos sobre el total de individuos evaluados. Severidad es la proporción o grado del tejido vegetal enfermo y para evaluarla se pueden construir escalas que son categorizaciones de diferentes niveles de enfermedad en intervalos convenientes, y en donde a cada uno se les asigna un grado (Arauz Cavallini, 1998).

2.2. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo fueron:

- 1) Aislar y caracterizar cepas patógenas de *P. digitatum* a partir de frutos de limón y evaluar su comportamiento (sensibles o resistentes) frente al fungicida imazalil.
- 2) Construir una escala de severidad adecuada para medir la magnitud del daño de la enfermedad sobre los frutos de limón.

2.3. Materiales y Métodos

2.3.1. Medios y condiciones de cultivo para las cepas de *P. digitatum*

2.3.1.1. Medio sólido: agar papa glucosado 2 %

El medio de cultivo agar papa glucosado (APG 2 %) se preparó a partir de una infusión de 200 g de papa hervida durante 45 min en 1000 ml de agua destilada y que posteriormente se filtró empleando una gasa. Luego se ajustó nuevamente el volumen a 1000 ml y se adicionaron 17 g de agar-agar y 20 g de glucosa. A continuación se ajustó el pH a 5,0 utilizando un termo-peachímetro

Altronix® (Mod.TPX1) con el agregado de ácido clorhídrico 0,1N. Finalmente, el medio de cultivo se esterilizó durante 20 min en autoclave a 120 °C.

2.3.1.2. Medio semisólido: agar 0,8 %

Para preparar el medio semisólido agar 0,8 %, se disolvieron 8 g de agar-agar en 1000 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 6,0. Este medio se utilizó para diluir y realizar la siembra de los conidios con la metodología de difusión en placa.

2.3.2. Aislamiento e identificación de las cepas

Las cepas de *P. digitatum* (PD) usadas en esta tesis, fueron aisladas a partir de frutos de limones con síntomas de la enfermedad “moho verde”, recolectados en empaques cítricos. Las muestras se tomaron de ocho empaques de la Provincia de Tucumán y consistieron de un conjunto de cinco frutos por empaque, recolectados de bins en preselección. Los aislamientos se realizaron tomando trozos del tejido enfermo, los cuales fueron desinfectados en alcohol 70 % (20 seg) e hipoclorito de sodio 5 % (1 min) y enjuagados tres veces en agua destilada estéril, posteriormente se colocaron en placas de Petri conteniendo 10 ml del medio de cultivo APG 2 %. Las placas se incubaron en estufa a 25 °C durante 7 días con un ciclo de luz natural continua. Para disminuir la posibilidad de contaminantes, se repicaron tres veces las zonas externas de crecimiento del patógeno en tubo pico de flauta con APG 2 %. Luego las colonias se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Para los ensayos se utilizaron cultivos jóvenes, reactivados en APG 2 % e incubados a 25 °C.

Los aislados se identificaron de acuerdo a las claves de Barnet y Hunter (1998), Carrillo (2003) y Frisvad y Samson (2004). Para ésto se realizó la caracterización morfológica a través del análisis macro y microscópico de cada una de las colonias aisladas y sus estructuras típicas (conidios, conidióforos, fiálides, micelio, etc.).

Para preparar la suspensión del patógeno, se recolectaron los conidios raspando la superficie de las placas con espátula de Drigalsky bajo condiciones estériles, luego de 7 días de crecimiento. Los conidios se suspendieron en solución Tween 80 (0,05 %) con agitación en vórtex durante 2 min y se filtraron a través de una gasa con jeringa estéril. Para los ensayos de infección (patogenicidad) e inhibición *in vitro*, la concentración fue ajustada a 10^6 conidios/ml a través del recuento en microscopio óptico con un hematocitómetro (Cámara de Newbauer).

2.3.2.1. Pruebas de patogenicidad

Para dar cumplimiento a los postulados de Koch y asegurar así su patogenicidad en frutas cítricas, las diferentes cepas aisladas de *P. digitatum* fueron inoculadas en condiciones estériles en frutos de limón previamente desinfectados con alcohol 70 %, con cada una de las cepas de PD y a una concentración de 10^6 conidios/ml. Esta inoculación se llevó a cabo realizando una única herida en el flavedo, en la zona ecuatorial del fruto, con un elemento punzante (2 mm de diámetro por 1 mm de profundidad), que luego fue sumergido en la suspensión de conidios del patógeno y depositado en la fruta

(Eckert y Brown, 1986; Smilanick *et al.*, 1999; Palou *et al.*, 2001a; Torres, *et al.*, 2007) (Fig. 2.2). Como control se empleó fruta herida con el implemento punzante estéril sin el inóculo.



Figura 2.2. Técnica de inoculación por herida en frutos de limones.

Una vez inoculados, los frutos se colocaron en recipientes plásticos herméticos y fueron incubados a 20 °C en condiciones de luz natural durante 7 días. Para cada cepa se utilizó un lote de 10 limones por tratamiento y tres repeticiones. Transcurridos los 7 días de incubación de la enfermedad, se evaluó la incidencia como número de frutos enfermos sobre número total de frutos, por 100.

2.3.3. Selección de las cepas patógenas frente al fungicida químico imazalil

A los efectos de seleccionar las cepas de mayor resistencia a imazalil, se realizaron ensayos de inhibición *in vitro* de los diferentes aislados de *P. digitatum* frente a dicho fungicida. Las cepas seleccionadas fueron utilizadas para medir la actividad inhibitoria de las bacterias lácticas (BAL) y para los experimentos en fruta.

2.3.3.1. Suspensiones del fungicida químico

En los experimentos se utilizó el fungicida químico imazalil Fungaflor®, formulado como concentrado emulsionable al 50 %. En las pruebas *in vitro* se utilizaron suspensiones acuosas del mismo, luego de agitación durante 5 min en vórtex y en un rango de concentraciones de entre 3,2 y 100 ppm.

2.3.3.2. Metodología de difusión en placa para la determinación de la efectividad del fungicida imazalil

La actividad antifúngica de diferentes concentraciones del fungicida imazalil (3,2-100 ppm) se determinó por el método de difusión en placa (Dhingra y Sinclair, 1985; Parente y Hill, 1992). Para ello, se utilizaron cajas de Petri con 10 ml medio sólido APG 2 % sobre el cual se adicionó una capa de 10 ml de agar 0,8 % conteniendo la suspensión del patógeno a una concentración de 10^6 conidios/ml. Posteriormente, se realizaron pocillos con un sacabocado de bronce

estéril, de de 0,5 cm de diámetro, en los cuales se colocaron 80 µl de las diferentes concentraciones del fungicida. Como control, se adicionó en uno de los pocillos, agua destilada estéril. Las cajas se incubaron a 28 °C durante 48 h y la actividad antifúngica se determinó por la aparición de halos de inhibición de crecimiento fúngico alrededor de los pocillos. Para calcular el porcentaje de inhibición se midió el diámetro de los mismos, con regla manual y los resultados fueron expresados en mm.

Las pruebas se realizaron bajo condiciones de esterilidad, por triplicado y los experimentos se repitieron dos veces. El análisis estadístico se realizó con el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2009), utilizando el Análisis de la Varianza y comparación de medias con la prueba de Duncan a un nivel de significancia (α) de 0,05.

2.3.3.2.1. Cálculo del porcentaje de inhibición (PI)

La actividad antifúngica *in vitro* se expresó como porcentajes de inhibición (PI) y fue calculado con los valores obtenidos de los diámetros de halos de inhibición (mm) (Fig. 2.3). La fórmula empleada para el cálculo fue la siguiente:

$$PI = \frac{\text{Área del halo de inhibición}}{\text{Área de la caja de Petri}} * 100 = \frac{\pi * r_1^2 \text{ del halo}}{\pi * r_2^2 \text{ de la caja}} * 100 \quad ;$$

Donde:

r_1 : radio del halo = diámetro del halo/2

r_2 : radio de la caja de Petri = diámetro de la caja /2

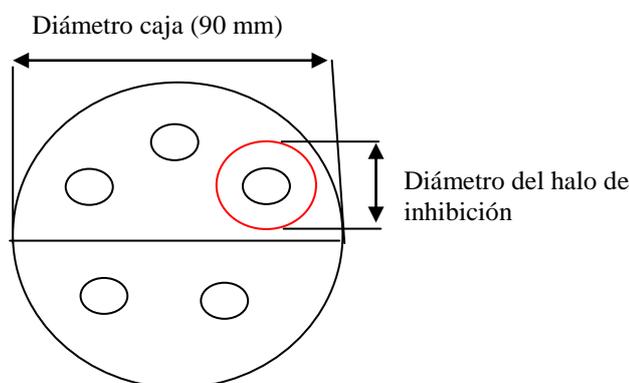


Figura 2.3. Esquema de los diámetros de la caja de Petri y los halos de inhibición para el cálculo de porcentaje de inhibición.

2.3.4. Evolución de los síntomas de podredumbre verde en fruta y construcción de una escala de severidad de la enfermedad

La evolución de la enfermedad en el tiempo, en frutos artificialmente inoculados, fue evaluada para registrar la intensidad de la enfermedad (severidad e incidencia) a fin de construir una escala de severidad (magnitud de daño) y además para medir posibles diferencias en agresividad o patogenicidad entre las cepas. Esta evaluación del desarrollo de la enfermedad se hizo con las

cepas PD1, PD2 y PD5, seleccionadas previamente del experimento de resistencia *in vitro* de las cepas frente a imazalil.

Los frutos de limón se desinfectaron superficialmente con alcohol 70 % y fueron posteriormente inoculados con las cepas (cinco frutos para cada cepa) a una concentración de 10^6 conidios/ml. La inoculación se realizó con la técnica descrita anteriormente. Como control se empleó fruta herida con el implemento punzante estéril sin el inóculo. Posteriormente, los frutos se colocaron en recipientes plásticos, herméticos y separados.

La fruta fue incubada a 25 °C y 85 % HR, con ciclo de luz natural durante 6 días (hasta que alcanzó el máximo grado de desarrollo la enfermedad). Se evaluó diariamente la evolución de los síntomas de la podredumbre: ablandamiento (mancha acuosa), micelio y esporulación. Se registró el diámetro (en mm) de cada tipo de lesión. Con los resultados obtenidos se construyó una escala de severidad que fue utilizada para evaluar este parámetro, posteriormente, en los experimentos en fruta.

2.3.5. Resistencia *in vivo* de las cepas de *P. digitatum* al fungicida imazalil

Se realizó un experimento de resistencia *in vivo* frente al fungicida imazalil, a fin de evaluar el comportamiento (sobre frutos de limón) de las tres cepas de PD que habían resultado como las más resistentes *in vitro* (PD1, PD2 y PD5) a dicho fungicida, y además para seleccionar una cepa a utilizar en el resto de los experimentos con las BAL y los de fruta en los Capítulos 5 y 6.

Para esto, los frutos de limón, previamente desinfectados con alcohol 70 %, fueron inoculados en la zona ecuatorial del modo antes descrito, con una suspensión de conidios del patógeno a una concentración de 10^6 conidios/ml y luego fueron tratados con las siguientes concentraciones de imazalil: 1) 0,05 %; 2) 0,1 % y 3) 0,15 %. Los controles utilizados fueron: 1) testigo PD1 (fruta inoculada con PD1 y tratada con agua); 2) testigo PD2 (fruta inoculada con PD2 y tratada con agua); 3) testigo PD5 (fruta inoculada con PD5 y tratada con agua); 4) fruta sana sin inóculo y 5) fruta herida sin inóculo. La aplicación de los tratamientos se realizó con un pulverizador manual cubriendo toda la fruta (Smilanick *et al.*, 2005). Una vez aplicados los tratamientos, la fruta fue colocada en cajas comerciales de cartón y se incubó en cámaras a 20 °C y 90 % de humedad relativa durante 7 días. Al final del ensayo se evaluó incidencia y severidad con la escala descrita en el apartado 2.4.3 del presente capítulo.

Cada tratamiento consistió de un lote de 10 frutas con tres repeticiones, empleando un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA).

2.3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2009) utilizando el análisis de la varianza y comparación de medias con la prueba de Duncan a un nivel de significancia (α) de 0,05.

2.4. Resultados y discusión

2.4.1. Aislamiento e identificación de las cepas

A partir de los limones provenientes de los empaques cítricos, durante la campaña citrícola 2006, se aislaron 15 cepas con características comunes al género *Penicillium*. Luego del análisis micromorfológico y cultural, se descartaron aquellas colonias que no correspondían al tipo de las de *P. digitatum*, como ser aquellas colonias que otorgaban al medio de cultivo colores vivos, de crecimiento lento, conidios azulados o pequeños ($\leq 6 \mu\text{m}$) y esféricos. Finalmente, de ese total se seleccionaron 6 cepas (una cepa por cada empaque) que reunieron las características específicas de *P. digitatum* y que además mostraron en experimentos preliminares el más alto grado de patogenicidad (ver Fig. 2.6). Dichas cepas fueron identificadas como: PD1, PD2, PD3, PD4, PD5 y PD6. Estos aislamientos tuvieron similar crecimiento en el medio de cultivo APG 2 %, desarrollando un micelio blanquecino y conidios de color verde oliva característicos (Fig. 2.4.A), mientras que las colonias presentaron el color marrón claro típico en el reverso de la placa (Fig. 2.4.B).

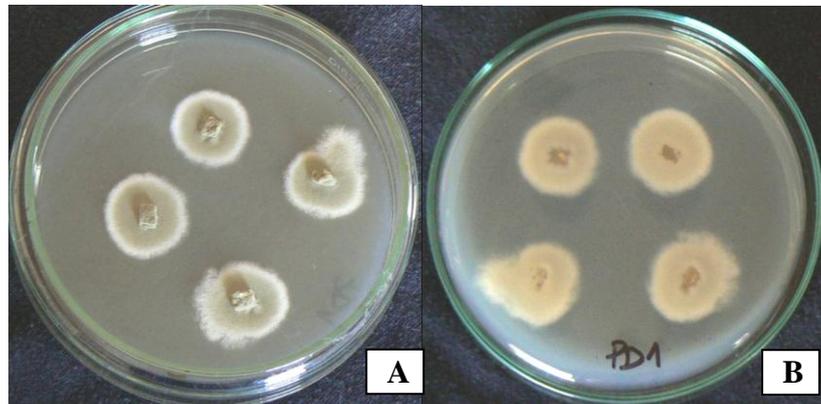


Figura 2.4. Colonias de *P. digitatum* aisladas de frutos de limón. A) anverso y B) reverso de la colonia.

El análisis microscópico permitió observar las estructuras morfológicas características de *P. digitatum*, los conidióforos ramificados, las fiálides y sobre éstas los conidios en cadena, de forma elipsoidales a globosos típicos.

En la Figura 2.5 se muestran las estructuras morfológicas observadas, bajo microscopio óptico, de las colonias de *P. digitatum*. En la Figura 2.5.A se pueden observar todas las estructuras juntas, conidióforos ramificados y sobre éstos las fiálides alargadas y levemente ensanchadas en su base, típicas de *P. digitatum* y con conidios a su alrededor. En la Figura 2.5.B se muestran sobre las fiálides, los conidios en cadena antes que estos se desprendan y en la Figura 2.5.C, un conjunto de conidios de forma globosa a elipsoidales.

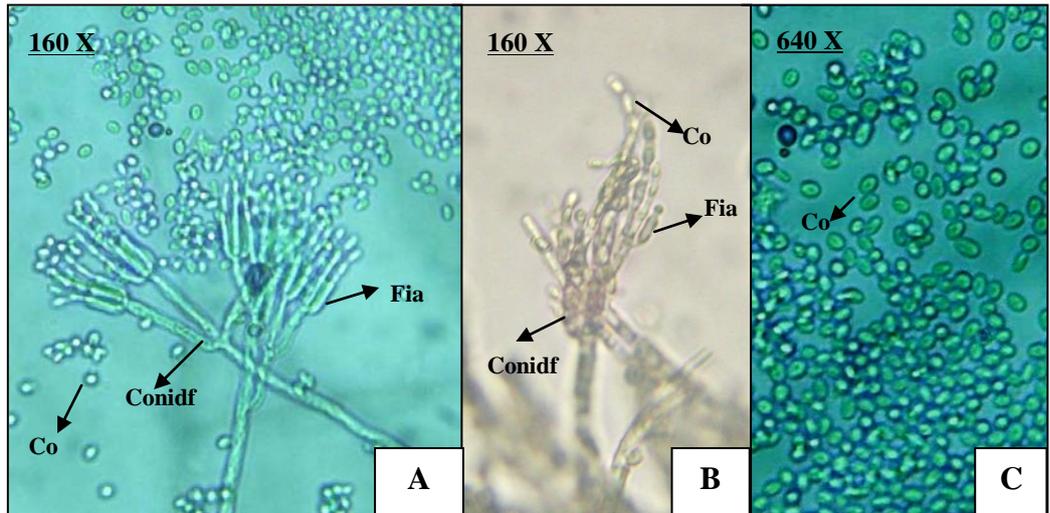


Figura 2.5. Conidióforos, fiálides y conidios de *P. digitatum*, en observación microscópica. A) Conidióforos (conidf), fiálides (fia) y conidios (co), B) conidios en cadena sobre las fiálides y C) conjunto de conidios.

Estas características observadas en todas las colonias, permitieron identificar y concluir que las cepas aisladas correspondieron a *P. digitatum*, ya que concuerdan con las descripciones realizadas en las claves de Barnett y Hunter (1998), Carrillo (2003) y Frisvad y Samson (2004). Además, las colonias de *P. digitatum* en el medio el cultivo fueron similares en apariencia al “moho” que se desarrolló en frutas infectadas (ver Fig. 2.6), tal como describieron Whiteside *et al.* (1988).

2.4.1.1. Pruebas de patogenicidad

Las cepas inoculadas en los limones produjeron los síntomas característicos de la enfermedad “moho verde de los cítricos” (Fig. 2.6). Los síntomas observados se desarrollaron conforme a lo que describieron varios autores, apareciendo primero una mancha periférica alrededor del sitio de inoculación, blanda y translúcida (aspecto acuoso), y que con el transcurso de los días aumentó de tamaño, acompañada de un micelio blanquecino y más tarde, de conidios de color verde oliva característicos (Whiteside *et al.*, 1988; Palou, 2002; Ochoa *et al.*, 2007; Sommer *et al.*, 2007). Todas las cepas produjeron un 100 % de incidencia de la enfermedad en los frutos inoculados, indicando que se trataban de cepas patógenas de cítricos (Fig. 2.6).

Estos resultados, junto a las características macro y micromorfológicas observadas de las colonias, confirmaron que las cepas correspondían a *P. digitatum* (Frisvad y Samson 2004).



Figura 2.6. Patogenicidad de las cepas de *Penicillium digitatum* inoculadas en limones no tratados, luego de 7 días de incubación a 20 °C.

2.4.2. Efectividad *in vitro* del fungicida químico imazalil frente a cepas de *P. digitatum*

Se evaluó el crecimiento *in vitro* de las seis cepas de *P. digitatum*, frente a diferentes dosis del fungicida químico imazalil. Las concentraciones empleadas fueron desde 3,2 a 100 ppm (Tabla 2.1).

Los resultados obtenidos de la actividad antifúngica de imazalil, expresada como porcentajes de inhibición (PI) de las diferentes dosis del fungicida frente a las cepas de PD, se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Valores de porcentajes de inhibición (PI) obtenidos para las distintas cepas de *P. digitatum* frente al fungicida imazalil a diferentes concentraciones.

Porcentajes de inhibición (PI)						
Imazalil (ppm)	PD1	PD2	PD3	PD4	PD5	PD6
3,2	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	7,7 ef
6,3	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	10,4 ij
12,5	2,8 b	2,8 b	2,8 b	2,4 b	2,1 b	16,0 o
25,0	4,0 c	4,0 c	5,4 d	4,5 c	4,5 c	19,8 p
37,5	7,1 e	7,7 ef	7,7 ef	9,7 hi	5,4 d	22,8 q
50,0	7,7 ef	9,0 gh	9,7 hi	11,1 jk	6,0 d	25,0 r
75,0	10,4 ij	11,1 jk	12,1 l	12,6 l	8,3 fg	30,9 s
100,0	11,1 jk	11,9 kl	15,1 n	14,3 m	10,4 ij	*

Letras diferentes indican diferencias significativas, entre columnas y filas, según prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$). (*) No se pudo medir el halo de inhibición por ser muy alta la concentración del fungicida para esa cepa.

El mayor PI fue de 30,9 % para la cepa PD6 (cepa más sensible), correspondiente a una concentración de 75 ppm de imazalil y esta actividad difirió significativamente del resto de las cepas. Esta cepa fue inhibida el 100 % de su crecimiento a mayores concentraciones del fungicida (> 75 ppm) por lo que no pudieron medirse los halos de inhibición y resultó ser la más sensible en este experimento al imazalil (Fig. 2.7). Los menores valores de PI comparando

entre las cepas, a una concentración de 100 ppm de imazalil, fueron para PD1 (PI = 11,1 %), PD2 (PI = 11,9 %) y PD5 (PI = 10,4 %). La cepa PD5, que mostró el valor más bajo de PI, no difirió estadísticamente de PD1 pero sí lo hizo de PD2. Por el contrario, las cepas PD1 y PD2 no difirieron entre sí a esta concentración del fungicida. Considerando las cepas PD1, PD2 y PD5, todas difirieron significativamente del resto a 100 ppm de imazalil y se seleccionaron como las más resistentes al fungicida químico. Estas cepas se emplearon para los ensayos de actividad antifúngica de las bacterias lácticas y para el experimento de resistencia *in vivo* frente a imazalil.

Holmes y Eckert (1995) establecieron el límite de 0,1 ppm de imazalil adicionado al medio de cultivo, para caracterizar las cepas de *P. digitatum* que crecieran en esas condiciones, como resistentes. Asimismo Holmes y Eckert (1999) sugieren que la variabilidad de sensibilidad al imazalil reportada en distintas investigaciones, pueden ser explicadas por la diferencia en los distintos procedimientos y cálculos de los valores de inhibición (EC_{50}), como así también por el pH del medio de cultivo que influye significativamente y modifica la acción del imazalil sobre *Penicillium*. Con el fin de mostrar este efecto, en la Figura 2.7 se ejemplifica la diferencia de inhibición *in vitro* para las cepas PD5 y PD6 frente al fungicida imazalil. Como puede observarse, la cepa PD5 fue inhibida a partir de concentraciones superiores a 12,5 ppm, en cambio en la cepa PD6 aún con concentraciones de 3,2 ppm, fueron efectivas observándose efecto inhibitorio. Holmes y Eckert (1999) encontraron que la resistencia a imazalil, de ciertos biotipos de *P. digitatum*, fue 35 veces superior comparado con el de cepas sensibles. En nuestros resultados la cepa PD5 fue aproximadamente 15 veces más resistente que la cepa PD6 *in vitro*. El más bajo PI hallado para PD6 fue de 7,7 % a 3,2 ppm de imazalil y este mismo valor de PI fue hallado en la cepa PD5 pero a 50 ppm de imazalil (Tabla 2.1).

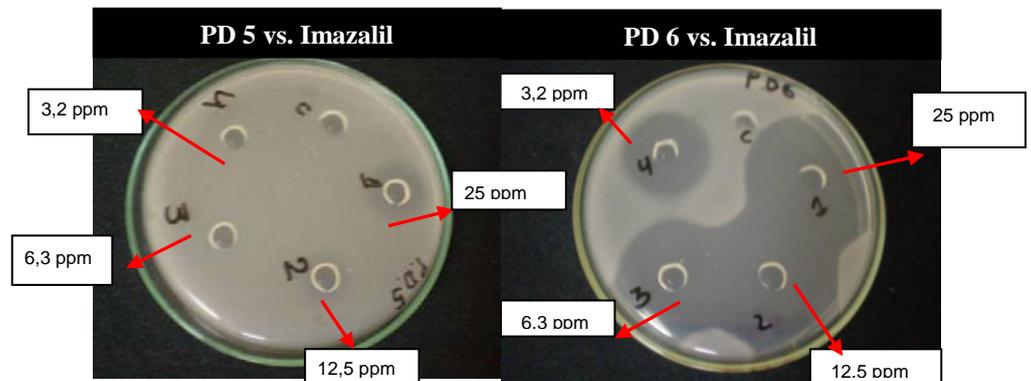


Figura 2.7. Inhibición *in vitro* del crecimiento de PD5 y PD6 frente al fungicida imazalil.

Estos resultados nos permiten concluir que existen diferencias de sensibilidad entre las distintas cepas de *P. digitatum* frente al fungicida imazalil, teniendo ésto una importante implicancia en el manejo de poscosecha. Así, por ejemplo, si en un empaque se encuentran cepas con comportamientos similares a la cepa PD6, su control será sencillo y efectivo sin necesidad de aumentar las dosis de los fungicidas. En cambio, en el otro extremo si las cepas fueran resistentes (PD5) sería necesario, plantear un manejo adecuado de las mismas adoptando medidas como rotar los grupos químicos de los fungicidas; o bien

realizando un manejo preventivo desde cosecha y una correcta desinfección (Eckert y Wild, 1983; Holmes y Eckert, 1999; Palou *et al.*, 2001b; Kinay *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2009).

2.4.3. Evolución de los síntomas de “moho verde de los cítricos” en frutos de limón y construcción de una escala de severidad

A los fines de analizar la evolución de los síntomas de la enfermedad en los frutos, se registraron los síntomas y signos del patógeno desde el día de la inoculación, midiendo los diámetros de cada tipo de lesión (mm) hasta alcanzar el máximo de la enfermedad (esporulación completa).

El tiempo de incubación para la enfermedad fue de 2 días ya que fue a partir de este tiempo que se observaron los primeros síntomas de la enfermedad, exhibiéndose un ablandamiento (20 mm de diámetro) alrededor del punto de inoculación; de color más claro que el tejido sano. Al 3º día, este síntoma evolucionó cubriendo la mitad de la cara del limón (65 mm de diámetro) y apareciendo además los primeros signos del patógeno (micelio blanco), en forma circular (15 mm de diámetro) también alrededor del sitio de inoculación. Al 4º día, el ablandamiento y el micelio continuaron avanzando pero además aparecieron las primeras estructuras reproductivas del patógeno, los conidios. Esta esporulación fue inicialmente escasa (10 mm de diámetro) y luego al 5º día cubrió casi toda la mitad de la fruta (50 mm de diámetro) (Fig. 2.8). Esta evolución de los síntomas, fue similar a la que describieron los autores Whiteside *et al.* (1988), Fajardo *et al.* (1998), Kinay *et al.* (2007) y Sommer *et al.* (2007).

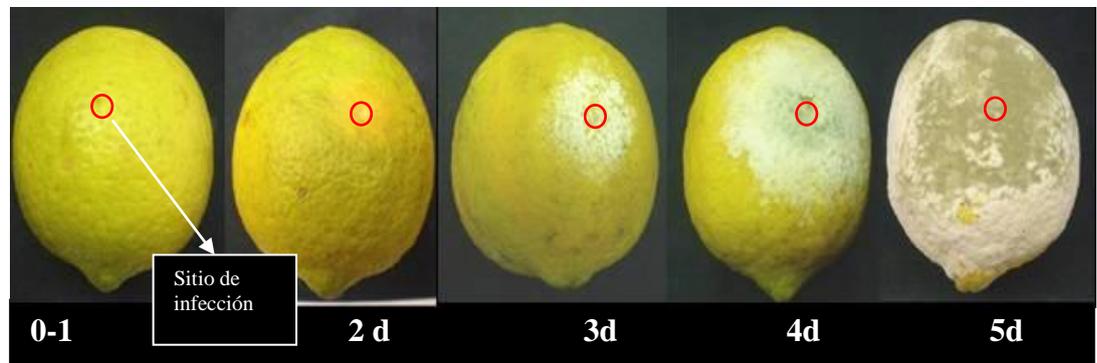


Figura 2.8. Evolución de los síntomas de "moho verde" en limones inoculados artificialmente con *P. digitatum* (cepa PD2) e incubados a 25 °C durante 6 días.

El incremento del área afectada por la enfermedad fue de 25 mm por día. De manera similar, Plaza *et al.* (2004) inoculando también limones con *P. digitatum* (sin tratamiento), reportaron una tasa de incremento de la enfermedad de 20 mm por día. Esta escasa diferencia puede deberse a la capacidad intrínseca de las cepas evaluadas y la susceptibilidad de los frutos, como así también a la diferencias de las temperaturas y humedad empleadas.

El período de latencia de la enfermedad (desde inoculación hasta la aparición de primeros signos del patógeno), visualizado a través de la aparición del micelio blanquecino, en todos los aislamientos evaluados, estuvo entre los 3 y los 3,5 días (Fig. 2.8), coincidentes con los resultados obtenidos por Holmes y

Eckert (1995). Por otro lado, el inicio de esporulación en nuestros experimentos estuvo alrededor de los 4 días (Fig. 2.8), de manera semejante a lo reportado por Kinay *et al.* (2007) que encontraron para diferentes aislados de PD sobre frutos de limón un inicio de esporulación a los 3,5 días.

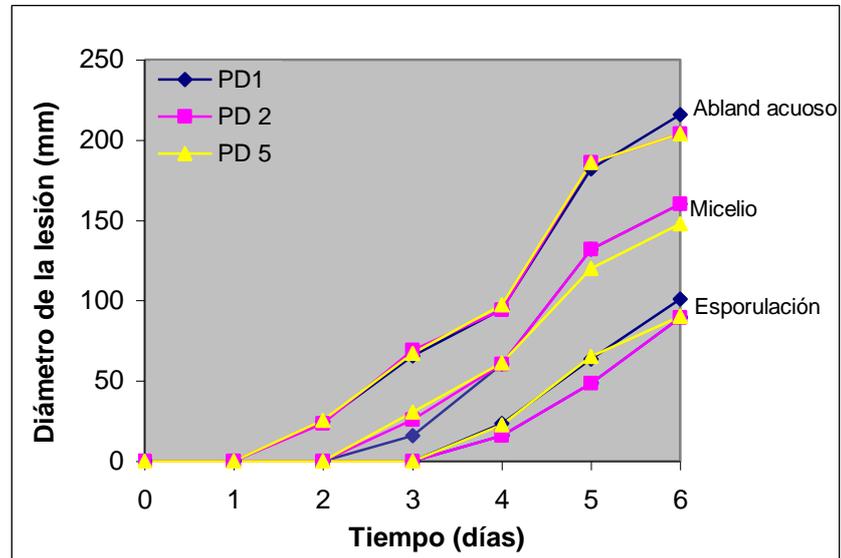


Figura 2.9. Evolución de los síntomas de las cepas PD1, PD2 y PD5 de *P. digitatum* sobre frutos de limón, en el tiempo (días). Los valores corresponden a los promedios del diámetro (mm) de las lesiones.

En la Figura 2.9, puede observarse que las tres cepas evaluadas presentaron el mismo comportamiento en cuanto al desarrollo de los síntomas. Asimismo, para un mismo síntoma, en la evaluación final no hubo diferencias estadísticamente significativas del tamaño de la lesión (Fig. 2.10). Las tres cepas de *P. digitatum* mostraron la misma velocidad de desarrollo de la enfermedad, lo que nos permite inferir que no hay diferencias de agresividad o virulencia entre las cepas. Smilanick y Eckert (1986), Torres Leal (1989), Holmes y Eckert (1995) y Kinay *et al.* (2007) tampoco encontraron diferencias significativas de la virulencia entre las cepas, evaluando la tasa de incremento de la enfermedad en el tiempo con cepas de *P. digitatum* sensibles y resistentes a fungicidas.

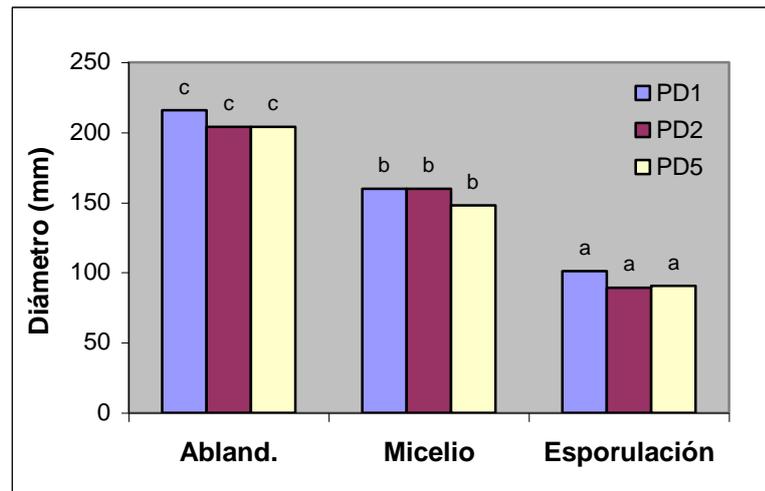


Figura 2.10. Valores promedio obtenidos de los diámetros de la lesiones (mm) a los 6 días para cada cepa de *P. digitatum*, en frutos de limón. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$).

Con los valores obtenidos del desarrollo de la enfermedad en el tiempo, se confeccionó la escala para evaluar el parámetro severidad en los ensayos *in vivo*. Debido a que los síntomas de la enfermedad y signos del patógeno fueron bien definidos y marcados, se construyó una escala categórica de cinco grados (Fig. 2.11):

- **G0:** ausencia de enfermedad.
- **G1:** ablandamiento acuoso (lesiones de 10 mm a 30 mm de diámetro). Ausencia de micelio.
- **G2:** presencia de micelio blanco (a partir de 10 mm de diámetro), sin conidios.
- **G3:** esporulación inicial de color verde (de 10 mm a 30 mm de diámetro).
- **G4:** esporulación de color verde, completa en la mitad de la cara del limón (> 30 mm de diámetro).



Figura 2.11. Escala de severidad de la enfermedad “moho verde de los cítricos”.

A cada fruta evaluada (unidad evaluada) se le asignó un grado, según el estado de desarrollo de la enfermedad (de 0 a 4) y se utilizó la siguiente fórmula para el cálculo del valor de severidad (S):

$$S = \frac{\sum n}{N};$$

Donde;

S: severidad

n: número de unidades de cada grado

N: número total de unidades evaluadas

2.4.4. Resistencia *in vivo* de las cepas de *P. digitatum* al fungicida imazalil

Las cepas PD1, PD2 y PD5, resistentes al imazalil en los experimentos *in vitro*, se ensayaron sobre frutos de limón, frente al mismo fungicida, para evaluar su comportamiento (sensibles y/o resistentes) *in vivo*.

En la Figura 2.12 se muestran los resultados obtenidos para el parámetro incidencia. En la misma se grafican los valores promedios obtenidos de incidencia para cada cepa de PD en función de la concentración del fungicida imazalil.

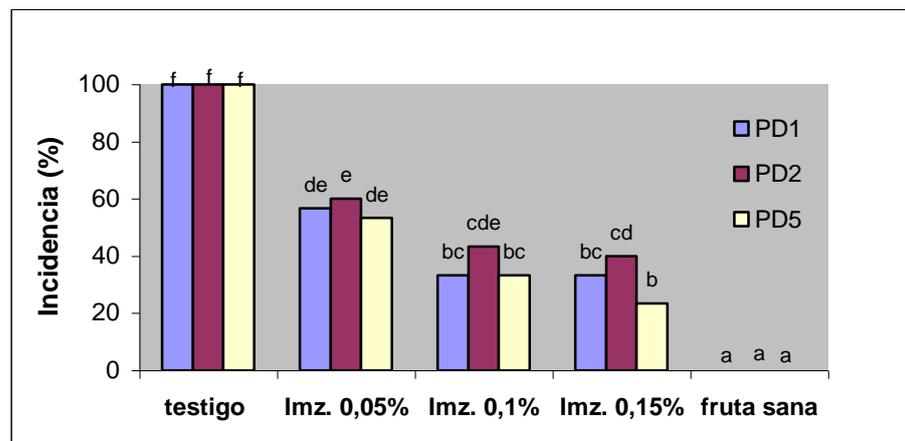


Figura 2.12. Valores promedios de incidencia (%) de cepas de “moho verde de los cítricos” frente al fungicida imazalil (a diferentes concentraciones) en limones artificialmente inoculados con PD, a los 7 días e incubados a 20 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$).

Analizando los resultados, el tratamiento imazalil 0,15 %, mostró diferencias estadísticas entre las cepas PD5 (I = 23,3 %) y PD2 (I = 40 %). Para el resto de las concentraciones del fungicida, no hubo diferencias significativas en la incidencia entre cepas (Fig. 2.12). Estos resultados mostraron que la cepa PD5 fue más sensible (a 0,15 % de imazalil) que la cepa PD2. Sin embargo frente a las otras dos concentraciones evaluadas de imazalil (0,05 % y 0,1 %) no hubo diferencias de sensibilidad entre las cepas de *P. digitatum* para el parámetro incidencia.

Comparando la respuesta de cada cepa frente a las distintas concentraciones del fungicida se observó que PD1 tratada con imazalil 0,15 % o 0,1 % tuvieron similares valores de incidencia ($I = 33,3 \%$) y no hubo diferencias estadísticas entre ambas concentraciones, pero sí difirieron significativamente de la concentración 0,05 % de imazalil que tuvo una $I = 56,7 \%$. Es decir que para la cepa PD1 las concentraciones de imazalil 0,15 % y 0,1 % fueron igualmente eficientes para mantener la incidencia de la enfermedad a niveles bajos, y superiores a la efectividad de imazalil 0,05 %. Por otro lado, en la cepa PD2 tratada con 0,05 % y 0,1 % de imazalil, la incidencia fue similar estadísticamente ($I = 60 \%$ e $I = 43,3 \%$, respectivamente) y sólo la concentración de 0,05 % difirió estadísticamente de 0,15 % de imazalil ($I = 40 \%$), ya que entre las concentraciones de 0,1 y 0,15 % tampoco hubo diferencias significativas entre sí. Por último, la cepa PD5 tuvo el mismo comportamiento que la PD1 frente al imazalil, mostrando la misma efectividad las concentraciones de 0,15 % y 0,1 % del fungicida ($I = 33,3 \%$ para ambas) y difiriendo significativamente de 0,05 % de imazalil ($I = 56,7 \%$) en el control de la enfermedad.

En la Figura 2.13 se grafica la severidad de la enfermedad registrada para las tres cepas de *P. digitatum* con distintas concentraciones del fungicida químico imazalil. Para una misma concentración, las cepas evaluadas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí de resistencia o sensibilidad *in vivo* para dicho parámetro (Fig. 2.13). El comportamiento de cada cepa en particular, en cuanto a severidad, en respuesta a la concentración del imazalil, fue similar a la descrita anteriormente, para el parámetro de incidencia.

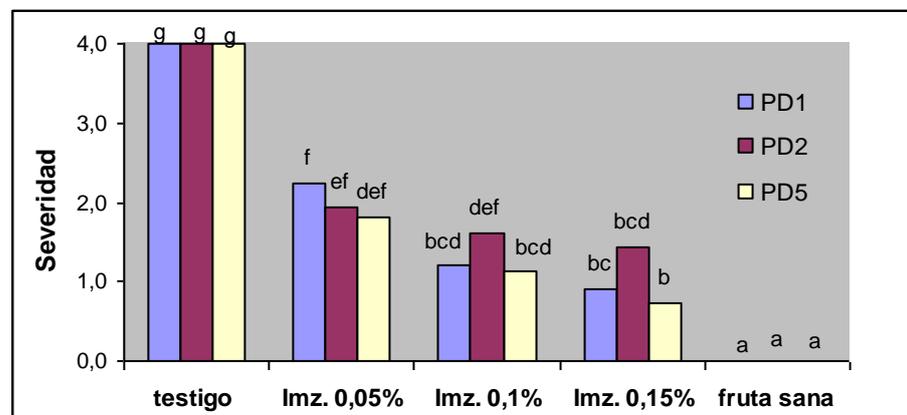


Figura 2.13. Valores de severidad de cepas de “moho verde de los cítricos”, frente al fungicida imazalil (a diferentes dosis), en limones artificialmente inoculados, a los 7 días e incubados a 20 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$).

Debido a que no se registraron diferencias muy marcadas de comportamiento (sensibilidad y/o resistencia) en los parámetros de incidencia y severidad, entre las cepas evaluadas (PD1, PD2 y PD5) frente al imazalil y a los efectos de simplificar el desarrollo experimental, se seleccionó la cepa PD1 para los ensayos en fruta en los Capítulos 5 y 6. Adicionalmente, esta cepa presentó un comportamiento intermedio entre PD5 y PD2 en los ensayos *in vitro* frente a la mayoría de los biocontroladores evaluados (Cap. 3 y Cap. 4).

Estos resultados mostraron que existe una relación dependiente de la intensidad de la enfermedad (severidad e incidencia) con la dosis del fungicida. A mayores concentraciones de imazalil, fueron menores la severidad y la incidencia, independientemente de las cepas de *P. digitatum* evaluadas y viceversa, a menores concentraciones del fungicida, se registró aumento de los parámetros mencionados (Fig. 2.12 y Fig. 2.13). Estos resultados concuerdan a los encontrados por Smilanick *et al.* (1997, 2005, 2008); Fogliata *et al.* (2000) y D'Aquino *et al.* (2006) quienes encontraron una reducción lineal del porcentaje de podredumbre con aumentos de la concentración de fungicidas químicos.

Los resultados obtenidos permitieron confirmar la presencia de resistencia al fungicida imazalil en las cepas evaluadas. Esto se vió reflejado primero en los experimentos *in vitro*, ya que a dosis elevadas de imazalil (100 ppm) sólo una de las cepas (PD6) fue completamente inhibida, mientras que el resto mostró crecimiento. Por otra parte, en los experimentos *in vivo* (con los frutos) las cepas de *P. digitatum* (PD1, PD2 y PD5) lograron desarrollar y esporular (con diferentes valores de incidencia y severidad) a pesar de ser tratadas con dosis habituales (0,05-0,15 %) del fungicida químico imazalil.

La resistencia de *P. digitatum* a imazalil, está reportada desde 1997 en Tucumán, (Fogliata *et al.*, 2000). Sin embargo, Palou *et al.* (2001b) en Tarragona (España), encontraron un bajo porcentaje de cepas de *Penicillium spp.* resistentes al imazalil, de las cuales ninguna correspondió a las especies *P. digitatum* ni *P. italicum*. En Cuba, Muiño *et al.* (2007) desde 1987 monitorean la resistencia de las cepas de *Penicillium spp.* a los fungicidas tiabendazol e imazalil y no detectaron hasta este momento problemas de resistencia.

2.5. Conclusiones

Con estos experimentos se puede concluir que a nivel local, existe diversidad en el comportamiento de resistencia frente al fungicida imazalil, ya que las cepas fueron aisladas de diferentes empaques de la provincia de Tucumán y mostraron distintos valores de inhibición. Del total de cepas aisladas, solo una cepa (PD6) fue sensible al fungicida químico y el resto se comportó en distintos grados como resistentes *in vitro* a 100 ppm.

Las cepas más resistentes (PD1, PD2 y PD5) al fungicida imazalil en los experimentos *in vitro* no mostraron diferencias de comportamiento (sensibles y/o resistentes) entre sí cuando fueron evaluadas sobre frutos de limón (*in vivo*) frente a este fungicida. Asimismo podemos concluir que estas cepas no mostraron diferencias de virulencia ya que presentaron la misma velocidad de desarrollo de la enfermedad.

Se construyó una escala de severidad con cinco categorías o grados a partir de los síntomas de la enfermedad "moho verde de los cítricos", que fueron bien definidos y característicos.

El comportamiento y caracterización de las cepas patógenas tiene importancia en el control y manejo de poscosecha en el empaque donde es necesario contar con esta información para realizar un eficiente control de las enfermedades de poscosecha.

CAPÍTULO 3

SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS ANTAGONISTAS FRENTE A *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc.

3.1. Introducción

3.1.1. Características generales de las bacterias lácticas, hábitats y clasificación

Las bacterias lácticas (BAL) constituyen un diverso y amplio grupo de bacterias con similares comportamientos ecológicos y que comparten características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. El término “bacterias lácticas” esta íntimamente asociado a bacterias que intervienen en procesos de fermentación de alimentos de origen animal y vegetal inicialmente lácticos (Axelsson, 2004).

Las BAL tienen gran capacidad de adaptación y se encuentran en variados ecosistemas como ser productos lácteos y cárnicos, pescados, vegetales, cereales, en los tractos gastrointestinal y urinario de animales (incluido en humanos), en aguas residuales y estiércol.

La clasificación de las BAL en diferentes géneros se basa en su morfología, modo de fermentar la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido, capacidad de crecer en presencia de altas concentraciones de sal y tolerancia ácida o alcalina. Actualmente también se emplean técnicas moleculares y genéticas para su análisis (Klein *et al.*, 1998; Axelsson, 2004).

Desde el punto de vista taxonómico es muy difícil establecer los rasgos de semejanza exclusivos entre las especies por la diversidad de hábitats en los que se encuentran y ha sido tema de controversia de taxónomos a lo largo de la historia. En función de la definición otorgada al grupo de las BAL, existen alrededor de 20 géneros. Sin embargo, desde el punto de vista práctico, se consideran 12 géneros como los principales y son los siguientes: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. Los géneros *Carnobacterium* y *Lactobacillus* son baciliformes y el resto de los géneros son cocos. Una excepción a esto, es el género *Weissella*, que es el primer género de BAL que por sus características puede incluirse en ambos grupos (bacilos o cocos) (Axelsson, 2004).

Las BAL se caracterizan por ser bacterias Gram-positivas, no forman esporas, son catalasa-negativas, de hábitat anaeróbico pero aerotolerantes, ácido-tolerantes y estrictamente fermentativas con producción de ácido láctico como producto final del metabolismo de los azúcares. Estas características fisiológicas pueden ser modificadas por ciertas condiciones de crecimiento o medios de cultivo (Klein *et al.*, 1998; Axelsson, 2004).

El efecto benéfico de las BAL se atribuye principalmente a la inhibición del desarrollo de otros microorganismos indeseables y patógenos, como así también a los cambios organolépticos y/o nutritivos favorables que producen durante su crecimiento en diversos sustratos y alimentos (Ström, 2005). Estas propiedades determinaron que las BAL se hayan utilizado desde hace mucho tiempo en la elaboración de alimentos fermentados (yogur, leches acidificadas,

quesos, embutidos crudos y curados, etc.) y ensilados para la alimentación animal.

Desde el punto de vista tecnológico, las BAL adquieren cada vez mayor importancia ya que son consideradas microorganismos GRAS, por lo cual constituyen una alternativa válida de bioconservación o biopreservación (Trias *et al.*, 2008).

3.1.2. Actividad antifúngica de las BAL

Las BAL pueden proteger a los alimentos de patógenos por competencia en el crecimiento, por producción de metabolitos antagónicos o por formación de otros compuestos antimicrobianos (Sjögren *et al.*, 2003; Ström, 2005). Estos compuestos son ácidos orgánicos, principalmente lactato y acetato; peróxido de hidrógeno; péptidos de bajo peso molecular, proteínas, ácidos grasos de cadena corta y bacteriocinas (Valerio *et al.*, 2004; Ström, 2005).

Se han reportado numerosas cepas de BAL, por ejemplo *Lactobacillus coryniformis*, *L. plantarum* y *Pediococcus pentosaceus* que mostraron efecto inhibitorio frente a diversos hongos y a levaduras contaminantes de alimentos (Magnusson *et al.*, 2003; Sjögren *et al.*, 2003).

En experimentos realizados por Trias *et al.* (2008) se evaluaron numerosas cepas de BAL como agentes de biocontrol frente a hongos, por ejemplo *Penicillium expansum*, *Monilinia laxa* y *Botrytis cinerea*, así como bacterias (*Xanthomonas campestris* y *Erwinia carotovora*) fitopatógenas de frutas, mostrando efectos inhibitorios *in vitro* a los mismos a excepción para *P. expansum*. Para este último patógeno, las BAL se aplicaron directamente sobre frutos de manzano y fueron efectivas mostrando una reducción de la enfermedad. Estos autores reportaron a las BAL como potenciales agentes de biocontrol frente las podredumbres de poscosecha.

En el Centro de Referencia de Lactobacilos (CERELA) en Tucumán, se reportó que algunas cepas de bacterias lácticas mostraron actividad antifúngica frente a diversos mohos y levaduras de alimentos. Esta actividad estuvo relacionada principalmente con la producción de ácidos orgánicos, bacteriocinas, péptidos de bajo peso molecular y proteínas (Torres, 2008).

3.2. Objetivo

El objetivo del presente capítulo fue seleccionar y determinar el comportamiento de cepas de bacterias lácticas como posibles antagonistas frente a *P. digitatum* y caracterizar los metabolitos activos involucrados en el efecto inhibitorio.

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Medios y condiciones de cultivo

3.3.1.1. Cepas de *P. digitatum*

Para los ensayos se utilizaron cultivos jóvenes de las cepas PD1, PD2 y PD5 previamente seleccionadas (ver Cap. 2). Los aislados fueron reactivados en APG 2 % e incubados a 25 °C y luego de 7 días de crecimiento se recolectaron los conidios, como se explicó anteriormente en el Capítulo 2 (apartado 2.3.2). Los conidios se suspendieron en solución Tween 80 (0,05 %) y la concentración fue ajustada a 10⁶ conidios/ml a través del recuento en microscopio óptico con un hematocitómetro.

3.3.1.2. Cepas de bacterias lácticas y condiciones de cultivo

Se evaluaron 33 cepas de bacterias lácticas (BAL), listadas en la Tabla 3.2 y pertenecientes a la colección de cultivos del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET), que fueron aisladas de diferentes fuentes (lácteos, vegetales, cereales y carnes). Las cepas fueron reactivadas y cultivadas en el medio MRS, sin acetato (De Man *et al.*, 1960) a 37 °C durante 24 h, sin agitación. El caldo MRS fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe y es utilizado para el cultivo y el enriquecimiento de lactobacilos. El mismo está compuesto por: peptona (10 g/l), extracto de carne (8 g/l), extracto de levadura (4 g/l), glucosa (20 g/l), Tween 80 (1 ml/l), fosfato dipotásico (2 g/l), citrato triamónico (2 g/l), sulfato de magnesio (0,2 g/l) y sulfato de manganeso (0,05 g/l), a un pH final de 6,6. El empleo de medio MRS sin acetato, permite descartar el efecto antifúngico del ácido acético reportado previamente por Cabo *et al.* (2002).

Para evaluar actividad antifúngica de las BAL, se extrajeron los sobrenadantes estériles (SE) de cultivo, mediante centrifugación a 9000 x g por 10 min a 4 °C. Luego de filtrar y ajustar el pH a 4,0 con el agregado de ácido clorhídrico (0,1 N) se colocaron en tubos Eppendorf® y se conservaron refrigerados (0 °C) hasta su uso.

3.3.2. Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de las BAL

La actividad antifúngica de las BAL se determinó por el método de difusión en placa, descrito en el Capítulo 2 (apartado 2.3.3.2). En este caso, en los pocillos se colocaron 80 µl de los distintos SE de cada una de cepas de BAL evaluadas. Como control, se adicionó en uno de los pocillos medio de cultivo MRS sin acetato (control negativo de inhibición). Luego de incubar durante 48 h, se midieron los diámetros de los halos (mm) de inhibición de crecimiento, alrededor del pocillo y se calculó los PI como se detalló anteriormente en el Capítulo 2 (apartado 2.3.3.2.1).

Las pruebas se realizaron bajo condiciones estériles, por triplicado y los experimentos se repitieron dos veces. El análisis estadístico se realizó con el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2009) utilizando el análisis de la varianza y comparación de medias con la prueba de Duncan a un nivel de significancia (α) de 0,05.

3.3.3. Identificación de la naturaleza química de los metabolitos inhibitorios

A fin de caracterizar la naturaleza de los metabolitos bioactivos de las BAL con actividad antifúngica, los SE fueron neutralizados a pH 7,0 con NaOH 0,1N y calentados a 100 °C por 10 min. Estos SE neutralizados y calentados fueron evaluados por el método de difusión en placa (metodología descrita en el Cap. 2, apartado 2.3.3.2.). Para esto se colocaron en cada pocillo 80 µl del SE neutralizado, calentado y sin tratar (pH 4,0), más el control MRS sin acetato. Estos tratamientos se realizaron por duplicado, para cada cepa de BAL frente a la cepa PD2 (cepa más sensible a las BAL).

3.3.4. Determinación de ácidos orgánicos para los SE

La producción de ácidos orgánicos, presentes en los SE de cultivos de BAL fueron determinados por cromatografía líquida de alta performance (HPLC, "High performance liquid chromatography") y por métodos enzimáticos. Los ácidos láctico y fenil láctico fueron determinados por HPLC (modelo ISCO 2350) usando una columna de intercambio iónico Aminex 87H (300 mm x 78 mm, Bio Rad®), con las siguientes condiciones: fase móvil H₂SO₄ (2,5 mM), tasa del flujo 0,6 ml/min, temperatura de la columna 45 °C y un detector UV (210nm) (modelo ISCO V4) conectada con el software (Peak Simple II) para el análisis de datos. El ácido acético fue determinado mediante kits enzimáticos comerciales (Boehringer-Mannheim®, Germany).

3.3.5. Actividad antifúngica de ácidos orgánicos

La evaluación de la actividad antifúngica, de las distintas combinaciones de las mezclas de ácidos orgánicos, se llevó a cabo mediante un diseño de compuesto central y metodología de análisis de superficie de respuesta. El diseño experimental de compuesto central comprendió un factorial de 2³ con 8 puntos axiales y un punto central, con de 6 réplicas de cada uno de ellos. El resto de las combinaciones mostradas, en la Tabla 3.1 (hasta la combinación N° 16), se realizaron por duplicado, lo que resultó finalmente en un total 86 experimentos generados por el software estadístico Design Expert®, (Versión 7.0, Stat-Ease, USA).

Para el ensayo de actividad antifúngica de los ácidos orgánicos, las cantidades de los mismos fueron seleccionados siguiendo las concentraciones determinadas en los cultivos de las BAL de 24 h (Tabla 3.4) a partir de las ocho cepas que conjuntamente inhibieron a PD y también se adicionó el ácido propiónico por ser un aditivo y conservante muy empleado en al industria alimenticia (FAO, 2000). Además porque está reportado que este ácido tiene efecto fungistático y sinérgico junto al ácido láctico (Trias *et al.*, 2008). Las mezclas fueron preparadas de acuerdo a las combinaciones y concentraciones sugeridas por el programa estadístico y el pH fue ajustado a 4,0 (Tabla 3.1).

La actividad antifúngica de estas mezclas, se evaluó con la metodología de difusión en placa (Cap. 2, apartado 2.3.3.2) frente a la cepa PD2 (cepa más sensible a las BAL) y los resultados obtenidos se analizaron a través de superficie de respuesta, generada por el software estadístico Statistical®, (Versión 7.0, Statsoft, EEUU). Las curvas tridimensionales de las variables evaluadas (ácidos orgánicos) resultantes de este software se muestran en la Figura 3.3. Esta respuesta de superficie representa la función de "deseabilidad"

(creada por el programa), que está directamente relacionada con la actividad antifúngica. Cada valor de actividad antifúngica es transformado a valor de deseabilidad cuyos valores van de 0 a 1; donde 0 es actividad o deseabilidad nula y 1 representa el máximo u óptimo valor de deseabilidad.

Tabla 3.1. Combinaciones de los distintos ácidos orgánicos: ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico y ácido fenil láctico; mediante el diseño de Superficie de respuesta.

Ácidos Orgánicos (mM)				
Combinación	Acido láctico	Acido acético	Ac. propiónico	Ac. Fenil láctico
1	211,1	28,3	5,3	0,4
2	211,1	28,3	1,8	1,3
3	211,1	28,3	5,3	1,3
4	211,1	28,3	1,8	0,4
5	211,1	76,7	5,3	0,4
6	211,1	76,7	1,8	1,3
7	211,1	76,7	5,3	1,3
8	211,1	76,7	1,8	0,4
9	411,1	28,3	5,3	0,4
10	411,1	28,3	1,8	1,3
11	411,1	28,3	5,3	1,3
12	411,1	28,3	1,8	0,4
13	411,1	76,7	5,3	0,4
14	411,1	76,7	1,8	1,3
15	411,1	76,7	5,3	1,3
16	411,1	76,7	1,8	0,4
17	311,1 ^a	52,5	3,5	0,8
18	111,1 ^e	52,5	3,5	0,8
19	511,1 ^e	52,5	3,5	0,8
20	311,1 ^e	4,2	3,5	0,8
21	311,1 ^e	100,8	3,5	0,8
22	311,1 ^e	52,5	0,0	0,8
23	311,1 ^e	52,5	7,0	0,8
24	311,1 ^e	52,5	3,5	0,0
25	311,1 ^e	52,5	3,5	1,7

^a punto central ^e punto axial

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Selección de BAL con actividad antifúngica

Del total de las BAL evaluadas, aproximadamente el 50 % de las cepas presentaron efecto antifúngico frente a algunas de las cepas de PD. En la Tabla 3.2 se muestran las BAL que mostraron esta actividad inhibitoria. De éstas, las BAL que inhibieron conjuntamente a las tres cepas de PD fueron ocho en total y están listadas al comienzo de dicha tabla.

Analizando el comportamiento de cada cepa, fueron 15 cepas de BAL que inhibieron a PD1, 17 cepas a PD2 y 19 cepas a PD5. Los rangos de PI fueron: 2,1-7,7 % para PD1, 3,6-9,0 % para PD2 y 2,8-5,4 % para PD5 (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Porcentajes de inhibición (PI) obtenidos con las distintas cepas de BAL frente PD1, PD2 y PD5.

Cepas de BAL	% de inhibición (PI)			Origen de aislamiento
	PD1	PD2	PD5	
<i>Lactobacillus casei</i> CRL 76	4,9 hij	7,1 mn	4,0 e-h	Productos lácteos
<i>L. casei</i> CRL 208	5,4 jk	9,0 p	4,5 f-i	Productos lácteos
<i>L. plantarum</i> CRL 778	7,7 no	7,1 mn	4,0 efg	Fermento de panificación
<i>L. plantarum</i> CRL 1073	4,9 hij	6,5 lm	4,0 e-h	Arveja
<i>Pediococcus pentosaceus</i> CRL 908	2,1 b	5,4 jk	2,8 bcd	Coliflor
<i>L. plantarum</i> CRL 1081	6,0 kl	7,1 mn	5,4 jk	Arveja
<i>L. acidophilus</i> CRL 1063	4,0 e-h	4,0 e-h	2,8 bcd	Productos lácteos
<i>L. paracasei</i> CRL 1501	4,5 f-i	7,7 no	4,0 e-h	Tomate
<i>L. acidophilus</i> CRL 1070	4,5 f-i	6,0 kl	0,0 a	Silaje
<i>L. rhamnosus</i> CRL 981	3,2 cde	7,7 no	0,0 a	Maíz
<i>P. pentosaceus</i> CRL 792	3,2 cde	0,0 a	3,2 cde	F. de panificación
<i>L. plantarum</i> CRL 725	4,9 g-j	0,0 a	3,6 cde	Bagazo
<i>L. plantarum</i> CRL 130	2,8 bc	0,0 a	4,0 efg	P. lácteos
<i>Lactococcus lactis</i> CRL 1109	5,4 jk	0,0 a	0,0 a	P. lácteos
<i>L. casei</i> CRL 87	6,5 lm	8,3 op	0,0 a	P. lácteos
<i>L. plantarum</i> CRL 1093	0,0 a	6,5 lm	0,0 a	P. lácteos
<i>L. plantarum</i> CRL 948	0,0 a	6,0 kl	4,5 f-i	Arveja
<i>P. pentosaceus</i> CRL 791	0,0 a	5,4 ijk	3,2 cde	P. lácteos
<i>L. mali</i> CRL 1003	0,0 a	6,0 kl	3,2 cde	Manzana
<i>L. coryniformis</i> CRL 1001	0,0 a	3,6 def	4,0 efg	Silage
<i>L. fermentum</i> CRL 973	0,0 a	4,9 g-j	3,2 cde	Remolacha
<i>P. acidilactici</i> CRL 902	0,0 a	0,0 a	4,0 e-h	Coliflor
<i>L. reuteri</i> CRL 1100	0,0 a	0,0 a	2,8 bcd	F. de panificación
<i>L. acidophilus</i> CRL 1064	0,0 a	0,0 a	3,2 cde	P. lácteos
<i>Enterococcus faecium</i> CRL 35	0,0 a	0,0 a	0,0 a	P. lácteos
<i>L. brevis</i> CRL 772	0,0 a	0,0 a	0,0 a	F. de panificación
<i>L. brevis</i> CRL 781	0,0 a	0,0 a	0,0 a	F. de panificación
<i>L. brevis</i> CRL 796	0,0 a	0,0 a	0,0 a	F. de panificación
<i>L. curvatus</i> CRL 705	0,0 a	0,0 a	0,0 a	P. lácteos
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CRL 742	0,0 a	0,0 a	0,0 a	Olivo
<i>Weissela confusa</i> CRL 761	0,0 a	0,0 a	0,0 a	P. lácteos
<i>Weissela ascens</i> CRL 962	0,0 a	0,0 a	0,0 a	P. cárnicos
<i>L. collinoides</i> CRL 1013	0,0 a	0,0 a	0,0 a	Manzana

Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$).

A pesar que la cepa PD5 fue inhibida por un mayor número de BAL (19 cepas) se manifestó en general como la más resistente a éstas, ya que tuvo los menores valores de PI (Tabla 3.2). Estos resultados fueron similares a los registrados frente al comportamiento del fungicida imazalil y al resto de los biocontroladores (ver Cap. 4), donde esta cepa también resultó ser la más resistente.

En resumen, las ocho cepas seleccionadas como las más activas por mantener su actividad frente a las tres cepas de PD fueron: *L. casei* CRL 76, *L. casei* CRL 208, *L. plantarum* CRL 778, *L. plantarum* CRL 1073, *P. pentosaceus*

CRL 908, *L. plantarum* CRL 1081, *L. acidophilus* CRL 1063 y *L. paracasei* CRL 1501. Dentro de este grupo de BAL no hubo diferencias estadísticamente significativas entre sí en cuanto al PI frente a PD1 y PD5, a excepción de *L. casei*, CRL 208; *L. plantarum* CRL 778 y *L. acidophilus* CRL 1063 (Tabla 3.2). Asimismo a este conjunto de cepas es al que se le determinó la producción de ácidos orgánicos.

La cepa más sensible al efecto de las BAL fue PD2 y la BAL con mayor efecto antifúngico (PI = 9 %) frente a ésta, fue *Lactobacillus casei* CRL 208 y difirió significativamente del resto de las BAL evaluadas (Tabla 3.2 y Fig. 3.1). Estos resultados muestran que esta cepa tuvo un marcado efecto antifúngico, respecto al resto de las cepas de BAL, con un efecto inhibitorio equivalente a 50 ppm del fungicida imazalil (ver Cap.2, apartado 2.4.2).

En el otro extremo, de estas ocho cepas seleccionadas, la que mostró menor actividad inhibitoria, contra PD1 y PD5, fue *Pediococcus pentosaceus*, CRL 908, con valores de PI de 2,1 % y 2,8 % respectivamente, sin diferir estadísticamente entre sí (Tabla 3.2).

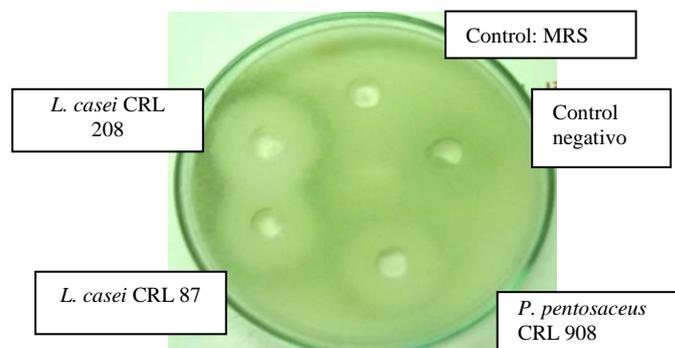
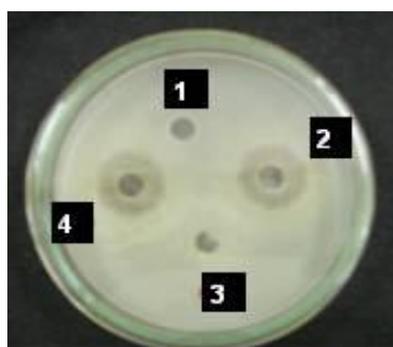


Figura 3.1. Halos de inhibición producidos por los SE de cepas de BAL, mostrando el efecto antifúngico sobre *P. digitatum* (cepa PD2).

3.4.2. Identificación de la naturaleza química de los metabolitos bioactivos

Los resultados de los ensayos de inhibición producidos por los SE de BAL neutralizados y/o calentados, para conocer la naturaleza de los metabolitos inhibitorios, se muestran en la Figura 3.2 y Tabla 3.3.

En la Figura 3.2 se observa a modo de ejemplo, el efecto inhibitorio observado de los SE de cultivo de *L. plantarum* CRL 1081 frente a la cepa PD2, luego de ser sometidos a calentamiento y neutralización. Se observa cómo el SE calentado mantuvo el efecto antifúngico igual al SE sin tratamiento (pH 4,0), no así el SE neutralizado que perdió toda su actividad. Trias *et al.* (2008) reportaron resultados similares, sugiriendo que la neutralización del pH hacía perder la capacidad inhibitoria de los sobrenadantes de ciertos cultivos de BAL, con lo cual relacionaron que el mayor efecto antimicrobiano se debería a la acidificación del medio.



- 1- MRS- Control
 2- SE de *L. plantarum*, a pH 4,0
 3- SE de *L. plantarum*, neutralizado a pH 7,0
 4- SE de *L. plantarum*, calentado (10 min a 100°C)

Figura 3.2. Efecto de sobrenadantes estériles de *L. plantarum* CRL 1081 (calentados y neutralizados) sobre *P. digitatum* (PD2).

El mismo comportamiento observado en la Figura 3.2. se registró para el resto de las cepas. Todos los SE de las BAL neutralizados (pH 7,0) perdieron su actividad frente a *P. digitatum*, no así los sometidos a calentamiento (Tabla 3.3). Estos resultados indicaron que los metabolitos antifúngicos serían de naturaleza ácida y termoestables.

Tabla 3.3. Porcentajes de inhibición de los sobrenadantes de cultivo (SE) de BAL, sometidos a calentamiento (SE Ø) y neutralización (SE Neutr.) frente a *P. digitatum* (PD2).

Porcentaje de Inhibición (PI)		
Cepas	SE Ø	SE Neutr.
<i>Lactobacillus casei</i> CRL 76	7,4	0,0
<i>Lactobacillus casei</i> CRL 208	9,3	0,0
<i>Lactobacillus casei</i> CRL 87	8,3	0,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> CRL 778	6,0	0,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> CRL 1073	5,4	0,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> CRL 1093	6,0	0,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> CRL 948	6,3	0,0
<i>Pediococcus pentosaceus</i> CRL 908	4,9	0,0
<i>Pediococcus pentosaceus</i> CRL 791	4,9	0,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> CRL 1081	4,9	0,0
<i>Lactobacillus mali</i> CRL 1003	7,1	0,0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL 1063	4,9	0,0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL 1070	4,9	0,0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL 981	6,0	0,0
<i>Lactobacillus paracasei</i> CRL 1501	7,4	0,0
<i>Lactobacillus coryniformis</i> CRL 1001	2,8	0,0
<i>Lactobacillus fermentum</i> CRL 973	4,9	0,0

Adicionalmente, este experimento nos permitió observar que la cepa *L. casei* CRL 208, nuevamente fue la más efectiva frente a PD2, mostrando un PI (9,3 %) similar al registrado en el ensayo descrito anteriormente (Tabla 3.2).

Los resultados obtenidos de este experimento permitieron concluir que los metabolitos se tratarían de ácidos orgánicos producidos por las BAL. El efecto primario alcanzado por las BAL podría deberse principalmente a la producción de ácido láctico, que hace bajar el pH en las células y que también inhibe directamente a algunos microorganismos (Ström, 2005).

La acción antifúngica de los ácidos orgánicos puede deberse a dos factores. Por un lado al efecto antagonista de la caída del pH que inhibe el desarrollo de los microorganismos ácido-sensibles y otra vía sería que la forma no disociada del ácido facilita la translocación al interior de las células, y una vez adentro, el mayor pH del citoplasma provocaría la disociación del ácido, generando de esta manera la acumulación de aniones junto a los protones y consecuentemente una disminución del pH intracelular, afectando directamente todos los procesos metabólicos celulares y provocando la disrupción de la estructura de la membrana celular (Brul y Coote, 1999; Piper *et al.*, 2001).

La cantidad y proporción de estos ácidos orgánicos producidos por las BAL y el pH final serían factores claves en la actividad antifúngica de las mismas. A partir de estos resultados, y para identificar y cuantificar los metabolitos antifúngicos, se determinó la producción de ácidos orgánicos de las ocho cepas de BAL seleccionadas.

3.4.2.1. Ácidos orgánicos presentes en los SE de BAL

La concentración de diferentes ácidos orgánicos presentes en los SE, fueron determinados para el grupo ocho cepas de BAL seleccionadas. Los valores obtenidos de la producción de los ácidos orgánicos, de los cultivos de 24 h de BAL, se muestran en la Tabla 3.4. Los ácido láctico, acético, y fenil láctico producidos por las BAL, serían los responsables del efecto antifúngico observado.

Tabla 3.4. Producción de ácidos orgánicos (mM): ac. láctico (AL), ac. acético (AC) y ac. fenil láctico (FL); por las cepas de BAL después de 24 h de cultivo en medio MRS.

Cepas BAL (CRL)	Producción de ácidos orgánicos (mM)		
	AL	AC	FL
<i>Lactobacillus casei</i> CRL 76	120,1	13,2	0,0
<i>Lactobacillus casei</i> CRL 208	120,1	11,2	0,0
<i>Pediococcus pentosaceus</i> CRL 908	174,4	15,3	0,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> CRL1081	491,9	96,7	5,2
<i>Lactobacillus plantarum</i> CRL 778	214,7	10,3	4,1
<i>Lactobacillus plantarum</i> CRL 1073	220,4	15,7	2,6
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL 1063	150,4	9,5	1,1
<i>Lactobacillus paracasei</i> CRL 1501	197,9	16,0	0,6

Los ácidos láctico y acético presentaron un amplio rango de concentración de 120 a 492 mM y de 9,5 a 96,7 mM respectivamente, en las distintas cepas de BAL. El ácido fenil láctico en cambio sólo fue detectado en cinco cepas y a bajas concentraciones (0,6 - 5,2 mM) (Tabla 3.4).

Resultados similares fueron reportados por Vermeulen *et al.* (2006), quienes sugirieron que el efecto antifúngico estuvo asociado a la producción de ácido láctico, acético y fenil láctico. Anteriormente, Magnusson *et al.* (2003)

encontraron también que el efecto de inhibición del crecimiento fúngico, observado con distintas cepas de BAL, estuvo relacionado a la producción de ácidos láctico y acético, pero además a un dipéptido. Recientemente, Trias *et al.* (2008), infirieron que no sólo los ácidos orgánicos, sino que también el peróxido de hidrógeno eran los responsables del efecto inhibitorio de las cepas de BAL frente a ciertos fitopatógenos de frutas.

El ácido fenil láctico resultó ser activo frente a numerosas especies de hongos (algunos productores de micotoxinas como *Penicillium verrucosum*, *P. citrinum* y *Aspergillus. ochraceus*) y ciertas bacterias contaminantes (*Listeria sp.*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*) (Dieuleveux *et al.*, 1998; Dieuleveux y Gueguen, 1998; Ström *et al.*, 2005). Las cepas *L. plantarum* CRL1081 y *L. plantarum* CRL 778 produjeron las mayores cantidades del ácido fenil láctico (4,1 y 5,2 mM, respectivamente). Estas concentraciones fueron 10 veces más altas que las reportadas por Valerio *et al.* (2004), sin embargo la actividad antifúngica de estas cepas no fueron mayores que las que no produjeron ácido fenil láctico, lo que indicaría que este metabolito no sería esencial para la actividad antifúngica. Por ejemplo, *L. casei* CRL 208 y *L. casei* CRL 76 (que no producen ácido fenil láctico) mostraron altos PI frente a *P. digitatum*.

La cepa de *L. plantarum* CRL 1081, fue la que tuvo las mayores concentraciones de ácidos láctico, acético y fenil láctico (419,9 mM, 96,7 mM y 5,2 mM) (Tabla 3.4) y también concordante a ésto, presentó altos valores de PI (superiores a 5 %) con las tres cepas de PD evaluadas (ver Tabla 3.2).

Con estos resultados, posteriormente se plantearon experimentos a los fines de evaluar la capacidad antifúngica de combinaciones de los ácidos orgánicos puros, producidos por las BAL frente a *P. digitatum*.

3.4.3. Actividad antifúngica de los ácidos orgánicos

Los resultados de la actividad antifúngica de los ácidos mostraron que esta actividad es dependiente del tipo de ácido orgánico presente en el medio y de la concentración de cada uno de ellos (Tabla 3.5 y Fig. 3.3).

En la Tabla 3.5 se muestra la distribución t-Student y sus correspondientes *p*-values. Estos *p*-values son usados como una herramienta para chequear la significancia de cada variable (en este caso, producción de ácidos orgánicos). Como puede observarse el efecto del ácido láctico fue mayor ($p < 0,000$) que el de los otros ácidos orgánicos ($p = 0,001 - 0,770$) (Tabla 3.5). La función lineal de esta variable fue significativa ($p < 0,05$) y mostró que el efecto antifúngico fue directamente proporcional a su concentración, y la función cuadrática para los ácidos acético, propiónico y fenil láctico fue también significativa ($p < 0,05$). A mayores o menores concentraciones que éstas, la actividad disminuyó. El comportamiento descrito, se observa en los gráficos tridimensionales de respuesta de superficie (Fig. 3.3).

Tabla 3.5. Coeficientes del modelo estimados por regresión lineal múltiple.

Factor	Efecto	p-value
Intercepción	3,63	0,000
Ácido láctico ^L	0,53	0,000*
Ácido láctico ^Q	-0,11	0,096
Ácido acético ^L	0,09	0,125
Ácido acético ^Q	-0,23	0,001*
Ácido propiónico ^L	-0,02	0,770
Ácido propiónico ^Q	-0,17	0,014*
Ácido fenil láctico ^L	-0,03	0,646
Ácido fenil láctico ^Q	-0,15	0,026*

* valores significativos a $p < 0,05$

En la Figura 3.3 se representa la deseabilidad (actividad antifúngica) de la combinación de dos variables mientras las demás permanecen en sus valores óptimos y constantes. En dicha figura, las curvas **a**, **b** y **c** grafican la función lineal de la variable ácido láctico con los ácidos acético, propiónico y fenil láctico, respectivamente. Como puede observarse, existe una relación lineal a medida que aumenta la concentración de ácido láctico y a una determinada concentración de la otra variable, aumenta la deseabilidad o actividad óptima. Los gráficos **d**, **e** y **f** representan la función cuadrática entre las variables ácido acético, propiónico y fenil láctico. En estas curvas los compuestos presentan una concentración óptima para cada uno, a partir de la cual luego la deseabilidad disminuye.

Este análisis nos permitió obtener las concentraciones óptimas de los metabolitos para el control del desarrollo fúngico, que serían de 511,1 mM de ácido láctico, 52,5 mM de ácido acético, 3,5 mM de ácido propiónico y 0,8 mM de ácido fenil láctico.

Para analizar la efectividad *in vivo* de esta mezcla óptima de los ácidos orgánicos, se investigó su comportamiento sobre los frutos de limones, que se detalla en el Capítulo 5.

3.5. Conclusiones

De un total de 33 cepas de bacterias lácticas evaluadas, se seleccionaron ocho cepas con propiedades antifúngicas frente a PD1, PD2 y PD5.

Se identificaron los metabolitos antifúngicos (ácido láctico, acético y fenil láctico) producidos por las BAL, responsables de la inhibición de las cepas patógenas de PD y se determinó la combinación óptima de los mismos para obtener el máximo de actividad antifúngica.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente capítulo nos permiten concluir que las BAL y sus productos (ácidos orgánicos) podrían emplearse para la bioconservación y preservación, evitando el desarrollo de cepas patógenas de frutos cítricos, como por ejemplo *P. digitatum*; reduciendo de esta manera la aplicación de pesticidas químicos que afectan negativamente el ambiente y constituyen un riesgo a la salud.

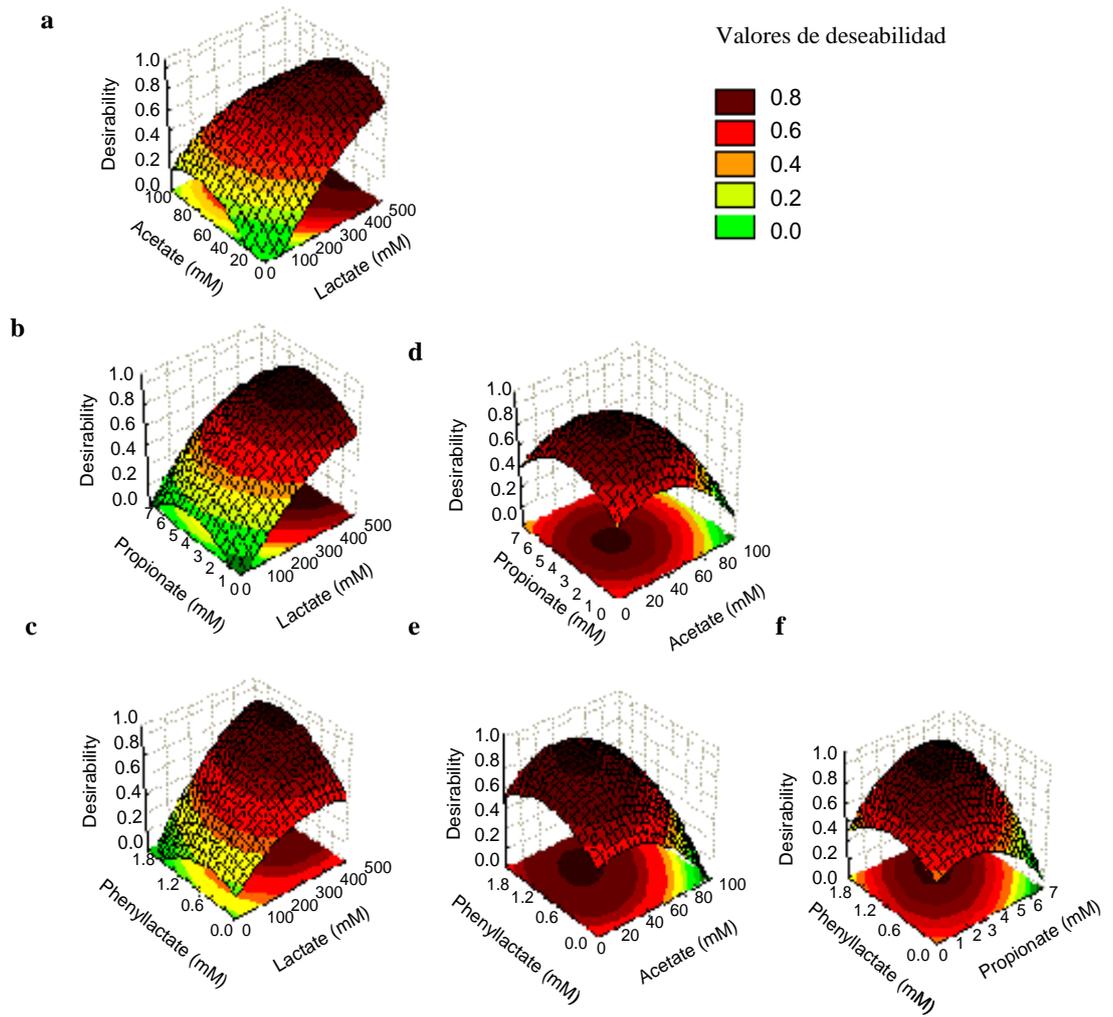


Figura 3.3. Superficie de respuesta para la mezcla de ácidos orgánicos. a) Función de deseabilidad para las variables acetato y lactato, b) Función de deseabilidad para las variables propionato vs. lactato, c) Función de deseabilidad para las variables fenil lactato y lactato, d) Función de deseabilidad para las variables propionato vs. acetato, e) Función de deseabilidad para las variables fenil lactato vs. acetato y f) Función de deseabilidad para las variables fenil lactato vs. propionato.

CAPÍTULO 4

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE EXTRACTOS VEGETALES, UN BIOFUNGICIDA Y SOLUCIONES DE BICARBONATO DE SODIO, FRENTE A *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc.

4.1. Introducción

4.1.1 Biopesticidas. Usos de extractos vegetales y biofungicidas en el control de enfermedades de poscosecha

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA-US, 2009) define a los biopesticidas como aquellos productos naturales derivados de animales, plantas, microorganismos (como ingredientes activos), e incluso a ciertos minerales (como por ejemplo, bicarbonato de sodio) para el control de plagas, malezas y enfermedades.

En los tejidos de los frutos y hortalizas existe una gran cantidad de compuestos cuyas propiedades antimicrobianas han sido poco estudiadas y que pueden ofrecer otra alternativa para disminuir la incidencia de las podredumbres (Umaña-Rojas, 1996).

Numerosos compuestos antifúngicos de origen vegetal y animal reducen la incidencia de podredumbres de poscosecha en una variedad de productos (*commodities*). Esto fue observado con extractos de plantas (aceites esenciales, compuestos aromáticos, sustancias volátiles, etc.), compuestos naturales derivados de la fermentación microbiana y de origen animal (El-Ghaouth, 1997; Mari *et al.*, 2003; Tripathi y Dubey, 2004; Tripathi y Shulka, 2007).

En investigaciones realizadas en el Instituto Superior de Biología (INSIBIO, Tucumán) se reportó que un extracto vegetal posee actividad antifúngica frente a patógenos de poscosecha de citrus. Se mostró que *P. digitatum* podía ser controlado con este extracto, tanto en ensayos *in vitro* como en pruebas realizadas sobre frutos de limón (Sendin, 2004; Sendin *et al.*, 2004). Además se demostró que este extracto era capaz de inducir los mecanismos de defensa en plantas de frutilla, frente al patógeno *Colletotrichum acutatum* (Grignola, 2007). En esta tesis se evaluó este extracto vegetal, cuya formulación está aún en desarrollo (patente en trámite), denominado Insibiox, que se obtuvo a partir de hojas de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) siguiendo un protocolo específico desarrollado en el mencionado instituto.

El producto comercial BC-1000® o Biocitrus® es un biofungicida y bactericida natural obtenido a partir extractos de cítricos, compuesto por polifenoles, bioflavonoides y ácidos orgánicos, y que es producido y comercializado por la empresa Chemie S.A. Los componentes de este producto están listados como sustancias GRAS por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA-US, 2009). Además por ser un fungicida de origen natural, es biodegradable, sin problemas residuales ni contaminación ambiental; siendo una alternativa viable para los casos de cepas resistentes a los fungicidas (Chemie S.A., 2009).

Biocitrus® actúa por acción directa contra los fitopatógenos afectando el metabolismo, al inhibir la respiración y alterar la permeabilidad de la membrana celular (Marcillaud y Doneche, 1997), pudiendo ocasionar ruptura de la misma y

la desnaturalización del protoplasma. Otro mecanismo posible es la inducción de resistencia (Esterio y Auger, 1997). Este biofungicida fue efectivo para controlar *Botrytis cinerea* en poscosecha de vid, frambuesa y arándano (Aguirre Hood y Pinilla, 2005). Biocitrus® está especialmente indicado para el control de hongos como los del complejo de la pudrición del racimo de vid: *B. cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* var. *niger*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Mucor racemosus* y *P. expansum*. Biocitrus® se formula como polvo dispersable y líquido emulsionable (Chemie S.A., 2009).

Serenade® es un biofungicida cuyo ingrediente activo es la bacteria *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, cepa QST 713, producido por AgraQuest, Inc. en Davis, California (EEUU). Esta bacteria se encuentra comúnmente en los suelos de diferentes hábitats de todo el mundo y es antagonista de fitopatógenos. Este antagonismo se debe a diversos mecanismos: competición por nutrientes, exclusión en el sitio, acción directa de la bacteria sobre el patógeno inhibiendo la germinación de las esporas, el desarrollo del tubo germinativo y el crecimiento del micelio (Agraquest Inc., 2009). Serenade® fue efectivo para controlar diferentes hongos y bacterias fitopatógenas en cultivos hortícolas (berenjenas, tomate, papa, pimiento, melón, calabaza, ajo, cebolla, frutilla) y en vid. Además, se sugirió que la cepa QST 713 podría actuar como un “elicitador” activando los mecanismos de defensa en las plantas (EPA-US, 2009).

También se investigó el uso del bicarbonato de sodio para el control de las enfermedades de poscosecha. Este es un producto que no presenta problemas de contaminación, tiene bajo costo y es utilizado como aditivo alimenticio, por lo tanto presenta pocas restricciones en su uso. Además, está incluido dentro de los productos GRAS por la FDA-US de EE.UU, (Conway *et al.*, 2007). La aplicación de bicarbonato fue efectiva para reducir la incidencia de enfermedades de poscosecha en manzanas y cítricos, especialmente cuando se combinó con tratamientos de inmersión en agua caliente o con otros agentes de biocontrol (Smilanick *et al.*, 1999; 2005; Müller y Bernal, 2001; Palou *et al.*, 2001a; Teixidó *et al.*, 2001; Conway *et al.*, 2004; 2007; Zhang *et al.*, 2004; Usall *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2007).

4.2. Objetivo

El objetivo del presente capítulo fue determinar y evaluar la capacidad inhibitoria *in vitro* de distintos productos naturales y biofungicidas frente a cepas de *P. digitatum*.

4.3. Materiales y Métodos

4.3.1. Medios y condiciones de cultivo para las cepas de *P. digitatum*

Se utilizaron las cepas de *P. digitatum* aisladas e identificadas como PD1, PD2, PD3, PD4, PD5 y PD6 (ver Cap. 2, apartado 2.4.1). Los aislados fueron reactivados en APG 2 % e incubados a 25 °C y luego de 7 días de crecimiento se recolectaron los conidios, como se explicó anteriormente en el Capítulo 2 (apartado 2.3.2). Los conidios se suspendieron en solución Tween 80 (0,05 %) y la concentración fue ajustada a 10⁶ conidios/ml a través del recuento en microscopio óptico con un hematocitómetro.

4.3.2. Preparación de las suspensiones de los productos biológicos y soluciones de bicarbonato de sodio

4.3.2.1 Extractos vegetales

El extracto vegetal Insibiox, fue obtenido siguiendo un protocolo desarrollado en el Instituto Superior de Biología (INSIBIO, Tucumán) (Sendin, 2004).

Para los ensayos *in vitro*, Insibiox fue suspendido en agua destilada estéril y luego centrifugado durante 15 min a 5000 x g, posteriormente se removió el sobrenadante y se determinó el peso seco. La evaluación de la actividad se realizó en la placa de Petri en un rango de concentraciones de 5 a 30 % (p/v) en agua.

El extracto Biocitrus® fue provisto por la empresa Chemie S.A. Para evaluar su actividad antifúngica, se realizaron suspensiones acuosas del mismo con agua destilada estéril, luego se agitó en vórtex durante 5 min, previo a aplicarlo en las placas de Petri. Las concentraciones empleadas fueron de 0,5 a 4 % (v/v).

4.3.2.2. Serenade®

Se empleó el biocontrolador comercial Serenade® (AgraQuest Inc., Davis, California) formulado como polvo mojable. Se realizaron suspensiones del producto en agua destilada estéril, las cuales luego fueron centrifugadas (5000 x g por 15 min) y posteriormente se extrajeron los sobrenadantes para ser utilizados en las determinaciones en las placas de Petri. Las concentraciones empleadas fueron de 0,4 a 3 x 10⁻⁴ % (p/v) (equivalente a 0,4 a 3 ppm).

4.3.2.3. Bicarbonato de sodio

El bicarbonato de sodio fue provisto por Rodhia Argentina S.A. En las pruebas se utilizaron suspensiones del producto preparadas con agua destilada estéril las cuales fueron agitadas en vórtex durante 5 min, previo a su utilización en las placas de Petri. Las concentraciones empleadas fueron de 0,5 a 3 % (p/v).

4.3.3. Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de los biocontroladores y el bicarbonato de sodio

La actividad antifúngica de los diferentes biocontroladores y del bicarbonato de sodio, se determinó por el método de difusión en placa descrito en el Capítulo 2 (apartado 2.3.3.2.) En este caso, en los pocillos se colocaron 80 µl de las diluciones de los productos evaluados. Como control negativo de inhibición, se adicionó en uno de los pocillos, agua destilada estéril. Luego de incubar durante 48 h, se midieron diámetros los halos de inhibición (mm) de crecimiento en torno a cada pocillo para calcular los PI como se detalló anteriormente en el Capítulo 2 (apartado 2.3.3.2.1).

Las pruebas se realizaron bajo condiciones estériles, por triplicado y los experimentos se repitieron dos veces. El análisis estadístico se realizó con el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2009) utilizando el análisis de la varianza, mientras que la comparación de medias se realizó con la prueba de Duncan a un nivel de significancia (α) de 0,05.

4.4. Resultados y discusión

4.4.1 Actividad antifúngica *in vitro* de los biocontroladores y el bicarbonato de sodio

Los productos alternativos mostraron actividad inhibitoria *in vitro* frente a las distintas cepas de *P. digitatum*. En la Figura 4.1 se observa, a modo de ejemplo, el efecto antifúngico visualizado a través de los halos de inhibición para dos de los biocontroladores evaluados, frente a la cepa PD2.

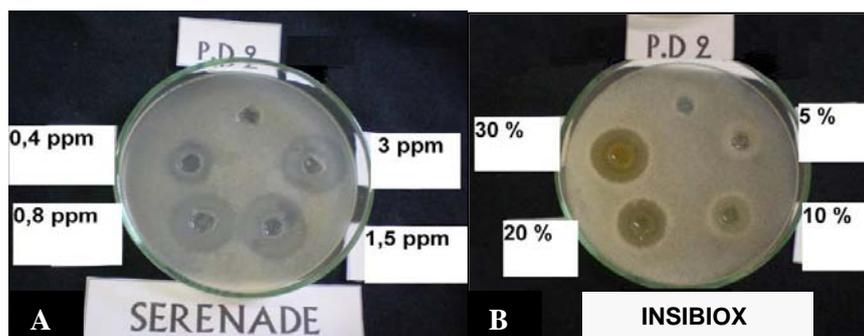


Figura 4.1. Halos de inhibición producidos por dos biocontroladores mostrando el efecto antifúngico sobre *P. digitatum* (cepa PD2). A) Serenade® (1 ppm equivale a 1×10^{-4} %) y B) Insibiox.

Serenade® resultó en los ensayos *in vitro* el producto biológico con mayor actividad inhibitoria, ya que a concentraciones muy bajas ($0,4 \times 10^{-4}$ %) mostró inhibición para todas las cepas de *P. digitatum* con valores altos de PI (Fig. 4.1. A y Fig. 4.2). Las concentraciones de Serenade® estuvieron en el orden de 1×10^5 veces menos que las concentraciones empleadas para extracto Insibiox (producto más concentrado), comparando similar actividad entre ambos. La cepa más sensible a este biofungicida fue la cepa PD4 (PI = 7,7 % a una concentración de $0,4 \times 10^{-4}$ %), difiriendo significativamente del resto de las cepas a esa concentración. La cepa de mayor resistencia a Serenade® fue PD6 con un PI = 4,5 % a 3×10^{-4} % (Fig. 4.2). Anteriormente, esta cepa había resultado ser la más sensible frente al fungicida imazalil (ver Cap. 2 apartado 2.4.2).

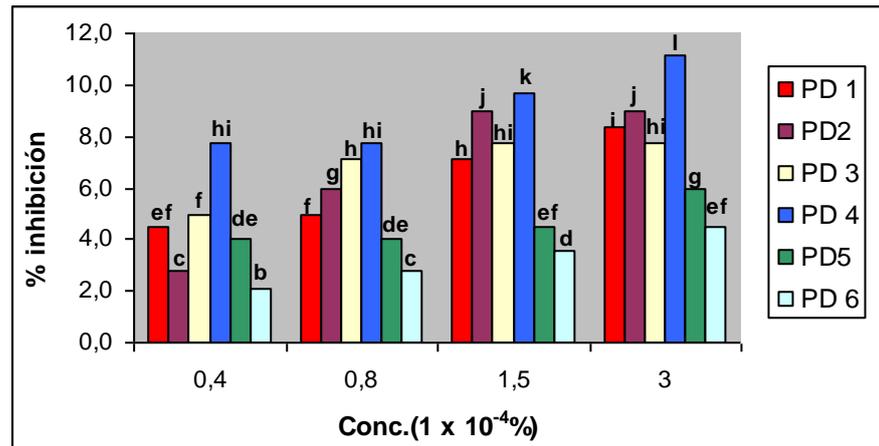


Figura 4.2. Efecto antifúngico de diferentes concentraciones de Serenade® frente a distintas cepas de *P. digitatum*. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$).

El comportamiento de las cepas fue muy diferente en cuanto a sensibilidad a este biofungicida. Serenade® presentó, en general, aumentos proporcionales del porcentaje de inhibición con aumentos de la concentración (Fig. 4.1. A y Fig. 4.2). Mari *et al.* (2003) sugieren que las variaciones en la acción antimicrobial de los compuestos naturales se deben en gran medida a la diferencia de solubilidad final en el medio de cultivo, así como también de su capacidad para interactuar con la membrana citoplasmática del patógeno y a la sensibilidad inherente de cada cepa.

Serenade® contiene en su formulación, células liofilizadas de *B. subtilis* (raza SQT 713) y lipopéptidos con propiedades antifúngicas (Agraquest, Inc., 2009). Las diferencias observadas de PI entre las cepas pueden deberse a las diferentes formas de interactuar entre los microorganismos involucrados, por ejemplo competición por nutrientes y espacio en el medio de cultivo, así como también por los metabolitos (lipopéptidos) que actúan directamente sobre el patógeno. Está reportado que *B. subtilis* produce un marcado efecto antifúngico *in vitro* frente a *P. digitatum* por lo cual se lo usa como control positivo de inhibición (Zhang *et al.*, 2004).

Biocitrus® inhibió a todas las cepas de *P. digitatum* aún con concentraciones de 0,5 %, salvo la cepa PD5 que no presentó halo de inhibición a esta concentración (Fig. 4.3). Esta última cepa se mostró resistente a dicho producto con valores bajos de inhibición (PI = 1,5 - 2,1 %), y las concentraciones inhibitorias no difirieron estadísticamente entre sí, es decir, que tuvieron el mismo efecto antifúngico. La cepa más sensible a este extracto biológico fue PD4 con un PI = 9 % a la máxima concentración de Biocitrus® evaluada y difirió significativamente del resto de las cepas (Fig. 4.3).

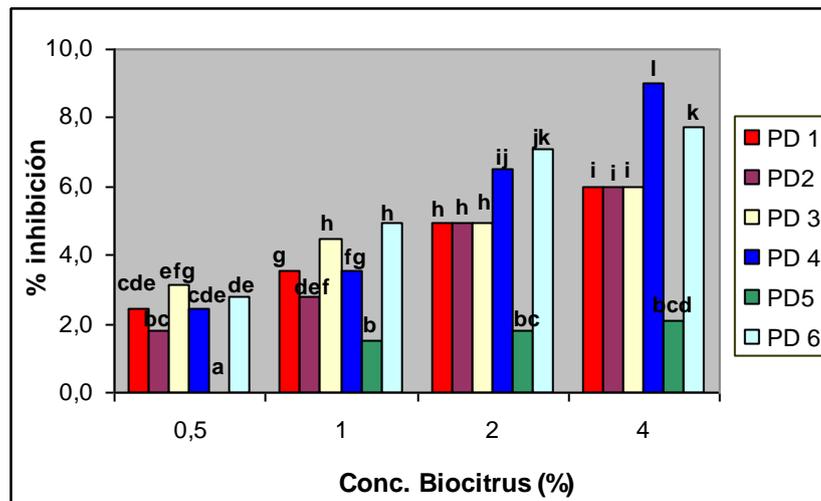


Figura 4.3. Efecto antifúngico de Biocitrus® frente a distintas cepas de *P. digitatum*. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$).

El efecto antifúngico de Biocitrus® también fue dependiente de su concentración en el medio de cultivo y mostró en general una relación lineal, ya que a medida que aumentó la concentración, hubo un incremento en el porcentaje de inhibición (Fig. 4.3), y a excepción de la cepa PD5, el resto de las cepas tuvo un comportamiento uniforme (en valores de PI) frente a este biocontrolador.

Biocitrus® contiene polifenoles y bioflavonoides que serían los responsables del efecto inhibitorio observado. De manera similar, se han reportado propiedades antifúngicas de extractos de flavedo de pomelo frente a *P. digitatum* y *P. italicum* durante pruebas *in vitro* e *in vivo* (Tripathi y Shulka, 2007). Por su parte, Stange *et al.* (2002) afirman que los extractos provenientes de diferentes *Citrus sp.* tienen distintos efectos sobre el crecimiento de los patógenos. En estas pruebas se pudo ver esta diferencia de sensibilidad entre los hongos ya que la cepa PD5 tuvo comportamiento muy diferente al resto.

El extracto vegetal Insibiox mostró actividad inhibitoria con concentraciones mayores a 5 %, a excepción de PD6 que resultó inhibida a dicha concentración presentando un PI de 2,1 % (Fig. 4.4). Sin embargo, la cepa PD2 presentó la mayor inhibición (PI = 7,1 %) frente a este extracto a la máxima concentración evaluada del mismo (Fig. 4.1. B) y difirió significativamente del resto de las cepas (Fig. 4.4). Por otra parte y al igual que para la mayoría de los biocontroladores, PD5 se mostró como la cepa más resistente con el más bajo PI (4,9 %), pero su actividad antifúngica, estadísticamente no fue diferente de la obtenida para las cepas PD3 y PD6 (PI = 5,4 %) (Fig. 4.4).

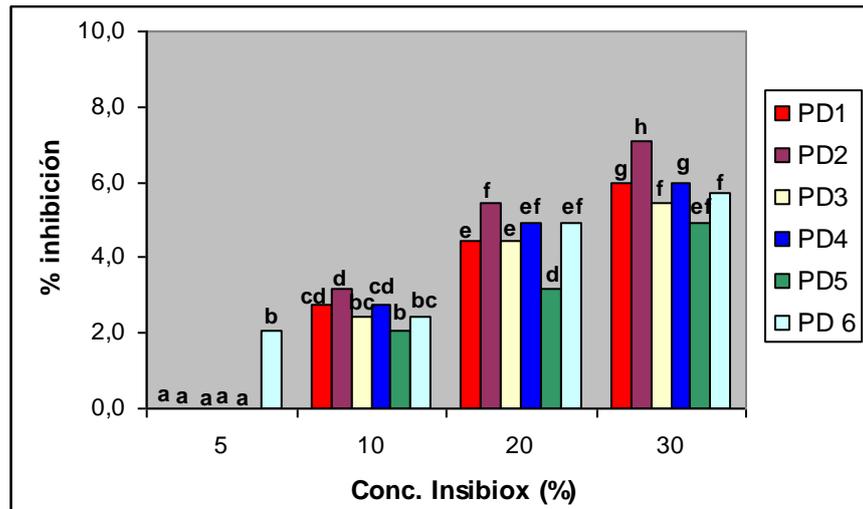


Figura 4.4. Efecto antifúngico de Insibiox frente a distintas cepas de *P. digitatum*. Valores tomados de la Tabla 4.1. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$).

El extracto Insibiox también presentó un comportamiento dependiente de su concentración en el medio, con incrementos de la actividad inhibitoria a medida que aumento la concentración del mismo (Fig. 4.4)

En cuanto al comportamiento de las cepas frente a bicarbonato de sodio (Fig. 4.5) puede observarse que este producto presentó alta actividad inhibitoria *in vitro* en todas las cepas (Fig. 4.5), a excepción de PD5 que se mostró como resistente al mismo y sólo fue inhibida con concentraciones superiores a 2 %. En general las cepas manifestaron comportamientos similares, en cuanto a valores de PI, a excepción de PD3 y PD5 que mostraron bajos PI (Fig. 4.5).

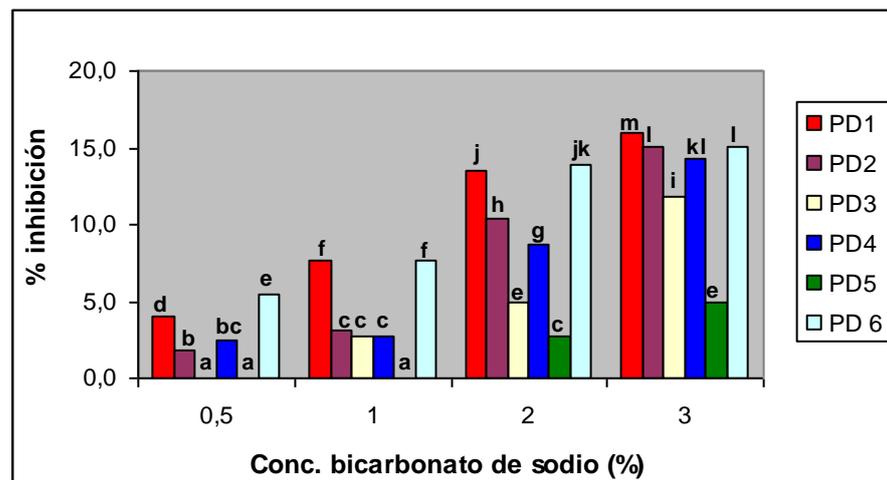


Figura 4.5. Efecto antifúngico de bicarbonato de sodio frente a distintas cepas de *P. digitatum*. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$).

El tratamiento con bicarbonato de sodio registró los mayores PI respecto de los demás productos alternativos evaluados. En las concentraciones de 3 y 2% de bicarbonato de sodio, se observaron halos de inhibición de gran diámetro alrededor de los pocillos, mientras que con el resto de las concentraciones, disminuyeron marcadamente (Fig. 4.5). Además se observó alrededor de la concentración de 2 %, un anillo de gran nitidez dentro del halo. Este comportamiento sería una respuesta a la gran difusibilidad que tiene el bicarbonato y al efecto del pH resultante de las diferentes concentraciones del mismo, que estuvo en un rango de entre 8,2 y 8,4 y que interactuaron con el patógeno. De acuerdo con Smilanick *et al.* (2005), el crecimiento de *P. digitatum* es óptimo a bajos valores de pH. Por consiguiente, el bicarbonato de sodio al modificar esta condición del medio por un aumento en el pH, inhibe el desarrollo de *Penicillium*. De manera similar a lo hallado en el presente trabajo, estos autores reportaron la inhibición *in vitro* de aislamientos de *P. digitatum* con elevados valores de pH (entre 8,0 y 9,0) y con incrementos de la concentración de bicarbonato de sodio e imazalil. También encontraron respuesta diferencial en cuanto a inhibición de la germinación de conidios, entre cepas sensibles y resistentes.

El efecto inhibitorio del crecimiento por elevados pH es complejo y dependiente de la ionización de los ácidos o bases en el medio donde se encuentra el hongo y altera la permeabilidad de la membrana según el pH, así como también produce estrés osmótico. Los bicarbonatos son inefectivos bajo condiciones ácidas porque en este estado predomina el ácido carbónico que es inestable y descompuestos fácilmente a CO₂ y agua. A medida que aumenta el pH, aumenta la concentración del ión bicarbonato y carbonato que son los responsables del efecto antifúngico (Smilanick *et al.*, 2005).

4.5. Conclusiones

Este capítulo permite concluir que las cepas tuvieron gran variabilidad de respuesta de acuerdo al biocontrolador empleado. Por ejemplo, la cepa PD6 fue muy sensible al bicarbonato de sodio mientras que con Serenade® se mostró como resistente. Sólo la cepa PD5 tuvo un comportamiento estable y se mostró resistente a casi todos los productos biológicos, a las BAL y al fungicida imazalil (ver Cap. 2 y Cap. 3).

Asimismo estos resultados demuestran que los productos biológicos evaluados en condiciones de laboratorio (*in vitro*), mostraron actividad inhibitoria frente a las distintas cepas de *P. digitatum*, inhibiendo el crecimiento y el desarrollo del mismo. Si bien el mayor PI (16,0 %) fue alcanzado con el bicarbonato de sodio, el biofungicida Serenade® fue el más efectivo *in vitro* ya que mostró elevados porcentajes de inhibición en un rango de concentración muy bajo (10⁴ veces menos concentrado). Sin embargo, el bicarbonato de sodio mostró una alta efectividad en las concentraciones evaluadas, y es un producto seguro, inócuo y de bajo costo por lo que constituye una importante alternativa.

El potencial de uso de estas sustancias naturales para el control de enfermedades de poscosecha, requiere una exhaustiva y detallada evaluación de su actividad biológica en los frutos, para así asegurar la inhibición efectiva del desarrollo del patógeno sin producir efectos fitotóxicos sobre la fruta y que no constituyan un riesgo para la salud. Por ésto se planteó evaluar su efecto sobre los frutos de limón y los resultados obtenidos se presentan en el capítulo siguiente.

CAPÍTULO 5

EFFECTO DE LOS PRODUCTOS BIOLÓGICOS, BICARBONATO DE SODIO Y ÁCIDOS ORGÁNICOS FRENTE A *P. digitatum* (Pers.) Sacc., EN FRUTOS DE LIMÓN

5.1. Introducción

5.1.1. Situación actual del control biológico en poscosecha de frutas cítricas

El área de control biológico en poscosecha es incipiente y se encuentra en sus etapas iniciales (Janisiewicz y Korsten, 2002; Sharma *et al.*, 2009), sin embargo, tiene un gran desafío por delante ya que la problemática que se presenta con el uso de los fungicidas químicos de síntesis es creciente por sus efectos cancerígenos, teratogénicos, residualidad alta y aguda, período largo de degradación, contaminación ambiental y otros efectos negativos en alimentos y humanos (Tripathi y Shukla, 2007). A esto debemos sumarle que en la actualidad existen pocos ingredientes activos permitidos para su uso en poscosecha y que las reglamentaciones exigen muy bajos niveles de residuos en fruta, e incluso la gran mayoría van hacia su prohibición (Umaña Rojas, 1996; Vero *et al.*, 2004; Viñas *et al.*, 2006). Así por ejemplo, la guazatina, un fungicida utilizado para el control de podredumbre amarga de los cítricos (*Geotrichum citri-aurantii*), fue recientemente prohibido por los países miembros de la UE (Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de España, 2009).

En este contexto, en los recientes años se vienen realizando numerosas investigaciones con diferentes microorganismos antagónicos, productos naturales solos o combinados con tratamientos físicos (termoterapia, curado, radiaciones, etc.); a fin de hallar un método de control biológico apropiado para sustituir los fungicidas de síntesis química o bajar las dosis de los mismos (Janisiewicz y Korsten, 2002). Sin embargo, actualmente son muy pocos los productos biológicos disponibles que controlen eficazmente las enfermedades de poscosecha bajo condiciones comerciales (El-Ghaouth, 1997; Arras y Arru, 1997; Janisiewicz y Korsten, 2002; Tripathi y Dubey, 2004; Usall, 2005; Tripathi y Shukla, 2007). Entre estas alternativas el uso de microorganismos antagónicos como bacterias, hongos y/o levaduras, han sido las más estudiadas y desarrolladas (El-Ghaouth, 1997; Sharma *et al.*, 2009).

Un aspecto importante a considerar con los agentes de biocontrol es la aceptación por parte de la sociedad del uso de organismos vivos, en los alimentos. Ya desde tiempos muy antiguos, las fermentaciones con microorganismos han sido métodos importantes para preservar los alimentos. En este contexto, está bien concebida y admitida la adición de ciertos microorganismos, por ejemplo en la industria láctea y sus derivados o en la de la panificación. Por esto, habría que esperar que los agentes microbianos sean una alternativa factible y aceptada por los consumidores (Viñas *et al.*, 2006). El éxito del control biológico depende también en gran medida de la influencia del consumidor, de preferir calidad interna a apariencia externa (Spadaro y Gullino, 2004).

El ambiente de poscosecha es propicio para la implantación del control biológico y juega un importante rol en la adopción de estas medidas (Janisiewicz y Korsten, 2002). A diferencia de las aplicaciones a campo, es un ambiente

restringido, lo que permite llegar de manera más eficaz al sitio blanco de acción con condiciones ambientales estables y generalmente manejables (Umaña-Rojas, 1996; Janisiewicz y Korsten, 2002; Mari *et al.*, 2003; Spadaro y Gullino, 2004; Viñas *et al.*, 2006; Tripathi y Shukla, 2007).

Como ejemplo práctico del uso de alternativas biológicas puede mencionarse la aplicación de luz UV, empleada para el control de la podredumbre de manzanas causada por *P. expansum*, y que consiste en un sistema de lámparas instaladas en el túnel de secado donde los frutos de manzanas giran permanentemente y reciben una determinada dosis de luz UV (Bettioli, 2006). Otra alternativa viable que resulta efectiva para los patógenos de poscosecha en cítricos, es el uso de tratamientos de inmersión de soluciones de carbonato y bicarbonato de sodio al 2 o 3 %, especialmente combinado con agua caliente (45 a 55 °C) y con agentes de biocontrol (Smilanick *et al.*, 1997; 1999; Teixidó *et al.*, 2001; Palou *et al.*, 2001a; Usall *et al.*, 2005; 2008; Torres *et al.*, 2007).

Actualmente también existen en el mercado biocontroladores comerciales formulados a base de microorganismos antagónicos, que son una herramienta para el control biológico en poscosecha. Dichos productos son formulaciones a base de levaduras *Candida oleophila* (Aspire®, EEUU; Israel) y *Cryptococcus albidus* (Yield Plus®, Sudáfrica) y bacterias *Pseudomonas syringae* (Biosave®, EE UU) y *Bacillus subtilis* (Avorgreen) (El-Ghaouth, 1997; Janisiewicz y Korsten, 2002; Mari *et al.*, 2003; Vero *et al.*, 2004; Bautista-Baños, 2006; Viñas *et al.*, 2006; Tripathi y Shukla, 2007). Asimismo, el biofungicida Serenade® está incluido en la lista de productos de biocontrol desarrollados para el control de enfermedades de poscosecha de frutas y vegetales (Sharma *et al.*, 2009). Sin embargo, los mayores reportes con este biofungicida están realizados para aplicaciones en cultivos fruti-hortícolas, por lo tanto hay pocas referencias de su evaluación para el tratamiento de poscosecha.

En la actualidad existen numerosos resultados a escala experimental, tanto *in vitro* como *in situ*, que son alentadores en el control biológico (Janisiewicz y Korsten, 2002). Algunas alternativas, extensamente estudiadas a través de varios años, requieren sólo ser registradas comercialmente y/o formuladas apropiadamente, por ejemplo la cepa CPA-2 de *Pantoea agglomerans* descubierta un grupo de investigadores de la Universidad de Lleida en Cataluña, España, que resultó ser muy efectiva frente a patógenos de poscosecha en diferentes especies de frutales, incluidos los cítricos (Teixidó, *et al.*, 2000; 2001; Poppe *et al.*, 2003; Usall *et al.*, 2005; 2008; Viñas *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2007).

Así también, diversos microorganismos han sido eficaces en el control de podredumbres de poscosecha en diversos frutales, especialmente las levaduras *Candida oleophila*, *C. shake*, *C. saitoana*, *Pichia guilliermondii*, *Cryptococcus laurentii* y *C. albidus*; las bacterias *Pseudomonas syringae* y *P. cepaica*; y los mohos *Aureobasidium pullulans* y *Trichoderma viridae* (Usall *et al.*, 2001; Viñas *et al.*, 2006).

En ciertos casos, resta evaluar en mayor profundidad aspectos tales como la seguridad tanto para los consumidores como para los operarios que manipulen los bioproductos, el efecto sobre la calidad y sobre la fisiología del hospedero, los mecanismos de acción involucrados, la estabilidad frente a diferentes condiciones ambientales, la compatibilidad con las distintas prácticas comerciales de poscosecha y los costos de producción (Janisiewicz y Korsten,

2002; Mari *et al.*, 2003; Tripathi y Dubey, 2004; Bautista-Baños, 2006; Viñas *et al.*, 2006; Tripathi y Shukla, 2007).

Sharma *et al.* (2009) concluyeron que en el futuro sería posible utilizar sólo cepas adaptadas a las condiciones de poscosecha y por medio de la biotecnología introducir genes para mejorar la actividad de biocontrol y desarrollar cultivares resistentes a los patógenos.

5.2. Objetivo

El objetivo del presente capítulo fue evaluar en condiciones *in vivo*, sobre frutos de *Citrus limon* cv 'Eureka', distintas alternativas biológicas para el control de *P. digitatum*, aplicados en diferentes tiempos entre la inoculación del patógeno y la aplicación de los tratamientos.

5.3. Materiales y Métodos

5.3.1. Material vegetal

Para los experimentos *in vivo* se emplearon frutos de limoneros (*C. limon*) del cultivar 'Eureka' provenientes de la zona productora citrícola pedemontana de Famaillá, Tucumán. Los experimentos se realizaron durante las campañas citrícolas 2007 y 2008. Los frutos utilizados para los experimentos, recién cosechados y sin tratamientos de poscosecha previo, fueron desinfectados por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio 0,5 %, durante 1 min, y fueron posteriormente inmersos en agua y dejados a secar a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización (Teixidó *et al.*, 2001).

5.3.2. Inoculación artificial del patógeno a frutos de limón

5.3.2.1. Preparación de la suspensión de conidios del patógeno

En los experimentos en fruta se empleó la cepa PD1 de *P. digitatum*, previamente seleccionada en los capítulos anteriores por su comportamiento intermedio frente al fungicida químico imazalil y a los distintos productos biológicos *in vitro*. Para la realización de la suspensión de conidios, se utilizaron cultivos jóvenes del patógeno, a partir de los cuales se recolectaron los conidios luego de 7 días de crecimiento, tal como fue explicado anteriormente en el Capítulo 2 (apartado 2.3.2). Los conidios del patógeno fueron suspendidos en solución Tween 80 (0,05 %) a una concentración de 10^6 conidios/ml, recomendada para evaluar los tratamientos de poscosecha (Eckert y Brown, 1986).

5.3.2.2. Inoculación por herida

Los frutos de limón previamente desinfectados, fueron inoculados en la zona ecuatorial del fruto con un elemento punzante (2 mm de diámetro por 1 mm de profundidad) sumergido en la suspensión de conidios del patógeno y realizando una única herida en el flavedo (ver Cap. 2, apartado 2.3.2.1).

5.3.3. Preparación de las suspensiones de los productos alternativos y el fungicida químico

Los productos empleados en los ensayos *in vivo* corresponden a los descritos en el Capítulo 4 (apartado 4.3.2), además de una mezcla de ácidos orgánicos resultantes del análisis de superficie de respuesta descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.4.3).

5.3.3.1 Extractos vegetales

Para evaluar la capacidad antifúngica de los extractos vegetales, Insibiox y Biocitrus®, se prepararon suspensiones acuosas de los mismos. Las concentraciones empleadas fueron entre 5-20 % (p/v) y entre 1-4 % (v/v) respectivamente y fueron seleccionadas de acuerdo a dosis probadas en los ensayos *in vitro* (Cap. 4).

5.3.3.2. Serenade®

Se realizaron suspensiones del biofungicida Serenade® formulado como polvo mojable con agua y las concentraciones empleadas fueron las recomendadas por la empresa comercializadora, de 0,25 a 1 % (p/v).

5.3.3.3. Bicarbonato de sodio

En los experimentos se utilizaron suspensiones de bicarbonato de sodio, preparadas con agua, en concentraciones de entre 1 y 3 % (p/v). Dichas concentraciones fueron las reportadas en diferentes investigaciones con este producto (Smilanick *et al.*, 1997; 1999). Previa aplicación del tratamiento se midió el pH, que estuvo alrededor de 8,1 y 8,3.

5.3.3.4. Mezcla de ácidos orgánicos

La mezcla de ácidos orgánicos utilizada para evaluar su capacidad antifúngica *in vivo* estuvo constituida por 500 mM de ácido láctico y 50 mM de ácido acético. Para cada ácido, se calcularon las cantidades necesarias para esas molaridades y se disolvieron en agua tibia (45 °C) para facilitar su solubilidad. Posteriormente se midió el pH y se ajustó a 4,0 con el agregado de ácido cítrico, a los efectos de simular el pH de los sobrenadantes de cultivos de BAL. Los ácidos propiónico y fenil láctico no se probaron por falta de disponibilidad al momento del ensayo de productos de calidad garantizada y por los altos costos (ácido fenil láctico).

5.3.3.5. Fungicida químico

Para los experimentos de control directo o curativos, con aplicación de tratamientos simultáneo (t 0h) y posterior a la inoculación (t 18h), se empleó como control positivo de inhibición el fungicida químico imazalil (Fungaflor®), formulado como concentrado emulsionable al 50 %, a una concentración de 0,15 % de ingrediente activo (i.a.) (v/v). Mientras que para los ensayos inductivos las concentraciones empleadas de dicho fungicida fueron 0,05 % y 0,001% de i.a. (v/v).

5.3.4. Aplicación de los productos alternativos en los frutos de limón

5.3.4.1. Ensayos de control directo (curativos) con aplicación de tratamientos: simultáneo (t 0h) y posterior a la inoculación (t 18h)

Los ensayos de control directo (curativos) fueron realizados sobre frutos de limón artificialmente inoculados con el patógeno. La aplicación de los tratamientos con los productos alternativos se realizó por inmersión de los frutos en cada suspensión durante 1 min (Teixidó *et al.*, 2001). Los tratamientos consistieron en:

- 1) Fruta tratada con extracto Insibiox: 20%, 10% y 5 %.
- 2) Fruta tratada con Biocitrus®: 4 %, 2 % y 1 %.
- 3) Fruta tratada con Serenade®: 1 %, 0,5 % y 0,25 %.
- 4) Fruta tratada con bicarbonato de sodio: 3 % (pH = 8,3), 2 % (pH = 8,1) y 1 % (pH = 8,1).
- 5) Fruta tratada con mezcla de ácidos orgánicos: 500 mM de ácido láctico más 50 mM de ácido acético.

Estos tratamientos fueron aplicados en dos tiempos diferentes: inmediatamente después de inoculada la fruta (t 0h ± 2h) y 18 h posteriores a la inoculación (t 18h ± 2h). En este último caso, la fruta luego de ser inoculada, permaneció en cámara a 20 °C hasta el momento de la aplicación de los tratamientos.

Los controles empleados fueron: 1) testigo absoluto (fruta inoculada y tratada con agua); 2) control positivo de inhibición (fungicida químico imazalil 0,15 %); 3) fruta sana, sin inocular y 4) fruta herida sin inocular.

5.3.4.2. Ensayo de inducción de defensa con tratamientos y posterior inoculación a las 48 h

5.3.4.2.1. Selección de metodología apropiada para posteriores tratamientos de inducción de defensa

Previo a la realización del ensayo de tratamientos inductivos y con el fin de determinar la metodología más apropiada, se hicieron pruebas preliminares que permitieron seleccionar la concentración de cada producto (una sola concentración para los productos alternativos) y la manera de aplicar los mismos.

El siguiente experimento, en el cual se utilizó el bicarbonato de sodio, fue realizado para elegir las técnicas a emplear. Frutos de limón previamente desinfectados como se describió anteriormente, fueron tratados con bicarbonato de sodio 3 % o con agua (control absoluto) por inmersión durante 1 min. Dichos tratamientos fueron aplicados sobre frutos sanos o sobre frutos heridos artificialmente, para lo cual se realizó una herida en la zona ecuatorial de los mismos (flavedo) con un elemento punzante de 1 mm de profundidad por 2 mm de diámetro (ver Cap. 2, apartado 2.3.4). Posteriormente, a las 48 h, los limones fueron inoculados artificialmente con la suspensión del patógeno a una concentración de 10^6 conidios/ml, en la misma herida o en nuevas heridas en el caso de la fruta sana. Esto se realizó simulando la presencia de heridas

naturales que puede traer la fruta desde la cosecha y la posterior infección en empaque o en alguna de las etapas subsiguientes.

En resumen, los tratamientos fueron:

- A) Control fruta sana, sin inocular.
- B) Control fruta sana, tratada con agua e inoculada a las 48 h.
- C) Control fruta herida, tratada con agua e inoculada a las 48 h (testigo absoluto).
- D) Fruta sana, tratada con bicarbonato de sodio 3 % e inoculada a las 48 h.
- E) Fruta herida, tratada con bicarbonato de sodio 3 % e inoculada a las 48 h.

Cada tratamiento consistió de 10 frutas con dos repeticiones en un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), y el análisis estadístico se realizó con el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2009) utilizando el análisis de la varianza y la comparación de medias con la prueba de Duncan a un nivel de significancia (α) de 0,05.

La fruta fue incubada en cámara bajo las mismas condiciones descritas en el apartado 5.3.4.3 y la evaluación se realizó como se detalla en el apartado 5.3.4.4, a distintos intervalos de tiempo (4, 7 y 15 días) posteriores al inicio del tratamiento. Para cada intervalo de tiempo se registró la incidencia y severidad de la enfermedad.

5.3.4.2.2. Ensayo de inducción de defensa o tratamientos preventivos sobre frutos de limón (t 48h)

Los productos alternativos se aplicaron como potenciales elicitores o como tratamientos preventivos a fin de evaluar si protegían heridas preexistentes a través de algún mecanismo que frenara o impidiera el posterior establecimiento del patógeno.

Además con el objeto de potenciar la inducción de las fitoalexinas y de manera similar a la metodología empleada por Arras *et al.* (2005) en la que los tratamientos inductivos con agentes de biocontrol (levaduras) y cloruro de calcio fueron evaluados sobre frutas heridas, previamente a la aplicación del tratamiento, se realizó una herida con un elemento punzante (2 mm diámetro por 1mm de profundidad) en el flavedo (ver Cap. 2, apartado 2.3.4).

A partir de los resultados obtenidos de las pruebas preeliminarias, los ensayos se realizaron por inmersión de las frutas durante 1 min en cada suspensión del agente inductor. Los tratamientos aplicados fueron:

- 1) Fruta tratada con Biocitrus® 2 %
- 2) Fruta tratada con Insibiox 10 %
- 3) Fruta tratada con bicarbonato de sodio 3 %
- 4) Fruta tratada con Serenade® 1 %
- 5) Fruta tratada con mezcla de ácidos orgánicos: 500 mM de ácido láctico más 50 mM de ácido acético.
- 6) Fruta tratada con imazalil 0,05 %

7) Fruta tratada con imazalil 0,001 %

Los controles empleados fueron:

8) Fruta sana

9) Fruta herida artificialmente sin inocular

10) Fruta herida artificialmente inoculada desde el inicio

11) Fruta herida artificialmente tratada con agua e inoculada a las 48 h (testigo absoluto)

Posteriormente, los frutos tratados se dejaron secar al aire y se colocaron en cámara por 48 h a 80 % de humedad relativa y a 20 °C, hasta el momento de la inoculación. Transcurrido ese tiempo, los limones fueron inoculados artificialmente con la suspensión del patógeno a una concentración de 10^6 conidios/ml en la misma herida para simular la infección que puede ocurrir durante el manipuleo y proceso de la fruta en el empaque.

5.3.4.3. Incubación de los tratamientos

Los tratamientos se dispusieron en cajas comerciales de cartón con separadores para mantener cada fruta individualizada y fueron incubados durante 7 días en cámara a 20 °C y humedad relativa 90 % (Fig. 5.1).



Figura 5.1. Cámara de incubación: A) Vista de la cámara de incubación, B) Cajas de cartón utilizadas para cada tratamiento y C) Disposición de los limones en el interior de la caja.

5.3.4.4. Evaluación de la intensidad de la enfermedad en el tiempo

Con el objetivo de evaluar la evolución de la enfermedad en el tiempo y la intensidad (incidencia y severidad), se realizaron evaluaciones intermedias a los 3, 5 y 7 días de realizada la inoculación. Se cuantificaron los parámetros severidad ($S = 0 - 4$ grados) utilizando la escala visual descrita en el Capítulo 2 (apartado 2.4.3) e incidencia ($I = 0 - 100$ %) como porcentaje de fruta enferma (independientemente del tamaño o magnitud de la lesión) sobre el total de fruta evaluada (Fig. 5.2).



Figura 5.2. Evaluación de los tratamientos a través de los parámetros incidencia y severidad (mediante una escala visual) de la enfermedad en los frutos de limón.

5.3.4.5. Diseño y análisis estadístico

Cada tratamiento consistió de 10 frutas con 3 repeticiones, en un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA). El experimento fue repetido 2 veces.

El análisis estadístico se realizó con el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2009) utilizando el Análisis de la Varianza y comparación de medias con la prueba de Duncan a un nivel de significancia (α) de 0,05.

5.4. Resultados y discusión

5.4.1. Ensayos de control directo (curativos)

5.4.1.1. Ensayo con inoculación y tratamiento simultáneo (t 0h)

Los resultados obtenidos del ensayo simultáneo entre inoculación y aplicación de los tratamientos alternativos de biocontrol, se muestran en las Figuras 5.3 y 5.4.

Analizando el parámetro de incidencia final, alcanzado a los 7 días de incubada la fruta a 20°C, los resultados mostraron que los tratamientos no presentaron diferencias estadísticamente significativas de reducción en la incidencia del “moho verde” respecto al testigo absoluto, ni entre sí, salvo el tratamiento con bicarbonato de sodio 3 % que difirió del testigo pero con un valor alto de $I = 73, 3\%$ (Fig. 5.3).

Comparando entre tratamientos, Insibiox 20% ($I = 86,7 \%$) presentó una incidencia similar al tratamiento con bicarbonato de sodio 3 %, sin embargo no difirió estadísticamente del resto de los tratamientos alternativos ni del testigo absoluto.

Bajo las condiciones de este experimento, ninguno de los tratamientos evaluados fue capaz de controlar la enfermedad, salvo el bicarbonato de sodio 3%, que logró controlar parcialmente la misma en un 27,7 %.

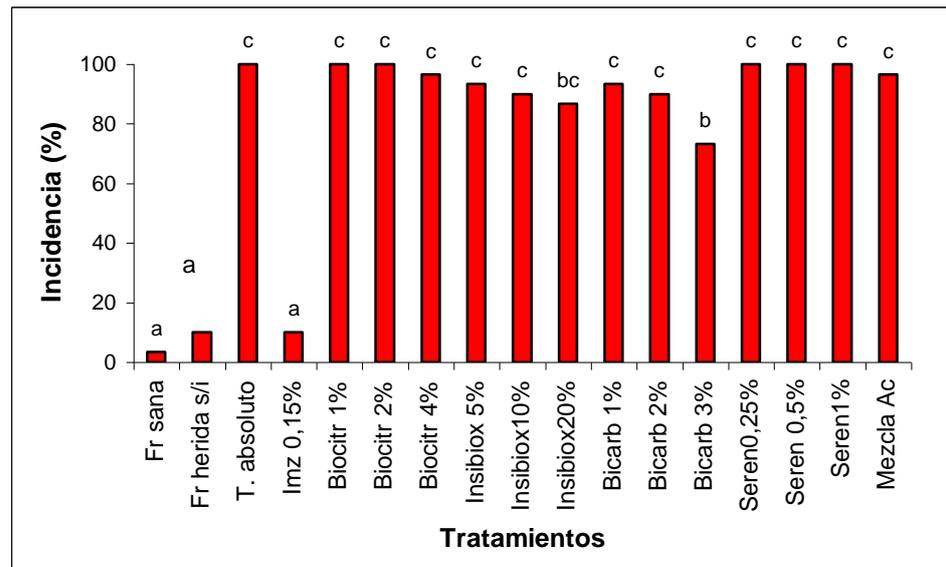


Figura 5.3. Incidencia (%) de “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón, con distintos tratamientos de biocontrol, imazalil y controles; en t 0h, a los 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. (s/i) Sin inocular. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$).

Sin embargo, cuando se evaluaron los distintos grados de severidad alcanzados luego de 7 días de incubación a 20 °C (Fig. 5.4), los tratamientos con Insibiox 20 %, Insibiox 10 %, Biocitrus® 4 %, bicarbonato de sodio 3 % y bicarbonato de sodio 2% redujeron significativamente la enfermedad respecto del testigo absoluto. El resto de los tratamientos, Biocitrus® 1 %, Biocitrus® 2 %, Insibiox 5 %, Serenade® en las tres concentraciones evaluadas y la mezcla de ácidos, no difirieron del testigo absoluto.

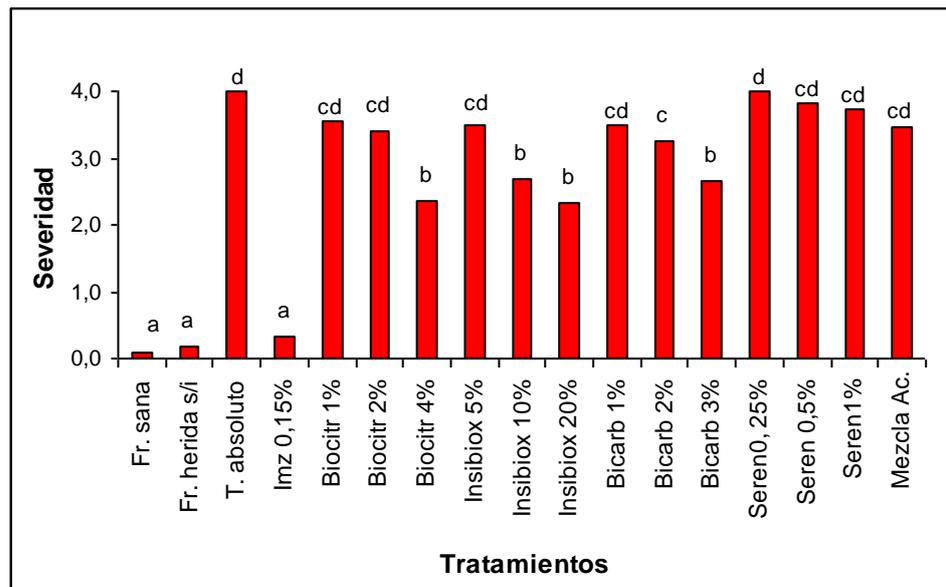


Figura 5.4. Severidad de “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón, con distintos tratamientos de biocontrol, imazalil y controles, en t 0h, a los 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. (s/i) Sin inocular. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$).

Comparando entre tratamientos, Insibiox 20 % mostró el más bajo valor de severidad ($S = 2,3$) pero no difirió estadísticamente de los tratamientos con Insibiox 10 % ($S = 2,7$), Biocitrus® 4% ($S = 2,4$) y bicarbonato de sodio 3 % ($S = 2,7$) (Fig. 5.4). Insibiox 20 % redujo aproximadamente un 42 % la severidad de la enfermedad, respecto al control absoluto ($S = 4,0$).

A pesar de las diferencias encontradas entre los tratamientos y el testigo absoluto, ningún tratamiento alternativo alcanzó los valores de control del fungicida imazalil (control positivo de inhibición), el cual fue eficiente para controlar la incidencia y la severidad (Fig. 5.3 y Fig. 5.4). Este control químico no difirió estadísticamente de los controles fruta sana y fruta herida sin inocular.

En la Figura 5.5 se muestra la evolución de la enfermedad en el tiempo, para los tratamientos que difirieron del testigo absoluto y los valores de severidad alcanzados por estos tratamientos, en cada intervalo de tiempo posterior a la inoculación. Además, puede observarse que los tratamientos siguieron el mismo comportamiento del testigo, es decir mostraron un incremento de los síntomas de la enfermedad en el tiempo, pero alcanzaron valores finales inferiores a éste.

Analizando estadísticamente los tratamientos en los distintos intervalos de tiempo (Fig. 5.5), podemos observar que al 3º día posterior a la inoculación con el patógeno, los tratamientos con Insibiox 20 % y Biocitrus® 4 % difirieron significativamente respecto del testigo, reduciendo el desarrollo de *P. digitatum*, mientras que los tratamientos con bicarbonato de sodio 2 % y 3 % e Insibiox 10 % no difirieron del testigo, mostrando la misma velocidad de desarrollo de la enfermedad a este tiempo. A partir de los 5 y hasta 7 días post-inoculación, todos los tratamientos se alejaron del testigo y difirieron significativamente de éste. Al final de la evaluación, tal como ya se mencionó anteriormente, el tratamiento de biocontrol con Insibiox 20 %, alcanzó el menor valor de severidad.

Asimismo, el resto de los tratamientos que difirieron del testigo, retrasaron el avance del patógeno sobre los frutos de limón comparado con el desarrollo normal visualizado en el testigo absoluto.

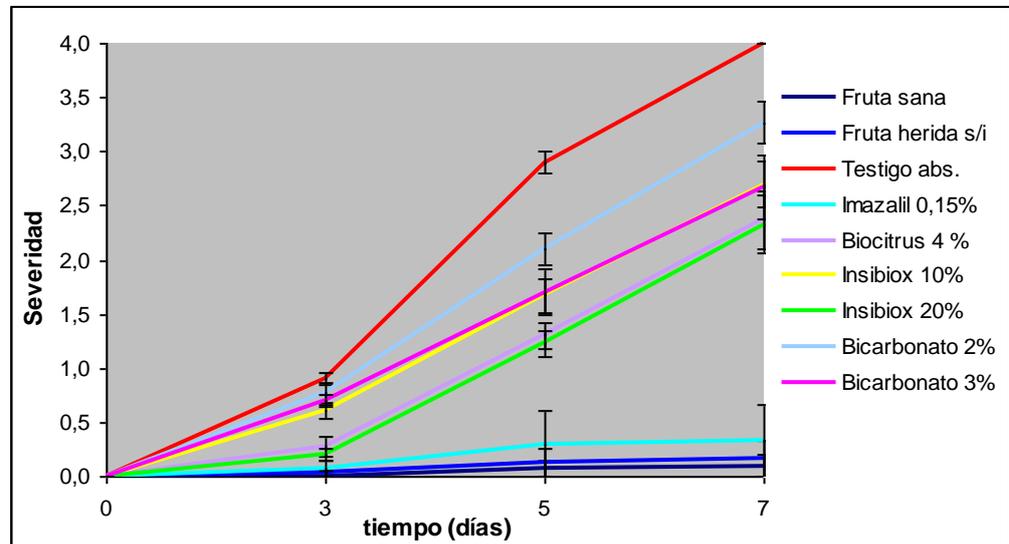


Figura 5.5. Evolución temporal de la enfermedad “moho verde de los cítricos” con distintos tratamientos de biocontrol (t 0h), imazalil y controles. (s/i) Sin inocular.

El tratamiento con bicarbonato de sodio al 2 %, presentó valores de severidad superiores a los registrados para la concentración de 3 % y fue la curva epidemiológica más próxima al testigo. Asimismo, el tratamiento con bicarbonato de sodio 3 % presentó sus valores de severidad muy cercanos al extracto Insibiox 10 % y sus curvas fueron semejantes. Este mismo comportamiento presentaron también los extractos de Biocitrus® 4 % e Insibiox 20 % y fueron los que más se apartaron del testigo. Asimismo puede observarse que el control imazalil presentó bajos valores de severidad y se mantuvo constante a lo largo del tiempo siguiendo el mismo comportamiento que los controles fruta sana y fruta herida sin inocular (Fig. 5.5).

En la Figura 5.6 se muestra, a modo de ejemplo, el efecto observado sobre la disminución de la severidad de “moho verde de los cítricos” sobre limones, para uno de los tratamientos empleados (Biocitrus® 4%). En la misma puede observarse las diferencias en grados de severidad logrados entre el tratamiento de biocontrol y el testigo absoluto en cada intervalo de tiempo, especialmente en el grado de esporulación alcanzada entre los tiempos 5 y 7 días post-inoculación.

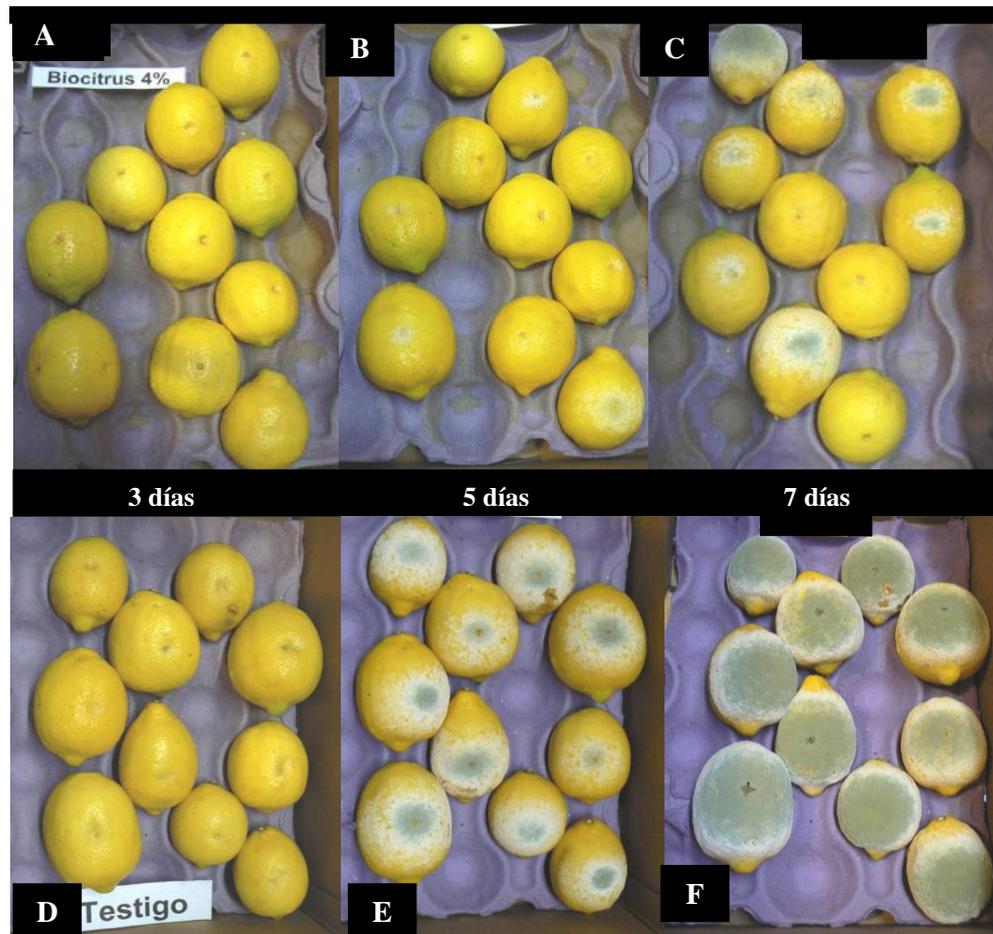


Figura 5.6. Efecto del tratamiento Biocitrus® (4 %), aplicado a t 0h, en distintos intervalos de tiempo, sobre la evolución de *P. digitatum* en limones artificialmente inoculados e incubados a 20 °C comparada con el testigo absoluto. A) Biocitrus® con 3 días post-inoculación, B) Biocitrus® con 5 días post-inoculación, C) Biocitrus® con 7 días post-inoculación D) Testigo con 3 días post-inoculación, E) Testigo con 5 días post-inoculación y F) Testigo con 7 días post-inoculación.

Asimismo, en la Figura 5.7 se aprecia el mismo comportamiento mencionado anteriormente. En dicha figura puede observarse los grados de severidad final (a los 7 días post-inoculación) alcanzados por los dos tratamientos (Biocitrus® 4% e Insibiox 20%) que mostraron mayores diferencias respecto al control. En la misma, se aprecia que los tratamientos alternativos de biocontrol no alcanzaron la esporulación completa del testigo, lo cual muestra claramente que estos productos interfirieron en el avance del patógeno.

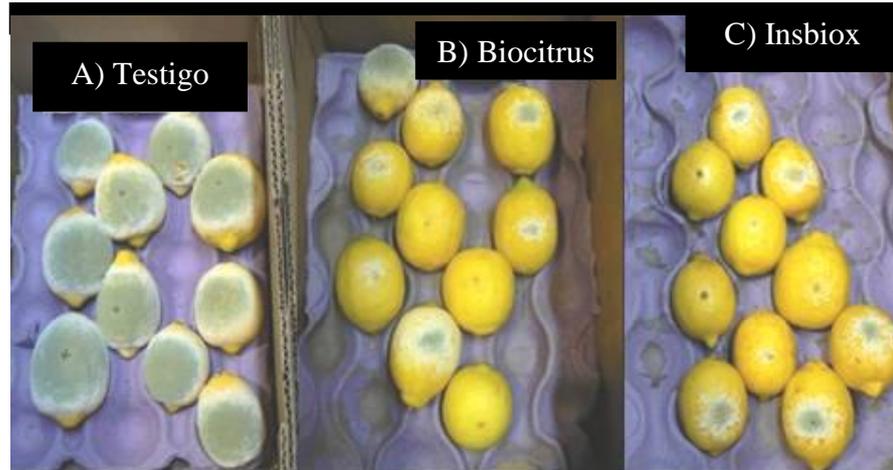


Figura 5.7. Severidad de la enfermedad “moho verde” sobre frutos de limón alcanzada con dos tratamientos de biocontrol en t 0h y el testigo, a los 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. A) Testigo, B) Biocitrus® 4 % y C) Insibiox 20 %.

5.4.1.2. Ensayo con inoculación y tratamiento posterior a las 18 h

De similar manera al ensayo descrito anteriormente, se aplicaron los mismos tratamientos pero dejando transcurrir 18 h entre la inoculación con el patógeno y la aplicación de los mismos.

Los resultados obtenidos en cuanto al parámetro incidencia de la enfermedad se muestran en la Figura 5.8. En la misma puede observarse que los tratamientos alternativos mostraron altos valores de incidencia, a excepción del tratamiento con bicarbonato de sodio (en concentraciones del 2 y 3 %), similares al experimento (t 0h) descrito anteriormente.

En este experimento, difirieron estadísticamente del testigo (I = 100 %) los tratamientos con Insibiox 20 % (I = 70 %), mezcla de ácidos orgánicos (I = 86,7 %) y bicarbonato de sodio en las tres concentraciones evaluadas (Fig. 5.8). Los tratamientos con bicarbonato de sodio 2 y 3 % fueron los más efectivos, reduciendo la incidencia de la enfermedad a la mitad aproximadamente (I = 53,3 % e I = 50 %, respectivamente). Entre ambas concentraciones de bicarbonato de sodio no hubo diferencias estadísticas, es decir que las dos fueron igualmente eficientes, pero sí difirieron de la concentración más baja (1 %), la cual tuvo menor control de la enfermedad (I = 86,7 %). Este último tratamiento (bicarbonato de sodio 1%) alcanzó los mismos valores de incidencia registrados para los tratamientos con mezcla de ácidos orgánicos e Insibiox 10 y 20 %.

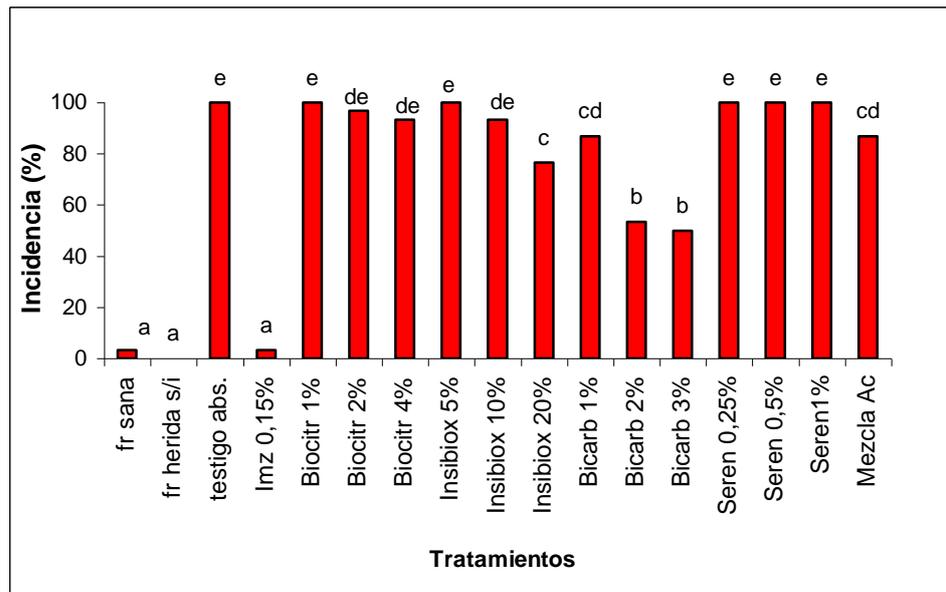


Figura 5.8. Incidencia (%) de “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón, con distintos tratamientos de biocontrol, imazalil y controles en t 18h, a los 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. (s/i) Sin inocular. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$).

En la Figura 5.9 se muestran los valores obtenidos para el parámetro severidad, donde puede apreciarse que al igual que en el experimento de control directo a t 0h, la misma fue reducida con los diferentes tratamientos alternativos de biocontrol, respecto al testigo. Sin embargo, en estos experimentos (t 18h) dicha reducción fue más significativa y marcada, comparada con los experimentos de control directo en t 0h (ver Fig. 5.4).

Analizando estadísticamente el parámetro severidad, podemos concluir que todos los tratamientos de control directo en t 18h difirieron significativamente respecto al testigo absoluto, excepto Serenade® 0,5 % (Fig. 5.9). Entre éstos, los tratamientos bicarbonato de sodio 3 y 2 % e Insibiox 20% fueron los que más redujeron la severidad enfermedad alcanzando los valores $S = 1,0$; $S = 1,2$ y $S = 1,4$, respectivamente y sin presentar diferencias estadísticas entre sí.

Los tratamientos con Biocitrus® 2 % ($S = 1,9$) y 4 % ($S = 1,7$), mezcla de ácidos ($S = 1,7$) e Insibiox 10 % ($S = 2,0$) presentaron un comportamiento similar reduciendo la severidad de la enfermedad sin diferencias estadísticas entre sí.

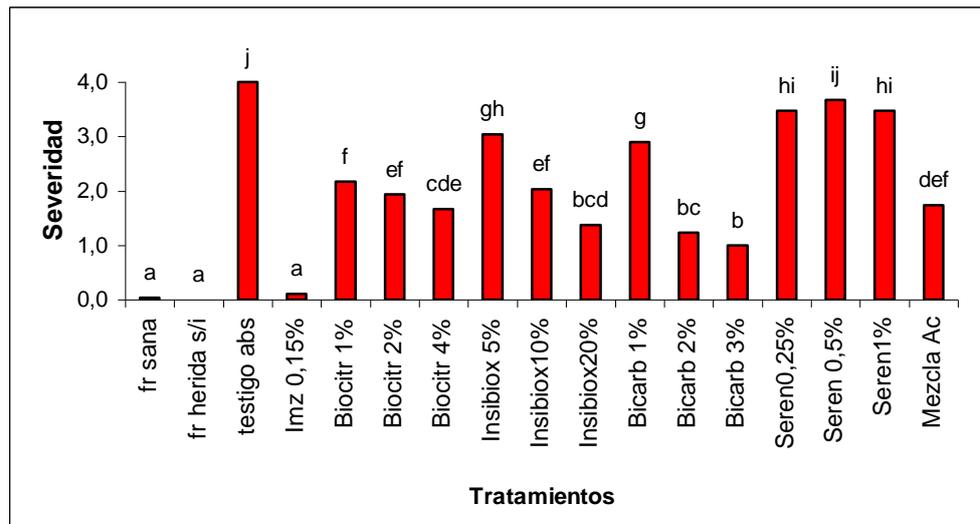


Figura 5.9. Severidad de “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón, con distintos tratamientos de biocontrol, imazalil y controles en t 18h, a los 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. (s/i) Sin inocular. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$).

Al igual que en el experimento de control directo en t 0h, y a pesar de las diferencias encontradas entre los biocontroladores y el testigo absoluto, ninguno de los tratamientos alternativos alcanzaron el control realizado por el fungicida imazalil (control positivo de inhibición), que fue eficiente para controlar la incidencia y la severidad de la enfermedad (Fig. 5.8 y Fig. 5.9). A la vez que este control químico no difirió estadísticamente de los controles fruta sana y fruta herida sin inocular.

En la Figura 5.10 se muestra la evolución de la enfermedad en el tiempo para los tratamientos que difirieron del testigo y los valores de severidad alcanzados por éstos, en cada intervalo de tiempo posterior a la inoculación.

Analizando estadísticamente los tratamientos en los distintos intervalos de tiempo (Fig. 5.10), podemos observar que a los 3, 5 y 7 días post-inoculación todos los tratamientos difirieron ampliamente del testigo y con valores bajos de severidad. Al final del ensayo (7 días post-inoculación) el tratamiento con bicarbonato de sodio (2 y 3 %) fue el más efectivo y redujo la severidad entre un 70 y un 75 % respecto del testigo. Este tratamiento, a excepción para Insibiox 20 %, fue estadísticamente diferente del resto de los tratamientos de biocontrol. Los tratamientos con Serenade® 0,5 y 1 %, no se consideraron en este análisis por presentar altos valores de severidad (superiores a 3,5).

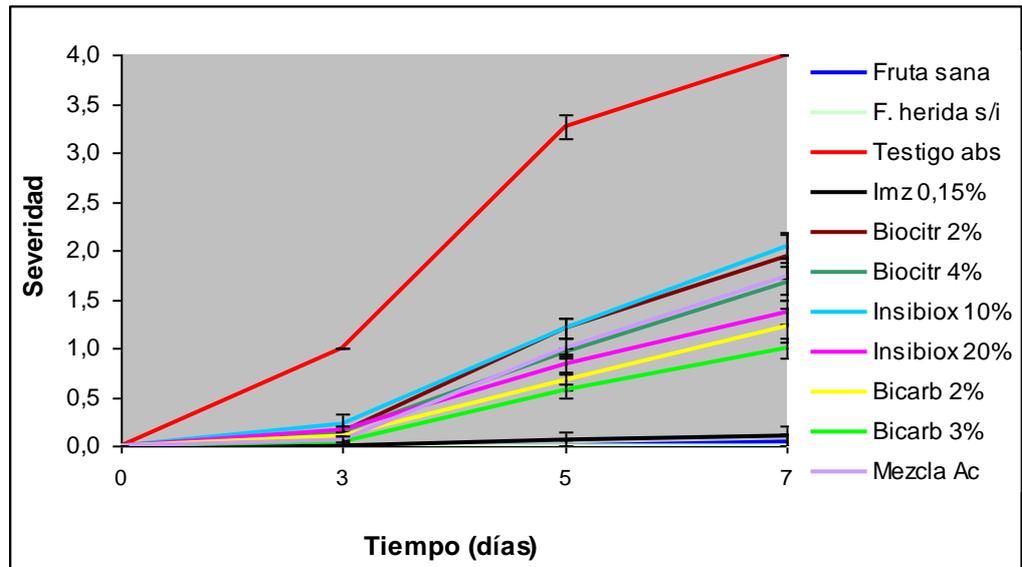


Figura 5.10. Evolución de la enfermedad “moho verde de los cítricos” en el tiempo con distintos tratamientos de biocontrol (t 18h), imazalil y controles. (s/i) Sin inocular.

Como se mencionó anteriormente, los tratamientos disminuyeron significativamente la velocidad de avance de la enfermedad respecto al testigo y entre éstos, la curva del tratamiento con bicarbonato de sodio 3 % fue la que más se apartó del mismo, alcanzando valores bajos de severidad con un leve incremento en el tiempo. Asimismo, el control químico imazalil tuvo muy bajos valores de severidad y se mantuvo constante en el tiempo siguiendo el mismo comportamiento que los controles fruta sana y fruta herida sin inocular (Fig. 5.10).

El efecto marcado en la disminución de la severidad que se registró para todos los tratamientos aplicados en t 18h, se ejemplifica en la Figura 5.11 donde puede observarse claramente las diferencias registradas para cada intervalo de evaluación (3, 5 y 7 días), entre el tratamiento de biocontrol (Biocitrus® 4 %) y el testigo absoluto. Es importante destacar que en este experimento los grados de severidad alcanzados fueron inferiores a los del experimento en t 0h (ver Fig. 5.6).

El testigo indica la evolución normal de la enfermedad en el tiempo y nos permite comparar la acción ejercida por el tratamiento de biocontrol, reflejada en el retraso de la enfermedad. Así por ejemplo, mientras el testigo alcanzó la esporulación máxima ($S = 4,0$) a los 7 días post-inoculación, el tratamiento presentado en la Figura 5.11, a este mismo tiempo, registró una severidad promedio de $S = 1,7$ que corresponde a la fase de aparición del micelio (ver Cap.2, apartado 2.4.3).

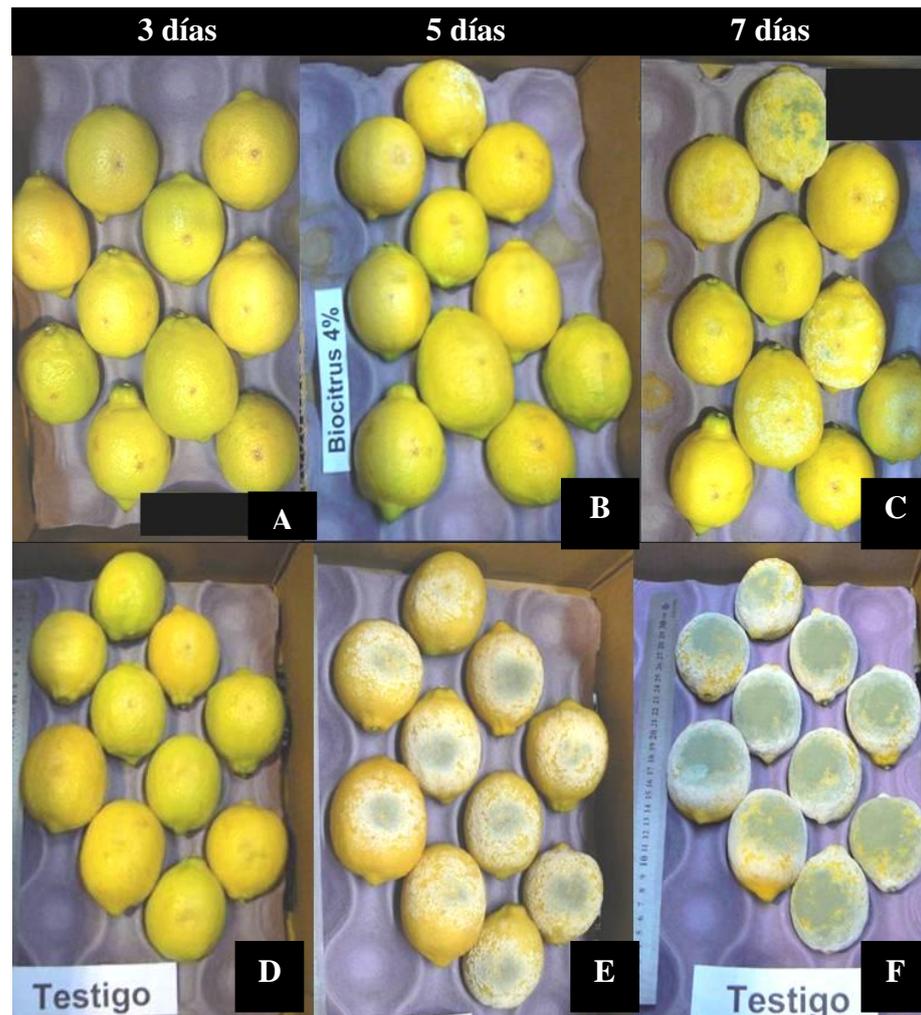


Figura 5.11. Efecto del tratamiento con Biocitrus® (4 %) en el tiempo (t 18h), sobre la evolución de *P. digitatum* en limones artificialmente inoculados e incubados a 20 °C comparado con el testigo absoluto tratado con agua. A) Biocitrus® 3 días post-inoculación, B) Biocitrus® 5 días post-inoculación, C) Biocitrus® 7 días post-inoculación D) Testigo a los 3 días post-inoculación, E) Testigo a los 5 días post-inoculación y F) Testigo a los 7 días post-inoculación.

En la Figura 5.12 se muestra el comportamiento observado de disminución de la severidad, para diferentes tratamientos y el testigo (a los 7 días post-inoculación). En la misma puede apreciarse que el tratamiento con bicarbonato de sodio 3 % (S = 1,0) presentó grados bajos de severidad (mostrando frutas sanas y en grado de micelio y esporulación inicial) respecto al testigo que alcanzó la máxima severidad (S = 4,0). Igualmente en los tratamientos con Biocitrus® 2 % (S = 1,9) y 4 % (S = 1,7), mezcla de ácidos orgánicos (S = 1,7) e Insibiox 20% (S = 1,4), se observaron frutas en grados de micelio y baja esporulación.

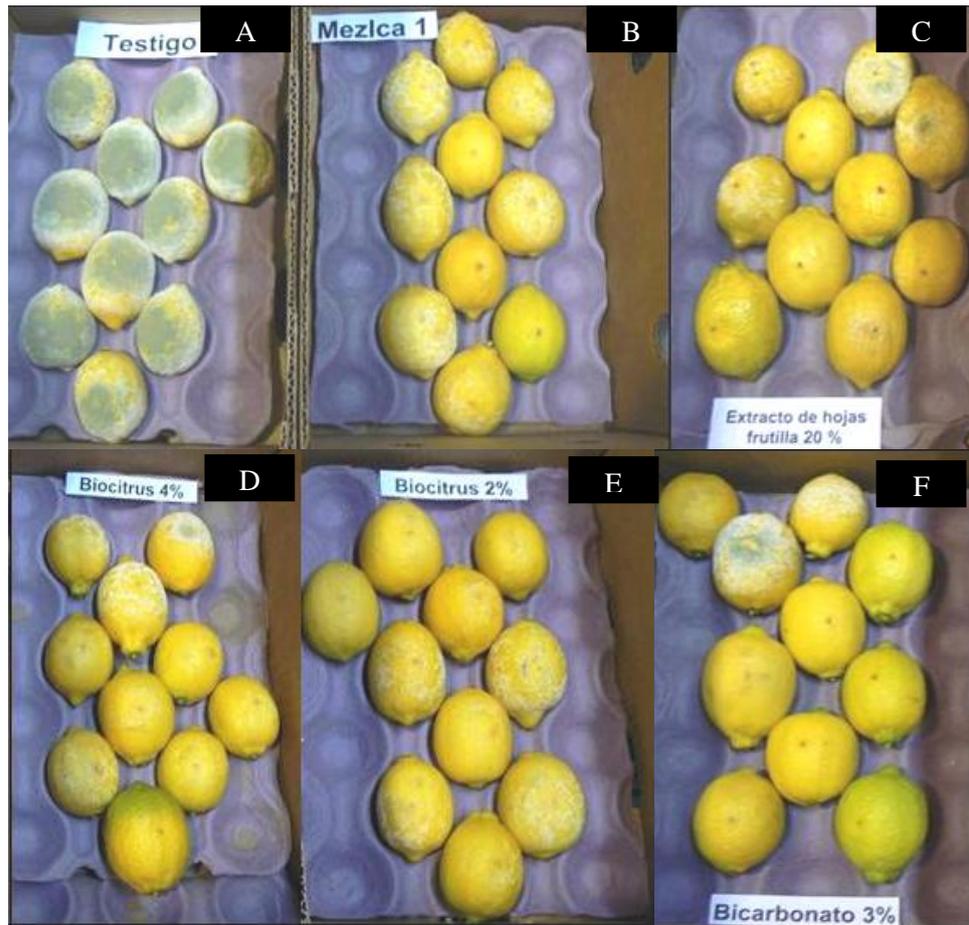


Figura 5.12. Severidad del “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón para los distintos tratamientos de biocontrol en t 18h, luego de 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. A) Testigo, B) Mezcla de ácidos orgánicos, C) Insibiox 20 %, D) Biocitrus® 4 %, E) Biocitrus® 2 % y F) Bicarbonato de sodio 3 %.

5.4.2. Ensayo de inducción de defensa con tratamientos y posterior inoculación a las 48 h

5.4.2.1 Selección de metodología apropiada para posteriores tratamientos de inducción de defensa

En la Figura 5.13 se muestran los resultados obtenidos en la prueba preeliminar de defensa inducida con el tratamiento de bicarbonato de sodio. Puede observarse, en dicha figura, que el tratamiento bicarbonato de sodio 3 %, con herida e inoculado a las 48 h (E), difirió significativamente del testigo absoluto (C). Este tratamiento fue muy eficiente para controlar la enfermedad y la redujo en un 90 % ya que tuvo valores bajos de incidencia ($I = 10\%$) y fue estadísticamente similar al control fruta sana sin inocular (A) ($I = 5\%$). Por otra parte, el tratamiento bicarbonato de sodio 3 %, fruta sana e inoculado a las 48 h (D) presentó la máxima incidencia ($I = 100\%$) sin diferir estadísticamente del testigo absoluto y del control fruta sana, tratado con agua e inoculado a las 48 h (B).

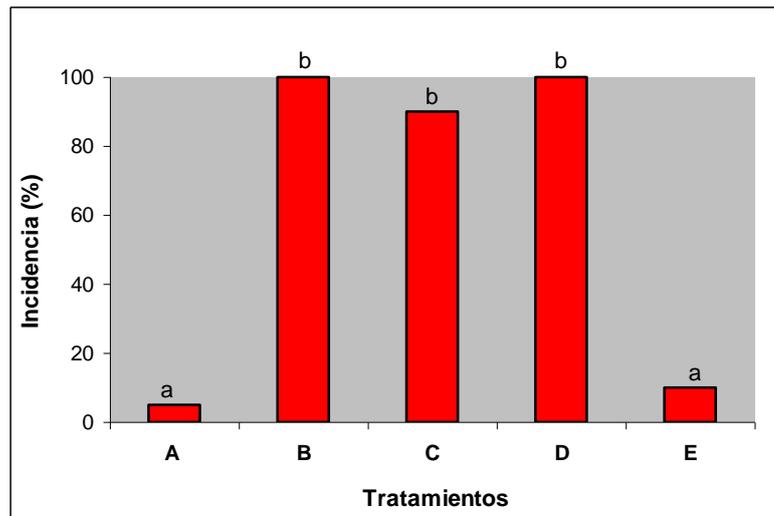


Figura 5.13. Incidencia (%) de “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón con tratamientos inductivos, a los 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. A) Control fruta sana sin inocular, B) Control fruta sana, tratada con agua e inoculada a las 48 h, C) Control fruta herida, tratada con agua e inoculada a las 48 h (testigo absoluto), D) Fruta sana, tratada con bicarbonato de sodio 3 % e inoculada a las 48 h y E) Fruta herida, tratada con bicarbonato de sodio 3 % e inoculada a las 48 h. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$).

La evolución de la enfermedad en el tiempo (Fig. 5.14) fue reducida significativamente con el tratamiento de bicarbonato de sodio 3 % con herida e inoculado a las 48 h (E). La severidad a los 15 días permaneció muy baja ($S = 0,7$). Este tratamiento tuvo un comportamiento similar al control de fruta sana.

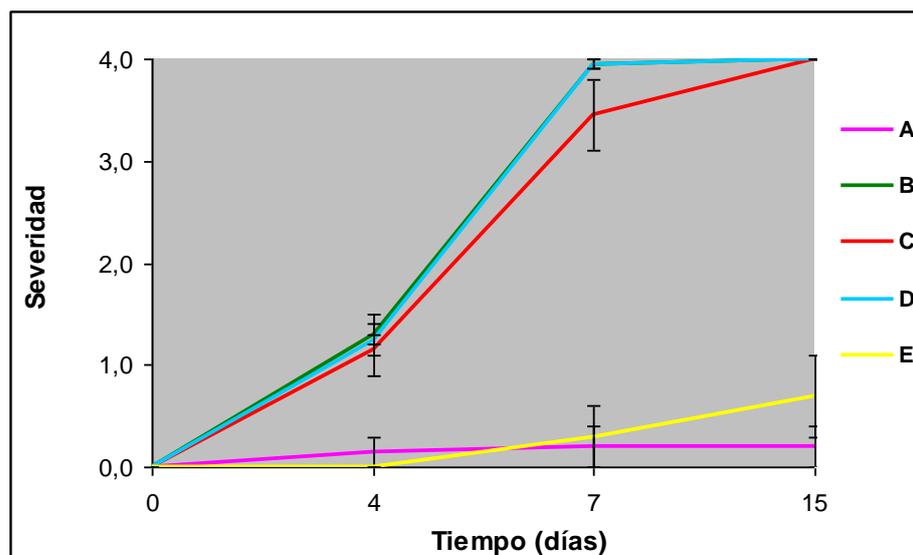


Figura 5.14. Evolución temporal de “moho verde de los cítricos” con tratamientos inductivos: A) Control fruta sana sin inocular, B) Control fruta sana, tratada con agua e inoculada a las 48 h, C) Control fruta herida, tratada con agua e inoculada a las 48 h (testigo absoluto), D) Fruta sana, tratada con bicarbonato de sodio 3 % e inoculada a las 48 h y E) Fruta herida, tratada con bicarbonato de sodio 3 % e inoculada a las 48 h.

Estos resultados nos estarían indicando que la presencia de bicarbonato de sodio sobre la herida induciría algún mecanismo que posteriormente protege a la fruta del ataque del patógeno al impedir su establecimiento. Cuando el bicarbonato de sodio se aplicó a frutas sanas y posteriormente se inoculó con el patógeno, no pudo evitarse el desarrollo de la enfermedad. Similares resultados fueron reportados por Usall *et al.* (2008) que observaron que tratamientos con carbonato de sodio previos al inóculo, aplicados en nuevas heridas (realizadas durante la inoculación) no impidieron completamente el desarrollo de la enfermedad. Asimismo, Baudoin y Eckert (1985) reportaron que heridas realizadas sobre la corteza de limones tornaron a los frutos resistentes a la infección, cuando inocularon con *Geotrichum candidum* entre 4 y 20 h después de herir.

De acuerdo a estos resultados obtenidos y en concordancia con otras metodologías descritas (Arras y Sanna, 1999; Arras *et al.*, 2005; Poppe *et al.*, 2003; Ballester, 2007; Usall *et al.*, 2008), en las que se emplearon tratamientos elicitors o preventivos con levaduras, termoterapia, cloruro de calcio, carbonatos y bicarbonato de sodio, aplicados sobre frutas heridas, se seleccionó la metodología de aplicación de los tratamientos con herida en el experimento desarrollado a continuación (apartado 5.4.2.2).

5.4.2.2. Ensayo de inducción de defensa o tratamientos preventivos sobre frutos de limón (t 48h)

Los resultados preliminares sugirieron que la aplicación de los tratamientos previos (t 48h) a la inoculación, presentaron una menor incidencia de la enfermedad que en los experimentos de biocontrol curativos donde el patógeno se inoculó primero y luego se realizó el tratamiento.

En la Figura 5.15 se muestran los resultados obtenidos de incidencia de la enfermedad a los 7 días de evaluación, para los tratamientos aplicados 48 h previas al inóculo. Los tratamientos con Biocitrus® 2 %, Insibiox 10 %, bicarbonato de sodio 3 %, Serenade® 1 % e imazalil 0,05 % difirieron significativamente del testigo absoluto y del control (fruta herida inoculada desde el inicio) y redujeron la incidencia, mientras que el tratamiento con imazalil 0,001 % y el tratamiento con mezcla de ácidos no presentaron diferencias estadísticas respecto al testigo absoluto.

Analizando estadísticamente los resultados para los tratamientos inductivos, la aplicación de bicarbonato de sodio 3 % fue muy efectiva y presentó valores bajos de incidencia ($I = 3,33$ %), con un control de 96,7 % de la enfermedad. Este tratamiento fue similar a los controles fruta sana y fruta herida sin inocular y difirió significativamente del resto de los tratamientos (Fig. 5.15.), mientras que el tratamiento con Serenade® 1 % que había manifestado valores de incidencia muy altos ($I = 100$ %) en los ensayos de biocontrol directo (t 0h y t 18h) presentó en este experimento una incidencia de 43,3 % respecto al testigo absoluto (Fig. 5.15.). El control ejercido por este tratamiento no difirió estadísticamente del fungicida químico imazalil 0,05 % ($I = 36,67$ %). Por otra parte, la incidencia registrada para el tratamiento con Insibiox 10 % ($I = 60$ %) fue estadísticamente similar a la del tratamiento con Biocitrus® 2 % ($I = 70$ %), a la vez que éste último no difirió de los tratamientos con mezcla de ácidos orgánicos ($I = 86,7$ %) ni de imazalil 0,001 % ($I = 83,3$ %) (Fig. 5.15.).

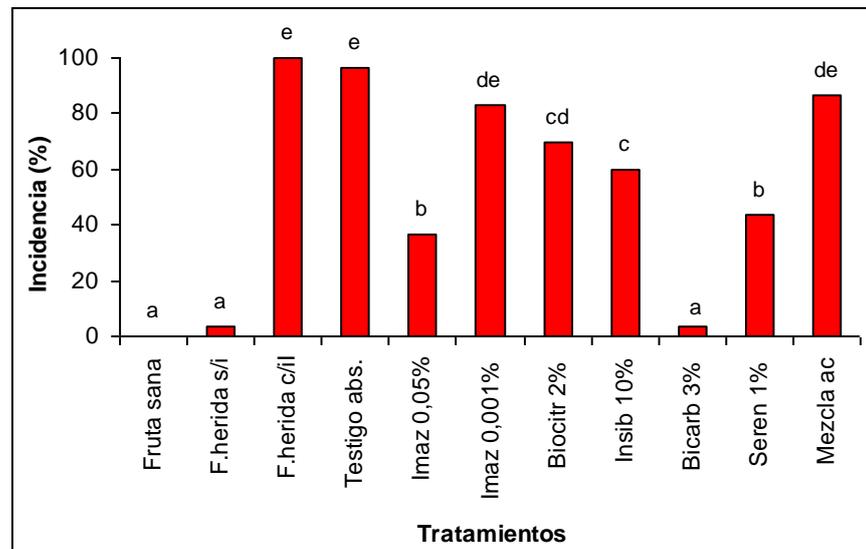


Figura 5.15. Incidencia (%) de “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón, con distintos tratamientos de inducción, imazalil y controles en t 48h, a los 7 días post-inoculación e incubados a 20 °C. (s/i) Sin inocular, (c/i) con inóculo desde el inicio. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$).

Al igual que en los experimentos curativos (t 0h y t 18h), la severidad de la enfermedad fue reducida significativamente en todos los tratamientos, excepto en el tratamiento con mezcla de ácidos orgánicos ya que en este caso se registró un marcado aumento en la esporulación (Fig. 5.16).

El tratamiento con bicarbonato de sodio 3 % fue el de más baja severidad ($S = 0,1$) difiriendo significativamente del resto de los tratamientos y fue similar a los controles fruta sana y fruta herida sin inocular. Este tratamiento fue efectivo para controlar la enfermedad y su acción fue superior a la ejercida por el fungicida químico imazalil (0,05 %) (Fig. 5.16). El tratamiento con bicarbonato de sodio 3 % en los experimentos anteriores había presentado mayores valores de severidad ($S = 2,7$ en $t 0h$ y $S = 1,0$ en $t 18h$). Estos resultados muestran claramente como mejoró su acción de control cuando su aplicación fue previa a la inoculación respecto a los tratamientos de biocontrol.

El tratamiento con Serenade® 1 % también redujo marcadamente la severidad ($S = 1,1$) respecto al testigo absoluto ($S = 3,3$) y difirió significativamente del resto de los tratamientos inductivos. Sin embargo, este efecto no alcanzó el control del tratamiento bicarbonato de sodio 3-% ni del fungicida químico imazalil 0,05 % ($S = 0,6$). Sin embargo, Serenade® también mejoró marcadamente su acción en este experimento, dado que previamente (en $t 0h$ y $t 18h$) había arrojado valores altos de severidad ($S = 3,7$ y $S = 3,5$, respectivamente).

La severidad observada para el tratamiento con Insibiox 10 % ($S = 1,7$) fue similar a la de Biocitrus® 2 % ($S = 2,0$), mientras que el tratamiento con mezcla de ácidos orgánicos no difirió estadísticamente del imazalil 0,001 % ni del testigo absoluto (Fig. 5.16), no teniendo efecto alguno sobre la enfermedad.

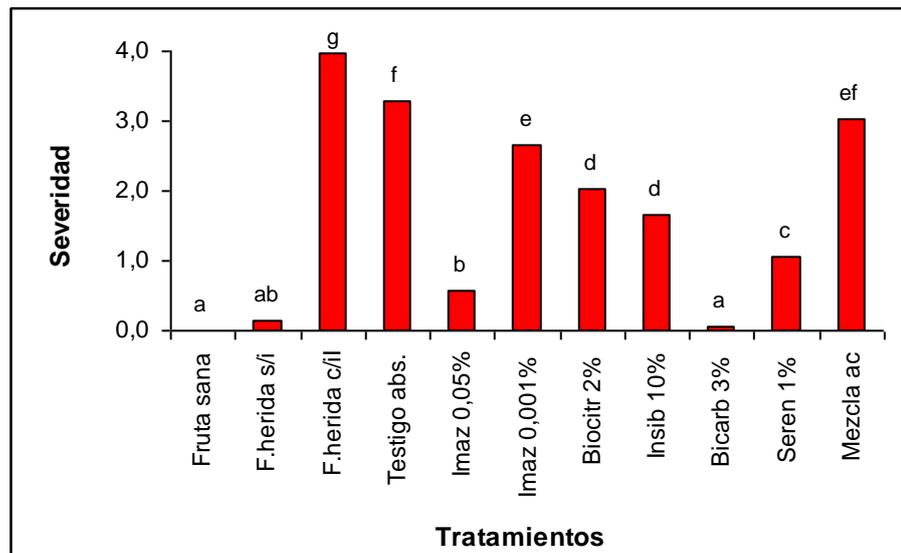


Figura 5.16. Severidad de “moho verde de los cítricos” sobre frutos de limón, con diferentes tratamientos de inducción, imazalil y controles en $t 48h$, a los 7 días post-inoculación e incubados a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. (s/i) Sin inocular, (c/il) con inóculo desde el inicio. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$).

En la Figura 5.17 se muestran los valores de severidad logrados a diferentes intervalos de tiempo para los tratamientos aplicados en $t 48 h$. A los 3 y 5 días post-inoculación todos los tratamientos, excepto mezcla de ácidos orgánicos e imazalil 0,001 %, difirieron significativamente del testigo. En este intervalo de tiempo, el tratamiento con bicarbonato de sodio 3 % fue el más efectivo ($S = 0,0$), difiriendo de todos los demás tratamientos, ya que no se

desarrolló la enfermedad y por lo tanto fue estadísticamente similar a los controles fruta sana y fruta herida sin inocular. Mientras que, a este tiempo, los tratamientos con Biocitrus® 2 %, Insibiox 10 % y Serenade® 1 % redujeron la severidad con valores similares y no hubo diferencias estadísticas entre ellos. Finalmente, a los 7 días post-inoculación, el tratamiento con bicarbonato de sodio 3 % mantuvo su acción sobre la enfermedad ($S = 0,1$) difiriendo significativamente del resto de los tratamientos. Luego de este tratamiento, se destacó Serenade® 1 % como el más efectivo ($S = 1,1$). El resto de los tratamientos tuvo un comportamiento intermedio mientras que la mezcla de ácidos orgánicos registró la mayor severidad de la enfermedad.

Con el fungicida imazalil a 0,05 % se registraron bajos valores de severidad siguiendo el mismo comportamiento de los controles fruta sana y fruta herida sin inocular, mientras que a la concentración de 0,001 % (50 veces menor) perdió su acción inhibitoria registrando altos valores de severidad e incidencia (Fig. 5.17.).

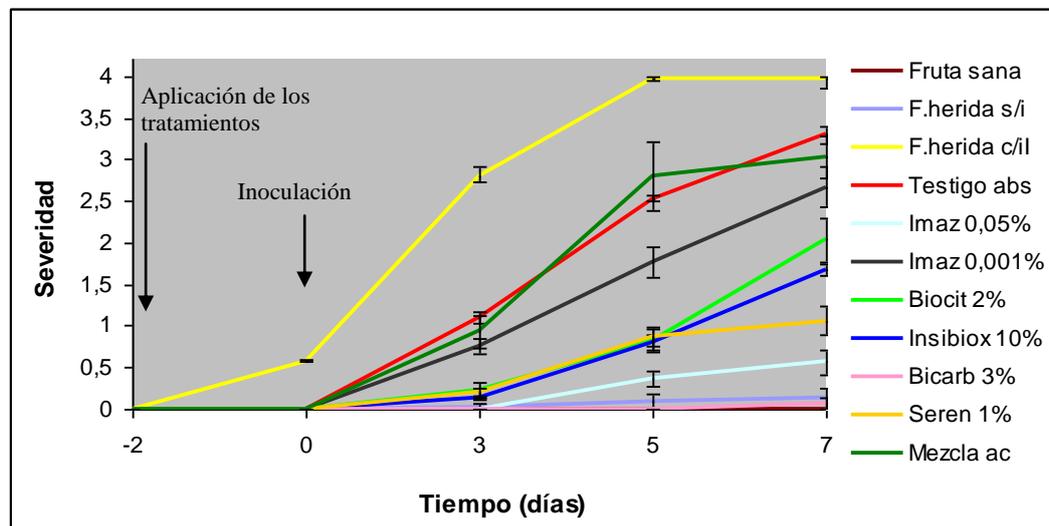


Figura 5.17. Evolución temporal del "moho verde de los cítricos" con diferentes tratamientos inductivos (t 48h), imazalil y controles. (s/i) Sin inocular, (c/il) con inóculo desde el inicio.

En la Figura 5.18 se muestran las diferencias registradas para cada intervalo de evaluación (3, 5 y 7 días), entre el tratamiento con bicarbonato de sodio 3 % y el testigo absoluto. En este experimento, el tratamiento con bicarbonato de sodio protegió a la fruta del posterior ingreso del patógeno y por lo tanto previno la enfermedad. Este resultado es concordante también con el encontrado en los experimentos preeliminares para selección de metodología (ver apartado 5.4.2.1), donde el bicarbonato de sodio aplicado sobre frutas heridas había prevenido la infección posterior por *P. digitatum*. En el resto de los tratamientos inductivos también se observó un efecto en la reducción de la severidad de la enfermedad, pero con una menor acción de control que el tratamiento con bicarbonato de sodio.

Estos resultados sugieren que la herida realizada conjuntamente con la aplicación de bicarbonato de sodio induce en la fruta cambios estructurales y/o fisiológicos que le permiten resistir a la infección posterior a las 48h.

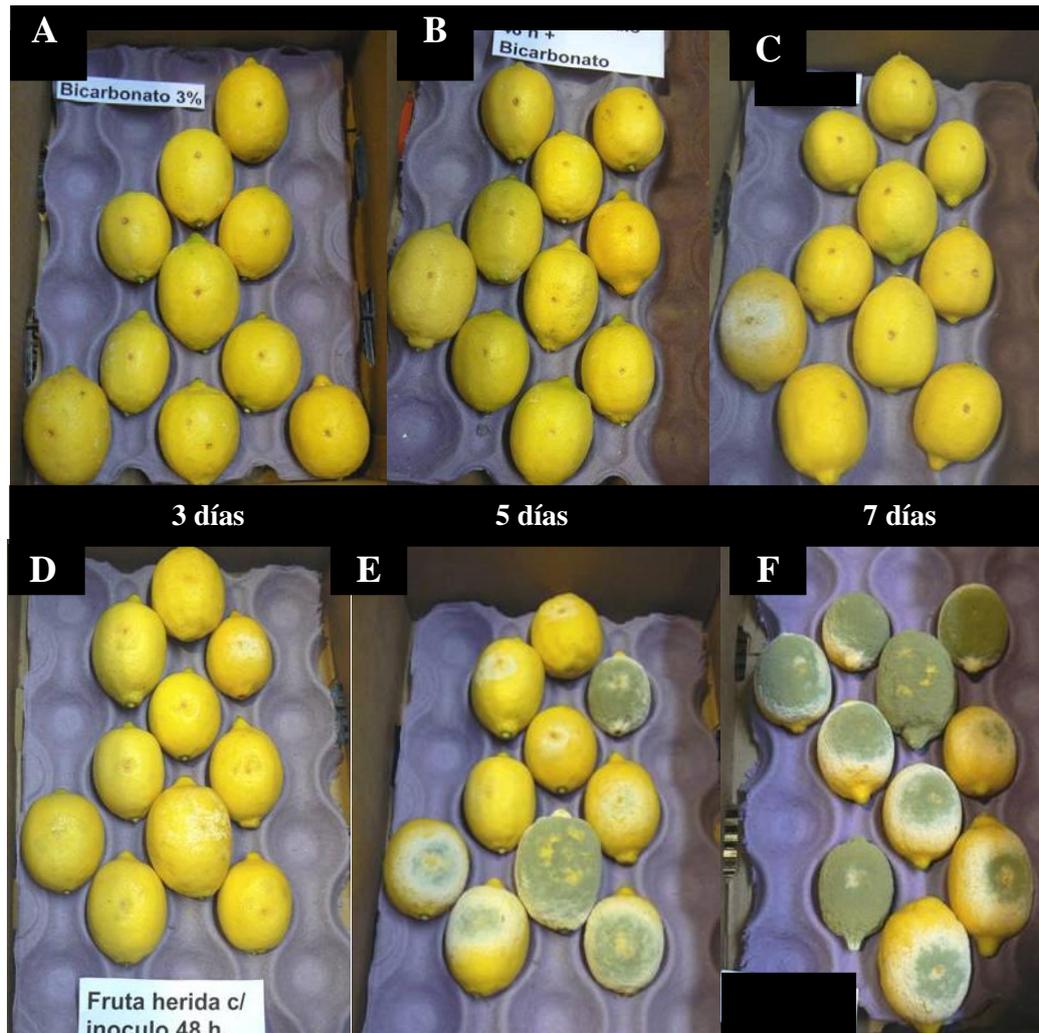


Figura 5.18. Efecto del tratamiento con bicarbonato de sodio (3 %) en el tiempo (t 48h), sobre la evolución de *P. digitatum* en limones artificialmente inoculados e incubados a 20 °C comparados con el Testigo absoluto tratado con agua. A) Bicarbonato de sodio, 3 días post-inoculación, B) Bicarbonato de sodio, 5 días post-inoculación, C) Bicarbonato de sodio, 7 días post-inoculación, D) Testigo, 3 días post-inoculación, E) Testigo, 5 días post-inoculación y F) Testigo, 7 días post-inoculación.

En la Figura 5.19, se muestra el efecto de disminución de la severidad (a los 7 días) alcanzados en los tratamientos inductivos que mayor acción tuvieron sobre la enfermedad, el testigo absoluto ($S = 3,3$) y el control fruta herida inoculada inicialmente ($S = 4,0$). En la misma, puede observarse que los tratamientos bicarbonato de sodio (3 %) y Serenade® (1 %) presentaron bajos grados de severidad respecto de los controles.

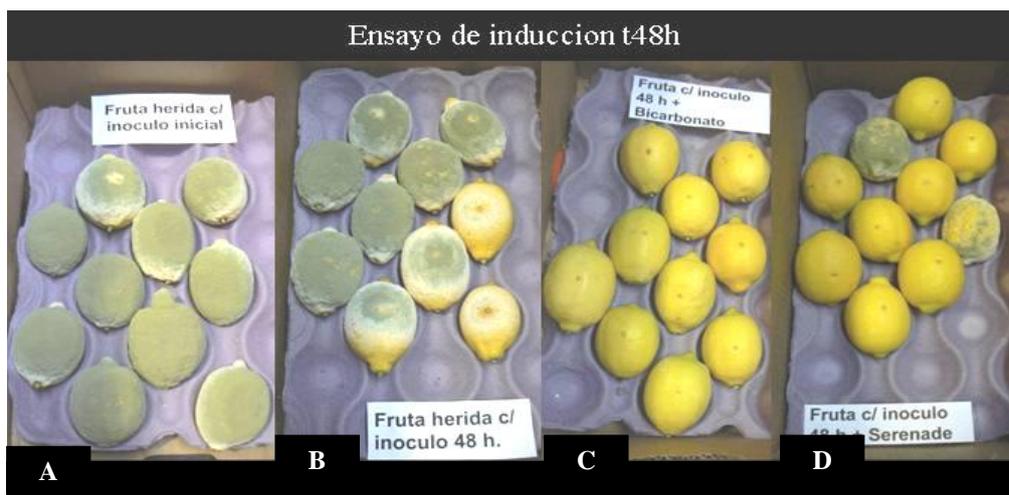


Figura 5.19. Grados de severidad alcanzados en los distintos tratamientos de inducción a los 7 días desde inoculación. A) Control fruta herida con inóculo desde el inicio, B) Testigo absoluto (fruta herida inoculada a las 48 h), C) Fruta tratada con bicarbonato de sodio 3 % y D) Fruta tratada con Serenade® 1 %.

En todos estos experimentos *in vivo* (sobre los frutos de limón), la evaluación de la enfermedad se realizó utilizando la escala de severidad propuesta en el Capítulo 2 (apartado 2.4.3), y esto nos permitió detectar diferencias, ya que si sólo se consideraba el parámetro incidencia no habría sido posible detectar el potencial de acción de los tratamientos alternativos. Los resultados encontrados muestran que la escala de severidad fue adecuada para evaluar el efecto positivo de los diferentes productos biológicos. Smilanick *et al.* (2005), Kinay *et al.* (2007), Palou *et al.* (2007) y Torres *et al.* (2007) también utilizaron una escala de daños para evaluar la severidad de la enfermedad “moho verde de los cítricos”. Sin embargo, otros autores como Obagwu y Korsten (2003) y Venditti *et al.* (2005) evaluaron la enfermedad a través de la incidencia, considerando fruta infectada sólo cuando fueron visibles los signos del patógeno (micelio o esporulación), sin tener en cuenta el síntoma inicial (ablandamiento acuoso). En cambio, en nuestra escala sí se incluyó este síntoma y por lo tanto, también, en el cálculo de la incidencia y severidad de la enfermedad. De similar manera a nuestros resultados, Palou *et al.*, (2007), encontraron valores elevados de incidencia (85 %) de *P. digitatum* y *P. italicum* luego de la aplicación de tratamientos de diferentes dosis de radiación (rayos X) sobre mandarinas, pero sin embargo cuando evaluaron la severidad de la enfermedad, hallaron una significativa reducción de esporulación para ambos patógenos luego de aplicar dicho tratamiento.

Cuando los tratamientos fueron aplicados simultáneamente con la inoculación del patógeno (t 0h), no fueron eficientes para controlar la incidencia de la enfermedad ($I > 94$ %) y sólo disminuyeron en algunos casos la velocidad del desarrollo de la misma. Cuando estos tratamientos se realizaron dejando transcurrir 18 h entre inoculación y la aplicación de los mismos, si bien tuvieron altos valores de incidencia ($I > 84$ %) mejoraron marcadamente su capacidad de controlar la severidad, retrasando y en algunos casos evitando la esporulación del patógeno. En concordancia con estos resultados, Neri *et al.* (2006b), aplicando vapores de trans-2-hexanal para el control de *P. expansum* en

manzanas, no encontraron control cuando la aplicación se realizó inmediatamente a la inoculación. En cambio cuando dejaron transcurrir entre 24 y 72 h posteriores a la inoculación, el tratamiento redujo significativamente la infección. Stange y Eckert (1994) también encontraron mejor control de *P. digitatum* sobre limones, dejando transcurrir 18 h entre la inoculación y la aplicación de un período de curado de 48 h a 32 °C.

El período de germinación de los conidios de *Penicillium sp.* se inicia alrededor de 15 a 24 h posteriores a la inoculación (Neri *et al.*, 2006a). Posiblemente debido a esto, los productos biológicos evaluados en t 18h, mejoraron su acción dado que actuaron sobre el conidio germinando o recién germinado. Stange y Eckert (1994) y Neri *et al.* (2006b) sugieren que esta etapa o fase sería la más sensible y propicia al control, que los conidios sin germinar (fase más resistente).

Sin embargo, los altos valores encontrados de incidencia de la enfermedad en los distintos experimentos, muestran la falta de acción erradicante o curativa de estas diferentes alternativas biológicas evaluadas. Esto constituye, tal como lo expresan numerosos autores, la mayor limitante de los métodos biológicos y que por sí solas estas alternativas no son suficientes para garantizar el control total de las enfermedades de poscosecha (El-Ghaouth, 1997; Fajardo *et al.*, 1998; Janisiewicz y Korsten, 2002; Spadaro y Gullino, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Conway *et al.*, 2007; Usall *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2009). Además, Janisiewicz y Korsten (2002) sugieren que los sistemas de frutas cítricas parecen ser menos propensos a los tratamientos de biocontrol que los sistemas de frutas pomoideas, cuya conservación se realiza en cámaras frigoríficas. La combinación de microorganismos antagonistas con otros métodos de control parece ser la técnica apropiada para superar esto (Janisiewicz y Korsten, 2002).

Lima *et al.* (1999), sugieren que la interacción compleja resultante entre el antagonista, el patógeno, el hospedero y el ambiente, pueden afectar significativamente la actividad inhibitoria de los microorganismos en el control biológico de las enfermedades de poscosecha.

La bacteria *Bacillus subtilis* está citada como un antagonista para el control de *P. digitatum* y *P. italicum* en poscosecha de citrus (Sharma *et al.*, 2009). Sin embargo, en esta tesis la cepa SQT 713 de *B. subtilis* (Serenade®) en los experimentos de control directo (t 0h y t 18h) no mostró acción sobre el patógeno (I = 100 %). Asimismo Fogliata *et al.* (2000), evaluaron con una metodología similar a la empleada en esta tesis, la levadura *Candida oleophila* sobre frutos de limón con cepas de *P. digitatum* (sensible y resistentes a imazalil) y no encontraron control sobre la enfermedad, mostrando también un 100 % de podredumbre, independientemente de la cepa con la que había sido inoculada la fruta.

El biofungicida Serenade® había resultado ser muy eficiente en muy bajas concentraciones, en los experimentos *in vitro*, con una fuerte acción inhibitoria (ver Cap. 4, apartado 4.4.1), en contraposición con los resultados encontrados *in vivo*. La falta de correlación entre los resultados *in vitro* con los de experimentos *in vivo* fue reportada por Fravel (2005). Spadaro y Gullino (2004) citan que una cepa de la bacteria *Brevibacillus subtilis*, que produce antibióticos, había dado buenos resultados *in vitro* pero la aplicación sobre frutos no fue satisfactoria ni comercialmente aceptable. El problema que ocurre cuando la experimentación pasa de un sistema *in vitro* a otro *in vivo* (en campo o en frutos),

puede deberse a que las condiciones son completamente diferentes y el microorganismo antagónico no prospera o es incapaz de actuar bajo esas condiciones, o bien en los experimentos *in vitro*, habrían operado otros mecanismos de acción (Arras y Arru, 1997). Estos autores concluyeron que por estos motivos de los numerosos microorganismos antagónicos estudiados, en laboratorio, sólo unos pocos fueron exitosos y llegaron a ser adecuados para su uso comercial en el control biológico.

A pesar de los resultados con Serenade® en los experimentos t 0h y t 18h, cuando este tratamiento se aplicó previo a la inoculación (t 48h) mejoró su acción marcadamente con una I = 43,3 %. Esto indicaría que los agentes de biocontrol deberían estar previamente en los frutos, en heridas, antes del establecimiento del patógeno. Esto es particularmente importante en los microorganismos antagonistas que actúan por competición de espacio y nutrientes y son pobres erradicantes una vez iniciada la infección (Janisiewicz y Korsten, 2002). Cuando los microorganismos antagónicos son aplicados antes que el patógeno, adquieren una ventaja competitiva y logran imponerse al mismo (Spadaro y Gullino, 2004; Bautista Baños, 2006; Usall *et al.*, 2008). Esto explicaría la diferencia de comportamiento observada en los experimentos de control directo (t 0h y t 18h) y en el de inducción (t 48h). En este último experimento, la bacteria (*B. subtilis*) estuvo 48 h antes del patógeno y por lo tanto posiblemente facilitó su multiplicación en el sitio de herida, además de permitir la inducción de algún otro tipo de mecanismo de defensa en el fruto. De similar manera, Umaña-Rojas (1996) reportó una disminución en la incidencia de la antracnosis de mango, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, al aplicar una cepa de *Bacillus sp.*, seis horas antes de inocular con el patógeno, mientras que no encontró ningún efecto cuando el antagonista se aplicó seis horas después de *Colletotrichum*.

Las sales de carbonato (4 y 6 %) y bicarbonato de sodio (2 y 3%) resultaron efectivas para controlar *P. digitatum* en naranjas y limones cuando fueron aplicadas 24 h post-inoculación, con un período de inmersión de 2 min y a temperaturas de 40 °C y 45 °C (Smilanick *et al.*, 1997; 1999). Sin embargo, en nuestros resultados solo encontramos un control parcial (I = 50 %) de la enfermedad luego de la aplicación del tratamiento bicarbonato de sodio (en las concentraciones 2 y 3 %), a temperatura ambiente y 18 h posteriores a la inoculación. Palou (2002) y Zhang *et al.* (2004) hallaron resultados similares a éstos, con valores de incidencia entre 40 y 60 %, cuando evaluaron sobre naranjas y mandarinas inoculadas con *P. digitatum* y posteriormente tratadas con bicarbonato de sodio 2 % a temperatura ambiente. Esta acción fue mejorada con la combinación de la levadura *Cryptococcus laurentii*, alcanzando niveles de control de la enfermedad de 93,3 % (Zhang *et al.*, 2004).

Teixidó *et al.* (2001) y Torres *et al.* (2007) mostraron que el bicarbonato de sodio por sí solo tiene una limitada actividad inhibitoria, es fungistático y su acción no es muy persistente, tal como se encontró en nuestros experimentos de control directo, y que por lo tanto es necesario combinarlo con otros métodos. Asimismo Torres *et al.* (2007) sugirió que los resultados obtenidos empleando esta sustancia, son altamente variables entre experimentos.

A pesar de los altos valores de incidencia registrados en el tratamiento de bicarbonato de sodio 3%, en los experimentos t 0h (I = 73,3 %) y t 18h (I = 50 %) cuando se aplicó este tratamiento y luego a las 48 h se inoculó con el patógeno, se evitó el desarrollo de la enfermedad controlando prácticamente la totalidad de la misma (96,7 %). Estos resultados concuerdan además con los encontrados en

los ensayos preeliminares, en los cuales la incidencia final alcanzada luego de 15 días fue de 10 %. De similar manera, Usall *et al.* (2008) encontraron que la incidencia de podredumbre verde, en diferentes frutas cítricas, fue significativamente más baja ($I = 10\%$) en los tratamientos de frutas previamente heridas y tratadas con carbonato de sodio, bicarbonato de sodio y una combinación de un agente de biocontrol más bicarbonato de sodio, comparada con las frutas heridas y sin tratar (control). Por otra parte, Venditti *et al.* (2005) obtuvieron resultados de control total de la enfermedad cuando aplicaron un tratamiento de bicarbonato de sodio 5 % sobre frutos cítricos y 7 días posteriores inocularon con *P. digitatum* y *P. italicum*. De manera similar a nuestros resultados, estos mismos autores reportaron sólo un 6 % de incidencia cuando se dejaron transcurrir 48 h entre el tratamiento y la inoculación.

El comportamiento observado del bicarbonato de sodio previo a la inoculación, podría ser explicado a través de la inducción de mecanismos de defensa, formación de compuestos como ligninas y suberina (Ballester, 2007), efecto de pH (alcalinización que inhibe las enzimas patogénicas) y/o cambios estructurales en la corteza de los frutos (Droby *et al.*, 1997; Smilanick *et al.*, 2005; Venditti *et al.*, 2005;). Smilanick *et al.* (1999) reportaron que los tratamientos con bicarbonato y carbonatos además de inhibir el desarrollo del patógeno, no causan daño de fitotoxicidad ni afectan la respuesta de defensas naturales de la fruta. Asimismo, el ión Ca^{2+} también juega un rol central en las vías de señalización, transducción y regulación de procesos metabólicos (Droby *et al.*, 1997). Prusky *et al.* (2004) pudieron concluir que el ambiente del pH, en el sitio de herida, es importante para la expresión génica durante la patogénesis y por lo tanto regula las enfermedades ocasionadas por *Penicillium sp.*

Los resultados obtenidos con la mezcla de ácidos orgánicos, se deberían a que el ambiente ácido en las heridas sobre la fruta favorece el desarrollo de la enfermedad (Prusky *et al.*, 2004; Smilanick *et al.*, 2005). Por lo tanto habría un efecto estimulante de este tratamiento sobre la enfermedad en el experimento de inoculación y aplicación de tratamientos simultáneo (t 0h) y también cuando se lo aplicó previo al inóculo (t 48h). Prusky *et al.* (2004) reportaron un incremento en la virulencia de *P. expansum* a medida que disminuía el pH en el sitio de infección en frutas de manzana como consecuencia de la producción de ácido cítrico y glucónico por parte del hongo, favoreciendo así el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto cuando aplicaron experimentalmente estos ácidos en las heridas, aumentó la virulencia del patógeno. En nuestros experimentos, el tratamiento empleado con mezclas de ácidos orgánicos se ajustó a pH 4,0 con el agregado de ácido cítrico, este sería entonces un motivo adicional que habría estimulado la enfermedad.

Sin embargo, esta mezcla de ácidos orgánicos mejoró su acción cuando se dejaron transcurrir 18 h entre la inoculación y el tratamiento, posiblemente debido al efecto de una acción directa de los ácidos orgánicos sobre el conidio germinando (fase sensible) lo que produciría la disrupción de la membrana celular (Piper *et al.*, 2001).

Con respecto a los extractos vegetales, existen pocos estudios de su uso como posibles agentes de biocontrol sobre frutos (El-Ghaouth, 1997; Tripathi y Shukla, 2007). En nuestros ensayos, el extracto Insibiox (10 %) no disminuyó la incidencia de la enfermedad en los experimentos de biocontrol directo t 0h y t 18h ($I = 90\%$). Sin embargo, mejoró su acción cuando se lo aplicó previo al inóculo (t 48h) controlando un 40 % la enfermedad ($I = 60\%$), e indicando de este modo que estaría operando algún otro mecanismo de protección. Al igual

que los demás tratamientos, este extracto fue efectivo logrando disminuir la severidad en todos los experimentos (t 0h, t 18h y t 48h). Similarmente a nuestros resultados, Usall *et al.* (2005) encontraron buena acción inhibitoria *in vitro* de aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Eugenia caryophyllata* y *Cinnamomum zeylanicum*, pero cuando se realizó la evaluación sobre frutos de naranjas no hubo una reducción significativa en la incidencia de las podredumbres verde y azul. Sin embargo, Sendin (2004) obtuvo control satisfactorio de la podredumbre verde en frutos de limón utilizando un extracto metanólico obtenido de hojas de frutilla.

Por otra parte, el tratamiento con el extracto Biocitrus® mostró valores similares a Insibiox en cuanto a incidencia y severidad, mejorando también su acción en los experimentos t 18h y t 48h. La falta de control total de enfermedad con este producto, podría deberse a que contiene en sus ingredientes activos extractos de pulpa y semilla de naranjas (polifenoles, bioflavonoides, ácidos orgánicos, etc.) que en cierto punto podrían haber estimulado al patógeno ya que como informaron Eckert y Ratnayake (1994), ciertos compuestos presentes en los cítricos sirven de señal para iniciar la infección por el patógeno e inducen la germinación de los conidios de *P. digitatum*. Posiblemente, por dicho motivo, este biocontrolador aplicado en este sistema no mostró resultados efectivos de control de la incidencia de la enfermedad.

Cuando se evaluó, este extracto (Biocitrus®), *in vitro* hubo una acción inhibitoria frente al patógeno, pero en el sistema natural al incluirse el hospedero (en este caso los frutos), probablemente las condiciones hicieron que fueran más favorables al patógeno, puesto que tal como sugieren Stange *et al.* (2002), la corteza de los frutos cítricos es el hábitat natural de *P. digitatum* y *P. italicum* durante la fase patogénica de su ciclo de vida. En cambio en otros sistemas, diferentes de los cítricos por ejemplo en poscosecha de vid, frambuesa y arándano, este biocontrolador sí resultó efectivo para controlar *Alternaria sp.* y *Botrytis cinerea* (Aguirre Hood y Pinilla, 2005). A pesar de esto, Stange *et al.* (1993) y Caccioni *et al.* (1998) identificaron compuestos antifúngicos obtenidos de cítricos con actividad inhibitoria frente a *P. digitatum*. Stange *et al.* (2002) concluyeron que los extractos de diferentes *Citrus sp.* tienen distintos efectos sobre el crecimiento fúngico, dependiendo de la abundancia o ausencia de compuestos estimulantes o inhibitorios y de la sensibilidad de los patógenos.

En todos los experimentos, el fungicida imazalil (en concentraciones mayores a 0,05 %) fue, como se esperaba, muy eficiente para disminuir la incidencia y la severidad de la enfermedad. Este fungicida es altamente efectivo en suprimir a *P. digitatum* evitando la infección en frutas cítricas (Eckert y Wild, 1983). Sin embargo, en los experimentos con agentes de biocontrol, no es adecuado comparar los resultados con los de los fungicidas químicos, sin tener en cuenta las ventajas y desventajas de cada método (Janisiewicz y Korsten, 2002; Sharma *et al.*, 2009) y es por ello que en estos experimentos se lo utilizó como control de inhibición positivo.

En resumen, los tratamientos aplicados 48 h previas a la inoculación del patógeno (como inductores o preventivos) mejoraron su acción sobre la enfermedad ya que disminuyeron la incidencia y la severidad de la misma, respecto de los experimentos de biocontrol curativo (t 0h y t 18h). Este efecto fue muy marcado en los tratamientos bicarbonato de sodio 3 % y Serenade® 1 %. Los resultados sugieren la inducción de algún tipo de respuesta de defensa que puede estar operando en el fruto, o bien otros mecanismos desconocidos. Consecuentemente, se decidió investigar la presencia de algún mecanismo

conocido de la respuesta de defensa en el fruto, y que se detalla en el Capítulo siguiente.

5.5. Conclusiones

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que las distintas alternativas biológicas evaluadas *in vivo* (Insibiox, Biocitrus®, bicarbonato de sodio, mezcla de ácidos orgánicos y Serenade®) retrasaron el desarrollo normal del patógeno, *P. digitatum* sobre los frutos de limón, visualizado a través de la disminución en la severidad de la enfermedad.

Si bien los tratamientos alternativos (a excepción de bicarbonato de sodio 3 %) tuvieron valores altos de incidencia, lo que muestra la falta de acción curativa de los mismos, el efecto sobre la severidad fue muy significativo en todos los experimentos (especialmente en t 18h y t 48h) por lo que debería potenciarse este efecto en búsqueda de un nivel de acción semejante a los fungicidas de síntesis química. La efectividad de los mismos podría mejorarse por ejemplo, con incrementos en la concentración, combinando entre sí los productos o con otras alternativas de control (termoterapia, conservación en cámaras de frío, radiaciones UV).

Los tratamientos aplicados como inductores de defensa (48 horas antes de la inoculación) tuvieron diferente grado de efectividad, siendo el bicarbonato de sodio 3 % el más efectivo (I = 3,3 %; S = 0,1) y a continuación de éste Serenade® 1 %, con valores de I = 43,3 % y S = 1, 1.

El tratamiento de bicarbonato de sodio 3 % logró prevenir la posterior infección y desarrollo de *P. digitatum*. Estos resultados nos permiten concluir que este tratamiento y el tratamiento Serenade® 1 % podrían aplicarse inmediatamente luego de ser cosechada la fruta, momento en el cual se producen la mayor cantidad de heridas y antes de llegar al empaque donde existe una alta presión de inóculo, protegiendo entonces posteriores infecciones e induciendo posiblemente algún tipo de mecanismo de defensa de la fruta.

CAPÍTULO 6

DETERMINACIÓN DE FITOALEXINAS

6.1. Introducción

6.1.1. Mecanismos de defensa en las plantas y frutos

La inducción de los mecanismos de defensa de las plantas, a través de la aplicación de agentes inductores o “elicitors” (bióticos o abióticos), es una estrategia que está incrementando su importancia como una alternativa biológica basada en la resistencia propia de la planta para enfrentar a los patógenos.

La resistencia de las plantas a los patógenos se debe principalmente a las barreras físicas y químicas preexistentes y a la respuesta inducida a ciertos factores de estrés bióticos y abióticos (Arras y Arru, 1997; Arras, 1996; Stange *et al.*, 2007).

Existen en la actualidad numerosos productos basados en la inducción de la defensa. Así por ejemplo, se puede mencionar la aplicación exógena de ácido salicílico, ácido jasmónico o metil-jasmonatos, que inducen respuestas de defensa en cultivos hortícolas. También, la aplicación de los productos comerciales Bion® (Syngenta Crop Protection) un análogo funcional del ácido salicílico y Messenger® (Eden Biosciencie Corp) procedente de la proteína harpín aislada de *Erwinia amylovora*, inducen respuestas de defensa en numerosas plantas (Ballester, 2007).

Diferentes componentes naturales del epicarpo (flavedo) de los frutos cítricos, ya sean preformados (ceras, cutícula, compuestos químicos como el citral) o inducidos (fitoalexinas, ligninas, callosa, suberinas), presentan actividad antifúngica y están involucrados en la defensa de la fruta para frenar el ataque de patógenos (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992; 1995; Rodov *et al.*, 1995; Arras y Sanna, 1999; Ortuño *et al.*, 2006). Mediante el uso de antagonistas presentes sobre la superficie de la fruta o bien otros microorganismos artificialmente introducidos, es posible intervenir para promover las defensas naturales de los frutos a fin de gatillar el control biológico (Arras y Arru, 1997), además de someter la fruta a diferentes agentes abióticos (radiaciones, calor, etc.) y químicos (ácido fosfórico, fosetyl-aluminio, etc.) (Afek y Szejnberg, 1995).

Las fitoalexinas son compuestos de bajo peso molecular que se acumulan alrededor del sitio de infección o en respuesta a elicitors biológicos. En general, estos compuestos son tóxicos e inhiben el crecimiento de microorganismos (Kuniga y Matsumoto, 2006; Ballester, 2007). Las más abundantes en los diferentes cultivares cítricos son las cumarinas: escoparona (6,7-dimetoxicumarina), escopoletina (7-hidroxi-5-metoxicumarina) y umbeliferona (7-hidroxycumarina). El aumento de estos compuestos estuvo acompañado por la reducción en la incidencia de las enfermedades de poscosecha en cítricos (Afek y Szejnberg, 1988; Kim *et al.*, 1991; Ben-Yehoshua *et al.*, 1992; 1995; 2000; Arras, 1996; Ortuño *et al.*, 1997; Porat *et al.*, 1999; Arras *et al.*, 2006; Ballester, 2007). Sin embargo, Ben-Yehoshua *et al.* (2000) y Nafussi *et al.* (2001) reportaron que la síntesis de fitoalexinas en limones no fue inducida por el tratamiento térmico (inmersión en agua caliente) por sí sólo, sino hasta que la fruta fue inoculada con el patógeno.

También se demostró la inducción de mecanismos de defensa por un aumento de fitoalexinas en naranjas, a través de diferentes elicitores biológicos Margosan-O® (aceite esencial de semillas de *Azadirachta indica*), quitosano y Aspire®, un producto de biocontrol formulado a base de *Candida oleophila* (Fajardo *et al.*, 1998; Droby *et al.*, 2002). De igual manera, Porat *et al.* (2003), observaron en pomelo la inducción de defensa a *P. digitatum* a través del ácido β -aminobutírico (BABA). Este incremento de la defensa también fue asociado con una inducción diferencial de la actividad de proteínas (PR) tales como quitinasas, β -1,3-glucanasas y peroxidasas (Porat *et al.*, 1999; Poppe *et al.*, 2003; Ballester *et al.*, 2006). Así mismo, Benhamou (2004) reportó la activación transcripcional de genes de defensa que llevaron a la síntesis y acumulación de nuevos productos de defensas.

Existen pocos antecedentes sobre el bicarbonato de sodio como desencadenante de mecanismos de defensa para enfermedades de poscosecha en frutos. Venditti *et al.* (2005) demostraron un incremento en la fitoalexina escoparona en el tejido de frutas cítricas cuando se aplicaba bicarbonato de sodio como control de *P. digitatum*.

La producción de estas fitoalexinas depende del estado de madurez de los frutos y de la variedad de citrus (Arras, 1996; Kuniga y Matsumoto, 2006; Ballester, 2007). Cualquier estrategia con el objeto de explotar el potencial de defensa de las frutas y vegetales, debería tener en consideración el status fisiológico del tejido en cuestión y de los factores externos que pueden afectar su fisiología (El-Ghaouth, 1997). Esto constituye la principal limitante de esta herramienta de biocontrol. Asimismo, Arras (1996) y Janisiewicz y Korsten (2002) agregan como otra limitante más, la relativamente lenta producción de las fitoalexinas.

Debido a los resultados obtenidos (ver Cap. 5 apartado 5.4.2.2) de los experimentos inductivos o preventivos donde primeramente se aplicaron los tratamientos y luego 48 h se inoculó el patógeno, en los cuales la incidencia de la enfermedad fue disminuída, se decidió investigar si era posible detectar la presencia de alguna fitoalexina como indicadora de la activación de mecanismos de defensa en los frutos.

Para ésto, se realizó la determinación de la presencia de las fitoalexinas escoparona y umbeliferona por ser las más abundantes en el flavedo de los cítricos.

6.2. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo fueron:

- 1) Puesta a punto de las técnicas TLC y fluorimetría para la detección de fitoalexinas en cítricos.
- 2) Determinar la presencia y acumulación de fitoalexinas (escoparona y umbeliferona) en frutos de limón, luego de aplicar diferentes tratamientos biológicos como posibles elicitores de la defensa.

6.3 Materiales y Métodos

6.3.1. Obtención del extracto de flavedo

Se tomaron muestras del epicarpo de limón, para la obtención de un extracto de flavedo, siguiendo las metodologías de Venditti *et al.* (2005) y Ortuño *et al.* (2006) con ciertas modificaciones realizadas en este trabajo. A partir de este extracto, se evaluó la presencia de las fitoalexinas escoparona y umbelliferona y también la posible acumulación de las mismas, a distintos intervalos de tiempo.

La obtención del extracto de flavedo, se realizó a partir de una muestra compuesta de tres limones sometidos a los distintos tratamientos inductivos. Para esto se removió el tejido de flavedo (parte coloreada del fruto), con un bisturí, de la mitad del epicarpio del limón (del lado de la herida), constituyendo una muestra de tejido fresco de 30 g.

Para tomar las muestras, siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 5. (5.3.4.2.2), se aplicaron los siguientes tratamientos a 3 frutos, previamente heridos:

- 1) Fruta tratada con Biocitrus® 2 %, sin inocular
- 2) Fruta tratada con Biocitrus® 2 % e inoculada a las 48 h
- 3) Fruta tratada con Insibiox 10 %, sin inocular
- 4) Fruta tratada con Insibiox 10 % e inoculada a las 48 h
- 5) Fruta tratada con bicarbonato de sodio 3 % sin inocular
- 6) Fruta tratada con bicarbonato de sodio 3 % e inoculada a las 48 h
- 7) Fruta tratada con Serenade® 1 %, sin inocular
- 8) Fruta tratada con Serenade® 1 % e inoculada a las 48 h.
- 9) Fruta tratada con imazalil 0,05 %, sin inocular
- 10) Fruta tratada con imazalil 0,05 % e inoculada a las 48 h
- 11) Fruta tratada con imazalil 0,001 %, sin inocular
- 12) Fruta tratada con imazalil 0,001 % e inoculada a las 48 h

Los controles empleados fueron:

- 1) Fruta sana sin inocular
- 2) Fruta herida sin inocular
- 3) Fruta herida inoculada inicialmente
- 4) Fruta herida inoculada a las 48 h (testigo absoluto)

Además en estos tratamientos se realizó la aplicación del agente inductor sólo (sin inóculo), a fin de evaluar si el elicitador; sin la presencia del patógeno, era capaz de inducir o no algún mecanismo de defensa en el fruto. No se realizó la aplicación de tratamiento con la mezcla de ácidos orgánicos, por haber arrojado altos valores de incidencia y severidad en el experimento t 48h descrito en el Capítulo 5 (apartado 5.4.2.2.).

La extracción de la muestra se realizó en tres momentos diferentes: A) dos días posteriores a la aplicación de los tratamientos (2 dpt), B) cuatro días posteriores a la aplicación de los tratamientos (4 dpt) y C) seis días posteriores a la aplicación de los tratamientos (6 dpt).

Una vez tomadas las muestras de los frutos, se acondicionaron colocándose en sobres individuales de papel madera, para ser secadas posteriormente en estufa. Dentro de cada sobre se adicionó también una cápsula conteniendo sílica gel para absorber excedentes de humedad.

Las muestras de flavedo de limón se secaron en estufa a 37 °C durante 4 días hasta peso constante. Luego se trituraron en molinillo hasta obtener un polvo fino de 4 g materia seca (MS) (Ortuño *et al.*, 2006). A continuación se agregó metanol puro 1/5 (p/v), se agitó durante 30 min en shaker y se filtró por papel Whatman N° 2 (5 cm) con bomba de vacío. El residuo seco fue lavado tres veces con metanol enjuagándose y reuniendo todos los filtrados. Este extracto metanólico de flavedo, se evaporó en rotavapor a presión reducida (40 °C) y se resuspendió nuevamente en metanol ajustándose a un volumen final de 2 ml. Posteriormente se guardó en cámara de frío a (7 °C) protegido de la luz, hasta su uso (Venditti *et al.*, 2005).

6.3.2. Estándares empleados y medios de solubilización

Como estándares se utilizaron escoparona (PM: 206,19 g/mol) (Sigma-Aldrich®) y umbeliferona (PM: 162,14 g/mol) (Sigma-Aldrich®). Ambos patrones se solubilizaron en metanol (Ballester, 2007), para que estuvieran en el mismo solvente que las muestras de flavedo.

A partir del peso molecular de cada estándar se realizó el cálculo para preparar una solución de 10 mM. Se pesó cada estándar y se colocó en un Eppendorf®. Luego se agregó el volumen de metanol necesario para lograr dicha concentración y se agitó a alta velocidad en vórtex durante 2 min hasta su completa disolución.

6.3.3. Determinación por cromatografía de capa fina (TLC)

La determinación de las fitoalexinas del extracto de flavedo se realizó utilizando la técnica de cromatografía de capa delgada (TLC).

6.3.3.1. Selección de los solventes orgánicos para la cromatografía

Con el objeto de seleccionar la mezcla de solventes óptima para la separación de los estándares, se realizaron ensayos previos con diferentes solventes orgánicos, combinando la polaridad de cada uno y la afinidad de los mismos a dichos estándares. Los solventes evaluados fueron: A) tolueno / acetato de etilo, en las proporciones (v/v) 4:1 y 6:1 B) alcohol etílico puro, C) cloroformo puro, D) acetonitrilo puro, E) acetato de etilo / tolueno, en las proporciones (v/v) 1:1, 2:1, 4:1 y 7:1 y F) acetato de etilo puro.

6.3.3.2. Cromatofolios y fase móvil utilizada

Se usaron cromatofolios de sílica gel, con fluorescencia, F 254 (Merck®) y la mezcla de solventes utilizada para las corridas de los ensayos, previa selección, fue tolueno/acetato de etilo (6:1).

6.3.3.3. Determinación de las fitoalexinas en el extracto de flavedo y condiciones de la cromatografía

Se sembraron 10 µl de cada extracto de flavedo y 2 µl de cada estándar (10 mM) en el cromatofolio separados por 2 cm (Fig. 6.1). Se colocaron en la cuba de cromatografía con la mezcla de solventes (tolueno/ acetato de etilo) (6:1) y se dejó correr durante 1 h. Luego se realizó la lectura de los cromatofolios iluminando con luz UV (210 nm). Para una mejor detección de las bandas de fluorescencia se probó concentrar la muestra, duplicando el volumen de los extractos de flavedo a 20 µl, pero se dificultaron la siembra y la corrida de las placas, posiblemente por una mayor concentración de los aceites esenciales. En consecuencia, las muestras se analizaron por fluorescencia (fluorómetro), luego de aislar las bandas de las placas de TLC.

6.3.4. Determinación por medición en fluorómetro

Los análisis por fluorimetría se realizaron utilizando el equipo ISS *Multidimensional Fluorescence Spectrometer* (software VINCI), disponible en el Instituto Superior de Investigaciones Biológicas, Tucumán.

6.3.4.1. Espectro patrón de los estándares y estimación de las pérdidas por TLC

Se realizaron diluciones de los estándares escoparona (E) y umbeliferona (U) con metanol puro, desde 0,1 mM a 4×10^{-4} mM para realizar las curvas patrón de excitación y emisión de cada estándar.

Con el objeto de estimar la pérdida de intensidad de la fluorescencia debida a la técnica TLC, se sembró una cantidad conocida de cada estándar, se corrió y luego se removió del cromatofolio, realizando un corte de un rectángulo ($0,2 \text{ cm}^2$) en la placa y raspando suavemente con un bisturí. El polvo obtenido, se colocó en un microtubo Eppendorf® al que se le agregó un volumen de 200 µl de metanol. Posteriormente se centrifugó (15 min a $1000 \times g$) recuperándose el sobrenadante que se paso a otro microtubo y se ajustó el volumen nuevamente a 500 µl con metanol. Luego, esta suspensión conteniendo el estándar, fue analizada en fluorómetro, colocando 200 µl de la misma en la cubeta de cuarzo (0,5 ml). La concentración de los estándares fue calculada a partir de la concentración y el volumen conocido sembrados en la placa TLC. Como blanco se utilizó la fluorescencia del fondo de sílica gel y del solvente (metanol) puro.

6.3.4.2. Determinación de las fitoalexinas en los extractos de flavedo

Como se mencionó anteriormente (ver apartado 6.3.3.3), para incrementar la sensibilidad de detección de las fitoalexinas presentes en las muestras, se realizó el análisis del extracto de flavedo por fluorimetría. Para esto, se removieron de los cromatofolios las bandas a la altura de cada estándar, siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito (apartado 6.3.3.1). Posteriormente, las muestras fueron analizadas en fluorómetro colocando 200 µl de las mismas en la cubeta de cuarzo. Las mediciones se realizaron a las siguientes longitudes de onda: escoparona a 342 nm de excitación y umbeliferona a 324 nm de excitación.

6.3.5. Análisis y estimación del error experimental

Debido a la complejidad experimental y a la incapacidad de realizar múltiples mediciones independientes confiables, la estimación del error experimental se realizó por la metodología de propagación del error experimental (Taylor, 1982; Maroto *et al.*, 2002). Esto fue factible a través de la identificación y cuantificación de las fuentes de incertidumbre en cada una de las etapas experimentales como ser; error de pesada, error de secado, error de dilución, error de extracción, error incorporado en la TLC y fluorimetría.

6.4. Resultados y discusión

6.4.1. Cromatografía de capa fina

6.4.1.1. Selección de la mezcla de solventes

Las distintas combinaciones de solventes orgánicos evaluadas como fase móvil para la cromatografía TLC, estuvo influenciada por la polaridad resultante de cada mezcla o del solvente, y por la afinidad con uno u otro estándar, que hizo que migraran de manera diferente en las placas. En la Figura 6.1 se muestran los resultados obtenidos de algunas de las corridas utilizando los estándares. Las mezclas de solventes más hidrofílicas como el alcohol etílico y el acetonitrilo, hicieron migrar hacia arriba de la placa los estándares sin mostrar una separación muy marcada entre ambos (Fig. 6.1.A). Los solventes de polaridad intermedia, como por ejemplo acetato de etilo / tolueno (en las proporciones 1:1 y 2:1), hicieron migrar a los estándares a la mitad de la placa, sin mostrar tampoco una separación nítida entre ellos. Mientras que el solvente cloroformo por ser altamente polar e hidrofóbico, sólo hizo desplazar al estándar escoparona, en cambio el estándar umbeliferona no se movió de la línea de siembra (Fig. 6.1.B).

La combinación óptima encontrada para estas condiciones de cromatografía fue la mezcla tolueno / acetato de etilo en las proporciones 6:1 (v/v) (Fig.6.1.C), en la que hubo una buena separación entre ambos estándares. Esta fue entonces la mezcla de solvente seleccionada para las corridas de las placas en la TLC.

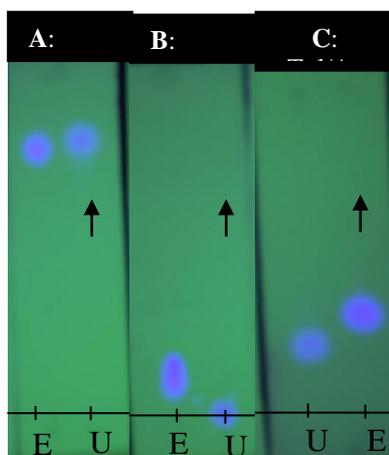


Figura 6.1. Cromatografía de capa fina para los estándares escoparona (E) y umbeliferona (U) en distintos solventes: **A)** Acetonitrilo, **B)** Cloroformo y **C)** Tolueno/acetato de etilo (6:1). Las flechas indican el sentido de la corrida.

6.4.1.2. Determinación de las fitoalexinas en el extracto de flavedo

Los resultados obtenidos en la cromatografía TLC para los controles y los distintos tratamientos se muestran en las Figuras 6.2, 6.3 y 6.4.

En la Figura 6.2 se aprecian los resultados para los controles y para el tratamiento con Biocitrus®. En cada extremo de las placas y en el centro, se observan las bandas fluorescentes de los estándares (E: escoparona y U: umbeliferona) y entre ellas se encuentran las muestras de los controles y del tratamiento con Biocitrus® 2 % sin inocular, correspondientes a los tres tiempos en que fueron tomadas las muestras (2dpt, 4dpt y 6dpt).

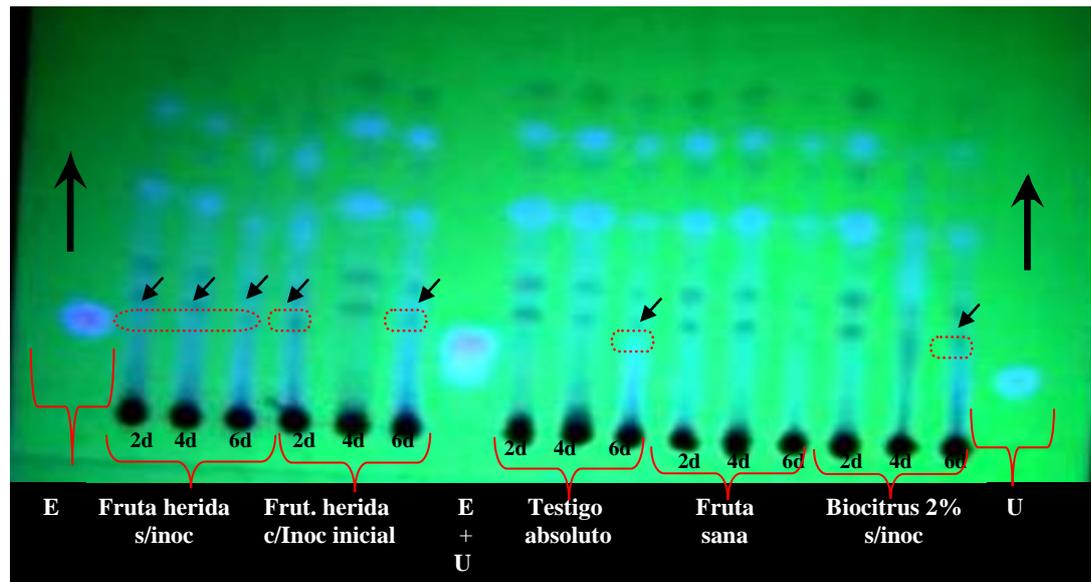


Figura 6.2. Detección de las fitoalexinas por TLC para los controles: fruta herida (sin inocular e inoculada inicialmente), testigo absoluto y fruta sana y el tratamiento Biocitrus® (sin inocular), a distintos intervalos de tiempo: 2dpt, 4dpt y 6 dpt. Las flechas indican las bandas detectadas. A cada lado y en el centro de la placa se observan las bandas de los estándares: E (escoparona) y U (umbeliferona). Las flechas gruesas indican el sentido de la corrida.

Se detectó una banda fluorescente más intensa en el tratamiento con Biocitrus® 2 % (sin inocular) en último tiempo de muestreo (6dpt). Esto estaría indicando que dicho tratamiento, presumiblemente, induciría algún mecanismo de defensa en el fruto que llevó a la posterior acumulación de la fitoalexina.

En cuanto a los controles, se detectaron bandas fluorescentes siempre que la fruta estuvo herida, mientras que en el control de fruta sana no se observó ninguna banda, independientemente del tiempo de muestreo. Al igual que el tratamiento con Biocitrus® 2 % (sin inocular), el testigo absoluto (fruta herida e inoculada a las 48 h) también presentó una banda en 6dpt. Por otra parte, el control fruta herida sin inocular presentó bandas en los tres tiempos con un leve incremento de fluorescencia hacia el final (6 dpt). El control de fruta herida inoculada desde el inicio presentó bandas solo en 2 dpt y 6 dpt.

En la Figura 6.3 se muestran los resultados de la TLC para los tratamientos con Biocitrus® (inoculado), Insibiox (sin inocular e inoculado) y bicarbonato de sodio (sin inocular e inoculado), a diferentes intervalos de tiempo (2dpt, 4dpt y 6dpt).

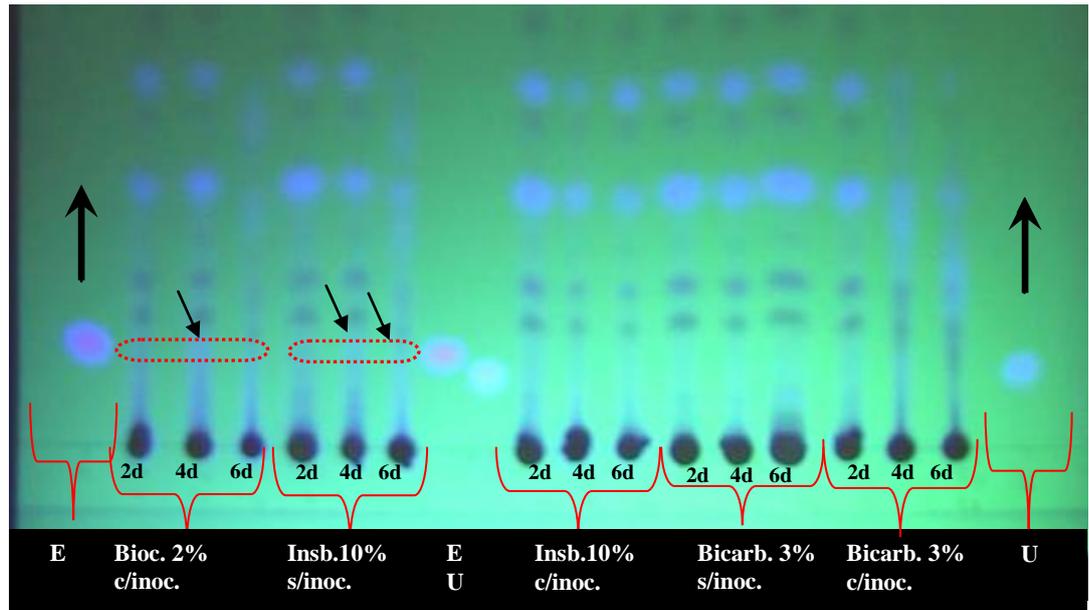


Figura 6.3. Detección de fitoalexinas por TLC para los tratamientos: Biocitrus® (con inóculo), Insibiox (sin inocular y con inóculo) y bicarbonato de sodio (sin inocular y con inóculo), a diferentes intervalos de tiempo: 2 dpt, 4 dpt y 6 dpt. Las flechas indican las bandas detectadas. A cada lado y en el centro de la placa se observan las bandas de los estándares: E (escoparona) y U (umbeliferona). Las flechas gruesas indican el sentido de corrida.

El tratamiento con Biocitrus® 2 % (inoculado) mostró bandas fluorescentes leves en los tres tiempos, pero fue más intensa en 4 dpt. Asimismo el tratamiento con Insibiox 10 % (sin inocular) presentó este mismo comportamiento, con bandas más marcadas en los tiempos 4 dpt y 6 dpt (Fig. 6.3). Sin embargo, en este tratamiento (Insibiox) inoculado con el patógeno no se observó la manifestación de bandas, al igual que en el tratamiento con bicarbonato de sodio 3 % (inoculado y sin inocular) (Fig. 6.3).

En la Figura 6.4 se muestran los resultados de la detección de las fitoalexinas en TLC para los tratamientos con Serenade® (inoculado y sin inocular), imazalil 0,05 % (inoculado y sin inocular) e imazalil 0,001 % (inoculado y sin inocular), a diferentes intervalos de tiempo (2 dpt, 4 dpt y 6 dpt). En la misma puede apreciarse la presencia de bandas fluorescentes en los tratamientos con Serenade® (inoculado y sin inocular) en los tres momentos de muestreo, especialmente en este tratamiento sin inocular (6 dpt) donde la banda manifestada fue más notoria y marcada, indicando algún tipo de inducción dependiente del tiempo (Fig. 6.4).

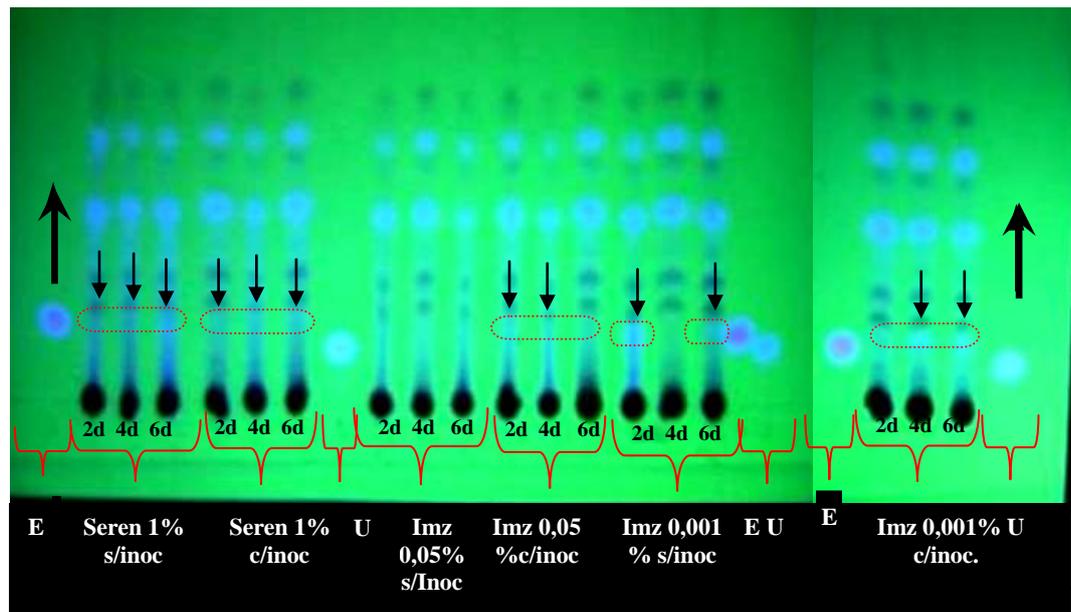


Figura 6.4. Detección de fitoalexinas en TLC para los tratamientos: Serenade® (sin inocular y con inóculo), imazalil 0,05 % (sin inocular y con inóculo) e imazalil 0,001% (sin inocular y con inóculo), a distintos intervalos de tiempo: 2 dpt, 4 dpt y 6 dpt. Las flechas indican las bandas detectadas. A cada lado y en el centro de la placa se observan las bandas de los estándares: E (escoparona) y U (umbeliferona). Las flechas gruesas indican la dirección de corrida.

Por otro lado el tratamiento con imazalil en ambas concentraciones evaluadas (inoculado y sin inocular), también mostró bandas fluorescentes, especialmente en el tratamiento imazalil 0,001% (sin inocular) en el tiempo 2 dpt manifestando algún tipo de inducción cuando la fruta recibe este tratamiento químico (Fig. 6.4).

Las bandas fluorescentes detectadas migraron a la altura del estándar escoparona, sin embargo no fueron puntuales, salvo algunas excepciones, sino que fueron continuas. Ésto posiblemente, debido a que estuvieron contaminadas con umbeliferona y otros compuestos fluorescentes, por lo que se purificaron las bandas y se evaluaron las muestras por emisión de fluorescencia (fluorometría) a fin de cuantificar y confirmar la presencia de cada fitoalexina.

6.4.2. Medición en fluorómetro

6.4.2.1. Espectro patrón de los estándares

Para poder cuantificar y conocer el espectro de los estándares se realizaron las curvas patrón de los mismos, analizando la longitud de excitación y de emisión de cada uno de ellos.

Primeramente, y con el objeto de seleccionar la longitud de excitación de los estándares, se realizó un espectro de absorbancia para cada estándar empleando un espectrofotómetro (Beckman DU7500 de arreglo de diodos) y se seleccionaron los picos de mayor intensidad.

En la Tabla 6.1 se muestran los datos de absorbancia obtenidos para los estándares (escoparona y umbeliferona). En el mismo puede observarse que se

registraron cuatro picos de absorbancia para escoparona (0,1 mM) a 206, 229, 293 y 342 nm de excitación. El del extremo (206 nm) se descartó por hallarse muy cerca del umbral de longitud onda de la medición (200-600 nm). En consecuencia, se seleccionaron los picos 229 y 342 nm por ser los de mayor intensidad para realizar las curvas patrón de escoparona en el fluorómetro. Para el caso del estándar umbeliferona (0,1 mM), sólo se detectó un pico de importancia a la longitud de excitación de 324 nm (Tabla 6.1). Este mismo perfil de espectro fue reportado por Ballester (2007) para estos estándares.

Tabla 6.1. Máxima absorbancia (U.A.) (picos) para escoparona y umbeliferona (0,1 mM) a diferentes longitudes de onda, medidos por espectrofotometría.

Escoparona 0,1 mM	
λ máx (nm)	Absorbancia (U.A.)
206	2,339
229	1,854
293	0,589
342	1,225
Umbeliferona 0,1 mM	
λ máx (nm)	Absorbancia (U.A.)
324	1,605

6.4.2.1.1 Espectro patrón para el estándar escoparona

6.4.2.1.1.1 Espectro de excitación

Conociendo previamente la longitud de emisión de mayor intensidad (424 nm) reportada por Ballester (2007), se realizó la curva de excitación realizando un barrido desde 200 a 600 nm de longitud de onda. En la Figura 6.5 se observa el espectro de excitación de escoparona, donde se distinguen dos picos de excitación, uno de mayor intensidad, a 342 nm, y otro de menor intensidad a 229 nm de excitación, coincidentes con los valores previamente determinados con el espectro de absorción (Tabla 6.1).

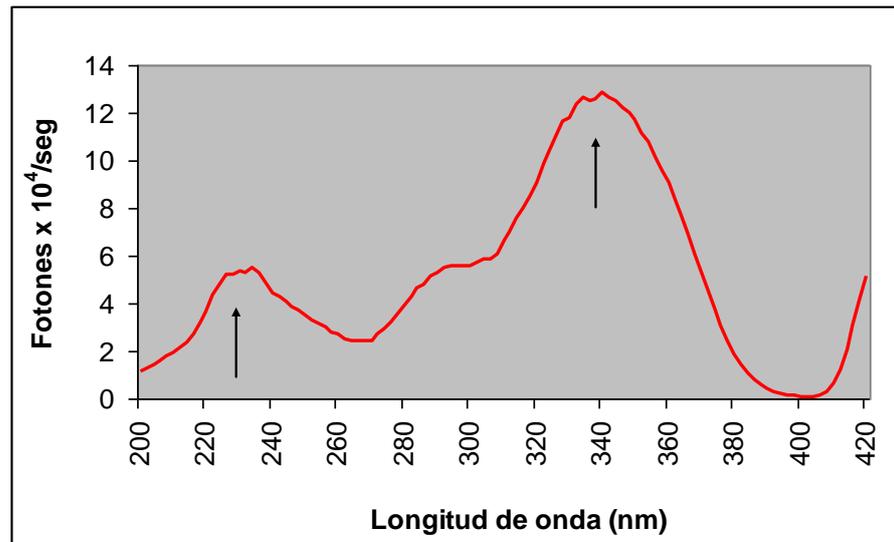


Figura 6.5. Espectro de excitación de la escoparona (0,2 mM) a λ emi 424 nm. Las flechas indican las longitudes de excitación máximas alcanzadas.

6.4.2.1.1.2. Espectro de emisión

Para determinar la longitud de emisión, se hizo un barrido de emisión de 200 a 600 nm excitando a 342 y 229 nm de longitud de onda (picos de excitación). Cuando se excitó a 229 nm se observó un pico de muy baja intensidad, en cambio a la longitud de 342 nm de excitación se observó un pico de emisión de gran intensidad a 424 nm de longitud de onda (Fig.6.6). Debido a esto, se seleccionó la longitud de excitación de 342 nm y en el rango de emisión entre 350 y 600 nm, ya que entre 200 y 350 nm no hubo ningún pico de emisión.

Con esta curva (Fig. 6.6) se confirmó entonces la longitud de 342 nm de excitación, previamente obtenida por espectrofotometría, y fue la que se empleó para identificar la presencia de esta fitoalexina en las muestras, como así también para poder cuantificarla midiendo la intensidad de fluorescencia emitida a esta longitud de excitación específica.

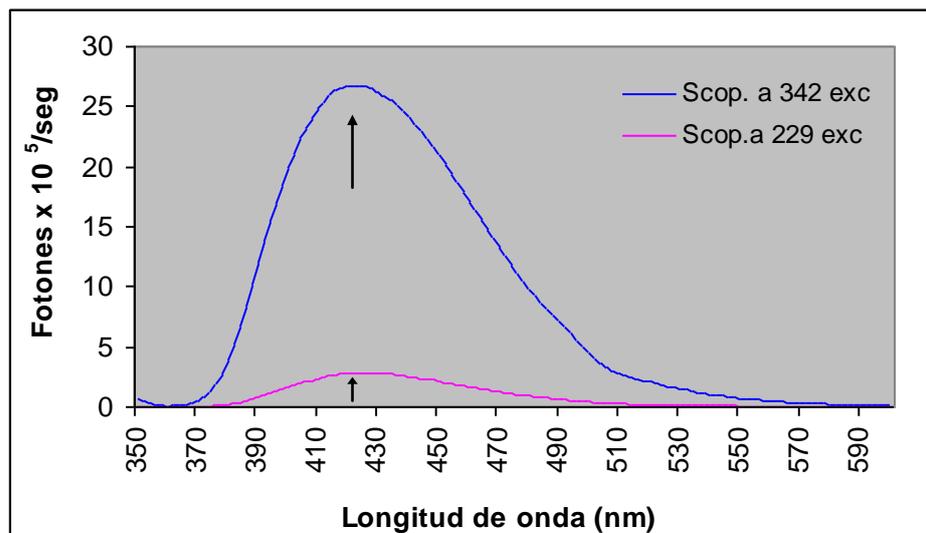


Figura 6.6. Espectro de emisión para la escoparona 0,1 mM, excitando a las longitudes de onda de 342 nm y 229 nm. Las flechas indican las máximas intensidades emitidas.

6.4.2.1.1.3. Cálculo de la concentración de escoparona

A la longitud de excitación seleccionada (342 nm) se midió la emisión de fluorescencia de soluciones de escoparona en metanol puro, a distintas concentraciones desde 0,1 a 4×10^{-4} mM, determinándose la línea de ajuste y su correspondiente fórmula para el cálculo de la estimación de la concentración en las muestras.

En la Figura 6.7 se muestran los resultados obtenidos de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración para escoparona, donde se puede observar un aumento proporcional de intensidad de fluorescencia a medida que aumentó la concentración de la misma. Esto nos permitió obtener la fórmula de estimación la concentración de escoparona con un buen ajuste lineal (R^2) (Fig. 6.7).

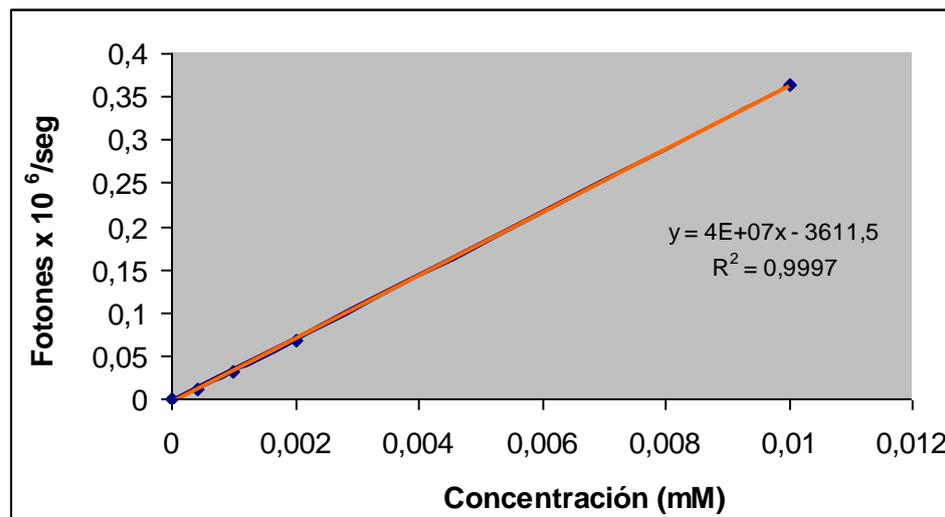


Figura 6.7. Gráfico de intensidad de fluorescencia de escoparona (fotones/seg.) en función de la concentración (mM).

6.4.2.1.1.4. Estimación de la pérdida de escoparona sometida a TLC

Para conocer la pérdida que ocurre durante la manipulación de las muestras, se realizaron cálculos a fin de obtener un factor de corrección que nos permitiera estimar la concentración del estándar luego de haber sido sometido a la cromatografía TLC y de esta manera también poder cuantificar y corregir las muestras.

Para ésto, en primer lugar se calcularon la intensidad de fluorescencia del estándar escoparona pura (IE_p) y para el metanol puro (IM_p). La diferencia entre estos valores dió la intensidad de escoparona pura corregida (IE_{pc})

Por otra parte se calculó la intensidad de escoparona TLC (IE_{TLC}) y la intensidad de metanol TLC (IM_{TLC}) luego de recuperar las muestras de los cromatofolios y analizarlas en el fluorómetro. La diferencia entre ambos arrojó el valor de la intensidad de escoparona TLC corregida (IE_{TLCc}).

Finalmente, para conocer cuánto del estándar se perdió por la técnica de TLC (PE_{TLC}) se sustrajeron los valores de la intensidad escoparona pura corregida, menos la intensidad de escoparona TLC corregida.

Estos procedimientos se resumen en las siguientes fórmulas:

$$1) IE_p - IM_p = IE_{pc}$$

$$2) IE_{TLC} - IM_{TLC} = IE_{TLCc}$$

$$3) PE_{TLC} = IE_{pc} - IE_{TLCc}$$

La pérdida para escoparona TLC calculada fue de 45,7 % respecto al total (escoparona pura corregida). Esto significa que casi la mitad del estándar se perdió durante la manipulación (en el momento de siembra, elución, adsorción en la sílica gel, etc.). Con este valor se obtuvo un factor de corrección de 1,8 para estimar la concentración de esta fitoalexina en las muestras.

En la Figura 6.8 se grafican los espectros en escoparona pura, escoparona TLC y escoparona TLC corregida. En la misma puede observarse como el espectro de escoparona TLC es aproximadamente la mitad del espectro

patrón de escoparona pura, tal como había arrojado el cálculo de estimación de pérdida (PE_{TLC}) mencionado anteriormente (45,7 %), y que como luego cuando es ajustada con el factor de corrección se aproxima y sigue el mismo patrón que el espectro de escoparona pura. Esto nos indicó que los cálculos fueron correctos y se adecuaron para realizar los ajustes y las estimaciones de la concentración de esta fitoalexina en las muestras.

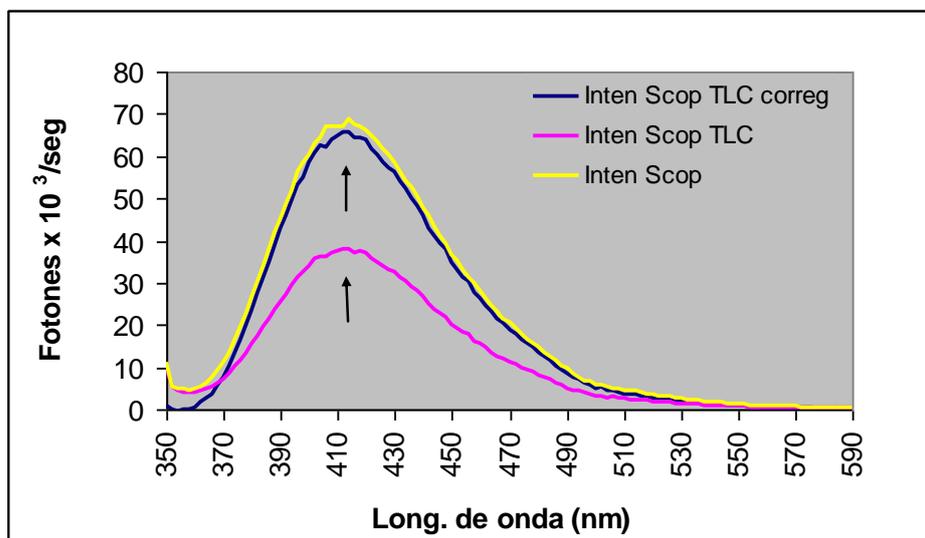


Figura 6.8. Espectro de emisión a λ_{exc} 342 nm de la escoparona pura (0,002 mM), escoparona por TLC y escoparona TLC corregida y ajustada por fórmula. Las flechas indican los máximos de intensidad de fluorescencia.

6.4.2.1.2. Espectro patrón para el estándar umbeliferona

6.4.2.1.2.1 Espectro de excitación

Del mismo modo que se realizó con la escoparona se procedió con la umbeliferona. Conociendo la longitud de emisión de mayor intensidad (393 nm) reportada en bibliografía (Ballester, 2007), se realizó el espectro de excitación realizando un barrido desde 200 a 600 nm de longitud de onda. En la Figura 6.9 se muestra el espectro de excitación de umbeliferona, donde puede observarse un pico de intensidad a 324 nm, entre las longitudes de 200 a 360 nm de excitación. Desde 360 a 600 nm de longitud de onda, no se observó ningún pico.

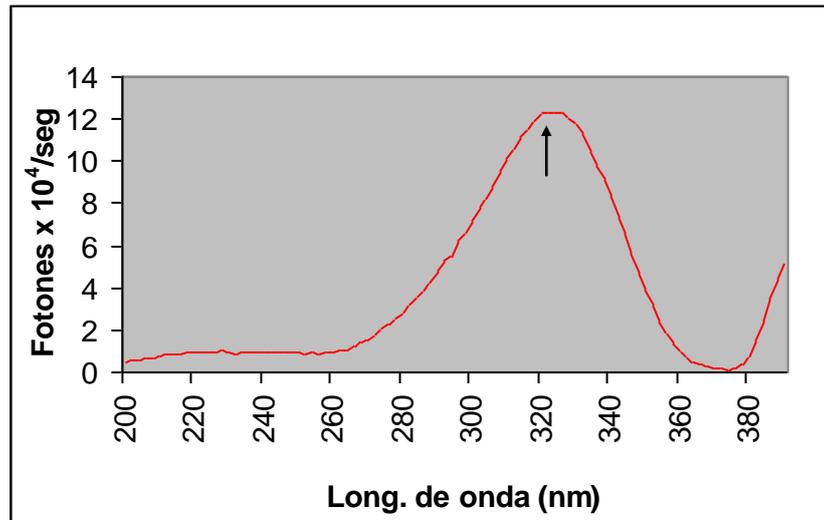


Figura 6.9. Espectro de excitación a λ_{emi} 393 nm para la umbeliferona (0,02 mM). La flecha indica la longitud de onda de mayor excitación.

6.4.2.1.2.2. Espectro de emisión

Se realizó un barrido de emisión de 200 a 600 nm de longitud de onda, excitando a 324 nm (Fig. 6.10). Como se muestra en la Figura 6.10, se observó un solo pico de emisión a 393 nm. Además se seleccionó el rango de longitud de emisión entre 330 y 600 nm, ya que entre 200 y 330 nm no hubo ningún pico.

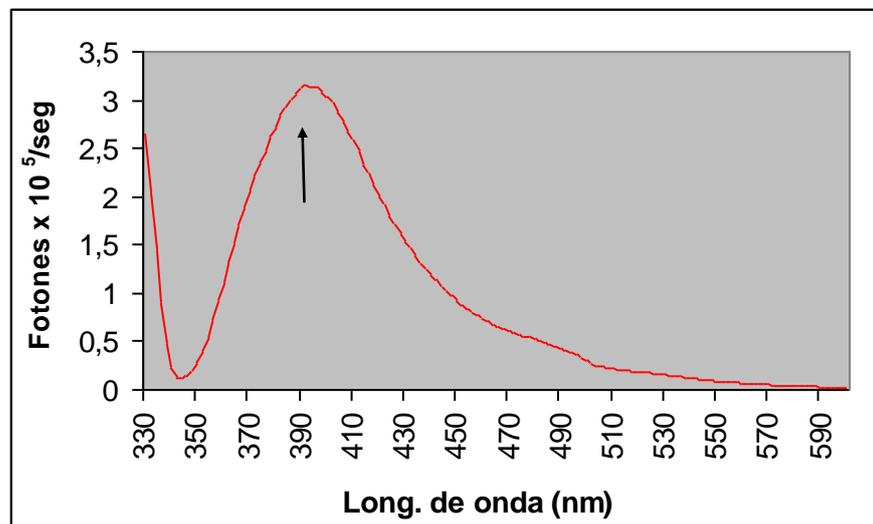


Figura 6.10. Espectro de emisión para la umbeliferona (0,01 mM) a λ_{exci} 324 nm. La flecha indica la longitud de onda de mayor emisión.

Con esta curva (Fig. 6.10) se confirmó la longitud excitación (324 nm), tal como había resultado también por espectrofotometría (ver Tabla 6.1) y fue la que se empleó para identificar la presencia esta fitoalexina en las muestras, como así también para cuantificarla a través de la intensidad de fluorescencia.

6.4.2.1.2.3. Cálculo de la concentración de umbeliferona

A la longitud de excitación seleccionada (324 nm) se midió la fluorescencia de soluciones de umbeliferona a diferentes concentraciones desde 0,1 mM hasta 4×10^{-4} mM en metanol puro, determinándose la línea de ajuste y su correspondiente fórmula para de la estimación de la concentración en las muestras.

En la Figura 6.11 se muestran los resultados de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de umbeliferona, donde se puede observar, al igual que para escoparona, un aumento proporcional de intensidad de fluorescencia en función de la concentración, lo que permitió obtener la fórmula de estimación con ajuste muy buen ajuste lineal (R^2).

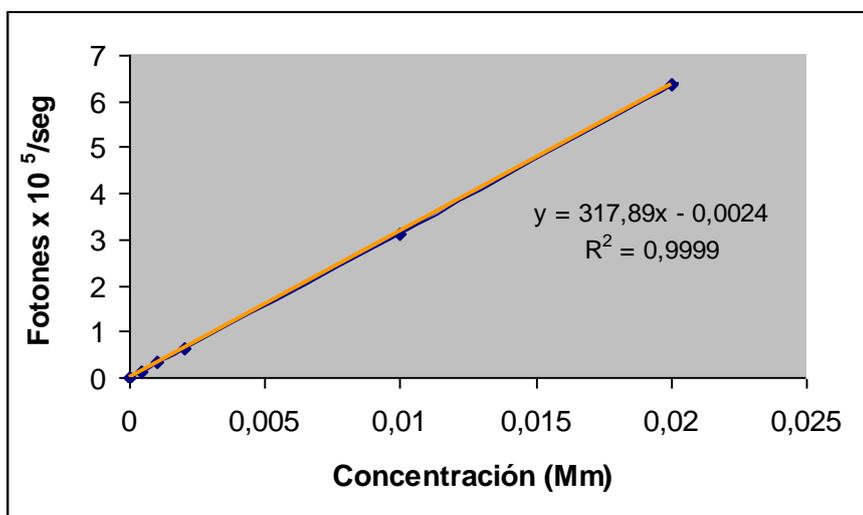


Figura 6.11. Intensidad de fluorescencia (fotones/seg.) de la umbeliferona en función de la concentración (mM).

6.4.2.1.2.4. Estimación de la pérdida de umbeliferona sometida a TLC

Para estimar la pérdida del estándar umbeliferona por la técnica de TLC, se procedió de manera similar a lo descrito anteriormente para escoparona con el fin de obtener el factor de corrección. En este caso los procedimientos fueron los siguientes:

1) Se calcularon la intensidad de fluorescencia para el estándar umbeliferona pura (I_{Up}) y para el metanol puro (I_{Mp}). La diferencia entre estos valores correspondió a la intensidad de umbeliferona pura corregida (I_{Upc})

2) Luego se calculó la intensidad de umbeliferona TLC ($I_{U_{TLC}}$) y la intensidad de metanol TLC ($I_{M_{TLC}}$) y la diferencia entre ambos arrojó el valor de la intensidad de umbeliferona TLC corregida ($I_{U_{TLCc}}$).

3) Para conocer la pérdida del estándar por la técnica de TLC (PU_{TLC}) se sustrajeron los valores de la intensidad umbeliferona pura corregida menos la intensidad de umbeliferona TLC corregida.

Estos procedimientos se resumen en las siguientes fórmulas:

$$1) I_{Up} - I_{Mp} = I_{Upc}$$

$$2) IU_{TLC} - IM_{TLC} = IU_{TLC}c$$

$$3) PU_{TLC} = IU_{pc} - IU_{TLC}c$$

La pérdida para umbeliferona por TLC, calculada como se describió arriba, fue de 50 %. Es decir que la mitad del estándar se perdió durante la manipulación de la muestra tal como ocurrió también para el estándar de escoparona. Con este valor se obtuvo un factor de corrección de 2 para estimar la concentración de esta fitoalexina en las muestras.

En la Figura 6.12 se grafican las curvas de los espectros obtenidos de emisión de la umbeliferona pura, umbeliferona TLC y umbeliferona TLC corregida. En la misma puede observarse como el espectro de umbeliferona TLC es aproximadamente la mitad del espectro patrón umbeliferona pura, tal como había arrojado el cálculo de estimación de pérdida (PU_{TLC}) mencionado anteriormente (50 %), pero luego cuando es ajustada con el factor de corrección se aproxima y sigue el patrón similar al estándar puro. Sin embargo, en este caso se observó en el espectro umbeliferona sometida a TLC corregida, un leve hombro (indicado con un círculo rojo en la Fig. 6.12), probablemente debido a que el estándar arrastró algún tipo de impureza que estaría provocando interferencia, emitiendo también fluorescencia (aunque débilmente) a esa longitud de onda de excitación. A pesar de esto, el ajuste realizado por fórmula fue adecuado para realizar las estimaciones de la concentración de esta fitoalexina en las muestras ya que los picos de ambas curvas (umbeliferona pura y umbeliferona TLC corregida) fueron coincidentes (Fig. 6.12.).

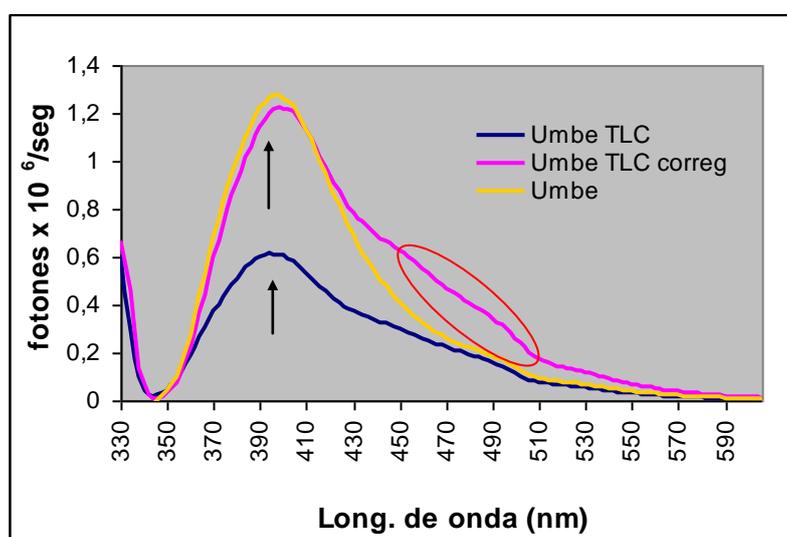


Figura 6.12. Espectro de emisión a λ_{exc} 324 nm la de umbeliferona pura (0,04 mM), umbeliferona por TLC (0,04 mM) y umbeliferona en TLC corregida y ajustada por fórmula. Las flechas indican los máximos de intensidad de fluorescencia y el círculo rojo el hombro en la curva.

6.4.2.2. Determinación de las fitoalexinas en los extractos de flavedo por emisión de fluorescencia

Los resultados obtenidos del análisis de las muestras de flavedo, a través del fluorómetro, permitieron detectar la presencia de la fitoalexina escoparona en

todos los tratamientos y en los controles, pero solo en la fruta herida. Como se observa en la Figura 6.13, las curvas siguieron el mismo patrón del estándar, presentando el pico de emisión a la misma longitud de onda.

En la Figura 6.13 se ejemplifican los resultados obtenidos luego del tratamiento con Serenade® al 1% (sin inocular), en los tiempos 2 dpt, 4dpt y 6dpt y el espectro del estándar escoparona. En esta figura puede observarse el incremento de la fitoalexina en el último tiempo (6 dpt), que se estimó a través del aumento de intensidad de fluorescencia registrado, medido en fotones/seg.

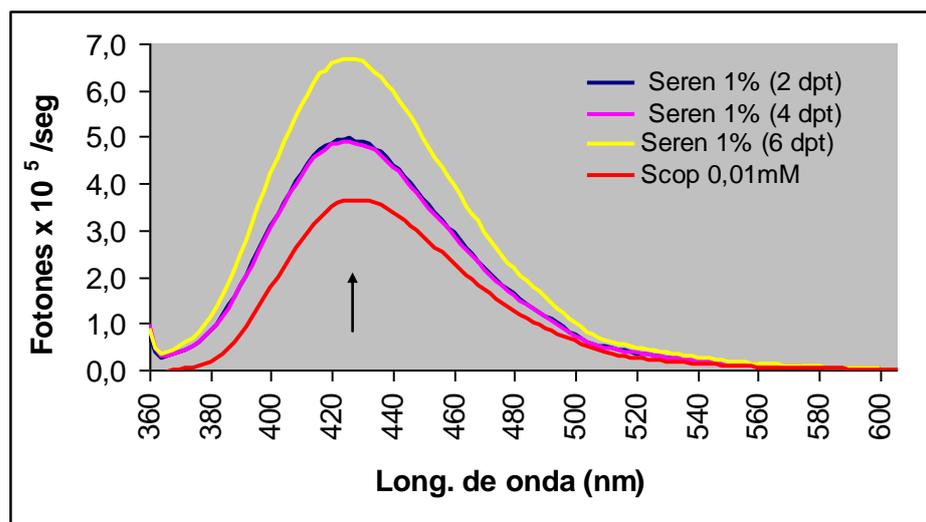


Figura 6.13. Espectros de emisión de la escoparona (λ_{exci} 342 nm), contenidos en el flavedo de frutos tratados con Serenade® 1 % (sin inocular). La flecha indica la intensidad máxima de fluorescencia.

Para el caso de la fitoalexina umbeliferona, no fue posible detectarla con esta técnica. Ninguno de los tratamientos mostró una señal de fluorescencia, ni los picos de emisión semejantes con el espectro patrón de este estándar (Fig. 6.14).

En la Figura 6.14 se muestra un ejemplo del comportamiento observado en los distintos tratamientos. En la misma se incluye el espectro del estándar de umbeliferona (0,02 mM) y umbeliferona TLC (0,04 mM), ambas con el pico de emisión a 393 nm y las del tratamiento con Serenade® (sin inocular) que no presentó ni el espectro, ni el pico máximo a esa longitud de emisión. Debido a ésto, en adelante, se informarán solamente los resultados de la fitoalexina escoparona.

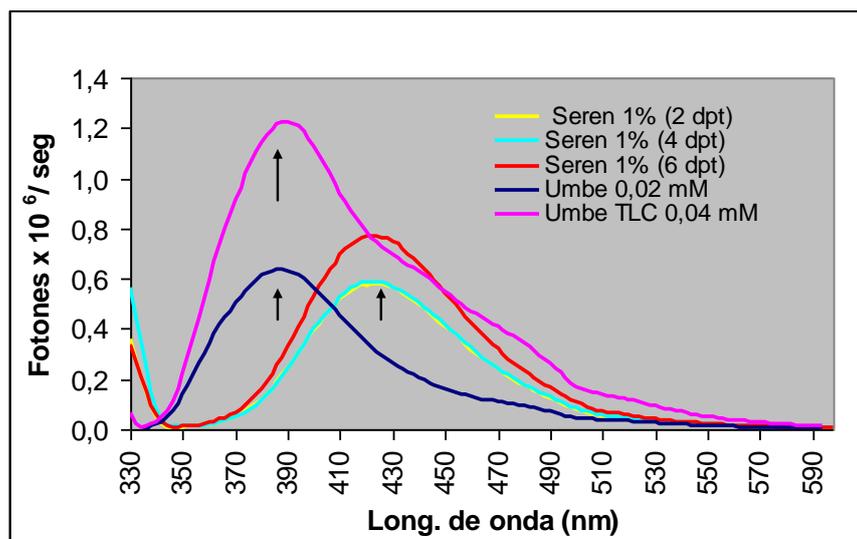


Figura 6.14. Espectros de emisión de la umbeliferona (λ_{exci} 324 nm), contenidos en el flavedo de frutos tratados con Serenade® 1 % (sin inocular). La flecha indica la intensidad máxima de fluorescencia.

Las cantidades detectadas de la fitoalexina escoparona en el control fruta sana fueron prácticamente despreciables, comparada al resto de los tratamientos donde la fruta fue herida (Fig. 6.15 y Fig. 6.16). En la Figura 6.15 puede observarse los valores de intensidad de fluorescencia registrados para el control fruta sana (en los tres tiempos de muestreo) y el espectro patrón del estándar escoparona (0,01 mM) a la misma longitud de excitación (342 nm).

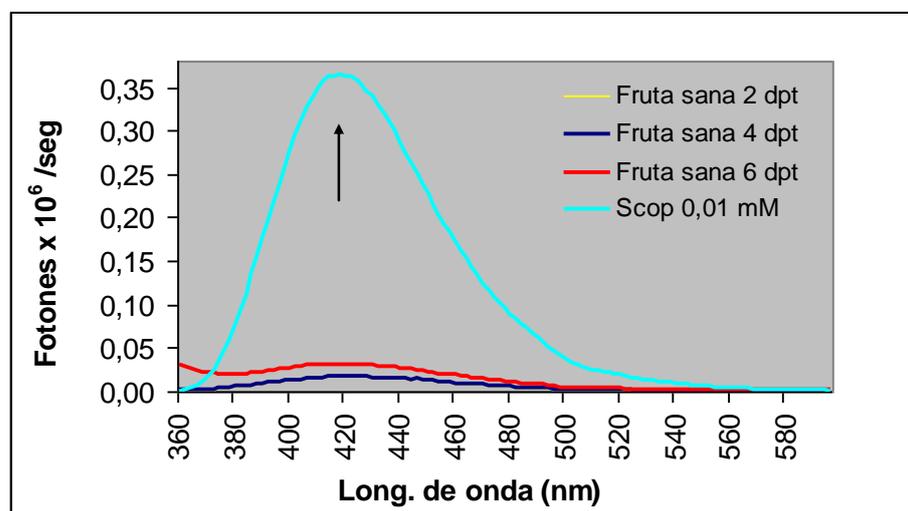


Figura 6.15. Intensidad de fluorescencia de escoparona (λ_{exci} 342 nm) en el control fruta sana, comparado con el espectro patrón del estándar. La flecha indica la intensidad máxima de fluorescencia.

El cálculo de la estimación de la concentración de escoparona en las muestras, medido por la intensidad de fluorescencia, se realizó por medio de las

fórmulas y correcciones descriptas en los apartados 6.4.2.1.1.3 y 6.4.2.1.1.4. Luego de conocer la concentración (mM) de escoparona presente en las muestras se calculó (a partir del peso molecular del estándar y los volúmenes de los que se partieron) la concentración de escoparona en microgramos (μg) y se refirió al peso fresco (Pf) de la muestra (30 g). Así los valores de la concentración de escoparona fueron expresados en $\mu\text{g/g}$ Pf, ya que estas son las unidades utilizadas de referencia en la bibliografía.

En la Figura 6.16 se presentan los resultados de la concentración de escoparona ($\mu\text{g/g}$ Pf) obtenidos luego de aplicar los diferentes tratamientos elicitores, sin la presencia del inóculo, la del testigo absoluto y los controles de fruta sana y fruta herida sin inocular. En la misma puede observarse que, al igual que en el control fruta herida (sin inocular), los diferentes tratamientos elicitores mostraron un incremento en la concentración de la fitoalexina, especialmente en el último tiempo (6 dpt). Además se puede ver que el tratamiento con Serenade® al 1 % (6 dpt) fue el que tuvo los mayores valores en concentración de la fitoalexina (31,8 $\mu\text{g/g}$ Pf), difiriendo significativamente del resto de los tratamientos.

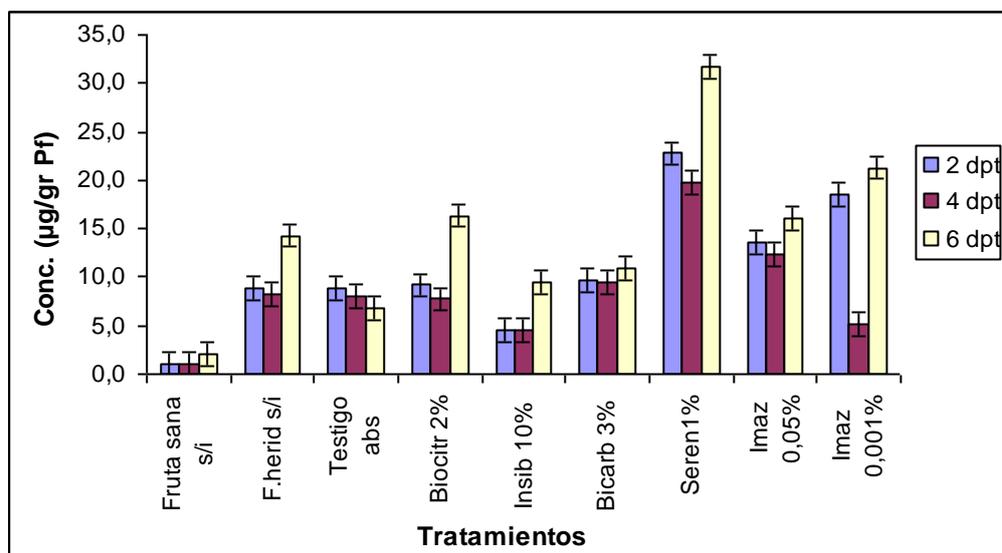


Figura 6.16. Concentración de escoparona ($\mu\text{g/g}$ Pf) en el flavedo de los frutos para los controles de fruta sana sin inocular, fruta herida sin inocular y fruta herida inoculada a las 48 h (testigo absoluto), y para los diferentes tratamientos elicitores sin inocular: Biocitrus® 2 %, Insibiox 10 %, bicarbonato de sodio 3 %, Serenade® 1 %, imazalil 0,05 % e imazalil 0,001 %; en los tiempos 2 dpt, 4 dpt y 6 dpt. (s/i) Sin inocular. Las barras representan el error experimental ($\pm 1,2$ $\mu\text{g/g}$ Pf).

El control de fruta herida sin inocular, presentó también inducción de la fitoalexina, mostrando el mismo comportamiento que los tratamientos elicitores e indicando que la acción de herir por sí sola, desencadenó algún mecanismo de defensa en la fruta (Fig. 6.16). Los tratamientos con Insibiox (10 %), bicarbonato de sodio (3 %) y Biocitrus® (2 %) registraron valores similares a los obtenidos con este control (Fig. 6.16). Por lo tanto podemos concluir que estos tratamientos, por sí solos, no indujeron la síntesis de la fitoalexina, ya que el efecto observado puede deberse también a la herida.

El tratamiento con imazalil 0,001 % presentó un comportamiento diferente ya que primero mostró un valor muy alto en el tiempo 2 dpt, posteriormente un descenso muy marcado en el tiempo 4 dpt para luego incrementar su valor final (6 dpt) (Fig. 6.16.). Este resultado es coincidente con lo observado en la TLC donde se observaron bandas de fluorescencia para los tiempos 2 dpt y 6 dpt. Mientras que el tratamiento con este fungicida químico a 0,05 % presentó valores uniformes en los tiempos 2 dpt y 4 dpt y un leve incremento en 6 dpt.

Cuando los frutos tratados con los elicitores fueron desafiados frente al patógeno (Fig. 6.17), se detectó en general menor concentración de escoparona comparada con las de estos tratamientos elicitores solos (sin inocular) (Fig. 6.16). Además se observó una disminución de la concentración de la fitoalexina con el transcurso del tiempo, a excepción de los tratamientos con bicarbonato de sodio y con Serenade® y del control fruta herida inoculada desde el inicio.

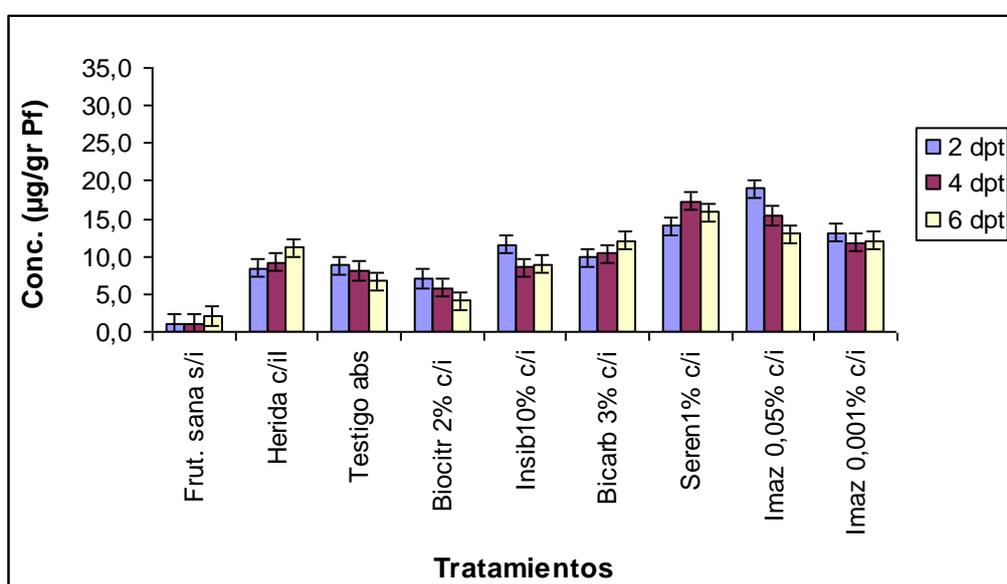


Figura 6.17. Concentración de escoparona ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) para los controles de fruta sana sin inocular, fruta herida inoculada inicialmente y fruta herida inoculada a las 48 h (testigo absoluto), y para los diferentes tratamientos elicitores inoculados a las 48 h: Biocitrus® 2 %, Insibiox 10 %, bicarbonato de sodio 3 %, Serenade® 1 %, imazalil 0,05 % e imazalil 0,001 %; en los tiempos 2 dpt, 4 dpt y 6 dpt. (s/i) Sin inocular, (c/il) con inóculo desde el inicio y (c/i) con inóculo. Las barras representan el error experimental ($\pm 1,2 \mu\text{g/g Pf}$).

En la Figura 6.18 se muestra la variación de la concentración de escoparona ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) para el tratamiento con Serenade®, el testigo absoluto y los diferentes controles en función del tiempo. En esta figura se observa claramente como este tratamiento promovió un aumento en la concentración de escoparona, respecto a los controles. Este resultado es coincidente con el observado en la TLC donde este tratamiento reveló la presencia de bandas fluorescentes intensas (ver Fig.6.4).

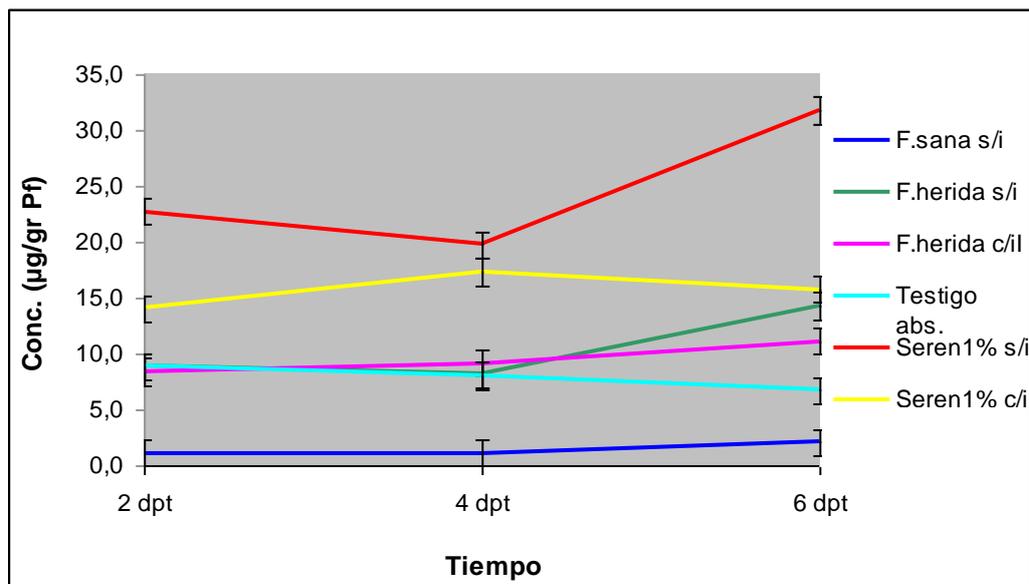


Figura 6.18. Variación de la concentración de la escoparona, en el tiempo, luego del tratamiento con Serenade® 1% (inoculado a las 48 h y sin inocular) y en los controles: fruta sana, fruta herida sin inocular, fruta herida inoculada desde el inicio y testigo absoluto (fruta inoculada a las 48 h). (s/i) Sin inocular, (c/i/l) con inóculo desde el inicio y (c/i) con inóculo. Las barras representan el error experimental ($\pm 1,2 \mu\text{g/g Pf}$).

Afek y Szejnberg (1995), Arras (1996), Ben-Yehoshua *et al.* (2000), Porat *et al.* (2003) y Arras *et al.* (2006) reportaron que la síntesis de escoparona, en frutas cítricas, se inicia 24 h posteriores a la aplicación del tratamiento (inmersión en agua caliente, radiaciones UV y aplicación de levaduras antagonistas) y que alcanza niveles suficientes para inhibir el patógeno dentro de los 2 días posteriores al tratamiento. Afek y Szejnberg (1995) sugieren que este tiempo sería crítico en la fruta para frenar el avance de la infección. Asimismo, estos autores demostraron que la concentración de escoparona continúa en incremento hasta alcanzar un máximo a los cuatro días después de la inoculación. Por este motivo, en este trabajo, las muestras se tomaron dos días posteriores a los tratamientos (el día de la inoculación), luego a los cuatro días (dos días post-inoculación) y finalmente a los seis días (cuatro días post-inoculación).

La inoculación con el patógeno se realizó dejando transcurrir 48 h entre la aplicación de los elicitores y la inoculación, ya que como describieron numerosos autores, se encontró mayor efectividad de estos métodos inductivos si se los realizaban antes de la inoculación con el patógeno (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992; Arras, 1996; Porat *et al.*, 2003; Arras *et al.*, 2006; Ballester, 2007)

Los resultados encontrados nos permiten afirmar que se detectó la presencia de escoparona luego de aplicar los tratamientos elicitores, siempre que la fruta haya sido herida. En consecuencia, podemos concluir que la fruta desencadenó una respuesta de defensa, detectada a través de la presencia e incremento de esta fitoalexina. Además entre los mecanismos de defensa estudiados, las fitoalexinas siempre son inducidas por el patógeno o por elicitores y no están naturalmente en los frutos (Ben-Yehoshua *et al.*, 2000).

Por otra parte, con las técnicas empleadas, no fue posible detectar la fitoalexina umbeliferona. Ballester (2007) tampoco logró detectar las fitoalexinas umbeliferona, escopoletina ni esculetina; que son consideradas precursoras de escoparona. Afek *et al.* (1999) sugieren que la umbeliferona se acumula en el tejido del albedo y que precede a la formación de escoparona, por lo que tendría importancia en la respuesta de defensa temprana de la fruta (inmadura) frente al patógeno. Posiblemente, esto podría explicar porque no fue detectada esta fitoalexina en nuestros experimentos, ya que se utilizaron limones maduros y se tomaron las muestras del flavedo, a pesar que otros autores reportaron haberla detectado en este tipo de tejido del fruto (Droby *et al.*, 2002).

Por otro lado y en concordancia con nuestros resultados, se reportó que la escoparona solo fue detectada en frutos que habían recibido algún tipo de estrés o con inductores como tratamientos térmicos, biológicos, bicarbonato de sodio y radiaciones UV (Ben-Yehoshua, *et al.*, 1992; Ortuño *et al.*, 1997; Venditti *et al.*, 2005; Ballester, 2007) y no fue detectada en tejidos sanos (Kim *et al.*, 1991; Ben-Yehoshua, *et al.*, 1992; 2000; Arras, 1996; Arras *et al.*, 2006; Ballester, 2007). Inclusive se informó que la fitoalexina no se inducía con un tratamiento térmico por sí solo, sino cuando la fruta era herida o inoculada con el patógeno (Ben-Yehoshua, *et al.*, 2000).

Los resultados encontrados en este trabajo nos permiten presumir además, que la herida por sí sola también sería capaz de inducir la fitoalexina escoparona, tal como lo reportaron Ortuño *et al.* (1997), Venditti *et al.* (2005) y Ballester (2007). De igual manera, estos autores detectaron escoparona en frutas heridas independientemente si eran o no inoculadas con el patógeno.

Ben-Yehoshua *et al.* (1992) relacionaron además el incremento de las fitoalexinas con la reducción de los porcentajes de frutas infectadas por *P. digitatum*. Ellos concluyeron que la aplicación de tratamientos con luz UV, dos días antes de inocular con el patógeno, permitió a la fruta iniciar la síntesis de las fitoalexinas y alcanzar niveles de resistencia que luego permitieron frenar la infección. Este mismo comportamiento habría ocurrido en los experimentos inductivos (t 48h) presentados en el Capítulo 5 (apartado 5.4.3.1), donde se observaron menores valores de incidencia y severidad de la enfermedad luego de aplicar los tratamientos elicitores y 48 h más tarde se inoculó con el patógeno. Ballester (2007) también observó este mismo comportamiento, encontrando que el tratamiento más efectivo que lograba reducir los porcentajes de infección de *P. digitatum* en naranjas, era la aplicación de ácido metil jasmónico 48 h antes de la inoculación con el patógeno. Asimismo, Venditti *et al.* (2005) encontraron reducción en el porcentaje de infección por *P. digitatum* y *P. italicum* asociada a un incremento en la concentración de la fitoalexina escoparona.

Las cumarinas actuarían directamente sobre el patógeno, retrasando su desarrollo y permitiendo activar otros mecanismos que contribuirían a frenar el avance de la infección, como ser por ejemplo; la cicatrización de heridas, el aumento de ligninas y de compuestos fenólicos, y la acumulación de suberinas (Ballester, 2007).

Kim *et al.* (1991) determinaron que la concentración media inhibitoria de esta fitoalexina *in vitro* frente a *P. digitatum* fue de 29 y 46 µg/ml para la elongación del tubo germinativo y la germinación de los conidios, respectivamente. En nuestros experimentos la máxima concentración de escoparona detectada fue en el tratamiento con Serenade® (6 dpt) (31,8 µg/g Pf) y se encuentra dentro de estos valores reportados (Fig. 6.16 y Fig. 6.18). Sin

embargo, en el resto de los tratamientos las cantidades detectadas de escoparona fueron en general inferiores a estas concentraciones. Esto puede deberse a que en la metodología empleada, tomamos la muestra de flavedo de la mitad del fruto de limón; lo que habría producido una dilución del compuesto, ya que Kim *et al.* (1991) y Porat *et al.* (2003) reportaron que sólo se detectó la fitoalexina en el sitio de inoculación e incluso más allá de 1 cm de este sitio no fue detectada al igual que en el punto opuesto a éste. Asimismo, Ballester (2007) indica que en general los tratamientos de inducción de defensa en los frutos cítricos tienen carácter local, es decir se manifiesta en zonas cercanas al punto de aplicación del elicitor, disminuyendo progresivamente en zonas más distales.

Los tratamientos elicitores inoculados con el patógeno también mostraron inducción de la fitoalexina, pero se observó una disminución general en la concentración de la misma en el tiempo (Fig. 6.17). Afek y Sztejnberg (1988) y Ortuño *et al.* (1997) sugieren que esto posiblemente se debe a la degradación de las fitoalexinas ante el avance del patógeno. Los tratamientos con Serenade® (1%) y bicarbonato de sodio (3%) se alejaron de este comportamiento probablemente debido a que tuvieron baja incidencia de la enfermedad (ver Cap 5 apartado 5.4.3.1) y por lo que se comportaron como los tratamientos elicitores sin inocular (sin patógeno), donde la fruta continuó incrementando la concentración de la fitoalexina (Fig. 6.17). En el control fruta herida inoculada inicialmente se observó un ligero incremento en la concentración de la fitoalexina en el tiempo, posiblemente, debido a un efecto de señalización que produjo el inóculo desde el inicio y que llevó a la fruta a aumentar la concentración de la fitoalexina para frenar el patógeno. Kim *et al.* (1991) demostraron que el patógeno tiene un importante rol en la elicitación de la respuesta de defensa.

El testigo absoluto (fruta herida e inoculada a las 48 h) se comportó como el resto de los tratamientos elicitores (inoculados a las 48 h), con una disminución en la concentración de la fitoalexina en el tiempo. En este caso la herida inicial actuó como elicitor, sin embargo la herida por sí sola tiene menor capacidad de desencadenar la respuesta de defensa comparada con el inóculo (Kim *et al.*, 1991).

Es importante resaltar que la aplicación del fungicida químico (a 0,05 % y a una concentración 50 veces menor) fue también capaz de elicitar respuesta de defensa. No se encontraron reportes en la bibliografía consultada acerca de determinaciones de fitoalexinas luego de aplicar los fungicidas químicos en frutas. Esto nos estaría indicando que la fruta respondería ante el estímulo del fungicida químico, por lo que se debería continuar en futuras investigaciones, con estudios para conocer y explicar lo que ocurre en el metabolismo de la fruta luego de la aplicación de estos fungicidas químicos.

En el tratamiento imazalil 0,001 % en 4 dpt hubo un descenso muy marcado debido posiblemente al efecto de dilución mencionado. Por otra parte, Arras (1996) expresa que la biosíntesis de fitoalexinas es variable y está relacionada con factores tales como el tamaño de la herida y la cepa antagonista involucrada (como tratamiento inductor), y su cantidad y concentración dependen del tiempo entre el tratamiento y la inoculación. El estado fisiológico del fruto, también influye en la cantidad de sustratos y enzimas (por ejemplo; sintetasa, catalasas, etc.) involucradas en la síntesis y metabolismo de las fitoalexinas (El-Ghaouth, 1997; Kuniga y Matsumoto, 2006).

6.5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente capítulo, nos permiten concluir que la fruta respondió a distintos estímulos como ser herida, patógeno, tratamientos biológicos y fungicida químico, desencadenando mecanismos de defensa. Esto se pudo confirmar a través de la presencia e incremento registrado de la fitoalexina escoparona, especialmente en el tratamiento con Serenade® 1% (sin inocular) que fue el que experimentó mayor incremento de la fitoalexina en el tiempo. Posiblemente por éste y otros mecanismos de defensa no abordados en esta tesis, se registraron menores niveles de incidencia y severidad de la enfermedad en los experimentos inductivos (t 48h) desarrollados en el Capítulo 5, especialmente con los tratamientos Serenade® y bicarbonato de sodio. Sin embargo, para el tratamiento con bicarbonato de sodio 3 % que previno la enfermedad en esos experimentos, no fue posible detectar un incremento significativo de la fitoalexina escoparona, con la metodología empleada.

El uso de esta herramienta de inducción de defensa no debe ser descartada, ya que puede ser integrada a otras técnicas de control biológico para contribuir al manejo de las enfermedades de poscosecha. Además, debe considerarse como un refuerzo de defensa natural de la fruta que ocurre a un nivel metabólico, cuando aplicamos algún tratamiento biológico o químico. Por todo esto, es necesario conocer los procesos que ocurren a niveles bioquímicos y moleculares, para poder encontrar las mejores condiciones que permitan alcanzar niveles óptimos y efectivos para afrontar los patógenos.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN GENERAL

La podredumbre verde de los cítricos causada por *P. digitatum* es una de las enfermedades patológicas de poscosecha que más afectan la comercialización de los frutos cítricos a nivel mundial (Eckert y Wild, 1983; Whiteside *et al.*, 1988; Fogliata, *et al.*, 2000; Palou, 2002). Este patógeno está presente en todas las etapas de la producción; desde el campo, momento de la cosecha, procesamiento y empaque, en almacenamiento, transporte y mercado e incluso después de ser adquirido por el consumidor (Amiri y Bompeix, 2005).

En trabajos realizados en España, por Palou *et al.* (2001), se mostró que las poblaciones de *Penicillium* presentes exhibían una gran variabilidad de empaque a empaque, entre las quintas y en el momento de cosecha, de acuerdo a la estación del año. En los resultados obtenidos en este estudio también se observaron diferencias en el comportamiento de las cepas patógenas de *P. digitatum* frente al fungicida imazalil y a las diferentes alternativas evaluadas, confirmando que en nuestras condiciones también existe variabilidad intrínseca dentro de la población fúngica de este patógeno. Incluso se detectaron cepas resistentes al fungicida imazalil, por lo que adicionalmente, se sugiere un monitoreo permanente de los empaques para evaluar la presencia y frecuencia de estas cepas, ya que éste tiene implicancia directa en el manejo de poscosecha.

El control de la enfermedad “podredumbre verde de los cítricos” continúa siendo una preocupación para los responsables de la cadena cítrica debido a que actualmente solo se disponen de fungicidas de síntesis química para su manejo. Los países compradores exigen cada vez menores residuos de productos químicos e incluso la legislación actual va hacia la prohibición de los mismos (Vero *et al.*, 2004; Viñas *et al.*, 2006). Por lo cual, es necesario buscar métodos alternativos de control, a fin de lograr la reducción del uso de agroquímicos y obtener frutos de calidad, libre de residuos e inócuos para los consumidores y el ambiente. Con este objetivo, en este estudio se evaluaron algunas alternativas biológicas de bajo impacto ambiental como ser: dos extractos vegetales (Insibiox y Biocitrus®), cepas de bacterias lácticas y sus metabolitos, la bacteria *Bacillus subtilis* cepa QST 713 (Serenade®) y el bicarbonato de sodio.

Los resultados de los productos biológicos aplicados en los frutos de limón sugirieron que estas distintas alternativas, por sí solas no son capaces de controlar al patógeno, dado que mostraron altos valores de incidencia de la enfermedad. Sin embargo hubo una marcada disminución en la severidad, indicando que estos productos lograron interferir con el establecimiento y desarrollo normal del patógeno sobre los frutos de limón.

Esta disminución de severidad registrada es importante ya que muestra que los tratamientos evaluados, ejercieron un efecto de biocontrol, por lo que no deben descartarse estas alternativas. Entonces sería necesario potenciar este efecto a través de la combinación entre sí o con otros métodos, tales como: termoterapia, empleo de sanitizantes, conservación en frío, curado, radiaciones UV, etc., para lograr el control de la enfermedad.

Además, si se tiene en cuenta las condiciones experimentales utilizadas, habría que considerar evaluar el efecto de estos productos en las condiciones de planta de empaque habituales, ya que en nuestros experimentos la fruta fue tratada en condiciones excesivamente rigurosas, es decir, con herida, con una alta presión de inóculo (1×10^6 conidios/ml) y con temperatura y humedad óptimas para el desarrollo de la enfermedad. El efecto observado en esta tesis por los biocontroladores evaluados podría potenciarse bajo esas condiciones reales de manipulación de las frutas cítricas, donde se integran medidas de prevención y control de las enfermedades patológicas de poscosecha. Como sugieren Janisiewicz y Korsten (2002), el ambiente de poscosecha es propicio para la implantación del control biológico y juega un importante rol en la adopción de estas medidas.

En el control biológico hay aún un amplio campo por explorar e investigar, por lo que es necesario continuar en la búsqueda e implementación de alternativas viables, a través de una estrategia más amplia que integre varias medidas. Las prácticas de control de enfermedades patológicas en poscosecha deben considerarse parte de los programas de MIC (Manejo Integrado de Cultivo), el cual inicia durante la plantación, estación de crecimiento, continuando durante la cosecha y extendiéndose hasta el manejo poscosecha. Incluyéndose en esta última etapa, el empaque, almacenamiento, transporte y comercialización hasta que el producto llegue al consumidor (Adavaskej, 2007). En este contexto, las alternativas biológicas evaluadas en esta tesis podrían incluirse como una medida más de ese gran conjunto de prácticas de MIC, que contribuyan finalmente a un manejo más completo e integrado de los patógenos de poscosecha.

Nuestros resultados también mostraron que cuando se aplican los productos biológicos, previos a la inoculación con el patógeno, algunos de ellos indujeron mecanismos de defensa presentes en la fruta, y que frenaron el posterior desarrollo del patógeno. Dentro de los tratamientos más efectivos como preventivos se destacó el tratamiento con bicarbonato de sodio 3%, sin embargo no se observó un incremento de la fitoalexina escoparona luego de la aplicación del mismo indicándonos que estarían operando otros mecanismos de defensa en el fruto. En el tratamiento Serenade® 1% y en menor medida en los tratamientos con el fungicida químico, los extractos vegetales y los controles, siempre que la fruta estuvo herida, se detectó la presencia e incremento de la fitoalexina escoparona, confirmando los reportes previos de investigadores; que indican que en la fruta ocurren procesos bioquímicos que contribuyen a la defensa de patógenos (Afek y Sztejnberg, 1988; Kim *et al.*, 1991; Ben-Yehoshua *et al.*, 1992; 1995; 2000; Rodov *et al.*, 1995; Ortuño *et al.*, 1997; 2006; Arras y Sanna, 1999; Porat *et al.*, 1999; Arras *et al.*, 2005; 2006; Ballester, 2007).

En base a las hipótesis planteadas al inicio de esta tesis y a los resultados encontrados, podemos concluir:

- Se confirma la hipótesis que las bacterias lácticas (BAL) producen metabolitos, con propiedades antifúngicas, que ejercen una acción frente a *Penicillium digitatum* en los frutos de limón, sin embargo no se pudo confirmar la hipótesis que estos metabolitos inducirían una respuesta de defensa.
- Se confirma la hipótesis que los extractos vegetales (Insibiox y Biocitrus®) poseen diferentes compuestos antifúngicos que son efectivos para controlar parcialmente a *Penicillium digitatum* y además que pueden

actuar indirectamente como “elicitores”, facilitando la defensa propia de la fruta frente al patógeno.

- Se confirma la hipótesis que el biofungicida Serenade® posee actividad antifúngica indirecta que inhibe parcialmente el desarrollo de *Penicillium digitatum* y también que activa el sistema de defensa natural de la fruta.
- Se confirma la hipótesis que el bicarbonato de sodio permite controlar a *Penicillium digitatum* en poscosecha, por acción indirecta a través de la inducción de algún mecanismo de defensa de los frutos y parcialmente por acción antifúngica directa.
- Se confirma la hipótesis que la síntesis de fitoalexinas se induce como respuesta a la aplicación de los “elicitores” y que se observa un incremento de las mismas en el tejido del epicarpo (flavedo) del fruto.

Los resultados obtenidos permiten proponer algunas líneas de investigación futuras que podrían completar el trabajo iniciado en esta tesis. Entre ellas, se sugiere que sería importante evaluar el efecto de incrementos en la concentración de uso de los productos biológicos, la combinación entre sí, con otros tratamientos (tratamientos térmicos, radiaciones, uso de sanitizantes, etc.) o con fungicidas químicos (bajando las dosis de los mismos); como así también evaluar el momento oportuno de aplicación de estos productos biológicos, por ejemplo, luego de la cosecha, ya que la herida estimula procesos de defensa en la fruta y mejora la acción de los mismos.

También es necesario, continuar investigando los mecanismos de defensa que ocurren en la fruta, como herramienta basada en la defensa natural.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis nos permiten concluir lo siguiente:

- Del total de cepas aisladas (15), se seleccionaron seis cepas (PD1, PD2, PD3, PD4, PD5 y PD6) que reunieron las características específicas y comunes de *P. digitatum*. Estas cepas fueron resistentes *in vitro* a 100 ppm frente al fungicida imazalil, a excepción de una cepa (PD6) que fue sensible a esta concentración.
- Las cepas PD1, PD2 y PD5 fueron las más resistentes *in vitro* y no mostraron diferencias de comportamiento *in vivo* en cuanto a la velocidad de desarrollo de la enfermedad en el tiempo, ni de resistencia frente al fungicida imazalil, cuando fueron evaluadas sobre frutos de limón. Esto nos permitió concluir que no hubo diferencias de patogenicidad entre estas cepas.
- Se construyó una escala de severidad con cinco grados a partir de los síntomas de la enfermedad “moho verde de los cítricos”, que fue adecuada para evaluar el efecto de las distintas alternativas de tratamientos biológicos sobre los frutos de limón.
- De un total de 33 cepas de bacterias lácticas evaluadas se seleccionaron ocho cepas (*L. casei* CRL 76 y CRL 208; *L. plantarum* CRL 778, CRL 1073 y CRL 1081; *P. pentosaceus* CRL 908; *L. acidophilus* CRL 1063 y *L. paracasei* CRL 1501) con propiedades antifúngicas frente a PD1, PD2 y PD5.
- Los metabolitos antifúngicos producidos por las BAL fueron identificados como ácido láctico, acético y fenil láctico, observándose un efecto dependiente de la concentración relativa de cada uno de ellos y del pH del medio.
- Los productos biológicos (Insibiox, Biocitrus®, Serenade® y bicarbonato de sodio) evaluados en condiciones de laboratorio (*in vitro*) mostraron actividad antifúngica frente a las todas las cepas de *Penicillium digitatum*, inhibiendo el crecimiento y el desarrollo del mismo.
- Los tratamientos con los productos alternativos (a excepción de bicarbonato de sodio 3%) realizados simultáneamente y 18 h posteriores de la inoculación como así también aplicados 48 h previas al patógeno, no lograron controlar completamente el desarrollo de *P. digitatum* (incidencia) sobre los frutos de limón. Sin embargo hubo una marcada disminución de la severidad, respecto al testigo (tratado con agua) indicando que interfirieron el normal establecimiento del patógeno sobre los frutos de limón, retrasando la enfermedad.
- El tratamiento con bicarbonato de sodio (3 %), aplicado 48 horas previas al inóculo, fue eficiente para reducir los parámetros incidencia y severidad ya que previno el desarrollo de la enfermedad “moho verde de los

cítricos” sobre frutos de limón y fue similar estadísticamente al control de fruta sana sin inocular.

CAPÍTULO 9

BIBLIOGRAFÍA

- Adaskaveg JE, Förster H y NF Sommer (2007) Fundamentos de Fitopatología y Manejo de las enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas comestibles. In: Tecnología postcosecha de cultivos frutihortícolas. AA Kader (Ed.). Postharvest Technology Research and Information Center. UC Davis. Department of Plant Sciences, 191-227 pp. [CD-ROM]
- Afek U, Orenstein J, Carmeli S, Rodov V y MB Joseph (1999) Umbelliferone, a phytoalexin associated with resistance of immature Marsh grapefruit to *Penicillium digitatum*. *Phytochemistry* **50**,1129-1132.
- Afek U y A Szejnberg (1995) Scoparone (6,7-dimethoxycoumarin), a *Citrus* phytoalexin involved in resistance to pathogens. In: Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action. M Daniel y R Purkayastha (Eds.), Marcel Dekker, New York, 263-286 pp.
- Afek U y A Szejnberg (1988) Accumulation of scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathology* **78**, 1678-1682.
- Aguirre Hood R y B Pinilla (2005) Uso de BC 1000 para el control de pudrición ácida y *Botrytis* en uva de mesa, uva vinífera y otros frutales menores. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. URL: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/monteval_egre_j/7.html. Acceso 29 de marzo de 2010.
- Agraquest Inc. (2009) Agrochemical Division, fungicides products. URL: <http://www.agraquest.com/agrochemical/products/fungicides-serenade-max.php>. Acceso 29 de marzo de 2010.
- Amiri A y G Bompeix (2005) Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre and postharvest environments: consequences for decay development. *Plant Pathology* **54**, 74-81.
- Arauz Cavallini LF (1998). Fitopatología: un enfoque agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica (1 Ed.), 254-256 pp.
- Arras G, D'hallewin G, Molinu MG, Dore A, Venditti T, Fois M, Lima G y M Agabbio (2006) Induction of phytoalexins biosíntesis in orange fruit by the biocontrol yeast *Rhodotorula glutinis*. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **71**, 915-921.
- Arras G, D'hallewin G, Petretto A, Marceddu S, Loche M y M Agabbio (2005) Biological and physical approaches to improve induced resistance against green mold of stored citrus fruit. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **70**, 391-397.
- Arras G y P Sanna (1999) Resistance of citrus fruits to *Penicillium italicum*. *Proc. 51st National Symp. Crop Protection*, Gent. Belgium, **64**, 527-530.
- Arras G y S Arru (1997) Mode of action of some microbial antagonists against fungal pathogens. *Ann. Microbiol. Enzymol.* **47**, 97-120.

- Arras G (1996) Mode of action of an isolate *Candida fomata* in biological control of *Penicillium digitatum* in oranges fruits. *Postharvest Biol. and Technol.* **8**, 191-198.
- Asociación Tucumana del Citrus (2009). Reseña histórica y estadísticas del Citrus en Tucumán. URL: <http://www.atc.com>. Acceso 29 de marzo de 2010.
- Axelsson L (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. S Salminen, A von Wright y A Ouwehand (Eds.). Marcel Dekker Inc., New York. (3 Ed.), 1-66 pp.
- Ballester AR (2007) Resistencia frente a la infección por *Penicillium digitatum* durante la postcosecha de los frutos cítricos. Bases moleculares y metabolismo de fenilpropanoides. Tesis para obtener el título de Doctor. Universidad de Valencia, España, 1-282 pp.
- Ballester AR, Lafuente MT y L González-Candelas (2006) Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in citrus fruit-*Penicillium digitatum* interaction. *Postharvest Biol. and Technol.* **39**, 115-124.
- Barnet HL y BB Hunter (1998) Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota (4 Ed.), 10-94 pp.
- Baudoin ABAM y JW Eckert (1985) Development of resistance against *Geotrichum candidum* in lemon peel injuries. *Phytopathology* **75**, 174-179.
- Bautista Baños S (2006) El control biológico en la reducción de enfermedades de postcosecha en productos hortofrutícolas: usos de microorganismos antagonistas. *Rev. Iber. de Tecnología de Postcosecha* **8**, 1-6.
- Benhamou N (2004) Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold: a comparison with the effect of chitosan. *Phytopathology* **94**, 693-705.
- Benítez Ahrendts MR y L Carrillo (2004) Levaduras inhibidoras de *Penicillium*. *Rev. Arg. Microbiol.* **36**, 182-186.
- Bettiol W (2006) Productos alternativos para el manejo de enfermedades en cultivos comerciales. *Fitosanidad* **10**, 85-98.
- Ben-Yehoshua S, Rodov V, Nafussi B, Peretz J y R Porat (2000) Biotic and abiotic induction of resistance against pathogens in citrus fruits. *Proc. Intl. Soc. Citricult. IX Congr.*, Orlando Florida. **2**, 1107-1112.
- Ben-Yehoshua S, Rodov V, Fang DQ y JJ Kim (1995) Preformed antifungal compounds of citrus fruit: effect of postharvest treatments with heat and growth regulators. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1062-1066.
- Ben-Yehoshua S, Rodov V, Kim JJ y S Carmeli (1992) Preformed and induced antifungal materials of citrus fruit in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1217-1221.
- Brul S y P Coote (1999) Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* **50**, 1-17.

- Cabo ML, Braber AF y P Koenraad (2002) Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *J. Food Prot.* **65**, 1309-1316.
- Caccioni DRL, Guizzardi M, Biondi DM, Renda A y G Ruberto (1998) Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Int. J. of Food Microbiol.* **43**, 73-79.
- Carrillo L (2003) Los hongos de los alimentos y los forrajes. Ediciones Universidad Nacional de Salta. Salta, Argentina, 61-70 pp.
- Chemie S.A. (2009) Ficha técnica del producto Biocitrus®. URL: http://www.chemiesa.com/fichaTecnica/ficha_tecnica_20081208194359.pdf. Acceso 29 de marzo de 2010.
- Cocco M, Vázquez DE, Albors A, Cháfer M, Meier GE y F Bello (2008) Combinación de tratamientos térmicos y bicarbonato de sodio para el control de *Penicillium digitatum* en frutos cítricos. *Rev. Iber. de Tecnología de Postcosecha* **9** (1), 55-62.
- Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de España (2009) Sustancias activas de productos fitosanitarios aceptadas, excluidas y en revisión comunitaria, a 11 de noviembre de 2009. URL: http://www.gobcan.es/agricultura/doc/agricultura/infofito/sustancias_activas.pdf. Acceso 29 de marzo de 2010.
- Conway WS, Janisiewicz WJ, Leverentz B, Saftnes RA y MJ Camp (2007) Control of blue mold of apple by combining controlled atmosphere, an antagonist mixture and sodium bicarbonate. *Postharvest Biol. and Technol.* **45**, 326-332.
- Conway WS, Leverentz B, Janisiewicz W, Blodgett A., Saftner R y M Camp (2004) Integrating heat treatment, biocontrol and sodium bicarbonate to reduce postharvest decay of apple caused by *Colletotrichum acutatum* and *Penicillium expansum*. *Postharvest Biol. and Technol.* **34**, 11-20.
- D'Aquino S, Schirra M, Palma A, Angioni A, Cabras P y Q Micheli (2006) Residue levels and effectiveness of Pyrimethanil vs Imazalil when using heated postharvest dip treatments for control of *Penicillium* decay on citrus fruit. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4721-4726.
- De Man JC, Rogosa M y ME Sharpe (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal in Applied Bacteriology* **23**, 130-135.
- Dhingra OD y JB Sinclair (1985) Biological control. In: Basic plant pathology methods. CRC Press, Boca Raton, Florida (1 Ed.), 245-258 pp.
- Dieuleveux V y M Gueguen (1998) Antimicrobial effects of D-3-phenyllactic acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE medium, milk and cheese. *J. Food Prot.* **61**, 1281-1285.
- Dieuleveux V, Van der Pyl D, Chataud J y M Gueguen (1998) Purification and characterization of anti-*Listeria* compounds produced by *Geotrichum candidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 800-803.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M y CW Robledo (2009) InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

- Droby S, Vinokur V, Weiss B, Cohen L, Daus A, Goldschmidt EE y R Porat (2002) Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology* **92**, 393-399.
- Droby S, Wisniewski ME, Cohen L, Weiss B, Touitou D, Eilam Y y E Chalutz (1997) Influence of CaCl₂ on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. *Phytopathology* **87**, 310-315.
- Eayre CG, Skaria M, Bull CT y B Mackey (2003) An avirulent *Galactomyces* species that controls green mold of citrus caused by *Penicillium digitatum*. *Subtrop. Plant Sci.* **55**, 46-50.
- Eckert JW y M Ratnayake (1994) Role of volatile compounds from wounded oranges in induction of germination of *Penicillium digitatum* conidia. *Phytopathology* **84**, 746-750.
- Eckert JW y GE Brown (1986) Evaluation of postharvest treatments for citrus fruits. In: Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens. KD Hickey (Ed.), American Phytopathological Society, St Paul, MN, 93-97 pp.
- Eckert JW y L Wild (1983) Problems of fungicide resistance in *Penicillium* rot of citrus fruits. In: Pest resistance to pesticides. GP Georghiou y T Saito (Eds.). Plenum Press, New York, 526-555 pp.
- El-Ghaouth A (1997) Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. *J. of Industrial Microbiol. and Biothechnol.* **19**, 160-162.
- EPA-US (Environmental Protection Agency, United States) (2009). URL: <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/>. Acceso 29 de marzo de 2010.
- Esterio M y J Auger (1997) *Botrytis*: Nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Departamento de Sanidad Vegetal, Santiago, Chile, 125 p.
- Fajardo JE, McCollum TG, McDonald RE y RT Mayer (1998) Differential induction of proteins in orange flavedo by biologically based elicitors and challenged by *Penicillium digitatum* Sacc. *Biol. Control* **13**, 143-151.
- FAO (2007) Manejo postcosecha de los cítricos. In: Manual de manejo postcosecha de frutas tropicales (papaya, piña, plátano, cítricos) URL: <http://www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/ac304s/ac304s00.htm>. Acceso 29 de marzo de 2010.
- FAO (2000) Compendium of food additive specification. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, FAO Food and Nutrition Paper 1, 52 p.
- FDA-US (2009) (Food and Drug Administration, United States). URL: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/default.htm>. Acceso 29 de marzo de 2010.
- FederCitrus (Federación Argentina del Citrus) (2009) La actividad cítrica Argentina 2009. URL: <http://www.federCitrus.org/actividad-citricola-2009.pdf>. Acceso 29 de marzo de 2010.

- Fischer IH, Lourenço SA, Spósito MB y L Amorim (2009). Characterisation of the fungal population in citrus packing houses. *Eur. J. Plant Pathol.* **123**, 449-460.
- Fogliata MG, Torres Leal GJ y LD Ploper (2000) Behaviour of imazalil-resistant strains of *Penicillium digitatum* Sacc. against fungicides currently employed in citrus packinghouses and alternative fungicides in Tucumán Province, Argentina. *Proc. Intl. Soc. Citricult. IX Congr.*, Orlando Florida, **2**, 1006-1008.
- Fogliata MG, GJ Torres Leal y LD Ploper (1998) Detección de cepas resistentes de *Penicillium digitatum* a los fungicidas de uso corriente en plantas de empaque de cítrico de Tucumán. *Avance Agroind.* **73**, 19-22.
- Fravel DR (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 337-359.
- Frisvad JC y RA Samson (2004) Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology* **49**, 1-174.
- García M A (1996) Requerimientos ecológicos del limón. In: Manual de producción de limón. MO Haro (Ed). Ediciones INTA, 31-50 pp.
- Grignola J (2007) Utilización de extractos de *Fragaria ananassa* como agrobiocida para el manejo de la antracnosis de la frutilla. Trabajo de tesis para la obtención de título de grado de Licenciado en Biotecnología. Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), Universidad Nacional de Tucumán (UNT), Argentina, 1-53 pp.
- Holmes GJ y JW Eckert (1999) Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* **89**, 716-721.
- Holmes GJ y JW Eckert (1995) Relative fitness of imazalil-resistant and sensitive biotypes of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology* **79**, 1068-1073.
- Janisiewicz WJ y L Korsten (2002) Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**, 411-441.
- Kim JJ, Ben Yehoshua S, Shapiro B, Henis Y y S Carmeli (1991) Accumulation of scoparone in heat-treated lemon fruit inoculated with *Penicillium digitatum* Sacc. *Plant Physiol.* **97**, 880-885.
- Kinay P, Mansour MF, Gabler FM, Margosan DA y JL Smilanick (2007) Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected of California. *Crop Protection* **26**, 647-656.
- Klein G, Pack A, Bonaparte C y G Reuter (1998) Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. of Food Microbiol.* **41**, 103-125.
- Kuniga T y R Matsumoto (2006) Comparative study of scoparone accumulation in various *Citrus* species after inoculation with gray mold. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **75**, 379-384.
- Lima G, Arru S, De Curtis F y G Arras (1999) Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. *J. of Industrial Microbiol. and Biothechnol.* **23**, 223-229.

- Magnusson J, Ström K, Roos S y J Sjögren (2003) Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**,129-135.
- Marcillaud L y B Doneche (1997) First results about use of a possible substitution product for sulfur dioxide in wine making. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **31**, 93-98.
- Mari M, Bertolini P y G Pratella (2003) Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 761-766.
- Maroto A, Boqué R, Riu J y FX Rius (2002) Estrategias para el cálculo de la incertidumbre. URL: <http://www.quimica.urv.cat/quimio/general/estinc.pdf> Acceso 29 de marzo de 2010.
- Muiño BL, Pérez L, Pollanco A, Ponciano I, Lorenzo ME, Martín EL, González MA, Arévalo R, Rodríguez J, Trujillo M y Y Santana (2007) El monitoreo y manejo de la resistencia a los fungicidas en Cuba. *Fitosanidad* **3**, 91-100. URL: <http://www.inisav.cu/fitosanidad/2007/Revista%203-07.pdf>. Acceso 29 de marzo de 2010.
- Müller IA y R Bernal (2001) Manejo de la fruta cítrica en poscosecha: efecto del bicarbonato y carbonato de sodio e imazalil aplicados en agua caliente y a temperatura ambiente, en el crecimiento de *Penicillium* en poscosecha. Avances anuales de investigación en cítricos: poscosecha, protección vegetal, INIA Salto Grande, Salto, Uruguay, 20-23 pp.
- Nafussi B, Ben-Yehoshua S, Rodov V, Peretz J, Ozer BK y G D'hallewin (2001) Mode of action of hot-water dip in reducing decay of lemon fruit. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 107-113.
- Neri F, Mari M y S Brigati (2006a) Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. *Plant Pathology* **55**, 100-105.
- Neri F, Mari M, Menniti AM y S Brigati (2006b) Activity of trans-2-hexenal against *Penicillium expansum* in 'Conference' pears. *J. of Applied Microbiology* **100**, 1186-1193.
- Obagwu J y L Korsten (2003) Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biol. and Technol.* **28**, 187-194.
- Ochoa J, Hernández Montiel L, Lastisnere Barragán H, León de la Luz J y C Sarralde Corona (2007) Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja, *Citrus sinensis* Obseck, cultivada en baja California Sur, México. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **5**, 352-359.
- Ortuño A, Báidez A, Gómez P, Arcas MC, Porras I, García-Lidón A y JA Del Río (2006) *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chem.* **98**, 351-358.
- Ortuño A, Botía JM, Fuster MD, Porras I, García-Lidón A y JA Del Río (1997) Effect of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) biosynthesis on the resistance of tangelo Nova, *Citrus paradisi*, and *Citrus aurantium* fruits against *Phytophthora parasitica*. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2740-2743.
- Palacios J (2005) Citricultura. Ed. Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires, Argentina, 29-61 pp.

- Palou L, Marcilla A, Rojas-Argudo C y M Alonso (2007) Effects of X-ray irradiation and sodium carbonate treatments on postharvest *Penicillium* decay and quality attributes of clementine mandarins. *Postharvest Biol. and Technol.* **46**, 525-261.
- Palou L (2002) Avaluació de sistemes alternatius als fungicides sintètics per al control de les podridures verda i blava en postcollita de cítrics. Memòria per optar al grau de doctor. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària. Universitat de Lleida, 1-255 pp .
- Palou L, Smilanick J, Usall J y I Viñas (2001a). Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. *Plant Disease* **85**, 371-376.
- Palou L, Usall J, Pons J y I Viñas (2001b) Micoflora epífita de los frutos y ambiental en campos de mandarino «Clemenules» en Tarragona. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* **16 (2)**, 257-272.
- Parente E y C Hill (1992) A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 290-298.
- Piper P, Ortiz Calderon C, Hatzixanthis K y M Mollapour (2001) Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiol.* **147**, 2635-2642.
- Plaza P, Usall J, Teixidó N y I Viñas (2004) Effect of water activity and temperature on competing abilities of common postharvest citrus fungi. *Int. J. of Food Microbiol.* **90**, 75-82.
- Poppe L, Vanhoutte S y M Höfte (2003) Modes of action of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist of postharvest pathogens on fruits. *Eur. J. Plant Pathol.* **109**, 963-973.
- Porat R, Weiss B, Cohen I, Daus A y A Aharoni (2004) Reduction of postharvest rind disorders in citrus fruit by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biol. and Technol.* **33**, 35-43.
- Porat R, Vinokur V, Weiss B, Cohen L, Daus A, Goldschmidt EE y S Droby (2003) Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by β -aminobutyric acid. *Eur. J. Plant Pathol.* **109**, 901-907.
- Porat R, Lers A, Dori S, Cohen L, Weiss B, Daus A, Wilson CL y S Droby (1999) Induction of chitinase and β -1,3-endoglucanase proteins by UV irradiation and wounding in grapefruit peel tissue. *Phytoparasitica* **27**, 1-6.
- Prusky D, McEvoy JL, Saftner R, Conway WS y R Jones (2004) Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit. *Phytopathology* **94**, 44-51.
- Rodov V, Ben-Yehoshua S, Fang DQ, Kim JJ y R Ashkenazi (1995) Preformed antifungal compounds of lemon fruit: citral and its relation to disease resistance. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1057-1061.
- SENASA (2009) Reporte comparativo del Comercio Exterior de productos, subproductos y derivados de origen vegetal. URL: www.senasa.gov.ar. Acceso 29 de marzo de 2010.
- Sendín LN (2004) Uso de extractos de hojas de frutillas silvestres y cultivadas para el control de enfermedades de poscosecha en cítricos. Trabajo de tesis para la obtención de título de grado de Licenciado en Biotecnología.

- Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO). Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Argentina, 1-38 pp.
- Sendín LN, Mamaní A, Filippone P, Torres Leal GJ, Castagnaro A y J Díaz Ricci (2004) Use of methanolic extracts obtained of strawberry leaves for the control of postharvest diseases in lemon. Abstract. 10th ISC Congress. Agadir, Morocco, 113 p.
- Sharma RR, Singh D y R Singh (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biol. Control*. **50**, 205-221.
- Sinclair WB (1984) The biochemistry and physiology of the lemon and other citrus fruits. Division of Agriculture and National Resources, University of California, 67-68 pp.
- Sjögren J, Magnusson J, Broberg A, Schnürer J y L Kenne (2003) Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 7554-7557.
- Smilanick JL, Mansour MF, Gabler FM y D Sorenson (2008) Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. *Postharvest Biol. and Technol.* **47**, 226-238.
- Smilanick JL, Mansour MF, Margosan DA y FM Gabler (2005) Influence of pH and NaHCO₃ on effectiveness of imazalil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control postharvest green mold on citrus fruit. *Plant Disease* **89**, 640-648.
- Smilanick J, Margosan D, Milkota F, Usall J y I Michael (1999) Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Disease* **83**, 139-145.
- Smilanick JL, Michael IF, Mansour MF, Mackey BE, Margosan DA, Flores D y CF Weist (1997) Improved control of green mold of citrus with Imazalil in warm water compared with its use in wax. *Plant Disease* **81**, 1299-1304.
- Smilanick JL y JW Eckert (1986) Growth, sporulation, and virulence of isolates of *Penicillium digitatum* resistant to the fungicide sec-Butylamine. *Phytopathology* **76**, 805-808.
- Sommer NF, Fortlage RJ y DC Edwards (2007) Enfermedades Postcosecha de Productos Seleccionados. In: Tecnología postcosecha de cultivos frutihortícolas. AA Kader (Ed.). Postharvest Technology Research and Information Center. UC Davis. Department of Plant Sciences, 227-287 pp. [CD-ROM].
- Sozzi GO (2007) Árboles frutales. Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento. Ed. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina, 309-328; 669-805 pp.
- Spadaro D y ML Gullino (2004) State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *Int. J. of Food Microbiol.* **91**, 185-194.
- Stange C, Briceño E, Latorre BA y P Arce-Johnson (2007) Interacción Planta Patógeno. In: Fisiología Vegetal. FA Squeo y L Cardemil (Eds.). Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. URL:

- http://www.biouls.cl/librofv/web/pdf_word/Capitulo%2013.pdf. Acceso 29 de marzo de 2010.
- Stange RR, Midland SL, Sims JJ y TG Mc Collum (2002) Differential effects of citrus peel extracts on growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *P. expansum*. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* **61**, 303-311.
- Stange RR, y JW Eckert (1994) Influence of postharvest handling and surfactants on control of green mold of lemons by curing. *Phytopathology* **84**, 612-616.
- Stange RR, Midland SL, Eckert JW y JJ Sims (1993) An antifungal compound produced by grapefruit and Valencia orange after wounding of the peel. *Journal of Natural Products* **56**, 1627-1629.
- Ström K (2005) Fungal inhibitory lactic acid bacteria. Characterization and application of *Lactobacillus plantarum* Mi LAB 393. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 1-36 pp.
- Taylor JR (1982) Propagation of uncertainties. In: An introduction of error analysis. Eugenie D. Communis (Ed) University Science Books. Oxford University Press. U.K., 40-80 pp.
- Teixidó N, Usall J, Palou L, Asensio A, Nunes C y I Viñas (2001) Improving control of green and blue molds of oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**, 685-694.
- Teixidó N, Usall J, Nunes C, Palou L y I Viñas (2000). Biological control of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on citrus fruits with *Pantoea agglomerans* (CPA-2). *Proc. Intl. Soc. Citricult. IX Congr.*, Orlando, Florida. **2**, 1134-1135.
- Terry LA y DC Joyce (2004) Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biol. and Technol.* **32**, 1-13.
- Toll Joubes J, Corizzi F y E Padilla (1971) Historia y evolución de los citrus en la Provincia de Tucumán 1956-1970. Pub. Misc. N° 42. Facultad de Agronomía y Zootecnia, UNT, 78 p.
- Torres Leal GJ (2005) Manejo de post-cosecha de limones y limas ácidas en el noroeste de Argentina. In: Actas del II Seminario Internacional de Postcosecha de los Cítricos. Concordia, Entre Ríos, Argentina. Ediciones INTA, 79-83 pp.
- Torres Leal GJ (1996) Tecnología de postcosecha. In: Manual de producción de limón. MO Haro (Ed). Ediciones INTA, 195-201 pp.
- Torres Leal GJ (1989) Virulence, fitness and persistence of Imazalil-resistant Strains of *Penicillium digitatum* Sacc. Thesis for the degree of Master of Science in Plant Science. Univ. of California, Riverside, 1-60 pp.
- Torres MJ (2008) Selección de bacterias lácticas (BAL) y caracterización de los metabolitos bioactivos. Trabajo de tesis para la obtención de título de grado de Licenciado en Biotecnología. Universidad Nacional de Tucumán (UNT), Argentina, 1-61 pp.
- Torres R, Nunes C, García J, Abadías I, Viñas I, Manso T, Olmo M y J Usall (2007) Application of *Pantoea agglomerans* CPA-2 in combination with

- heated sodium bicarbonate solutions to control the major postharvest diseases affecting citrus fruit at several Mediterranean locations. *Eur. J. Plan. Pathol.* **118**, 73-83
- Torres R, Teixidó N, Usall J, Abadías M y I Viñas (2005) Post-harvest control of *Penicillium expansum* on pome fruits by the bacterium *Pantoea ananatis* CPA-3. *J. Hortic. Sci. and Biotechnol.* **80**, 75-81.
- Trias R, Bañeras L, Montesinos E y E Badosa (2008) Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *J. International Microbiol.* **11**, 231-236.
- Tripathi P y AK Shulka (2007) Emerging non-conventional technologies for control of post harvest diseases of perishables. *Fresh Produce* **1**, 111-120.
- Tripathi P y NK Dubey (2004) Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biol. and Technol.* **32**, 235-245.
- Umaña-Rojas G (1996) Control biológico de enfermedades de poscosecha de frutas. In: X Congreso Nacional Agronómico y III Congreso de Fitopatología. Editorial San José, EUNED/EUNA, Costa Rica, **2**, 63-67.
- Usall J, Smilanick J, Palou L, Denis-Arrue N, Teixidó N, Torres R y I Viñas (2008) Preventive and curative activity of combined treatments of sodium carbonates and *Pantoea agglomerans* CPA-2 to control postharvest green mold of citrus fruit. *Postharvest Biol. and Technol.* **50**, 1-7.
- Usall J, Plaza P, Palou L, Torres R, Teixidó N, Abadías M, Smilanick I y I Viñas (2005) Investigaciones en el IRTA sobre alternativas a los fungicidas para el control de podredumbres en poscosecha de cítricos. In: Actas del II Seminario Internacional de Postcosecha de Cítricos. Concordia, Entre Ríos, Argentina. Ediciones INTA, 89-95 pp.
- Usall J, Teixidó N, Torres R, Ochoa de Eribe, X y I Viñas (2001) Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biol. and Technol.* **21**, 147-156.
- Valerio F, Lavermicocca P, Pascale M y A Visconti (2004) Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiol Lett.* **233**, 289-295.
- Venditti T, Molinu MG, Dore A, Agabbio M y G D' Hallewin (2005) Sodium carbonate treatment induces scoparone accumulation, structural changes, and alkalization in the albedo of wounded citrus fruits. *J. Agric. Food. Chem.* **53**, 3510-3518.
- Vermeulen N, Michael G, Ganzle G y F Vogel Rudi (2006) Influence of 343 peptide supply and cosubstrates on phenylalanine metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T and *Lactobacillus plantarum* TMW1.468. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 3832-3839.
- Vero S, Garmendia G, Garat F, Alaniz S, de Aurrecoechea I, Wozniak A y E Silvera (2004) Alternativas al tratamiento convencional de poscosecha de citrus. In: Memorias X Congreso Nacional de Hortifruticultura. Montevideo, Uruguay. URL:

- <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/publica/conferencia15.pdf>. Acceso 29 de marzo de 2010.
- Vero S y P Mondino (1999) Control biológico de postcosecha en Uruguay. *Rev. Horticultura Internacional* **7**, 1-10.
- Viñas I, Teixidó N, Abadías M, Torres R y J Usall (2006) Alternativas a los fungicidas de síntesis en el control de las enfermedades de postcosecha de frutas. In: Actas Simposio de Postcosecha, Orihuela, Alicante, España, 363-373 pp.
- Visintin G, Fállico L, García B y S Garrán (1998) Agentes biocontroladores de *Penicillium digitatum* sobre frutos cítricos. In: Actas del Primer Congreso Argentino de control biológico de las enfermedades de las plantas. Buenos Aires, Argentina, 31 p.
- Visintin G, Fállico L, García B y S Garrán (2000) Agentes biocontroladores de *Penicillium spp.* en la cera de cobertura para frutos cítricos. *Fitopatología* **35**, 163-168.
- Visintin G, Gieco I, García B y L Fállico (2005) Control Biológico de *Penicillium digitatum* sobre naranja Valencia. In: Actas del V Congreso Argentino de Citricultura, Concordia, Argentina, 56 p.
- Visintin G, García B, Gieco I, y A Ronconi (2006) Efecto de aditivos sobre la bioactividad de microorganismos frente a *Penicillium digitatum* en frutas cítricas. In: Resúmenes XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. San Fernando del Valle de Catamarca, Argentina, 298-299 pp.
- Visintin G, Gieco I, García B y L Fállico (2007a) Bioactividad de microorganismos nativos sobre infecciones en naranjas de *Penicillium digitatum* resistente y sensible a fungicidas. *Ciencia, Docencia y Tecnología* **34**, 229-242.
- Visintin G, García B, Gieco I y A Ronconi (2007b) Establecimiento y persistencia de una bacteria antagonista de *Penicillium digitatum* en frutas cítricas tratadas con ceras. In: Resúmenes IV Jornadas de Biología y Tecnología de Poscosecha y I Jornadas de Poscosecha del Cono Sur. Buenos Aires, Argentina, 88 p.
- Visintin G, García B, Fállico L. Alcaraz Fállico ME y G. Barredo (2008) Aplicación experimental de una bacteria antagónica de *Penicillium* por inmersión de cítricos. In: Actas del Primer Congreso Argentino de Fitopatología. Córdoba, Argentina, 221 p.
- Visintin G, García B, Cáceres C y G Barredo (2009) Potencial antagónico de la microflora cítrica adaptada a heridas y a bajas temperaturas frente a *Penicillium digitatum*. In: Actas de XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Santiago del Estero, Argentina, 96 p.
- Whiteside JO, Garnsey SM y LW Timmer (1988) Compendium of citrus diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 2-36 pp.
- Zhang H, Fu C, Zheng X, He D, Shan L y X Zhan (2004) Effects of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner, in combination with sodium bicarbonate on biocontrol of postharvest green mold decay of citrus fruit. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **45**, 159-164.