



**Universidad Politécnica de Cartagena**

**Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica**

**Departamento de Producción Vegetal**

**PROYECTO FIN DE CARRERA**

**ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE *Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr. Y  
DEL DESARROLLO DE LAS PODREDUMBRES DE FRUTOS DE  
TOMATE CON EL USO DE ACEITES ESENCIALES**



**Titulación: Ingeniería Agronómica**  
**Alumna: María Almudena Fuentes López**  
**Director: Juan Antonio Martínez López**

## RESUMEN

En unos tiempos en los que la eliminación o reducción del uso de fungicidas sintéticos constituye una necesidad, la búsqueda de sustancias inocuas o de muy reducida toxicidad que resulten ser una alternativa válida es un tema de investigación fundamental en este campo. Sin embargo, este tipo de investigación, realizado bajo este enfoque, se lleva realizando desde hace al menos 40 años y no existe una alternativa eficaz y económica para sustituir a los fungicidas de síntesis. Es por ello que, en postcosecha, los mayores esfuerzos se están enfocando, por un lado, en evaluar la integración de dos o más sistemas físicos y/o químicos compatibles o complementarios y, por otro lado, a obtener genotipos resistentes a las principales podredumbres. La opción que hoy por hoy parece más operativa, de acuerdo con el grado de investigación alcanzado, consiste en la realización de tratamientos preventivos utilizando sustancias de baja o nula toxicidad con acción sinérgica con los fungicidas de síntesis tradicionales con el propósito de reducir significativamente las dosis de los productos nocivos en los tratamientos fitosanitarios. Esta estrategia permitiría reducir drásticamente la toxicidad y los residuos de los fitosanitarios.

Investigando sobre esta línea, el presente trabajo expone el efecto de los extractos naturales de aceites esenciales de clavo, tomillo, mandarina y canela sobre el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea in vitro* y sobre las podredumbres provocadas por este hongo en frutos de tomate de las variedades Kumato y Boludo. La variabilidad de la respuesta de este hongo a las sustancias que interfieren en su crecimiento se ha puesto de manifiesto estudiando dos aislados distintos obtenidos de la podredumbre gris de cada variedad en el cultivo. El extracto de aceite esencial de clavo no tuvo un control significativo del crecimiento del hongo a la dosis de 750  $\mu\text{L/L}$ . Sin embargo, esta dosis estimuló el desarrollo de la podredumbre gris en los frutos de tomate.

## **Agradecimientos.**

*En primer lugar quisiera agradecer a Juan Antonio Martínez López la oportunidad que me ha brindado para este proyecto y enseñarme con paciencia infinita a realizar cada uno de los experimentos realizados, y al Departamento de Producción Vegetal por prestarme su ayuda cuando la necesitaba y darme ánimos en cada esquina donde me los encontraba.*

*A mi madre, mi padre, mi hermana, que tantas veces han aguantado mis quejas cuando parecía que no le veía fin. Y por supuesto a mi familia que tanto me ha apoyado.*

*A mis amigos, Virginia, Lola, Emperatriz, Mayka, Pedro... que cada día han mostrado un interés por mí el cual me ha hecho continuar.*

## ÍNDICE

<b>1. OBJETIVOS Y ANTECEDENTES.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ASPECTOS COMERCIALES Y AGRONÓMICOS DEL TOMATE.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Clasificación botánica.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2. Variedades comerciales.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.1. Muchamiel.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.2. Boludo.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.3. Kumato.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3. Cultivo del tomate.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4. El sector en España.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4.1. Superficie de cultivo, producción e importancia económica.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.2. Exportación.....</b>	<b>37</b>
<b>3. ALMACENAMIENTO DEL TOMATE Y SUS PROBLEMAS.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Condiciones óptimas de conservación.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2. Deterioro de los frutos durante la conservación y comercialización....</b>	<b>41</b>
<b>3.2.1. Pérdida natural de calidad.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2.2. Alteraciones fisiológicas.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2.3. Podredumbres.....</b>	<b>49</b>
<b>4. LA PODREDUMBRE GRIS DEL TOMATE.....</b>	<b>75</b>
<b>4.1. Descripción y agente causal.....</b>	<b>75</b>

4.2. Variabilidad genética y fenotípica de los diferentes aislados de <i>Botrytis cinerea</i> .....	78
4.3. Importancia comercial de la podredumbre.....	81
4.3.1. Incidencia e importancia de podredumbre gris en los cultivos.....	81
4.3.2. Interpretación del poder patógeno en la gravedad de las pérdidas ocasionadas por <i>Botrytis</i> spp.....	83
4.3.3. Algunos datos sobre las pérdidas causadas por <i>Botrytis</i> spp.....	85
4.4. Control de la podredumbre.....	87
4.4.1. Control químico.....	87
4.4.2. Métodos físicos.....	91
4.4.3. Control biológico.....	91
4.4.4. Aumento de la resistencia natural del hospedero.....	93
<b>5. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD FUNGISTÁTICA DE LOS EXTRACTOS DE ACEITES ESENCIALES DE MANDARINA, TOMILLO, CLAVO Y CANELA SOBRE EL DESARROLLO <i>in vitro</i> DE DISTINTOS AISLADOS DE <i>Botrytis cinerea</i>.....</b>	<b>121</b>
5.1. Introducción.....	121
5.2. Materiales y métodos.....	123
5.2.1. Material experimental y tratamientos.....	123
5.2.2. Unidad de observación y número de repeticiones.....	133
5.2.3. Definición, tipo y clasificación de las variables.....	134
5.2.4. Establecimiento de las hipótesis.....	137
5.2.5. Análisis estadístico.....	138
5.2.6. Protocolo de las mediciones.....	138
5.3. Resultados y discusión.....	140
5.4. Conclusiones.....	158

<b>6. EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE CLAVO SOBRE EL DESARROLLO <i>in vitro</i> DE DISTINTOS AISLADOS DE <i>Botrytis cinerea</i>....</b>	<b>159</b>
<b>6.1. Introducción.....</b>	<b>159</b>
<b>6.2. Materiales y métodos.....</b>	<b>161</b>
<b>6.2.1. Material experimental y tratamientos.....</b>	<b>161</b>
<b>6.2.2. Unidad de observación y número de repeticiones.....</b>	<b>163</b>
<b>6.2.3. Definición, tipo y clasificación de las variables.....</b>	<b>164</b>
<b>6.2.4. Establecimiento de las hipótesis.....</b>	<b>166</b>
<b>6.2.5. Análisis estadístico.....</b>	<b>167</b>
<b>6.2.6. Protocolo de las mediciones.....</b>	<b>168</b>
<b>6.3. Resultados y discusión.....</b>	<b>172</b>
<b>6.4. Conclusiones.....</b>	<b>182</b>
<b>7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE CLAVO EN EL CONTROL DE LAS PODREDUMBRES DE FRUTOS DE TOMATE.....</b>	<b>185</b>
<b>7.1. Introducción.....</b>	<b>185</b>
<b>7.2. Materiales y métodos.....</b>	<b>187</b>
<b>7.2.1. Material experimental y tratamientos.....</b>	<b>187</b>
<b>7.2.2. Unidad de observación y número de repeticiones.....</b>	<b>188</b>
<b>7.2.3. Definición, tipo y clasificación de las variables.....</b>	<b>190</b>
<b>7.2.4. Establecimiento de las hipótesis.....</b>	<b>191</b>
<b>7.2.5. Análisis estadístico.....</b>	<b>191</b>
<b>7.2.6. Protocolo de las mediciones.....</b>	<b>191</b>
<b>7.3. Resultados y discusión.....</b>	<b>196</b>
<b>7.4. Conclusiones.....</b>	<b>210</b>

**8. CONCLUSIONES.....** 213

**9.BIBLIOGRAFÍA.....** 215

# **CAPÍTULO 1**

## **OBJETIVOS Y ANTECEDENTES**



## Capítulo 1. Objetivo y antecedentes.

### Objetivo.

El objetivo del presente estudio ha sido comprobar la actividad de los aceites esenciales de clavo, tomillo, mandarina y canela, seleccionados en base a sus efectos antifúngicos descritos en la bibliografía, sobre el desarrollo y crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr., creciendo *in vitro* y sobre la incidencia y evolución de las podredumbres de los frutos del tomate a lo largo de su almacenamiento.

Con este estudio se pretende contribuir al conocimiento del efecto de los aceites esenciales sobre diferentes aislados de *B. cinerea* obtenidos de frutos de tomate no sólo para evaluar sus efectos, sino también con el objetivo de poner de manifiesto la variabilidad fenotípica que presenta esta especie.

Los aceites esenciales son extractos de plantas obtenidos generalmente de su fracción terpenoide, es decir, moléculas lipofílicas que se volatilizan a bajas temperaturas y que se están utilizando tradicionalmente en alimentación, por sus reconocidas propiedades culinarias y en medicina por sus propiedades antimicrobianas, de ahí su baja o nula toxicidad. De hecho, muchos de estos extractos han sido clasificados por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) como sustancias GRAS (Generally Recognized As Safe), es decir, sustancias reconocidas como inocuas. El uso de estos aceites esenciales para controlar las podredumbres de frutas y hortalizas es un tema de investigación actual del que se está obteniendo resultados prometedores, especialmente con el fin de eliminar o reducir el uso de los fungicidas de síntesis para reducir la toxicidad en el ser humano y en el medio ambiente y sus residuos. Esta estrategia permitiría también el uso de sustancias inocuas para el control postcosecha de las podredumbres de tomate, donde actualmente no se permite el uso de fungicidas de síntesis tras la cosecha, y facilitar la adecuación de una estrategia de producción integrada de tomate desde la producción al consumo.

## Antecedentes.

Los **aceites esenciales** son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias, semillas y a ciertos extractos de origen animal (almizcle, civeta, ámbar gris). Se trata de productos químicos intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles por naturaleza (se evaporan rápidamente) y livianos (poco densos). Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire. Se han extraído más de 150 tipos, cada uno con su aroma propio y virtudes curativas únicas. Proceden de plantas tan comunes como el perejil y tan exquisitas como el jazmín. Para que den lo mejor de sí, deben proceder de ingredientes naturales brutos y quedar lo más puro posible ([http://es.wikipedia.org/wiki/Aceite\\_esencial](http://es.wikipedia.org/wiki/Aceite_esencial)).

Son activos contra un gran número de bacterias, mohos y levaduras. Los terpenos presentes de los aceites esenciales son los antimicrobianos primarios. Poseen un efecto inhibitor sobre la germinación de esporas y el crecimiento del micelio de los hongos. Algunos de ellos, como el aceite esencial del tomillo, tiene un efecto perjudicial en las hifas de los hongos. Un ejemplo con un gran efecto es el de la actividad antifúngica de citral, el cual es el factor principal responsable de la inhibición del crecimiento de patógenos y aparte disminuye las pérdidas postcosecha. El mecanismo de los compuestos fenólicos centra sus efectos sobre las membranas celulares, alterando la membrana citoplasmática de manera que inhiben a los microorganismos. Los compuestos fenólicos están implicados en la resistencia a enfermedades en muchos cultivos a la vez que mejoran la lignificación de las heridas. En altas concentraciones causan daños y cambian a las frutas el sabor, lo que hace que su aplicación sea poco práctica (<http://www.intechopen.com/books/fungicides-for-plant-and-animal-diseases/natural-fungicides-obtained-from-plants>).

Los aceites esenciales presentan en general, una marcada capacidad antimicrobiana, y son utilizados en la industria alimentaria como inhibidores de la microbiota bacteriana acompañante, como saborizantes e incluso, en muchos casos por su marcada actividad antioxidante. (Actividad antibacteriana de una mezcla de aceites

esenciales de plantas de la familia *Rutaceae*, puros o en combinación con ácidos orgánicos) (Shiva y Calvo, 2003).

Hasta el momento se ha identificado que muchos de los aceites esenciales presentan propiedades antimicrobianas, no sólo contra bacterias, sino también contra hongos. Además, se ha demostrado recientemente que numerosos componentes terpenoides de los aceites esenciales vegetales son tóxicos por contacto para una amplia gama de insectos, por lo que pueden utilizarse como insecticidas de origen vegetal. Entre los compuestos químicos más potentes de este tipo figuran el timol, extracto del tomillo (*Thymus vulgaris*, *Lamiaceae*), la pulegona, extracto del poleo-menta (*Mentha pulegium*, *Lamiaceae*) y el eugenol, extracto del clavo (*Eugenia caryophyllus*, *Myrtaceae*) (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

Estudios recientes realizados en los artrópodos han revelado que la mayor parte de estos compuestos son neurotóxicos con efectos agudos que interfiere con el neurotransmisor octopamino, que es exclusivo de los artrópodos. Esta particularidad explica la tolerancia relativa de los mamíferos a estos compuestos, cuya química es relativamente sencilla y bien conocida. La disponibilidad de estos compuestos es fácil debido a su utilización comercial a escala mundial como perfumes, aromatizantes y uso alimentario. Además, como es posible obtener extractos puros de los terpenoides, se pueden preparar mezclas únicas y muy específicas de las materias activas según los insectos diana, en lugar de utilizar aceites esenciales complejos y de naturaleza variable (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

Sin embargo, el factor que más ha contribuido al desarrollo comercial de insecticidas a base de aceites esenciales en EE.UU., ha sido el hecho de que no sea necesario homologar buen número de estas sustancias. Esta exención ha permitido ahorrar años de trabajos de desarrollo y millones de dólares en ensayos ecotoxicológicos, y favorecido la introducción de numerosos nuevos insecticidas de este tipo en los EE. UU. (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

El aceite esencial de tomillo redujo notablemente el desarrollo de *B. cinerea* en frutas de mandarina cuando se aplica en forma de vapor

(<http://www.intechopen.com/books/fungicides-for-plant-and-animal-diseases/natural-fungicides-obtained-from-plants>).

Un grupo de investigadores demostró que los aceites esenciales de tomillo (*Thymus zygis*), clavo (*Eugenia caryophyllata*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*) impidieron el crecimiento de *Botrytis cinerea* ([www.postharvest.com.au](http://www.postharvest.com.au)).

La necesidad de encontrar productos inocuos o de escasa toxicidad para eliminar los fungicidas de síntesis en postcosecha o reducir las dosis de estos fungicidas con tratamientos sinérgicos a base de uso de bajas dosis de fungicida de síntesis + dosis óptima de aceite esencial es decidida a que durante el período de conservación de las frutas, hortalizas y flores se producen pérdidas que, principalmente, se deben a la aparición de alteraciones fúngicas que provocan podredumbres. El sistema de control más extendido es el empleo de productos químicos de síntesis, pero la utilización masiva, continuada y en algunos casos poco controlada ha generado una serie de problemas graves como son la aparición de cepas fúngicas resistentes, el incremento de residuos en los frutos y el consiguiente incremento de los riesgos para la salud humana y el medio ambiente, aparte de ser de elevado coste económico (Viñas *et al.*, 2005).

Los productos hortofrutícolas frescos, al tratarse de productos perecederos, precisan de una tecnología lo más adecuada posible para su conservación, con el fin de preservar en el tiempo su calidad organoléptica y general. Por ello, se precisan estrategias adecuadas para la protección cuali-cuantitativa de los frutos ante la necesidad de poder distribuir en el tiempo un producto perecedero con el objeto de satisfacer las necesidades del consumidor ya que, algunas variedades de frutas presentan su máximo consumo en períodos del año muy lejanos a los de su producción, y es sabido el legítimo derecho del sector comercial de beneficiarse del valor añadido que supone el incremento de precios de las ventas que se realizan en los meses posteriores a los de la producción de frutas. Por tanto, el derecho de tener que regular durante todo el año la salida de fruta hacia los mercados ha provocado la aparición de un gran número de centrales hortofrutícolas (Viñas *et al.*, 2005).

La experimentación con productos naturales para el control de las podredumbres durante la postcosecha de frutas y hortalizas frescas esta en auge, dada las trabas que el exigente mercado actual impone a los productos químicos de síntesis por el creciente aumento de cepas fúngicas resistentes y por el incremento de residuos en los frutos, con el consiguiente riesgo para la salud humana y para el medio ambiente (Martínez y Hernández, 2007).

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es un hecho constatado desde tiempos ancestrales. Los primeros estudios rigurosos sobre este hecho datan de la década de 1940. Desde entonces, se ha investigado distintos extractos vegetales y sus aceites esenciales en el control de insectos y microorganismos. En la actualidad se conoce la actividad antimicrobiana de muchos de estos aceites, pero son escasos los trabajos que estudian su mecanismo de acción. Durante aquella década, se puso de manifiesto que los aceites esenciales del tomillo afectaron al crecimiento de muchos hongos y, por tanto, podrían ser útiles como fungicidas de amplio espectro (Martínez y Hernández, 2007).

Se ha demostrado que los aceites esenciales de tomillo rojo (*Thymus zygis*), brotes de clavo (*Eugenia caryophyllata*) y hojas de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) impiden el crecimiento de *Botrytis cinerea*.

Los aceites esenciales no tienen tan amplio espectro como los pesticidas sintéticos, pero su eficacia se puede mejorar mediante el uso de ellos con el empaquetado adecuado. También se mostró que el vapor de aceite de eucalipto había reducido el crecimiento de las bacterias que causaron el pardeamiento de los frutos.

El inconveniente del aceite es que detienen el crecimiento de los hongos, mientras que se expone al aceite, pero una vez que el aceite se volatiliza, los hongos pueden continuar creciendo. Se esta estudiando la aplicación del aceite durante el almacenamiento del fruto, en forma de vapor en un proceso continuo, de baja concentración que evite la contaminación del producto, a pesar de que los aceites pueden manchar la piel de los frutos (<http://www.postharvest.com.au/>).



## **CAPÍTULO 2**

# **ASPECTOS COMERCIALES Y AGRONÓMICOS DEL TOMATE**



## Capítulo 2. Aspectos comerciales y agronómicos del tomate.

### 2.1. Clasificación botánica.

La **tomatera** es una planta de la familia de las solanáceas (*Solanaceae*) originaria de América y cultivada en todo el mundo por su fruto comestible, llamado **tomate**. Dicho fruto es una baya muy coloreada cuando madura, típicamente de tonos que van del amarillento al rojo, debido a la presencia de los pigmentos licopeno (un pigmento presente en otras frutas como la sandía y que posee efectos beneficiosos para la salud) y caroteno. Posee un sabor ligeramente ácido, mide de 1 a 2 cm de diámetro en las especies silvestres, y es mucho más grande en las variedades cultivadas. Se produce y consume en todo el mundo tanto fresco como procesado de diferentes modos, ya sea como salsa, puré, jugo/zumo, deshidratado o enlatado.

Existen diferentes variedades de producción y comercialización, y el tomate es uno de los principales ingredientes de la dieta mediterránea. La forma y tamaño de esta hortaliza carnosa varía: podemos encontrar tomates redondos, como el tomate cereza; globosos, como el tomate común; periformes, como el tomate pera; y ovoides, como el tomate acorazonado. En realidad el tomate es una fruta, pero no se suele comer de postre sino que se le considera una verdura u hortaliza, es decir, como una hortaliza de fruto.

#### Clasificación

REINO: *Plantae*

DIVISIÓN: *Magnoliophyta*

CLASE: *Magnoliopsida*

SUBCLASE: *Asteridae*

ORDEN: *Solanales*

FAMILIA: *Solanaceae*

GÉNERO: *Solanum*

ESPECIE: *S. lycopersicum*

### Generalidades.

Los primeros tomates llegaron a Europa a través de los conquistadores españoles en el siglo XVI, presentando un color amarillo. De ahí viene su denominación como *pomodoro* en Italia (pomodoro, cuyo significado es manzana de oro). Este fue el nombre que, en 1554, le puso el botánico italiano Piero Andrea Mattioli). También en la Francia del siglo XVIII se bautizó a la hortaliza como *pomme d'amour* o manzana de amor.

Bernal Díaz del Castillo, en su *Historia Verdadera de la Conquista de la Nueva España*, cita por primera vez en Europa al tomate. Setenta años después, aparece de nuevo mencionado como planta medicinal, detalle importante ya que hasta entonces se consideraba venenosa por parecerse a otros frutos de esta categoría existentes en Europa.

A finales del siglo XVII el tomate se convierte en la base de la actual dieta mediterránea, especialmente en la cocina italiana y española, que adaptan rápidamente este ingrediente a sus platos.

### Características

La planta del tomate es una hierba delicada que crece naturalmente de manera rastrera. Sin embargo, puede cultivarse de forma erecta o semierecta, con ayuda de estructuras de madera (tutores). Puede llegar e, incluso, sobrepasar al metro de altura.

Las hojas, pubescentes-tomentosas (como toda la planta), son alternas, de hasta 25 cm de largo, divididas en varias hojillas de diferentes tamaños que, a su vez, pueden estar divididas (principalmente en la base). Tienen ápice puntiagudo y margen desde aserrado a ligeramente hendido.

Los tallos son delgados (no superan los 2 centímetros de grosor) y, debido a esto, son frágiles. Externamente están cubiertos de abundantes tricomas, por lo que es áspero al tacto.

La flor tiene un cáliz de 5 sépalos angostamente triangulares, puntiagudos; la corola es amarilla en forma de estrella de 5 puntas (raramente más, y hasta 9 principalmente en plantas cultivadas). Hay 5 estambres, aunque a veces hasta 9, con sus filamentos unidos entre sí en la parte inferior, libres en la parte distal y rodeando al estilo. Las flores juntas forman inflorescencias dispuestas en racimos cortos o alargados, a veces ramificados, ubicados generalmente en los nudos.



**Figura 2.1.** Flor del tomate. Fuente: [http://es.wikipedia.org/wiki/Solanum\\_lycopersicum](http://es.wikipedia.org/wiki/Solanum_lycopersicum)

El fruto es una baya jugosa (el tomate propiamente dicho), de forma generalmente sub-esférica, globosa o alargada y, habitualmente, de unos 8 centímetros de diámetro, aunque el tamaño depende mucho de la variedad. Inmaduro, el fruto es del todo verde y, cuando madura, toma generalmente un color rojo intenso, pero también se encuentra en tonos anaranjados.

Sus semillas son numerosas, más o menos circulares, aplanadas, parduscas/amarillentas.

## 2.2. Variedades comerciales

### 2.2.1. Tomate Muchamiel

Planta anual de porte para entutorar. Las hojas son sencillas, pecioladas y de limbo hendido. Toda la parte verde de la planta está compuesta por pelos glandulares que al rozarse emite un líquido con olor característico. Las flores aparecen en racimos siendo el número de estas variables. El fruto es una baya carnosa, esférico, rizado y de gran calibre siendo verde al inicio y rojo-pintón cuando madura (<http://es.wikipedia.org/wiki/Tomate>).

El cultivo del tomate muchamiel exige mucha luz. Soporta temperaturas entre 15°C y 40°C, siendo su temperatura óptima de 25°C a 35°C. En cuanto al suelo es poco exigente, aunque conviene remover el suelo periódicamente para mantener la planta en condiciones óptimas de cultivo y evitar la aparición de malas hierbas.

Debido a su elevada masa foliar, ésta debe estar en un estado de humedad óptimo. Necesita riego frecuente pero en pequeña cantidades.

El destallado de esta variedad consiste en hacer cortes limpios en los tallos que brotan en las axilas con el fin de favorecer el crecimiento de un único tallo principal, es decir, que la planta solo tenga una guía y solo se desarrolle dirección. El entutorado nos ayudará al destallado, recolección y nos repercutirá en la calidad del fruto y control de enfermedades.

Su recolección es a partir de los 80 días desde su plantación. Para recolectar tomates muchamiel es aconsejable hacerlo cuando el tomate este entre verde y rojo, con un cuchillo o tijeras, llevando cuidado de no romper flores ni tallos.



**Figura 2.2.** Tomate Muchamiel. Fuente: <http://es.wikipedia.org/wiki/Tomate>

### 2.2.2. Tomate Boludo

Es una planta de vigor medio y porte abierto, con entrenudos cortos y buena cobertura foliar. Variedad de tomate de maduración precoz, con frutos de calibre medio, 60-80 mm de diámetro y unos 80-100 g de peso, muy uniformes, manteniendo el mismo calibre durante todo el ciclo de cultivo. Recomendada para su cultivo al aire libre, malla e invernadero. Buena adaptación al uso de porta-injertos. Forma redondeada y aspecto liso, fruto con una gran firmeza y larga conservación en postcosecha, ideal para la exportación. Color rojo intenso y cuello blanco, no verde. Ramilletes de 6 a 7 frutos muy uniformes (<http://www.seminis.com/global/es/Pages/default.aspx>).

Junto con la variedad “Dorothy”, este tomate es de los que mayor contenido tiene en azúcares y ácido oxálico. El abonado nitrogenado y fosfórico, propio de los sistemas de explotación intensivo, juegan un papel muy importante en la síntesis de ácidos y azúcares respectivamente.

Es un tomate que ofrece uniformidad en calibre, forma y color, una extraordinaria firmeza y conservación postcosecha. Además del sabor y del aroma, su adaptación a programas de Control Integrado y Control Biológico lo hacen muy atractivo para toda la cadena agroalimentaria, desde el agricultor al consumidor. Esta variedad ofrece resistencias a los virus del mosaico del tomate (ToMV), virus del bronceado del tomate (TSWV) y virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV), y a los hongos patógenos de las especies *Verticillium* y *Fusarium*. Con esto se quiere decir que esta variedad de tomate reduce la necesidad del uso de productos químicos, presenta

una buena producción por cosecha, alta resistencia a plagas y desarrolla frutos que duran más tiempo y tienen mejor sabor.

Boludo es una variedad recomendada para trasplantes de primavera y verano en malla y aire libre en cultivos tanto de ciclo largo como cultivos de ciclo corto y trasplantes de primavera y otoño temprano en invernadero en cultivos de ciclo corto y ciclo largo.

Se trata de una variedad que destaca por su gran capacidad de cuaje con alta temperatura, su producción y por su calidad de frutos en postcosecha. Es precoz en su maduración, uniforme y productiva durante todo el ciclo de cultivo, destacando por la regularidad de sus frutos, incluso en la fase final del cultivo.

Boludo destaca también por su combinación entre una alta calidad en sólidos solubles lo cual hace que el fruto tenga un sabor excelente y una larga conservación en postcosecha.



**Figura 2.3.** Invernadero propiedad de Don Miguel Sevilla Fructuoso en Mazarrón con tomates de la variedad Boludo. Foto: M<sup>a</sup> Almudena Fuentes López.



**Figura 2.4.** Tomate Boludo. Fuente: <http://www.seminis.com/global/es/Pages/default.aspx>

### 2.2.3. Tomate Kumato

La calidad de Kumato empieza en el campo donde agricultores seleccionados cuidan su crecimiento mediante técnicas tradicionales y cultivos con métodos naturales. Su maduración, siempre en planta, evoluciona de dentro hacia fuera. Por eso, su aspecto natural evoluciona del marrón oscuro al verde dorado, aportando frutos jugosos, de firme textura y con altos niveles de fructosa. El tamaño es bastante estándar, generalmente varía entre 80 y 120 g por fruto, con un diámetro de unos 5 a 6 cm. Es un alimento muy sano y son más dulces que los tomates habituales, tienen notas ligeramente ácidas, que contrastan y producen una sensación única y bien definida. Se recomienda consumirlo con frecuencia para una dieta saludable. Es especialmente rico en potasio, magnesio y vitaminas A y C. Además, es bajo en calorías (31 kcal. por cada 150 g) y, obviamente, no contiene colesterol ni grasas saturadas (<http://www.kumato.com/en.aspx>).

Se cultiva en España, Francia, Bélgica, Holanda, Suiza, Grecia, Turquía, y Canadá y maduran en condiciones climáticas óptimas para lograr los más altos niveles de fructosa y la firmeza. Los agricultores especializados seleccionados siguen estrictos protocolos y procedimientos de gestión de cultivo respetuosos con el medioambiente, cumpliendo rigurosos controles de calidad desde la recolección hasta el estante en el punto de venta.

El manipulado, envasado, almacenamiento y transporte se llevan a cabo en zonas de higiene y temperatura controladas, con métodos que cumplen las normas

internacionales de salubridad en instalaciones industriales (Eurepgap/BRC/IFS).  
([http://www.cetpenedes.es/cet/index.php?option=com\\_content&view=article&id=132:sistemas-de-gestio-agroalimentaria-iso-22000brcifseurepgap&catid=61:medi-ambient-qualitat-i-prevencio&Itemid=371&lang=es](http://www.cetpenedes.es/cet/index.php?option=com_content&view=article&id=132:sistemas-de-gestio-agroalimentaria-iso-22000brcifseurepgap&catid=61:medi-ambient-qualitat-i-prevencio&Itemid=371&lang=es)).



**Figura 2.5.** Tomate Kumato. Fuente: <http://www.kumato.com/en.aspx>

## 2.3. Cultivo del tomate

### Marcos de plantación

El marco de plantación se establece en función del porte de la planta, que a su vez dependerá de la variedad comercial cultivada. El más frecuentemente empleado es de 1,5 metros entre líneas y 0,5 metros entre plantas, aunque cuando se trata de plantas de porte medio es común aumentar la densidad de plantación a 2 plantas por metro cuadrado con marcos de 1 m x 0,5 m. Cuando se tutoran las plantas con perchas las líneas deben ser “pareadas” para poder pasar las plantas de una línea a otra formando una cadena sin fin, dejando pasillos amplios para la bajada de perchas (aproximadamente de 1,3 m) y una distancia entre líneas conjuntas de unos 70 cm.

### Poda de formación

Es una práctica imprescindible para las variedades de crecimiento indeterminado. Se realiza a los 15-20 días del trasplante con la aparición de los primeros tallos laterales, que serán eliminados, al igual que las hojas más viejas, mejorando así la aireación del cuello y facilitando la realización del aporcado. Así mismo se determinará el número de brazos (tallos) a dejar por planta. Son frecuentes las podas a 1 o 2 brazos, aunque en tomates de tipo Cherry suelen dejarse 3 y hasta 4 tallos.

### Aporcado y rehundido

Práctica que se realiza en suelos enarenados tras la poda de formación, con el fin de favorecer la formación de un mayor número de raíces, y que consiste en cubrir la parte inferior de la planta con arena. El rehundido es una variante del aporcado que se lleva a cabo doblando la planta, tras haber sido ligeramente rascada, hasta que entre en contacto con la tierra, cubriéndola ligeramente con arena, dejando fuera la yema terminal y un par de hojas.

### Tutorado

Es una práctica imprescindible para mantener la planta erguida y evitar que las hojas y sobre todo los frutos toquen el suelo, mejorando así la aireación general de la planta y favoreciendo el aprovechamiento de la radiación y la realización de las labores culturales (destallado, recolección, etc.). Todo ello repercutirá en la producción final,

calidad del fruto y control de las enfermedades. La sujeción suele realizarse con hilo de polipropileno (rafia) sujeto de una extremo a la zona basal de la planta (liado, anudado o sujeto mediante anillas) y de otro a un alambre situado a determinada altura por encima de la planta (1,8-2,4 m sobre el suelo). Conforme la planta va creciendo se va liando o sujetando al hilo tutor mediante anillas, hasta que la planta alcance el alambre. A partir de este momento existen tres opciones:

- Bajar la planta descolgando el hilo, lo cual conlleva un coste adicional en mano de obra. Este sistema está empezando a introducirse con la utilización de un mecanismo de sujeción denominado “holandés” o “de perchas”, que consiste en colocar las perchas con hilo enrollado alrededor de ellas para ir dejándolo caer conforme la planta va creciendo, sujetándola al hilo mediante clips. De esta forma la planta siempre se desarrolla hacia arriba, recibiendo el máximo de luminosidad, por lo que incide en una mejora de la calidad del fruto y un incremento de la producción.
- Dejar que la planta crezca cayendo por propia gravedad.
- Dejar que la planta vaya creciendo horizontalmente sobre los alambres del emparrillado.

### **Destallado**

Consiste en la eliminación de brotes axilares para mejorar el desarrollo del tallo principal. Debe realizarse con la mayor frecuencia posible (semanalmente en verano-otoño y cada 10-15 días en invierno) para evitar la pérdida de biomasa fotosintéticamente activa y la realización de heridas. Los cortes deben ser limpios para evitar la posible entrada de enfermedades. En épocas de riesgo es aconsejable realizar un tratamiento fitosanitario con algún fungicida-bactericida cicatrizante, como pueden ser los derivados del cobre.

### **Deshojado**

Es recomendable tanto en las hojas senescentes, con objeto de facilitar la aireación y mejorar el color de los frutos, como en hojas enfermas, que deben sacarse inmediatamente del invernadero, eliminando así la fuente de inóculo.

### **Despunte de inflorescencias y aclareo de frutos**

Ambas prácticas están adquiriendo cierta importancia desde hace unos años, con la introducción del tomate en racimo, y se realizan con el fin de homogeneizar y aumentar el tamaño de los frutos restantes, así como su calidad. De forma general podemos distinguir dos tipos de aclareo: el aclareo sistemático es una intervención que tiene lugar sobre los racimos, dejando un número de frutos fijo, eliminando los frutos inmaduros mal posicionados. El aclareo selectivo tiene lugar sobre frutos que reúnen determinadas condiciones independientemente de su posición en el racimo; como pueden ser: frutos dañados por insectos, deformes y aquellos que tienen un reducido calibre.

### **Fertirrigación**

En los cultivos protegidos de tomate el aporte de agua y gran parte de los nutrientes se realiza de forma generalizada mediante riego por goteo y va ser función del estado fenológico de la planta así como del ambiente en que ésta se desarrolla (tipo de suelo, condiciones climáticas, calidad del agua de riego, etc.). En cultivo en suelo y en enarenado; el establecimiento del momento y volumen de riego vendrá dado básicamente por los siguientes parámetros:

- Tensión del agua en el suelo (tensión mátrica), que se determinará mediante un manejo adecuado de tensiómetros, siendo conveniente regar antes de alcanzar los 20-30 centibares.
- Tipo de suelo (capacidad de campo, porcentaje de saturación).
- Evapotranspiración del cultivo.
- Eficacia de riego (uniformidad de caudal de los goteros).
- Calidad del agua de riego (a peor calidad, mayores son los volúmenes de agua, ya que es necesario desplazar el frente de sales del bulbo de humedad) (<http://www.infoagro.com>).

El límite máximo de residuos permitidos por la legislación española en la orden del 1 de abril de 2002 para el tomate durante su cultivo (puesto que durante la postcosecha del tomate no se permiten el uso de fungicidas) son 521 y aquí se muestran una parte:

**Tabla 2.1.** Parte de los residuos permitidos por la legislación española con su límite máximo.

1- metilciclopropeno [ 0,01 ]	Amitrol [ 0,01 p ]	Bensulfuron metil [ 0,05 ]
1,1 dicloro 2,2 bis (4 etilfenil) etano [ 0,01 ]	ANA [ 0,05 ]	Bensulida [ 0,05 ]
1,2 Dibromoetano [ 0,01 ]	Anhidrido sulfuroso [ 0,2 ]	Bensultap [ 0,02 ]
1,2 Dicloroetano [ 0,01 ]	Anilazina [ 1 ]	Bentazona [ 0,1 ]
1,3 Dicloropropeno [ 0,05 ]	Antraquinona [ 0,02 ]	Benzoilprop etil [ 0,01 ]
2,4 D [ 0,05 p ]	Aramite [ 0,01 ]	Benzotiazuron [ 0,05 ]
2,4 DB [ 0,05p ]	Asulam [ 0,05 ]	Benzoximato [ 0,01 ]
2,4,5 T [ 0,05 ]	Atrazina [ 0,05 ]	Beta-ciflutrin [ 0,05 ]
4-CPA [ 0,01 ]	Azafenidin [ 0,05 t ]	Bifenazato [ 0,01 ]
Abamectina [ 0,02 ]	Azimsulfuron [ 0,02 ]	Bifenazato [ 0,5 ]
Acefato [ 0,02 ]	Azinfos etil [ 0,02 ]	Bifenilo [ 0,01 ]
Acetamiprid [ 0,1 ]	Azinfos metil [ 0,05 ]	Bifenox [ 0,05 ]
Acetato de fentin [ 0,05 ]	Azociclotin (ver cihexatin) [ 0,05 ]	Bifentrin [ 0,2 ]
Acetocloro [ 0,01 ]	Azoxiestrobina [ 2 ]	Binapacril [ 0,05 ]
Acibenzolar S metil [ 1,0 p ]	Azufre [ 50 ]	Bioresmetrin [ 0,1 ]
Aclonifen [ 0,05 ]	Barban [ 0,05 ]	Bitertanol [ 3 ]
Acrinatriin [ 0,1 ]	Benalaxil [ 0,2 ]	Bromacilo [ 0,05 ]
Alacloro [ 0,05 ]	Benazolin etil [ 0,05 ]	Bromofenoxim [ 0,05 ]
Aldicarb [ 0,02 ]	Bendiocarb [ 0,05 ]	Bromofos etil [ 0,05 ]
Aldrin (ver dieldrin) [ 0,01 ]	Benfluralina [ 0,01 ]	Bromopropilato [ 1 t ]
alfa-Cipermetrin [ 0,5 ]	Benfuracarb [ 0,05 ]	Bromopropilato [ 0,05 ]
Aloxidim [ 0,5 ]	Benfuresato [ 0,05 ]	Bromoxinil [ 0,05 ]
Ametrina [ 0,05 ]	Benodanilo [ 0,05 ]	Bromuconazol [ 0,01 ]
Amidosulfuron [ 0,05 ]	Benomilo (ver carbendazima) [ 0,5 ]	Bromuro de metilo [ 0,05 ]
Amitraz [ 0,05 ]	Benoxacor [ 0,02 ]	Bromuro inorganico [ 50 ]

Bupirimato [ 0,5 ]	Cicloato [ 0,05 ]	Clorfluazuron [ 0,05 ]
Buprofezin [ 0,5 ]	Cicloxidim [ 0,05 ]	Cloridazona [ 0,05 ]
Butacloro [ 0,05 ]	Ciflutrin [ 0,05 ]	Clormecuat [ 0,05 ]
Butifos [ 0,05 ]	Cihalofop-butil [ 0,02 p ]	Clormefos [ 0,02 ]
Butilato [ 0,05 ]	Cihalotrin lambda [ 0,1 ]	Clorobencilato [ 0,02 ]
Butocarboxim [ 0,05 ]	Cihexatin [ 0,05 ]	Cloroxuron [ 0,05 ]
Butralina [ 0,1 ]	Cimoxanilo [ 0,05 ]	Clorpirifos [ 0,5 ]
Buturon (ver monolinuron) [ 0,05 ]	Cinidon-etil [ 0,05 p ]	Clorpirifos metil [ 0,5 ]
Cadusafos [ 0,03 ]	Cinosulfuron [ 0,05 ]	Clorprofam [ 0,05 ]
Canfecloro (toxafeno) [0,1]	Cipermetrin [ 0,5 ]	Clorsulfuron [ 0,05 ]
Captafol [ 0,02 ]	Ciproconazol [ 0,05 ]	Clortal dimetil [ 0,5 ]
Captan [ 2 ]	Ciprodinil [ 0,5 ]	Clortalonil [ 2 ]
Carbaril [ 0,5 ]	Ciromazina [ 1 ]	Clortiamida [ 0,05 ]
Carbendazima [ 0,5 ]	Cletodim [ 0,1 ]	Clortiofos [ 0,05 ]
Carbetamida [ 0,05 ]	Cloetocarb [ 0,05 ]	Clortoluron [ 0,05 ]
Carbofenotion [ 0,02 ]	Clofentezin [ 0,3 ]	Clozolinato [ 0,05 ]
Carbofurano [ 0,02 ]	Clomazona [ 0,05 ]	Cobre inorganico [ 20 ]
Carbosulfan [ 0,05 ]	Clopiralida [ 0,05 ]	Compuestos de mercurio [ 0,01 ]
Carboxina [ 0,2 ]	Cloquintocet - mexil [ 0,02 ]	Daminozida [ 0,02 ]
Carfentrazona etil [0,01 p]	Clorbenside [ 0,01 ]	DDT [ 0,05 ]
Cartap [ 0,01 ]	Clorbufam [ 0,05 ]	Deltametrin [ 0,3 ]
Cianazina [ 0,05 ]	Clordano [ 0,01 ]	Demeton s metilsulfona [ 0,02 ]
Cianuro de hidrogeno [0,05]	Clorfenapir [ 0,05 ]	Desmedifan [ 0,05 ]
Ciazofamida [ 0,2 p ]	Clorfenson [ 0,01 ]	Desmetrina [ 0,05 ]
Ciclanilida [ 0,05 p ]	Clorfenvinfos [ 0,02 ]	Dialato [ 0,05 ]
Clorfluazuron [ 0,05 ]	Dialifos [ 0,01 ]	Diflufenican [ 0,02 ]
Cloridazona [ 0,05 ]	Diazinon [ 0,01 ]	Dimepiperato [ 0,01 ]
Clormecuat [ 0,05 ]	Dicamba [ 0,05 ]	Dimetenamida-p [ 0,01 ]
Clormefos [ 0,02 ]	Diclobenil [ 0,05 ]	Dimetipin [ 0,1 ]
Clorobencilato [ 0,02 ]	Diclobutrazol [ 0,05 ]	Dimetirimol [ 0,1 ]
Cloroxuron [ 0,05 ]	Diclofluanida [ 5 ]	Dimetoato [ 0,02 ]
Clorpirifos [ 0,5 ]	Diclofop metil [ 0,02 ]	Dimetomorf [ 0,5 ]
Clorpirifos metil [ 0,5 ]	Dicloran [ 0,01 ]	Diniconazol [ 0,05 ]
Clorprofam [ 0,05 ]	Diclormid (ver dialamida) [ 0,05 ]	Dinitramina [ 0,01 ]
Clorsulfuron [ 0,05 ]	Dicloroacetiloxazos piredecano (ad-67) [ 0,05 ]	Dinobuton [ 1 ]
Clortal dimetil [ 0,5 ]	Diclorprop [ 0,05 ]	Dinocap [ 0,1 ]
Clortalonil [ 2 ]	Diclorvos [ 0,01 ]	Dinoseb [ 0,05 ]
Clortiamida [ 0,05 ]	Dicofol [ 1 ]	Dinoterb [ 0,05 ]
Clortiofos [ 0,05 ]	Dicrotofos [ 0,01 ]	Dioxation [ 0,05 ]
Clortoluron [ 0,05 ]	Dicuat [ 0,05 p ]	Disulfoton [ 0,02 ]
Clozolinato [ 0,05 ]	Dieldrin (ver aldrin) [ 0,01 ]	Ditianona [ 0,2 ]

Cobre inorganico [ 20 ]	Dietatil [ 0,05 ]	Ditiocarbamatos [ 3 (*2),(*3),(*4) ]
Compuestos de mercurio [ 0,01 ]	Dietiltiofosfato de fenilo [ 0,05 ]	Diuron [ 0,1 ]
Daminozida [ 0,02 ]	Dietofencarb [ 1 ]	DNOC [ 0,05 ]
DDT [ 0,05 ]	Difenamida [ 0,05 ]	Dodina [ 0,2 ]
Deltametrin [ 0,3 ]	Difenilamina [ 0,05 ]	Endosulfan [ 0,5 ]
Demeton s metilsulfona [ 0,02 ]	Difenoconazol [ 0,5 ]	Endotal [ 0,05 ]
Desmedifan [ 0,05 ]	Difenzocuat [ 0,1 ]	Endrin [ 0,01 ]
Desmetrina [ 0,05 ]	Diflubenzuron [ 0,05 ]	Epoconazol [ 0,05 ]
Dialato [ 0,05 ]	Diflufenican [ 0,02 ]	EPTC [ 0,05 ]

Fuente: <http://www.infoagro.com/abonos/lmr.asp>

## 2.4. El sector en España.

### 2.4.1 Superficie de cultivo, producción e importancia económica.

Tabla 2.2. Serie histórica de superficie, rendimiento, producción, precio y valor del tomate.

Años	Superficie (miles de hectáreas)	Rendimiento (qm/ha)	Producción (miles de toneladas)	Precio medio percibido por los agricultores (euros/100 kg)	Valor (miles de euros)
1999	63,4	611	3.874,7	32,1	1.243.781
2000	62,3	605	3.766,3	43,2	1.628.654
2001	63,0	630	3.971,7	33,6	1.334.885
2002	59,3	672	3.979,7	46,0	1.829.476
2003	63,0	627	3.947,3	49,1	1.937.743
2004	69,9	627	4.383,2	41,2	1.806.318
2005	72,3	665	4.810,3	52,2	2.510.496
2006	56,7	670	3.800,6	37,2	1.415.326
2007	53,3	766	4.081,5	39,8	1.622.795
2008	54,9	738	4.049,8	37,3	1.508.533
2009	63,8	752	4.798,1	32,4	1.556.488

Fuente: Estadísticas de Comercio Exterior de España. Agencia Estatal de Administración Tributaria (<http://www.magrama.gob.es/es/>)

La producción de tomate ha ido aumentando desde los años 1999 al 2005 de una manera regular hasta llegar al año 2006 (Tabla 2.2), en el que se produjo un descenso considerable puesto que disminuyó la superficie de cultivo. Por esta razón se redujo a su vez el valor percibido por los tomates producidos.

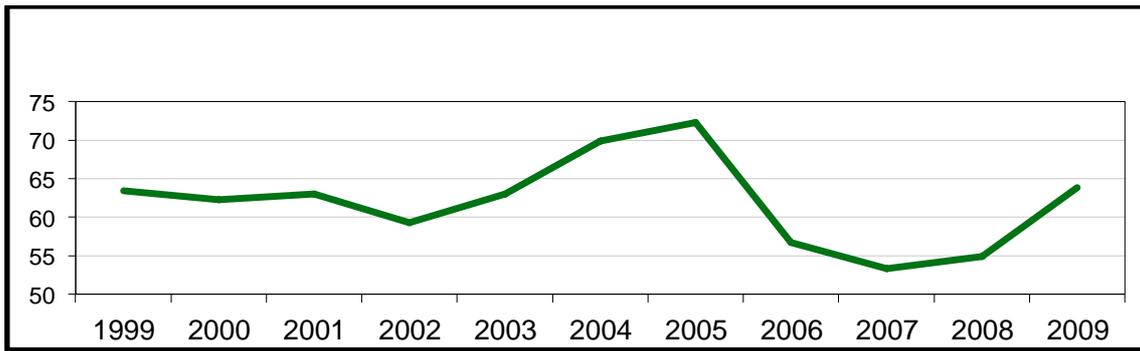
**Tabla 2.3.** Serie histórica de comercio exterior del tomate.

Años	Comercio exterior (toneladas)	
	Importaciones	Exportaciones
1999	19.596	958.429
2000	10.441	891.756
2001	35.445	1.041.117
2002	47.181	974.399
2003	69.462	966.002
2004	102.313	1.036.833
2005	132.513	937.004
2006	82.965	997.514
2007	246.202	884.244
2008	191.582	957.603
2009	186.594	729.358

Fuente: Estadísticas de Comercio Exterior de España. Agencia Estatal de Administración Tributaria (<http://www.magrama.gob.es/es/>)

Desde el año 1999, el nivel de importaciones de tomate ha tenido una tendencia general al aumento (Tabla 2.3). El mayor volumen de importación ocurrió en el 2007 (246.202 tm). Los registros hasta el 2009 denotan que la importación ha ido descendiendo, pero este descenso no va concomitante con la exportación.

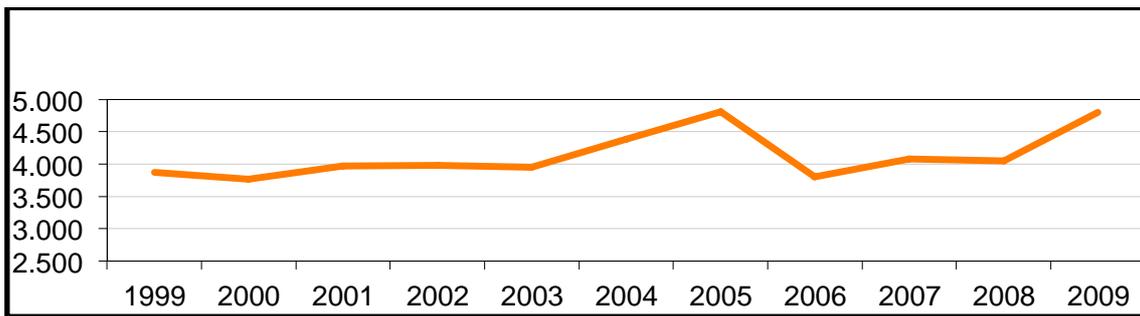
Los mayores valores de comercio exterior del tomate ocurrieron en el año 2004, donde se alcanzó un pico de exportación con 1.036.833 tm y un elevado valor de importación correspondiente a 102.313 tm.



**Figura 2.6.** Evolución de la superficie de tomate (miles de hectáreas).

Fuente: <http://www.magrama.gob.es/es/>

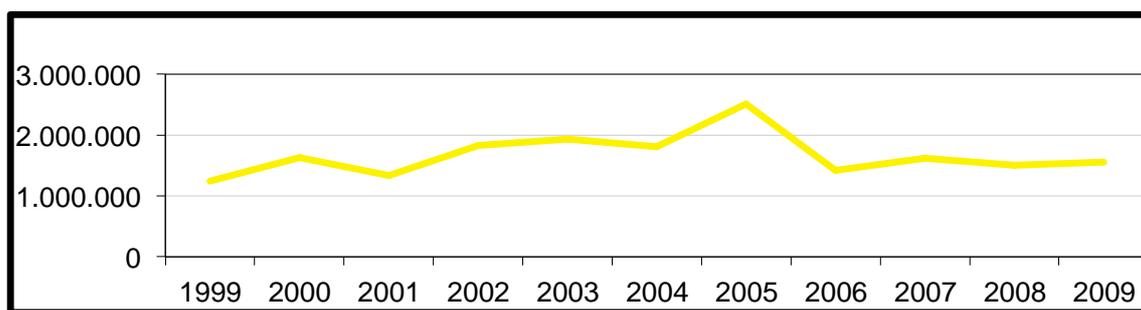
Como ya se comentó anteriormente (Tabla 2.2), tuvimos un aumento de superficie en el año 2003 que comenzó a disminuir a partir del 2005, alcanzando un valor estable en torno a 55.000 ha hasta el año 2008. En el 2009 se produjo un aumento de la superficie hasta casi 65.000 ha (Fig. 2.6).



**Figura 2.7.** Evolución de la producción de tomate (miles toneladas).

Fuente: <http://www.magrama.gob.es/es/>

La producción de tomate ha sido más o menos homogénea desde el año 1999, alcanzando su valor máximo en el año 2005, con un valor de 4.810.300 tm, aunque muy similar al obtenido en el 2009, con 4.798.100 tm (Tabla 2.2 y Fig. 2.7).



**Figura 2.8.** Evolución del valor de tomate (miles de euros).

Fuente: <http://www.magrama.gob.es/es/>

El valor del tomate ha sido muy homogéneo en la década comprendida entre los años 1999 y 2009 (Tabla 2.2 y Fig. 2.8). El valor máximo se obtuvo en el año 2005, coincidiendo con los mayores valores de producción y superficie cultivada (Tabla 2.2).

**Tabla 2.4.** Serie histórica de superficie y producción de tomate cosechado desde el 1 de enero hasta el 31 de mayo.

Años	Recolección del 1-I al 31-V	
	Superficie (miles de hectáreas)	Producción (miles de toneladas)
1999	7,9	635,5
2000	12,0	1.023,2
2001	11,8	1.002,0
2002	11,6	1.010,3
2003	12,0	1.056,3
2004	11,9	1.091,6
2005	11,1	893,2
2006	11,3	947,8
2007	11,6	1.039,1
2008	12,1	1.201,9
2009	11,7	1.048,7

Fuente: <http://www.magrama.gob.es/es/>

**Tabla 2.5.** Serie histórica de superficie y producción de tomate cosechado desde el 1 de junio hasta el 30 de septiembre.

Años	Recolección del 1-VI al 30-IX	
	Superficie (miles de hectáreas)	Producción (miles de toneladas)
1999	43,1	2.236,3
2000	41,5	2.116,6
2001	42,4	2.306,7
2002	39,3	2.278,7
2003	43,0	2.244,4
2004	49,0	2.595,6
2005	52,0	3.239,1
2006	35,9	2.147,4
2007	33,5	2.134,8
2008	35,0	2.157,1
2009	45,4	3.182,5

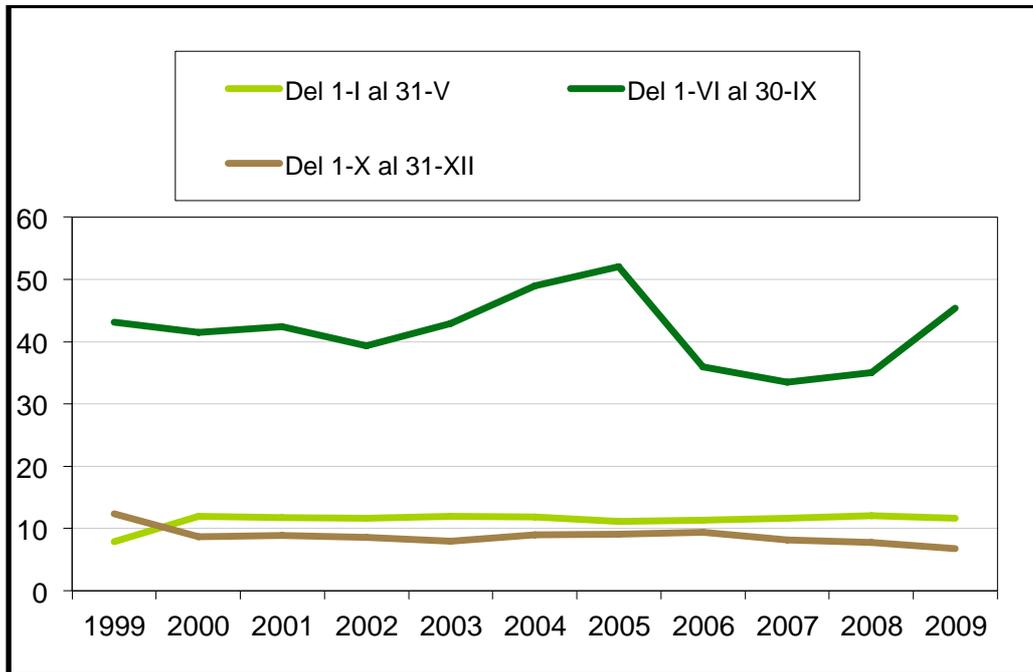
Fuente: <http://www.magrama.gob.es/es/>

**Tabla 2.6.** Serie histórica de superficie y producción de tomate cosechado desde el 1 de octubre hasta el 31 de diciembre.

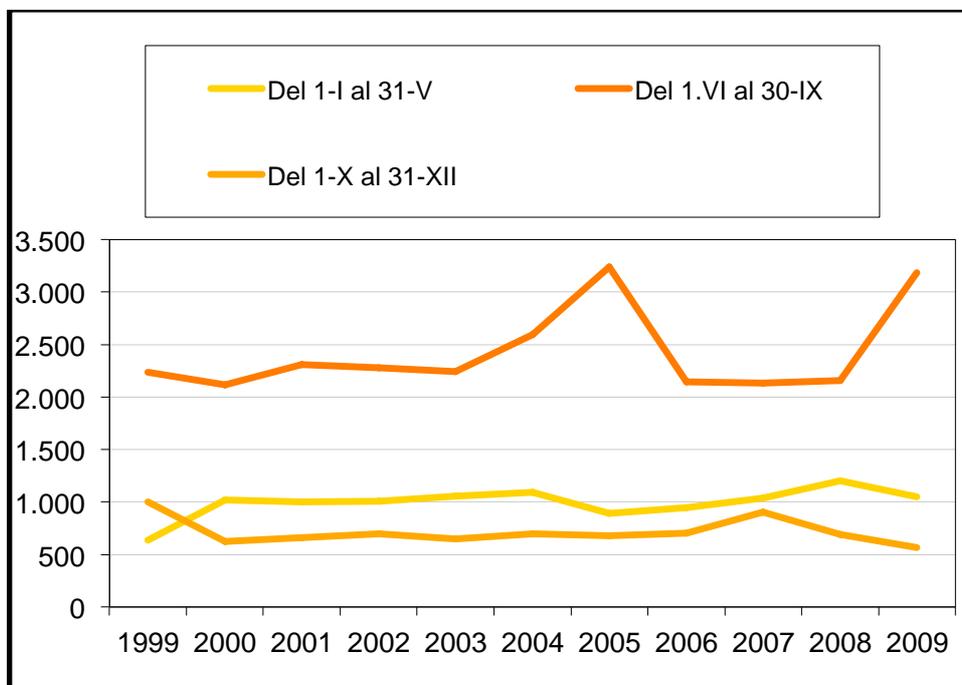
Años	Recolección del 1-X al 31-XII	
	Superficie (miles de hectáreas)	Producción (miles de toneladas)
1999	12,4	1.003,0
2000	8,7	627,0
2001	8,9	662,9
2002	8,6	698,3
2003	8,0	646,6
2004	9,0	696,0
2005	9,1	678,0
2006	9,4	705,4
2007	8,2	907,5
2008	7,8	690,8
2009	6,8	566,9

Fuente: <http://www.magrama.gob.es/es/>

Las superficies destinadas al cultivo de tomate fueron más o menos homogéneas a lo largo de las épocas de cosecha, pero es de destacar el período en el que el ciclo de cultivo coincidió con la primavera – verano, con un incremento de la producción (Tabla 2.4).



**Figura 2.9.** Evolución de la superficie de tomate según época de recolección (miles de hectáreas). Fuente: <http://www.magrama.gob.es/es/>



**Figura 2.10.** Evolución de la producción de tomate según época de recolección (miles de toneladas). Fuente: <http://www.magrama.gob.es/es/>

Tabla 2.7. Análisis provincial de la superficie de cultivo de tomate correspondiente al año 2009.

Provincias y Comunidades Autónomas	Superficie (hectáreas)			
	Secano	Regadío		Total
		Aire libre	Protegido	
A Coruña	–	77	197	274
Lugo	–	42	103	145
Ourense	–	65	156	221
Pontevedra	–	101	253	354
<b>GALICIA</b>	<b>–</b>	<b>285</b>	<b>709</b>	<b>994</b>
<b>P. DE ASTURIAS</b>	<b>40</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>90</b>
<b>CANTABRIA</b>	<b>40</b>	<b>3</b>	<b>–</b>	<b>43</b>
Álava	–	47	10	57
Guipúzcoa	31	30	15	76
Vizcaya	51	67	45	163
<b>PAÍS VASCO</b>	<b>82</b>	<b>144</b>	<b>70</b>	<b>296</b>
<b>NAVARRA</b>	<b>–</b>	<b>2.213</b>	<b>64</b>	<b>2.277</b>
<b>LA RIOJA</b>	<b>–</b>	<b>186</b>	<b>14</b>	<b>200</b>
Huesca	–	16	–	16
Teruel	–	1	3	4
Zaragoza	17	1.020	–	1.037
<b>ARAGÓN</b>	<b>17</b>	<b>1.037</b>	<b>3</b>	<b>1.057</b>
Barcelona	56	467	37	560
Girona	–	242	12	254
Lleida	–	374	1	375
Tarragona	5	448	1	454
<b>CATALUÑA</b>	<b>61</b>	<b>1.531</b>	<b>51</b>	<b>1.643</b>
<b>BALEARES</b>	<b>26</b>	<b>132</b>	<b>80</b>	<b>238</b>
Ávila	–	11	4	15
Burgos	–	15	–	15
León	–	17	8	25
Palencia	–	7	3	10
Salamanca	–	32	7	39
Segovia	–	42	–	42
Valladolid	–	57	–	57
Zamora	–	32	10	42
<b>CASTILLA Y LEÓN</b>	<b>–</b>	<b>213</b>	<b>32</b>	<b>245</b>

Provincias y Comunidades Autónomas	Superficie (hectáreas)			
	Secano	Regadío		Total
		Aire libre	Protegido	
<b>MADRID</b>	–	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>20</b>
Albacete	–	180	40	220
Ciudad Real	–	653	–	653
Cuenca	–	61	–	61
Guadalajara	–	10	–	10
Toledo	–	744	–	744
<b>CASTILLA-LA MANCHA</b>	–	<b>1.648</b>	<b>40</b>	<b>1.688</b>
Alicante	–	50	570	620
Castellón	81	559	20	660
Valencia	–	42	64	106
<b>C. VALENCIANA</b>	<b>81</b>	<b>651</b>	<b>654</b>	<b>1.386</b>
<b>R. DE MURCIA</b>	–	<b>590</b>	<b>3.436</b>	<b>4.026</b>
Badajoz	–	22.379	1	22.380
Cáceres	–	3.595	1	3.596
<b>EXTREMADURA</b>	–	<b>25.974</b>	<b>2</b>	<b>25.976</b>
Almería	–	226	9.921	10.147
Cádiz	–	1.540	–	1.540
Córdoba	13	374	–	387
Granada	–	798	1.342	2.140
Huelva	9	72	20	101
Jaén	1	415	–	416
Málaga	7	701	962	1.670
Sevilla	53	5.384	75	5.512
<b>ANDALUCÍA</b>	<b>83</b>	<b>9.510</b>	<b>12.320</b>	<b>21.913</b>
Las Palmas	39	49	1.064	1.152
S.C. de Tenerife	–	37	557	594
<b>CANARIAS</b>	<b>39</b>	<b>86</b>	<b>1.621</b>	<b>1.746</b>
<b>ESPAÑA</b>	<b>469</b>	<b>44.240</b>	<b>19.129</b>	<b>63.838</b>

Fuente: <http://www.magrama.gob.es/es/>

La comunidad de Extremadura fue la que destinó más hectáreas de regadío al aire libre para cultivar, seguida de Andalucía y después Navarra. Andalucía, País Vasco y Valencia, que se encontraron muy igualadas en cuanto a hectáreas disponibles en secano durante el 2009 (Tabla 2.7).

Tabla 2.8. Análisis provincial del rendimiento y producción correspondiente al año 2009.

Provincias y Comunidades Autónomas	Rendimiento (kg/ha)			Producción (toneladas)
	Secano	Regadío		
		Aire libre	Protegido	
A Coruña	–	85.000	109.480	28.113
Lugo	–	65.000	110.000	14.060
Ourense	–	65.000	120.000	22.945
Pontevedra	–	77.000	120.300	38.213
<b>GALICIA</b>	–	<b>74.656</b>	<b>115.731</b>	<b>103.331</b>
<b>P. DE ASTURIAS</b>	<b>15.000</b>	<b>30.000</b>	<b>60.000</b>	<b>2.850</b>
<b>CANTABRIA</b>	<b>15.000</b>	<b>22.500</b>	–	<b>668</b>
Álava	–	20.350	49.500	1.451
Guipúzcoa	13.400	26.700	53.800	2.023
Vizcaya	8.750	21.000	50.400	4.121
<b>PAÍS VASCO</b>	<b>10.508</b>	<b>21.975</b>	<b>51.000</b>	<b>7.595</b>
<b>NAVARRA</b>	–	<b>79.913</b>	<b>85.145</b>	<b>182.297</b>
<b>LA RIOJA</b>	–	<b>60.500</b>	<b>86.000</b>	<b>12.457</b>
Huesca	–	79.000	–	1.264
Teruel	–	30.000	130.000	420
Zaragoza	12.000	74.000	–	75.684
<b>ARAGÓN</b>	<b>12.000</b>	<b>74.035</b>	<b>130.000</b>	<b>77.368</b>
Barcelona	6.978	41.135	129.116	24.378
Girona	–	28.941	84.200	8.014
Lleida	–	34.602	60.000	13.001
Tarragona	10.000	40.093	75.000	18.086
<b>CATALUÑA</b>	<b>7.226</b>	<b>37.307</b>	<b>116.131</b>	<b>63.479</b>
<b>BALEARES</b>	<b>8.000</b>	<b>46.000</b>	<b>60.000</b>	<b>11.080</b>
Ávila	–	60.000	60.000	900
Burgos	–	50.000	–	750
León	–	21.300	48.500	750
Palencia	–	50.900	64.500	550
Salamanca	–	28.595	35.000	1.160
Segovia	–	30.000	–	1.260
Valladolid	–	42.000	–	2.394
Zamora	–	40.000	130.000	2.580
<b>CASTILLA Y LEÓN</b>	–	<b>37.453</b>	<b>73.953</b>	<b>10.344</b>
<b>MADRID</b>	–	<b>45.000</b>	<b>70.000</b>	<b>1.100</b>

Provincias y Comunidades Autónomas	Rendimiento (kg/ha)			Producción (toneladas)
	Secano	Regadío		
		Aire libre	Protegido	
Albacete	–	61.000	80.800	14.212
Ciudad Real	–	45.000	–	29.385
Cuenca	–	30.000	–	1.830
Guadalajara	–	24.000	–	240
Toledo	–	61.901	–	46.054
<b>CASTILLA-LA MANCHA</b>	<b>–</b>	<b>53.695</b>	<b>80.800</b>	<b>91.721</b>
Alicante	–	60.000	104.035	62.300
Castellón	12.914	19.361	34.000	12.549
Valencia	–	25.286	53.438	4.482
<b>C. VALENCIANA</b>	<b>12.914</b>	<b>22.865</b>	<b>96.942</b>	<b>79.331</b>
<b>R. DE MURCIA</b>	<b>–</b>	<b>62.000</b>	<b>103.500</b>	<b>392.206</b>
Badajoz	–	74.249	220.000	1.661.838
Cáceres	–	70.918	220.000	255.170
<b>EXTREMADURA</b>	<b>–</b>	<b>73.788</b>	<b>220.000</b>	<b>1.917.008</b>
Almería	–	45.071	90.725	910.268
Cádiz	–	45.500	–	70.070
Córdoba	12.500	35.000	–	13.253
Granada	–	57.018	73.398	144.000
Huelva	6.000	47.000	75.000	4.938
Jaén	5.000	35.000	–	14.530
Málaga	15.000	50.000	62.000	94.799
Sevilla	7.250	79.230	125.000	436.334
<b>ANDALUCÍA</b>	<b>8.563</b>	<b>65.024</b>	<b>86.778</b>	<b>1.688.192</b>
Las Palmas	40.000	70.204	90.957	101.779
S.C. de Tenerife	–	60.000	95.201	55.247
<b>CANARIAS</b>	<b>40.000</b>	<b>65.814</b>	<b>92.415</b>	<b>157.026</b>
<b>ESPAÑA</b>	<b>13.286</b>	<b>68.770</b>	<b>91.454</b>	<b>4.798.053</b>

Fuente: <http://www.magrama.gob.es/es/>

Las comunidades que más toneladas de tomates produjeron durante el año 2009 fueron, Extremadura, Andalucía y La Región de Murcia. En cuanto a los kilos de tomate por hectáreas, las comunidades de Galicia, Aragón, Extremadura y La Región de Murcia se encuentran entre las que mayores rendimientos obtuvieron durante el año 2009 (Tabla 2.8). La Región de Murcia es una de las principales productoras de tomate

en el ámbito nacional e internacional, gracias a sus inmejorables condiciones climáticas y de suelo.

**Tabla 2.9.** Análisis provincial de superficie y producción de tomate cosechado desde el 1 de enero hasta el 31 de mayo de 2009.

Provincias y Comunidades Autónomas	Recolección de 1-I a 31-V	
	Superficie (hectáreas)	Producción (toneladas)
A Coruña	–	–
Lugo	–	–
Ourense	–	–
Pontevedra	20	1.400
<b>GALICIA</b>	<b>20</b>	<b>1.400</b>
<b>P. DE ASTURIAS</b>	–	–
<b>CANTABRIA</b>	–	–
Álava	1	50
Guipúzcoa	5	269
Vizcaya	13	655
<b>PAÍS VASCO</b>	<b>19</b>	<b>974</b>
<b>NAVARRA</b>	–	–
<b>LA RIOJA</b>	–	–
Huesca	–	–
Teruel	–	–
Zaragoza	–	–
<b>ARAGÓN</b>	–	–
Barcelona	40	2.322
Girona	–	–
Lleida	–	–
Tarragona	18	723
<b>CATALUÑA</b>	<b>58</b>	<b>3.045</b>
<b>BALEARES</b>	<b>38</b>	<b>1.773</b>

Provincias y Comunidades Autónomas	Recolección de 1-I a 31-V	
	Superficie (hectáreas)	Producción (toneladas)
Ávila	–	–
Burgos	–	–
León	–	–
Palencia	–	–
Salamanca	3	105
Segovia	–	–
Soria	–	–
Valladolid	–	–
Zamora	–	–
<b>CASTILLA Y LEÓN</b>	<b>3</b>	<b>105</b>
<b>MADRID</b>	–	–
Albacete	–	–
Ciudad Real	–	–
Cuenca	–	–
Guadalajara	–	–
Toledo	–	–
<b>CASTILLA-LA MANCHA</b>	–	–
Alicante	200	11.200
Castellón	62	1.400
Valencia	22	1.320
<b>C. VALENCIANA</b>	<b>284</b>	<b>13.920</b>
<b>R. DE MURCIA</b>	<b>1.344</b>	<b>180.415</b>
Badajoz	–	–
Cáceres	–	–
<b>EXTREMADURA</b>	–	–
Almería	6.900	618.982
Cádiz	303	13.787
Córdoba y Jaén	–	–
Granada	1.034	82.000
Huelva	6	438
Málaga	668	40.726
Sevilla	40	4.600
<b>ANDALUCÍA</b>	<b>8.951</b>	<b>760.533</b>
Las Palmas	641	56.632
S.C. de Tenerife	313	29.854
<b>CANARIAS</b>	<b>954</b>	<b>86.486</b>
<b>ESPAÑA</b>	<b>11.671</b>	<b>1.048.651</b>

Fuente: <http://www.magrama.gob.es/es/>

**Tabla 2.10.** Análisis provincial de superficie y producción de tomate cosechado desde el 1 de junio hasta el 30 de septiembre de 2009.

Provincias y Comunidades Autónomas	Recolección de 1-VI a 30-IX	
	Superficie (hectáreas)	Producción (toneladas)
A Coruña	274	28.113
Lugo	145	14.060
Ourense	221	22.945
Pontevedra	326	36.253
<b>GALICIA</b>	<b>966</b>	<b>101.371</b>
<b>P. DE ASTURIAS</b>	<b>90</b>	<b>2.850</b>
<b>CANTABRIA</b>	<b>43</b>	<b>668</b>
Álava	56	1.401
Guipúzcoa	66	1.485
Vizcaya	137	2.811
<b>PAÍS VASCO</b>	<b>259</b>	<b>5.697</b>
<b>NAVARRA</b>	<b>2.277</b>	<b>182.297</b>
<b>LA RIOJA</b>	<b>200</b>	<b>12.457</b>
Huesca	16	1.264
Teruel	4	420
Zaragoza	1.037	75.684
<b>ARAGÓN</b>	<b>1.057</b>	<b>77.368</b>
Barcelona	471	19.214
Girona	254	8.014
Lleida	301	10.056
Tarragona	414	16.448
<b>CATALUÑA</b>	<b>1.440</b>	<b>53.732</b>
<b>BALEARES</b>	<b>167</b>	<b>7.756</b>
Ávila	15	900
Burgos	–	–
León	25	750
Palencia	10	550
Salamanca	33	950
Segovia	42	1.260
Soria	–	–
Valladolid	57	2.394
Zamora	42	2.580
<b>CASTILLA Y LEÓN</b>	<b>224</b>	<b>9.384</b>
<b>MADRID</b>	<b>18</b>	<b>990</b>

Provincias y Comunidades Autónomas	Recolección de 1-VI a 30-IX	
	Superficie (hectáreas)	Producción (toneladas)
Albacete	220	14.212
Ciudad Real	653	29.385
Cuenca	61	1.830
Guadalajara	10	240
Toledo	744	46.054
<b>CASTILLA-LA MANCHA</b>	<b>1.688</b>	<b>91.721</b>
Alicante	–	–
Castellón	487	8.903
Valencia	78	3.000
<b>C. VALENCIANA</b>	<b>565</b>	<b>11.903</b>
<b>R. DE MURCIA</b>	<b>598</b>	<b>19.610</b>
Badajoz	22.379	1.661.618
Cáceres	3.595	254.950
<b>EXTREMADURA</b>	<b>25.974</b>	<b>1.916.568</b>
Almería	1.015	91.027
Cádiz	760	34.580
Córdoba	387	13.253
Granada	798	45.500
Huelva	60	2.500
Jaén	416	14.530
Málaga	618	29.526
Sevilla	5.432	428.434
<b>ANDALUCÍA</b>	<b>9.486</b>	<b>659.350</b>
Las Palmas	196	17.317
S.C. de Tenerife	135	11.506
<b>CANARIAS</b>	<b>331</b>	<b>28.823</b>
<b>ESPAÑA</b>	<b>45.383</b>	<b>3.182.545</b>

Fuente: <http://www.magrama.gob.es/es/>

**Tabla 2.11.** Análisis provincial de superficie y producción de tomate cosechado desde el 1 de octubre hasta el 31 de diciembre de 2009.

Provincias y Comunidades Autónomas	Recolección de 1-X a 31-XII	
	Superficie (hectáreas)	Producción (toneladas)
A Coruña	–	–
Lugo	–	–
Ourense	–	–
Pontevedra	8	560
<b>GALICIA</b>	<b>8</b>	<b>560</b>
<b>P. DE ASTURIAS</b>	–	–
<b>CANTABRIA</b>	–	–
Álava	–	–
Guipúzcoa	5	269
Vizcaya	13	655
<b>PAÍS VASCO</b>	<b>18</b>	<b>924</b>
<b>NAVARRA</b>	–	–
<b>LA RIOJA</b>	–	–
Huesca	–	–
Teruel	–	–
Zaragoza	–	–
<b>ARAGÓN</b>	–	–
Barcelona	49	2.842
Girona	–	–
Lleida	74	2.945
Tarragona	22	915
<b>CATALUÑA</b>	<b>145</b>	<b>6.702</b>
<b>BALEARES</b>	<b>33</b>	<b>1.551</b>
Ávila	–	–
Burgos	15	750
León	–	–
Palencia	–	–
Salamanca	3	105
Segovia	–	–
Soria	–	–
Valladolid	–	–
Zamora	–	–
<b>CASTILLA Y LEÓN</b>	<b>18</b>	<b>855</b>

Provincias y Comunidades Autónomas	Recolección de 1-X a 31-XII	
	Superficie (hectáreas)	Producción (toneladas)
<b>MADRID</b>	<b>2</b>	<b>110</b>
Albacete	–	–
Ciudad Real	–	–
Cuenca	–	–
Guadalajara	–	–
Toledo	–	–
<b>CASTILLA-LA MANCHA</b>	<b>–</b>	<b>–</b>
Alicante	420	51.100
Castellón	111	2.246
Valencia	6	162
<b>C. VALENCIANA</b>	<b>537</b>	<b>53.508</b>
<b>R. DE MURCIA</b>	<b>2.084</b>	<b>192.181</b>
Badajoz	1	220
Cáceres	1	220
<b>EXTREMADURA</b>	<b>2</b>	<b>440</b>
Almería	2.232	200.259
Cádiz	477	21.703
Córdoba	–	–
Granada	308	16.500
Huelva	35	2.000
Jaén	–	–
Málaga	384	24.547
Sevilla	40	3.300
<b>ANDALUCÍA</b>	<b>3.476</b>	<b>268.309</b>
Las Palmas	315	27.830
S.C. de Tenerife	146	13.887
<b>CANARIAS</b>	<b>461</b>	<b>41.717</b>
<b>ESPAÑA</b>	<b>6.784</b>	<b>566.857</b>

Fuente: Estadísticas de Comercio Exterior de España. Agencia Estatal de Administración Tributaria (<http://www.magrama.gob.es/es/>)

En total, el período en el que se alcanzó una mayor producción en el año 2009 fue el correspondiente a las cosechas realizadas entre el 1 de junio y el 30 de septiembre, donde se obtuvieron **3.182.545 toneladas de tomates**. Mientras que las comunidades que más superficie destinaron al cultivo del tomate fueron Extremadura

(con 25.974 ha), Andalucía (con 9.486 ha) y Navarra (con 2.277 ha), de un total de 45.383 ha que hubieron en total en toda España. (Tabla 2.10). Pero se debe tener en cuenta que en comparación a superficie de la comunidad murciana, la producción en la Región de Murcia también fue elevada en el 2009, pues el cultivo del tomate siempre ha sido de gran importancia en esta Región, especialmente en la comarca de la Huerta de Murcia.

Los agricultores guardaban cada año, de manera habitual, las semillas de los mejores tomates para el cultivo del año siguiente. Esta selección garantizaba que durante generaciones se cultivaran infinidad de variedades de tomates autóctonos adaptados a cada microclima.

Actualmente, la producción se ha uniformizado y las variedades tradicionales se han ido abandonando en favor de los híbridos, más resistentes a las enfermedades y con una mayor productividad. Pero estas ventajas tienen también su inconveniente: la pérdida de biodiversidad.

En la Región de Murcia existen hoy día tres variedades que se cultivan durante todo el año y son: Muchamiel, Russian Black y Beffsteak. Son un componente fundamental en ensaladas o platos típicos (ensalada chilena, pizzas, gazpacho, etc.), y en varios productos industriales como deshidratados, enlatados, jugos, ketchup, mermeladas, pastas, salsas e, incluso, bebidas alcohólicas como el "Bloody Mary" ([http://www.proexport.es/frutasyhortalizas/ficha\\_producto.aspx?FrmId=29](http://www.proexport.es/frutasyhortalizas/ficha_producto.aspx?FrmId=29)).

2.4.2. Exportación.

Tabla 2.12. Comercio exterior de España correspondiente al año 2009.

Mundo y países	Importaciones	Exportaciones
<b>MUNDO</b>	<b>186.594</b>	<b>729.358</b>
<b>PAÍSES DE EUROPA</b>		
<b>Unión Europea</b>	<b>159.142</b>	<b>709.178</b>
Alemania	8.505	149.911
Austria	–	5.363
Bélgica	7.170	14.897
Bulgaria	–	1.029
Chipre	–	2
Dinamarca	287	5.560
Eslovaquia	–	4.828
Eslovenia	2	2.836
Estonia	–	1.889
Finlandia	–	4.608
Francia	7.386	115.416
Grecia	–	805
Holanda	16.830	109.432
Hungría	–	7.184
Irlanda	–	3.322
Italia	124	32.626
Letonia	16	3.317
Lituania	–	5.702
Luxemburgo	–	14
Malta	–	88
Polonia	1.601	35.849
Portugal	114.785	23.692
Reino Unido	1.521	139.841
República Checa	18	24.672
Rumania	–	3.002
Suecia	897	13.293
<b>Países con Solicitud de Adhesión</b>		
Antigua República de Macedonia	–	–
Croacia	–	1.056
Turquía	–	–
<b>OTROS PAÍSES DEL MUNDO</b>		
Canadá	–	219
Estados Unidos	–	162
Islandia	–	18
Noruega	–	1.602
Suiza	–	5.012

Fuente: <http://www.magrama.gob.es/es/>

El tomate es, después de la patata, la hortaliza más consumida en todo el mundo, tanto fresco como después de transformación. Se cultiva en todas las latitudes en condiciones muy variadas (climas, modos de producción...), lo que demuestra una gran plasticidad original y revela la eficacia del trabajo de los seleccionadores.

La producción mundial de tomates ha progresado regularmente durante el siglo XX y se ha incrementado considerablemente en las tres últimas décadas. Ha pasado de 48 millones de toneladas en 1978 a 74 millones en 1994, 89 millones en 1998 y ha alcanzado 124 millones en 2006. Entre los 16 países que han producido un millón de toneladas más, 6 están ampliamente por encima de los 5 millones de toneladas. Se estima que el 30% de los tomates producidos son transformados. Este porcentaje es muy diferente de un país a otro.

El consumo por individuo, ya sean tomates frescos o transformados, no deja de aumentar a escala mundial. Los países mediterráneos son grandes consumidores, y esto en todas las estaciones. En Francia, el consumo de tomate fresco es del orden de 13 kg/persona/año, alcanzando el consumo de productos transformados el equivalente a 22 kg de tomate fresco. Estas cifras, comunicadas por el Centro Técnico Internacional de Frutas y Legumbres (CTIFL), se basan en la producción nacional, integrando en ellas las importaciones y las exportaciones. Es probable que la demanda del tomate siga aumentando, debido al crecimiento de la población humana y a la duración de conservación, que permite el transporte a larga distancia, la diversificación de los tipos varietales y los cambios alimentarios que orientan al consumidor hacia productos como esta hortaliza. (Blancard, 2011).

Portugal y Holanda son los dos países de la Unión Europea que más importaciones realizan. Portugal, Reino Unido, Francia y Holanda son los países que más exportaciones realizan (Tabla 2.12).

## **CAPÍTULO 3**

# **ALMACENAMIENTO DEL TOMATE Y SUS PROBLEMAS**



## Capítulo 3. Almacenamiento del tomate y sus problemas.

### 3.1. Condiciones óptimas de conservación

- **Calidad:** la calidad del tomate estándar se basa principalmente en la uniformidad de forma y en la ausencia de defectos de crecimiento y manejo. El tamaño no es un factor que defina el grado de calidad, pero puede influir de manera importante en las expectativas de su calidad comercial.
  - **Forma:** bien formado (redondo, forma globosa, globosa aplanada u ovalada, dependiendo del tipo).
  - **Color:** color uniforme (anaranjado-rojo a rojo intenso; amarillo claro). Sin hombros verdes.
  - **Apariencia:** lisa y con las cicatrices correspondientes a la punta floral y al pedúnculo pequeñas. Ausencia de grietas de crecimiento, cara de gato o cicatriz leñosa pistilar (“cat face”), sutura (“zippering”), quemaduras de sol (“sunburn”), daños por insectos y daño mecánico o magulladuras.
  - **Firmeza:** firme al tacto. No debe estar suave ni se debe deformar fácilmente debido a sobremadurez.
- **Temperaturas óptimas:**
- Verde Maduro: 12,5-15°C.
  - Rojo Claro: 10-12,5°C.
  - Maduro Firme: 7-10°C de 3 a 5 días.

Los tomates Verde Maduro pueden almacenarse a 12,5°C durante 14 días antes de madurarlos sin reducción significativa de su calidad sensorial y desarrollo de color. La pudrición puede aumentar si se les almacena más de dos semanas a esta temperatura. Después de alcanzar el estado Maduro Firme, la vida es generalmente de 8 a 10 días si se aplica una temperatura dentro del intervalo recomendado. Durante la distribución comercial es posible encontrar que se aplican temperaturas de tránsito o de almacenamiento de corto plazo inferiores a lo recomendado, pero es muy probable que

ocurra daño por frío después de algunos días. Se ha demostrado que se puede extender la vida de almacenamiento del tomate con la aplicación de atmósfera controlada.

- **Temperaturas de maduración:** 18-21°C; 90-95% HR para una maduración normal, 14-16°C para una maduración lenta (por ejemplo, en tránsito).
- **Daño por frío:** los tomates son sensibles al daño por frío a temperaturas inferiores a 10°C si se les mantiene en estas condiciones durante 2 semanas o a 5°C por un período mayor a los 6-8 días. Los síntomas del daño por frío son alteración de la maduración (incapacidad para desarrollar completo color y pleno sabor, aparición irregular del color o manchado, suavización prematura), picado (depresiones en la superficie), pardeamiento de las semillas e incremento de pudriciones (especialmente pudrición negra o “black mould”, causada por *Alternaria* spp.). El daño por frío es acumulativo y puede iniciarse en el campo antes de la cosecha.
- **Humedad relativa óptima:** 90-95%; la humedad relativa alta es esencial para maximizar la calidad postcosecha y prevenir la pérdida de agua (deseccación). Los períodos prolongados de elevada humedad o la condensación pueden incrementar las pudriciones de la cicatriz del pedúnculo y de la superficie del fruto.
- **Tasa de producción de etileno:** 1,2-1,5 $\mu$ L / kg-h a 10°C y 4,3-4,9 $\mu$ L / kg-h a 20°C.
- **Efectos del etileno:** los tomates son sensibles al etileno presente en el ambiente y la exposición de los frutos Verde Maduro a este gas inicia rápidamente su maduración. Los tomates que están madurando producen etileno a una tasa moderada, por lo que no deben almacenarse o transportarse con productos sensibles al etileno como las lechugas y los pepinos.
- **Maduración:** una maduración rápida ocurre a temperaturas entre 12,5-25°C; HR 90-95%; etileno 100 ppm. Debe mantenerse una buena circulación de aire

para asegurar uniformidad en la temperatura del cuarto de maduración y prevenir la acumulación de CO<sub>2</sub>. El CO<sub>2</sub> retarda la acción del etileno para estimular la maduración.

La temperatura óptima de maduración que asegura buena calidad sensorial y nutricional es 20°C. A esta temperatura el desarrollo de color es óptimo y la retención de vitamina C alta. Los tomates separados de la planta y madurados a temperaturas superiores a 25°C desarrollan un color más amarillo y menos rojo y son más blandos. El tratamiento con etileno generalmente dura 24-72 h. Algunas veces se aplica un segundo tratamiento después del envasado cuando se cosechan accidentalmente frutos verde inmaduros.

- **Efectos de atmósferas controladas (A.C.):** el almacenamiento del tomate en atmósfera controlada ofrece un beneficio moderado. Las bajas concentraciones de O<sub>2</sub> (3-5%) retrasan la maduración y el desarrollo de pudriciones en la cicatriz del pedúnculo y en la superficie sin afectar severamente la calidad sensorial para la mayoría de los consumidores. Se han reportado hasta 7 semanas como período de almacenamiento usando una combinación de 4% O<sub>2</sub>, 2% CO<sub>2</sub> y 5% CO.

### 3.2. Deterioro de los frutos durante la conservación y comercialización

#### 3.2.1. Pérdida natural de calidad.

El ciclo del tomate, de semilla a semilla, varía de tres meses y medio a cuatro meses según la variedad y las condiciones del medio. Desde la siembra de la semilla a la floración transcurren de seis a ocho semanas, y siete a ocho de la floración a la maduración del fruto con formación de semillas.

Las pérdidas pueden ser provocadas o naturales (pérdidas de peso por deshidratación, marchitamiento, ablandamiento del fruto, pérdida de calidad visual, gustativa (sabor) y nutritiva, etc.). Las pérdidas naturales no se pueden evitar, pero si se pueden retrasar cuando los frutos se almacenan en condiciones adecuadas. La pérdida

de calidad natural es más patente conforme aumenta el período de conservación y avanza consecuentemente la senescencia.

El deterioro de los tomates consiste en la pérdida de calidad progresiva durante la comercialización por efecto del envejecimiento genético, programado o senescencia natural (en planta) o forzado (cosecha).

Puede ser de dos tipos de acuerdo con las prácticas de almacenamiento:

- Normal
- Anormal

El deterioro normal consiste en cambios fisiológicos, bioquímicos y patológicos en postcosecha que son inevitables aunque modulables.

El deterioro anormal son cambios fisiológicos, bioquímicos y patológicos por mal manejo de las técnicas de manipulación, conservación y comercialización.

Los **factores que influyen sobre el deterioro** se pueden agrupar en tres grupos de acuerdo con la fase de comercialización, desde la precosecha hasta el consumo:

- Factores previos a la cosecha
- Las técnicas de recolección
- Las condiciones durante el almacenamiento y transporte

#### FACTORES PREVIOS A LA COSECHA

El devenir de frutas y hortalizas en post-recolección depende en gran medida de los caracteres intrínsecos a los propios productos y a las condiciones en las que se han desarrollado:

- Características de la especie y variedad.

- Estado sanitario del material vegetal.
- Condiciones climáticas.
- Condiciones del cultivo:
  - Dotación de agua de riego y forma de aplicarla.
  - Nutrición.
  - Utilización de fitorreguladores.
  - Estado fitosanitario de los frutos o plantas.
  - Cualquier acción que facilite o limite la cantidad de inóculo infeccioso (propágulo) en campo como: la forma de realizar la poda, o el aclarado de frutos, el deshojado, los daños físicos o el no quemar o destruir despojos, etc.

#### LAS TÉCNICAS EN EL MOMENTO DE LA RECOLECCIÓN

- Índices de madurez.
- Recolección tras la lluvia.
- Recolección manual frente a mecanizada.
- Forma en la que se separa el fruto de la planta y las herramientas utilizadas (daños físicos).

#### LAS CONDICIONES DURANTE EL ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

Los objetivos que debe cumplir el almacenamiento es que el espacio tenga unas condiciones ambientales determinadas donde se reduzcan pérdidas de agua, minimice la tasa respiratoria reduciendo el metabolismo y se eviten los ataques de microorganismos, es decir, marchitamiento, brotación, maduración o senescencia y la contaminación.

#### Tipos de almacenamiento

- Condiciones naturales
- Refrigeración

- Atmósferas artificiales

### 3.2.2. Alteraciones fisiológicas

“**Blossom-end rot**” (**necrosis apical y necrosis interna**): es una enfermedad no parasitaria que se desarrolla en la extremidad de los frutos, a nivel o cerca del cierre pistilar, de pequeñas lesiones húmedas, bastante difusas en un primer momento, que pardean y se extienden progresivamente después. Al final, una gran alteración pardusca a negra, más o menos cóncava y bien delimitada, de consistencia un tanto seca, deprecia la extremidad apical de uno o varios frutos.

Se produce un pardeameinto esencialmente interno de algunas semillas y de una porción más o menos grande de la placenta situada en la parte pistilar de los frutos (zona estilar). Puede suceder que esta lesión interna tome el aspecto de una masa fibrosa acorchada. Esta necrosis interna correspondería a una forma poco evolucionada o atenuada de la necrosis apical clásica.

Este desorden fisiológico se observa corrientemente en todos los tipos de cultivo, especialmente en los que se riegan por surcos, por inundación, o en los huertos familiares que utilizan mangas de riego. Puede aparecer en todas las fases de desarrollo de los frutos, pero ocurre sobre todo cuando estos han alcanzado la tercera parte o la mitad de su tamaño máximo. Los tomates afectados por la necrosis apical son a menudo los primeros formados, que maduran más deprisa. Esta lesión puede ser colonizada por diversos microorganismos invasores secundarios.

Esta afección está ligada a una falta de calcio en la parte distal de los frutos, debida a un defecto de absorción de este elemento por las raíces o a su transporte insuficiente vía savia bruta al xilema.

Para remediarlo hay que asegurar el máximo de comodidad a las plantas. (Blancard, 2011).



**Figura 3.1.** Lesión húmeda en la extremidad de los frutos. Fuente: Blancard (2011).

**-Japeado fisiológico:** es una enfermedad no parasitaria mal conocida en la que el tomate presenta zonas verdes a amarillas más o menos extendidas, apareciendo sobre los frutos en la madurez., de consistencia firme y que las hacen impropias para la comercialización. Es una maduración parcial de los frutos en manchas que suelen aparecer en la zona peduncular. También se aprecian pardeamientos de ciertos vasos del pericarpio en las zonas todavía verdes.

El jaspeado se manifiesta más en los cultivos precoces y no calentados o de finales de otoño en invernadero. Los síntomas son parecidos a los ataques del virus ToMV.

El exceso de nitrógeno y calcio, la falta de potasio; los periodos de luminosidad reducida, la alternancia de períodos nublados y soleados; una conductividad eléctrica demasiado baja del suelo o de la solución nutritiva, asociada a excesos de agua y temperaturas demasiado bajas; y los suelos pesados; son factores que influyen favorablemente en esta afección.

Hay que remediarlo con manejar lo mejor posible los parámetros que influyen en su expresión. (Blancard, 2011).



**Figura 3.2.** Tomates con maduración incompleta. Fuente: Blancard (2011).

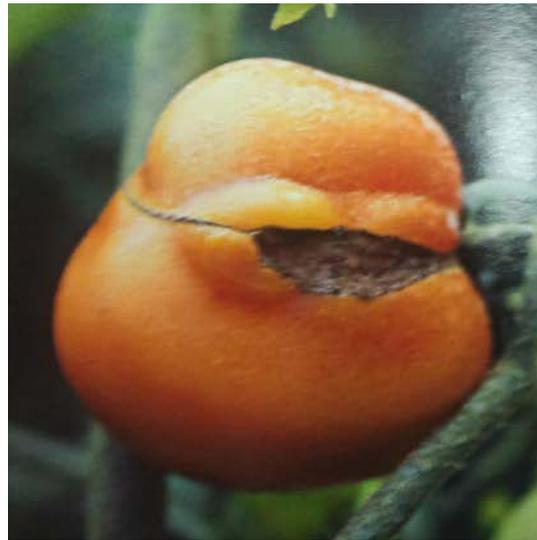
**-Rajado de frutos:** existen dos tipos de rajado en el fruto de tomate: “zippering” que son frutos con “cierre de cremallera” y “grow cracks” que son las grietas de crecimiento.

“Zippering”:

Es una enfermedad no parasitaria que consiste en que el fruto presente finas cicatrices pardas y necróticas, suberizadas, que rodean más o menos los frutos en su longitud y/o su anchura. Causan agrietamientos localizados y en donde se suberizan los tejidos pierden su elasticidad.

Aparecen por perturbaciones de la floración y después del cuajado, ligadas a temperaturas demasiado bajas.

Una vez que han aparecido los daños es demasiado tarde para intervenir. Esta anomalía depende mucho de la variedad que se cultiva. (Blancard, 2011).



**Figura 3.3.** Cicatriz desde la zona estilar a la zona peduncular, agrietamiento pardusco y parcialmente suberizado. Fuente: Blancard (2011).

“Grow cracks”:

Es una enfermedad no parasitaria que consiste en hendiduras, agrietamientos más o menos profundos y extendidos, que aparecen preferencialmente en las zonas peduncular y a veces estilar de los frutos. Estas hendiduras pueden ser longitudinales, radiales e incluso concéntricas. Cuanto más precozmente aparecen, más perjudiciales son.

Afectan sobre todo a los cultivos en el suelo y al aire libre. Ciertas producciones bajo cubierta en suelo o sin suelo, recolectadas en fases de madurez avanzadas, son igualmente afectadas.

Con flujos de agua demasiado importantes se genera un brusco crecimiento el cual la epidermis del fruto no puede compensar y por lo tanto acaban por rajarse y agrietarse. Los cambios climáticos también influyen en estos agrietamientos.

Hay que remediarlo controlando los factores que influyen en los flujos de agua en las plantas. (Blancard, 2011).



**Figura 3.4.** Epidermis agrietada en la parte estilar. Fuente: Blancard (2011).

-**"Catface" o cicatriz leñosa pistilar:** los tomates con esta fisiopatía carecen normalmente de forma y presentan grandes cicatrices y agujeros en el extremo pistilar del fruto. Se deforman los frutos de manera irregular y presentan protuberancias y cicatrices acorchadas más o menos extensas y espectaculares en la zona estilar. En ocasiones, el fruto tiene forma arriñonada con largas cicatrices. Una de las causas es el clima frío, la poda también puede incrementar este tipo de deformación bajo ciertas condiciones y los niveles altos de nitrógeno pueden agravar el problema.

Esta enfermedad afecta sobre todo a los cultivos precoces al aire libre y bajo cubierta, que han encontrado condiciones climáticas desfavorables durante la floración y el cuajado del tomate.

Su origen es de una enfermedad no parasitaria, dependiendo de la naturaleza de la variedad, de las condiciones climáticas en el momento de la floración, de los efectos de los herbicidas y de la poda que se le dé a la planta.

Para remediarlo hay que asegurarle a la planta la máxima comodidad durante el periodo de floración de los primeros ramos. (Blancard, 2011).



**Figura 3.5.** Cicatriz leñosa pistilar «Catface». Fuente: Maroto (1997).



**Figura 3.6.** Alteración acorchada irregular y agujeros en tomate maduro. Fuente: Blancard (2011).

### 3.2.3. Podredumbres

- **Podredumbre blanca** (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary. (1884); *Sclerotiniaceae*, Helotiales, Leotiomyctidae, Leotiomyctes, Ascomycota, Fungi).

Hongo polífago que ataca a la mayoría de las especies hortícolas. En plántulas produce “damping-off”. En planta produce una podredumbre blanda (no desprende mal

olor) acuosa al principio que posteriormente se seca más o menos según la succulencia de los tejidos afectados, cubriéndose de un abundante micelio algodonoso blanco, observándose la presencia de numerosos esclerocios, blancos al principio y negros más tarde. Los ataques al tallo con frecuencia colapsan la planta, que muere con rapidez, observándose los esclerocios en el interior del tallo. La enfermedad comienza a partir de esclerocios del suelo procedentes de infecciones anteriores, que germinan en condiciones de humedad relativa alta y temperaturas suaves, produciendo un número variable de apotecios. El apotecio cuando está maduro descarga numerosas esporas, que afectan sobre todo a los pétalos. Cuando caen sobre tallos, ramas u hojas producen la infección secundaria.

#### Control preventivo y técnicas culturales

- Eliminación de malas hierbas, restos de cultivo y plantas infectadas.
- Utilizar cubiertas plásticas en el invernadero que absorban la luz ultravioleta.
- Emplear marcos de plantación adecuados que permitan la aireación.
- Manejo adecuado de la ventilación y el riego.
- Solarización.

#### Control químico

**Tabla 3.1.** Control químico de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Materia activa	Dosis	Presentación del producto
Captan 40% + Tiabendazol 17%	0,15-0,25%	Polvo mojable
Ciprodinil 37.5% + Fludioxonil 25%	60-100 g/hl	Granulado dispersable en agua
Folpet 40% + Tiabendazol 17%	0,15-0,25%	Suspensión concentrada
Tebuconazol 25%	0,04-0,10%	Emulsión de aceite en agua



**Figura 3.7.** Esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*. Fuente: Blancard (2011).



**Figura 3.8.** *Sclerotinia sclerotiorum* en tomate. Fuente: Blancard, (2011).

- **Podredumbre gris** (*Botrytis cinerea* Pers. (1794); anamorfo de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, *Sclerotiniaceae*, Helotiales, Leotiomycetidae, Leomycetes, Ascomycota, Fungi).

Parásito que ataca a un amplio número de especies vegetales, afectando a todos los cultivos hortícolas protegidos, pudiéndose comportar como parásito y saprófito. En plántulas produce “damping-off”. En hojas y flores se producen lesiones pardas. En frutos tiene lugar una podredumbre blanda (más o menos acuosa, según el tejido), en los que se observa el micelio gris del hongo. Las principales fuentes de inóculo infeccioso está formado por esporas de resistencia y dispersión (conidios) y por los restos vegetales que son dispersados por el viento, salpicaduras de lluvia, gotas de condensación en plástico y agua de riego. La temperatura, la humedad relativa y fenología influyen en la enfermedad de forma separada o conjunta. La humedad relativa óptima oscila alrededor del 95% y la temperatura entre 17°C y 23°C. Los pétalos infectados y desprendidos actúan dispersando el hongo.

#### Control preventivo y técnicas culturales

- Eliminación de malas hierbas, restos de cultivo y plantas infectadas.
- Tener especial cuidado en la poda, realizando cortes limpios a ras del tallo. A ser posible cuando la humedad relativa no sea muy elevada y aplicar posteriormente una pasta fungicida.
- Controlar los niveles de nitrógeno y calcio.
- Utilizar cubiertas plásticas en el invernadero que absorban la luz ultravioleta.
- Emplear marcos de plantación adecuados que permitan la aireación.
- Manejo adecuado de la ventilación en bandas y en especial de la cenital y el riego.

Control biológico

- Existe un preparado biológico a base de *Trichoderma harzianum* Rifai T39.

Control químico

**Tabla 3.2.** Control químico de *Botrytis cinerea*.

Materia activa	Dosis	Presentación del producto
Benomilo 50%	0,10%	Polvo mojable
Captan 40% + Tiabendazol 17%	0,15-0,25%	Polvo mojable
Captan 47.5%	0,25-0,30%	Suspensión concentrada
Carbendazima 25% + Dietofencarb 25%	0,10-0,15%	Polvo mojable
Carbendazima 25% + Oxinato de cobre 41% + Quinosol 20%	0,10%	Polvo mojable
Carbendazima 50%	0,06%	Suspensión concentrada
Cimoxanilo 4% + Folpet 40%	0,30%	Polvo mojable
Ciprodinil 37.5% + Fluodioxonil 25%	60-100 g/hl	Granulado dispersable en agua
Clortalonil 30% + Metil tiofanato 17%	0,20-0,25%	Suspensión concentrada
Clortalonil 37% + Oxido cuproso 25%	0,15-0,30%	Polvo mojable
Diclofluanida 35% + Oxadixil 10%	0,20%	Polvo mojable
Diclofluanida 40% + Tebuconazol 10%	0,15-0,25%	Polvo mojable
Folpet 10%	20-30 kg/ha	Polvo para espolvoreo
Folpet 24% + Oxadixil 8% + Oxicloruro de cobre 12%	0,20-0,30%	Polvo mojable
Folpet 40% + Tiabendazol 17%	0,15-0,25%	Suspensión concentrada
Folpet 60% + Oxadixil 20%	0,10-0,13%	Polvo mojable
Iprodiona 2%	20-30 kg/ha	Polvo para espolvoreo
Mancozeb 60% + Metil tiofanato 14%	2-4 L/ha	Polvo mojable
Maneb 30% + Metil tiofanato 15%	0,40-0,60%	Suspensión concentrada
Pirimetaniil 40%	0,15-0,20%	Suspensión concentrada
Tebuconazol 25%	0,04-0,10%	Emulsión de aceite en agua



**Figura 3.9.** Tomate con *Botrytis cinerea*. Foto: M<sup>a</sup> Almudena Fuentes López.

- *Alternaria tomatophila* E.G. Simmons (2000). Anamorfo de *Lewia*, *Pleosporaceae*, Pleosporales, Pleosporomycetidae, Dothideomycetes, Ascomycota, Fungi.

### Frecuencia e importancia de los daños.

Entre las enfermedades aéreas del tomate, la alternariosis es sin duda una de las más frecuentes y más extendida en el mundo: se encuentra en todos los continentes, en todos los sitios en los que se cultiva esta solanácea. Se la encuentra bajo numerosos climas, en zonas de producción tropicales, subtropicales y templadas. La presencia de rocíos en las regiones semiáridas permite su desarrollo. Afecta sobre todo a los cultivos al aire libre, y a veces a las cubiertas frías. Es también muy presente en números huertos familiares. Sus daños pueden ser importantes si persisten unas condiciones climáticas húmedas y/o si no se ha previsto ningún método de protección. Provoca a veces defoliaciones importantes, origen de una reducción de los rendimientos, así como numerosas lesiones en frutos ligadas a los efectos del sol sobre dichos frutos, que están menos protegidos por el follaje.

Es una enfermedad muy presente en Francia; afecta a todas las producciones al aire libre. Se encuentra a veces bajos los túneles de plástico, prácticamente nunca en los cultivos intensivos en invernaderos calentados.

### Principales síntomas.

*A. tomatophila* ataca a todos los órganos aéreos del tomate, en todas las fases de crecimiento de la planta.

Afecta a las jóvenes plantas antes y después del trasplante, en los viveros extensivos húmedos y fríos. Además de la enfermedad de los semilleros, este hongo es origen de alteraciones negras más o menos extensas en el tallo, situadas cerca del cuello o más en altura. Después de haber rodeado el tallo, las lesiones pueden provocar rápidamente la desecación de las plantas y su muerte. Los ataques en esta fase de desarrollo de las plantas son debidos a la contaminación de las semillas y/o del suelo del vivero.

En las plantas adultas, ocasiona sobre todo manchas foliares, que se desarrollan más bien en las hojas bajas y maduras, y después avanzan hacia el ápice. Estas manchas son en un primer momento de color verde oscuro y después se vuelven rápidamente pardas a negras. Tienen una forma más o menos redondeada, a veces angular cuando están delimitadas por los nervios. Su diámetro es a menudo de 1 cm, pero pueden alcanzar varios centímetros cuando las condiciones climáticas son particularmente favorables y/o cuando las manchas confluyen. Dichas manchas tienen la característica de presentar discretos motivos concéntricos, que les confieren el aspecto de un blanco. Están situadas en el conjunto del limbo, incluida su periferia. En este último caso no presentan siempre anillos concéntricos. Un halo amarillo más o menos vivo (debido a los efectos de una toxina) es a veces visible alrededor de estas manchas que, al final, acaban por necrosarse. Cuando son numerosas y las condiciones climáticas son muy favorables, folios enteros pueden amarillear y secarse, conduciendo a veces a defoliaciones importantes de las plantas.

Manchas bastante parecidas se constatan también en los tallos, peciolos y pedúnculos; tienen un tinte negruzco y frecuentemente una forma más alargada. Estas lesiones pueden rodear el órgano afectado y provocar el deterioro de su parte distal.

En los frutos aparecen manchas cóncavas, bien delimitadas, cerca de la cicatriz peduncular y de los sépalos. Estos, colonizados en un primer momento, son a menudo alterados. La superficie de las zonas alteradas de los frutos se pliega; puede cubrirse con un moho negro, aterciopelado, bastante característico, y se encuentran motivos concéntricos, como en las hojas. Tanto los frutos verdes como los maduros pueden ser tocados; los que tienen una madurez avanzada son poco o nada afectados. Observemos que las contaminaciones pueden tener lugar a través de las heridas, como las grietas del crecimiento. Las lesiones en frutos pueden engendrar su caída en grandes cantidades. Los fuertes ataques de alternariosis pueden también ser origen de la reducción del tamaño y número de frutos reducido.

*A. tomatophila* puede conservarse durante varios años en la superficie de la semilla de tomate, en el suelo y en los restos vegetales, gracias a su micelio melanizado, sus conidios y sus clamidosporas.

Esta alternariosis es favorecida por higrometrías elevadas y temperaturas comprendidas entre 18 y 30°C. Los rocíos, precipitaciones débiles continuas (5 mm) o riegos por aspersión son suficientes para su extensión, pero deben ser repetidos para que la enfermedad evolucione rápidamente. Las plantas estresadas, mal abonadas o muy cargadas con frutos serias más sensibles. La enfermedad no tiene jamás un carácter exclusivo, pero se acentúa progresivamente con el tiempo a medida que las plantas envejecen, y se hace grave al final de la estación. En condiciones favorables, los síntomas son bastante notables en 5 a 7 días (Blancard, 2011).



**Figura 3.10.** *Alternaria tomatophila*. Fuente:

[http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/PhotoPages/Impt\\_Diseases/Tomato/Tom\\_Early.htm](http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/PhotoPages/Impt_Diseases/Tomato/Tom_Early.htm)

- *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (1876). *Incertae sedis*, Peronosporales, Peronosporomycetidae, Oomycetes, Oomycota, Chromista.

#### **Frecuencia e importancia de los daños.**

El mildiu ataca con gravedad en muchas zonas de protección del mundo. Es particularmente temible y destructor en las regiones de clima húmedo, y sus daños pueden ser muy importantes cuando las epidemias fulgurantes son mal controladas. No es raro, en este caso observar cultivos enteramente devastados, en los que el número de frutos comercializables es muy limitado. Este hongo chromista afecta sobre todo a los tomates cultivos al aire libre, pero también pueden ser observados bajo cubierta con clima mal gestionado. Como numerosos agentes de mildiu, *P. infestans* se manifiesta sobre todo en las zonas de producción que tuvieron períodos prolongados de humedad (lluvias, riegos por aspersión, neblinas, rocíos...) y tiempo favorable. Como su nombre anglosajón indica, “late blight”, es más bien tardío en la estación. Con frecuencia constituye una amenaza constante y necesita tratamientos fungicidas preventivos.

En Francia, país con un clima templado por excelencia, *P. infestans* encuentra condiciones particularmente favorables para su desarrollo (Blancard, 2011).

Desde los años 1990 y con la llegada de cepas A2 especialmente, su incidencia en tomate se ha acentuado fuertemente; es ahora frecuente y temido por el conjunto de productores de tomate al aire libre y por los horticultores familiares, sobre todo en los periodos de producción estival. Su incidencia es más escasa en cultivos bajo cubierta. Recordemos que, en Francia, la diversidad de las cepas aisladas en tomate es mayor que la observada a partir de las cepas de patata; es ratio de las cepas A2 es también mayor.

### Principales síntomas.

El mildiu puede atacar a todos los órganos aéreos del tomate. Se caracteriza por el desarrollo de las manchas al principio húmedas, incluso zonas sobre los folíolos. Estos daños confieren localmente a los tejidos afectados por un tinte verde pálido a verde pardo. Porciones importantes del limbo acaban por verse afectadas y no tardan en pardear y necrosarse. Estas manchas están frecuentemente rodeadas por un margen de tejido lívido, más definido, sobre el cual se forma a veces, en la cara inferior del limbo, una discreta y fugaz pelusa blanca constituida por los esporocistóforos y los esporocistos de *P. infestans*.

Cuando las condiciones son particularmente favorables, la progresión de los síntomas en los folíolos es fulgurante. Hojas, ramillas, e incluso plantas, acaban por necrosarse y secarse enteramente.

En los tallos y peciolo se pueden ver lesiones chancrosas más o menos extensas, pardas, con contorno irregular, que las rodean a menudo más o menos. Se pueden observar pardeamientos parecidos en los ramos florales, que son origen de la caída de numerosas flores.

Los frutos afectados en una fase precoz presentan jaspeados pardos muy característicos. A menudo están abollados. En este caso, la extensión de los jaspeados es un tanto lenta y su margen es irregular.

Si los ataques sobreviven más tardíamente, las zonas jaspeadas son más homogéneas y con frecuencia repartidas en círculos concéntricos festoneados. Pueden

presentarse a confusión con las ocasionas por otros *Phytophthora*, en particular *P. nicotianae*. La misma pelusa blanquecina que la observada en los foliolos es, de vez en cuando, visible en la superficie de los frutos. Estos permanecen relativamente duros, cualquiera que sea la precocidad del ataque. En ciertos casos microorganismos secundarios pueden invadir los tejidos lesionados y provocar diversas podredumbres más bien blandas. Señalemos que algunas semillas procedentes de frutos enfermos serian origen de la contaminación de futuras plántulas.

Recordemos que las plantas enfermas se reparten en focos en las parcelas; estos pueden aumentar rápidamente si las condiciones climáticas son favorables.

El modo de conservación de las cepas tomate de *P. infestans* es a veces difícilmente comprensible, en particular en los países en los que el invierno es muy frío. Parece que puede conservarse bajo diferentes formas, en función de las zonas de producción: a través de oosporas procedentes de la reproducción sexual las cuales se forman en los tejidos enfermos necrosados y se encuentran posteriormente en el suelo, al mismo tiempo que los restos vegetales; también bajo la forma de micelio en el interior de tubérculos de patatas enfermas que permanecen en el suelo; o sobre diversos huéspedes alternativos, plantas cultivadas o silvestres próximas en las que esporulan más o menos este hongo.

Este hongo chromista esta extremadamente influenciado por las condiciones climáticas. Se desarrolla más o menos bien con temperaturas comprendidas entre 3 y más de 25°C. Su esporulación es óptima entre 16 y 22°C. Le son necesarias imperativamente humedades relativas elevadas, superiores al 90%. Noches frías y días moderadamente cálidos con una fuerte humedad, favorece su extensión, por el contrario, una atmosfera seca y temperaturas próximas a 30°C la inhiben. Los períodos lluviosos, los riegos por aspersión y los rocíos son también muy favorables a las epidemias de mildiu. Bastan dos horas de presencia de agua sobre las hojas para iniciar una infección. La producción de esporangios es grande a 18°C, pero es nula a 28°C. Las oosporas se forman en cantidad entre 8 y 15°C; su producción necesita la presencia de humedad e higrometrías elevadas sin interrupción. (Blancard, 2011).



**Figura 3.11.** *Phytophthora infestans*. Fuente:  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phytophthora\\_infestans\\_\(late\\_blight\)\\_on\\_tomato.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phytophthora_infestans_(late_blight)_on_tomato.jpg)

- ***Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker (1979).**  
Anamorfo de *Gibberella*, *Nectriaceae*, Hypocreales, Hypocreomycetidae,  
Sordariomycetes, Ascomycota, Fungi.

#### **Frecuencia e importancia de los daños.**

Esta fusariosis radicular ha sido descrita por primera vez en Japón en 1969 (con pérdidas de rendimiento que pueden llegar al 40%), a continuación en California en 1971, y después en otros estados de los Estados Unidos (rendimientos reducidos hasta el 50%). Ahora está presente en numerosas zonas de producción, repartidas por todo el mundo; puede también atacar tanto al aire libre como bajo cubierta, en cultivo en suelo y sin suelo. Es en los cultivos sin suelo, donde ha provocado daños considerables, en particular durante las estaciones frías.

En Francia, sus primeros daños se han constatado en 1985, como consecuencia de la utilización de turbas importadas (Blancard, 2011).

Felizmente, la creación de variedades resistentes a este temible hongo ha permitido resolver eficazmente este problema fitosanitario, tanto en Francia como en muchos otros países. La llegada al mercado de nuevas variedades resistente a TYLCV pero sensibles a la familia *oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, ha demostrado que no

nos podemos olvidar de esta resistencia en Francia, pues esta fusariosis radicular ha atacado de nuevo con gravedad. Esto confirma que el hongo está instalado permanentemente en numerosas explotaciones. Esta fusariosis ha sido señalada más recientemente en varios países, en los que es más o menos nociva: varios países de la cuenca mediterránea (Creta, Turquía, Malta, Túnez...), en Eslovaquia...

### Principales síntomas.

*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* puede atacar a las plántulas de tomate y provocar su muerte. La enfermedad se expresa sobre todo cerca de la recolección, cuando las plantas están cargadas con frutos. Contrariamente a las enfermedades vasculares especialmente, aparecen marchitamientos más o menos importante en los folíolos y hojas del vértice del tallo; por otro lado, el tallo es muy delgado en esta zona. En función de las plantas, estos marchitamientos pueden ser en un primer momento reversibles durante la noche, y su influencia puede fluctuar según las condiciones climáticas. También pueden ser repentinos, evolucionar muy rápidamente hacia la necrosis y la desecación de los folíolos y las hojas, y conducir a la muerte de las plantas. Algunos autores señalan también la aparición de amarillos foliares situados sobre la periferia del limbo de las hojas viejas, que son seguidos por la necrosis de los peciolo y la caída de las hojas. Algunas plantas afectadas precozmente ven su crecimiento reducido.

Cualquiera que sea la gravedad de los marchitamientos, hay que buscar los síntomas primarios en las raíces y en el cuello de las plantas. En las primeras (la corteza y el cilindro) aparecen numerosas lesiones de color pardo y rojizo, húmedas, que evolucionan más rápidamente hacia la podredumbre. Cuanto menor es el diámetro de las raíces, más rápidamente se pudren y descomponen estas. Es el caso, en particular, de ciertos substratos de cultivos sin suelo, en los que las raíces son muy abundantes.

Frecuentemente se desarrolla un chancro en el cuello. En un primer momento se vuelve pardo oscuro, y los tejidos enfermos son más o menos deprimidos. Este chancro evoluciona a menudo longitudinalmente, sobre una cara del tallo, tomando la forma de una llama que puede extenderse hasta más de 30 cm por encima del cuello. La parte

central del chancro toma un tinte rosa a salmón y un aspecto un tanto mucoso debido a la formación de los esporodocios del hongo.

Conviene observar que el sistema vascular presenta también algunos síntomas, aunque no tengan nada que ver con una enfermedad vascular. De una manera general, el cilindro central de las raíces gruesas muestra pardeamientos bastante marcados. Ocurre lo mismo con los tejidos vasculares de la raíz vertical y con los situados a una y otra parte de dichos tejidos vasculares. El pardeamiento puede ser muy marcado y extenderse por el tallo varias decenas de centímetros por encima del cuello. A veces se desarrollan en el tallo raíces adventicias.

Los frutos de las plantas enfermas son con frecuencia poco turgentes y apagados.

Este hongo es capaz de mantenerse en el suelo gracias a los restos vegetales que albergan el micelio, micro y macroconidios y clamidosporas con paredes gruesas y resistentes. Se le encuentra también en el polvo presente en las cubiertas. *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* está dotado de aptitudes para la vida saprofítica, que le permiten colonizar y sobrevivir en diversos compuestos orgánicos y mantenerse en los cultivos sin suelo, incluso en presencia de variedades resistentes.

*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* parece preferir las temperaturas más bien bajas. Su óptimo térmico se situaría entre 18 y 20°C, y sus ataques más graves tendrían lugar a temperaturas comprendidas entre 10 y 20°C.

Inoculaciones sobre plántulas de tomate han revelado que esta fusariosis podría estar influenciada por ciertos micro y macroelementos. (Blancard, 2011).



**Figura 3.12.** *Fusarium oxysporum*. (<http://www.broadinstitute.org/news/1439>).

- *Mycovellosiella fulva* (*Cladosporium fulvum*) (Cooke) Arx 1983.  
Anamorfo de *Mycosphaerella*, *Mycosphaerellaceae*, Capnodiales,  
Dothideomycetidae, Dothideomycetes, Ascomycota, Fungi.).

El hongo sobrevive como parásito casi esencialmente foliar. Esta enfermedad está mundialmente extendida, en particular en las zonas de producción más húmedas y solo afecta a las hojas penetrando por los estomas en condiciones de humedad superiores a 70% y temperaturas entre 5 y 25° C.

Puede sobrevivir en trozos de hojas secas sobre el suelo, en estructuras de invernadero, etc. Afecta sobre todo a los cultivos bajo cubierta, tanto en suelo como sin suelo, así como a los cultivos al aire libre de zonas húmedas y cálidas. Sus daños pueden ser considerables bajo cubierta, sobre todo si se cultivan variedades sensibles. La destrucción de una parte del follaje ocasionada por sus epidemias puede ser el origen de disminuciones importantes de rendimiento.

### Principales síntomas.

Provoca manchas de color verde claro que se tornan amarillas pálidas, con contornos difusos, situadas más bien en los folíolos de las hojas bajas. Una pelusa, al

principio blanquecina y después violácea a pardo-aceituna, cubre progresivamente las manchas en la cara inferior del limbo. Al final, los tejidos situados en el centro de las manchas pardean, se necrosan y se secan, mientras que las hojas se enrollan. La enfermedad se extiende después hasta las partes altas de las plantas, mientras que las hojas viejas enteras acaban por secarse completamente y caerse a veces. El tallo también puede verse afectado. Las flores son raramente atacadas, pero cuando lo son mueren antes del cuajado. De vez en cuando, se desarrollan lesiones irregulares sobre los frutos verdes o maduros: de color negro, provistas de un borde difuso, dan lugar a una podredumbre peduncular. (Blancard, 2011).

#### **Condiciones predisponentes:**

Ataca más bien en otoño y al principio del invierno, y en la primavera. Si bien tiene un amplio rango de temperaturas, las epidemias suelen desarrollarse más eficientemente entre 20 y 25° C y en ambientes húmedas, y su actividad es limitada por debajo de 11°C. También requiere alta humedad relativa para germinar e infectar. Los abonos nitrogenados excesivos favorecen igualmente la cladosporiosis provocada por este hongo.

Hay que evitar la presencia de agua libre sobre el cultivo y realizar desinfección de estructuras y cubiertas. El uso de semilla sin tratamiento térmico ni fúngico, la siembra en terrenos con restos culturales de tomate y la deficiente ventilación en invernadero favorecen la infección. (<http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/cladosporium-fulvum>).

#### **Medidas preventivas/culturales:**

- Eliminación de malas hierbas.
- Tratar las estructuras y el suelo antes de realizar una nueva plantación en invernaderos con antecedentes de la plaga.
- Evitar dispersiones mediante operaciones culturales.

- Realizar una detección precoz de los focos. (<http://www.syngenta.com/country/es/sp/cultivos/tomate/enfermedades-tomate/Paginas/cladosporiosis.aspx>).



Figura 3.13. *Cladosporium*. Foto: M<sup>a</sup> Almudena Fuentes López.

- *Stemphylium botryosum* f. sp. *Lycopersici* Rotem, y. Cohen & I. Wahl (1966) (anamorfo de *Pleospora herbarum* [Pers.] Rabenh [1854]). *Pleosporaceae*, Pleosporales, Pleosporomycetidae, Dothideomycetes, Ascomycota, Fungi.

### Frecuencia e importancia de los daños.

Esta enfermedad, mundialmente extendida, es particularmente grave en las zonas de producción tropicales y subtropicales húmedas. Está descrita en el continente americano: Estados Unidos, Canadá, Brasil, Colombia, Perú...; es muy grave en Cuba. Afecta a numerosos países de África y es menos grave en Europa. La estenfiliosis es igualmente señalada en Asia (China, Japón, Indonesia, Tailandia...) y en Oceanía (Australia). Se la encuentra tanto al aire libre como bajo cubierta.

En condiciones cálidas y húmedas, estos hongos producen graves daños en las variedades sensibles, origen de las defoliaciones importantes.

### Principales síntomas.

La estenfiliosis es una enfermedad esencialmente aérea que ataca a los folíolos, raramente a los pecíolos y al tallo, jamás a los frutos.

En todos los folíolos del tomate se pueden observar minúsculas manchas parduscas, ligeramente angulares, a veces discretamente aureoladas por una orla clorótica. Su tamaño se limita con frecuencia a algunos milímetros, excepto en condiciones particularmente húmedas que favorecen su extensión y su confluencia. En este caso, pueden ocupar amplias porciones del tallo. Generalmente, las manchas se aclaran progresivamente y acaban por tomar un tinte grisáceo a medida que se necrosan y secan. Fructificaciones de *Stemphylium* spp. (masas pardas correspondientes a los conidios muriformes) son visibles con la lupa binocular en las dos caras del limbo. Los tejidos dañados, de aspecto apagado, se rajan a veces. En ataques particularmente graves, la fuerte densidad de las manchas, su extensión aumentada y su confluencia inducen mortalidades foliares importantes, precedidas de amarilleo, y caídas de hojas más o menos considerables.

A veces se observan raras lesiones pardas, más bien limitadas y longitudinales, en los pecíolos, incluso en el tallo. Severos ataques pueden tener lugar sobre plántulas en vivero en ciertos países, acompañados de amarillos y defoliaciones.

Este hongo dispone de potencialidades saprofitas que les permiten mantenerse fácilmente de una estación a otra, sobre y dentro del suelo, en los restos vegetales de todo tipo (folíolos, tallos, piezas florales senescentes...) del tomate y de numerosos huéspedes alternativos, cultivados o no. *Stemphylium botryosum* cuenta con sus peritecios para conservarse de una estación a otra, así como de sus ascosporas que pueden asegurar las contaminaciones primarias.

Los conidios de estos hongos germinan sobre los folíolos y penetran directamente a través de la cutícula o por medio de diversas heridas. Su micelio invade después rápidamente los tejidos y, 5 días después de las primeras contaminaciones, son ya visibles las manchas.

El desarrollo de *Stemphylium botryosum* es favorecido por condiciones climáticas húmedas, en particular la presencia de agua sobre las plantas (lluvia, rocío, aspersiones, condensaciones en los invernaderos) y por temperaturas elevadas. Sus óptimos térmicos se sitúan entre 23 y 27°C según la especie. (Blancard, 2011).



**Figura 3.14.** *Stemphylium botryosum*.  
(<http://ag.arizona.edu/plp/plpext/diseases/vegetables/spinach/spinstem3.html>).

- *Penicillium* spp. Anamorfo de *Eupenicillium*, *Trichocomaceae*, Eurotiales, Eurotiomycetidae, Eurotiomycetes, Ascomycota, Fungi.

Ocasiona daños en el tomate, tanto durante el cultivo como después de la recolección. Son responsables de lesiones blandas, húmedas y oscuras, que pueden desarrollarse bien a partir de la zona de implantación del pedúnculo, o bien en otra parte del fruto, a nivel de una herida. Los tejidos lesionados se cubren progresivamente de almohadillas esporíferas, cuyo color puede variar en función de la especie presente y del grado de evolución de las fructificaciones (azul, gris, verde).

*Penicillium expansum* es la especie con más frecuencia observada en numerosos frutos (manzana, pera, kiwi, pomelo...) y en diversas hortalizas como ajo o cebolla. Está naturalmente presente en el suelo y por supuesto en los diferentes órganos del tomate. Se conserva en su forma miceliana o en estado de esporas. Éstas, muy ligeras y producidas en masa, son transportadas por el aire hasta que caen sobre la superficie de un fruto cerca de una herida. Entonces germinan y el micelio se desarrolla de forma muy extensiva, avanzando en todas las direcciones en el interior de la carne, que se descompone poco a poco gracias a varias enzimas. El hongo no tarda en esporular; se

desarrollan conidióforos que generan conidios. El número de esporas presentes en la superficie de un fruto contaminado puede cifrarse en millones. Cuando llegan a su madurez, se separan fácilmente y flotan en el aire algún tiempo, antes de caer y provocar nuevas contaminaciones. La germinación es óptima con una atmósfera húmeda entre 20 y 25 °C, y el crecimiento del micelio se para por encima de los 30°C. Este hongo sólo ataca a frutos cambiantes o maduros y sintetiza dos toxinas: la patulina, una micotoxina bastante frecuente en alimentación animal, y la citrinina.



**Figura 3.15.** *Penicillium expansum*. Foto: M<sup>a</sup> Almudena Fuentes López.

- *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. (sin. *Rhizopus nigricans* Ehrenb., *rhizopus rot*). *Mucoraceae*, Mucorales, *Incertae sedis*, Zygomycetes, Zygomycota, Fungi.

Los síntomas que provocan son lesiones húmedas y blandas que se extienden rápidamente sobre los frutos maduros principalmente. Los tejidos afectados se licúan y acaban por descomponerse, la cutícula se agrieta. Se pueden constatar salidas de jugos. El micelio del hongo invade los tejidos, que un moho blanquecino a grisáceo recubre. Este moho está constituido por el micelio, los esporocistóforos y los esporocistos de este zigomiceto. Al final, se forman numerosas fructificaciones bastante aéreas, “en cabezas de alfiler negras”, sobre los tejidos lesionados.

Este hongo saprófito ubicuo se conserva muy fácilmente sobre y dentro del suelo, en numerosos restos vegetales, diversos substratos húmedos o secos, y se mantiene a veces varios años y bajo diferentes formas: esporas, clamidosporas, zigosporas, micelio. También es conocido por inducir podredumbres en numerosas especies vegetales, especialmente en frutos y hortalizas. Está presente en el entorno de las plantas en los campos y en los almacenes, en el material de acondicionamiento y de almacenamiento de los frutos. Penetra en los frutos a través de diversas heridas, así como a partir de las cicatrices pedunculares y estilares. Una vez en los tejidos, los invade, descompone rápidamente y termina por esporular en superficie, bajo la forma de numerosos esporangioforos que contienen innumerables esporas negras en vesículas esporíferas. Estas esporas son diseminadas por el viento a largas distancias, así como por las salpicaduras de agua, los obreros y algunos insectos “vectores pasivos”. También es posible la transmisión por contacto de fruto podrido a fruto sano.

Las condiciones climáticas húmedas y las temperaturas todavía suaves de los meses de agosto y septiembre son muy favorables para su desarrollo. Así, aprecia las temperaturas del orden de 23 a 27°C y las humedades elevadas. Ataca igualmente a baja temperatura durante la conservación de los frutos. Los tomates maduros son particularmente sensibles.



**Figura 3.16.** *Rhizopus stolonifer*. Fuente:

[http://agritech.tnau.ac.in/crop\\_protection/crop\\_prot\\_crop%20diseases\\_postharvest\\_tomato.html](http://agritech.tnau.ac.in/crop_protection/crop_prot_crop%20diseases_postharvest_tomato.html)

- *Mucor hiemalis* Wehmer y *Mucor circinelloides* Tiegh.

Las podredumbres que engendran, y los mohos que las cubren, son bastante parecidas a las producidas por *Rhizopus stolonifer*. Son húmedas y blandas y se cubren con un moho aéreo grisáceo. Ocurre lo mismo con sus características biológicas. Producen esporangios esféricos en la extremidad de pedicelos rectos.



**Figura 3.17.** *Mucor hiemalis*. Fuente: <http://www.flickrriver.com/photos/tags/mucor/interesting/>

- *Geotrichum candidum* Link, podredumbre agria (sour rot). Incertae sedis, Saccharomycetales, Saccharomycetidae, Saccharomycetes, Ascomycota, Fungi.

Este hongo levuriforme está asociado a podredumbres líquidas en frutos, que afectan sobre todo a los tomates al aire libre cultivados en llano y destinados a la industria. Se le encuentra más raramente en los frutos procedentes de cultivos en espaldera y destinados al mercado en fresco. Es un saprófito ampliamente presente en el ambiente de los cultivos de tomate, que es capaz de atacar a los frutos verdes o maduros a la menor oportunidad que se le presente.

Produce lesiones húmedas y grasientas, que aparecen a nivel de heridas o de la cicatriz peduncular de los frutos. Estas lesiones evolucionan rápidamente en los frutos maduros, cuya epidermis termina por rajarse, ocasionando salidas de jugos. Una mucosidad blanquecina y densa cubre a veces localmente los tejidos. El micelio es tabicado y porta artrosporas en cadenas que acaban por desarticularse.

A esta podredumbre le acompaña un olor ácido que revela un pH relativamente bajo de la carne del fruto, del orden de 4.

Los frutos verdes afectados permanecen duros más tiempo, pero acaban por tener el mismo destino que los frutos maduros cuando son invadidos enteramente.

Este hongo se conserva en el suelo, en los restos vegetales, en los depósitos de agua, en el material contaminado por la pulpa y/o que ha contenido frutos podridos. La penetración tiene lugar por las heridas, especialmente en la periferia de la cicatriz peduncular, en algún caso a través directamente de la cutícula. Un vector de esporas de este hongo puede ser *Drosophila melanogaster* (la mosca del vinagre), deposita esporas sobre las numerosas microheridas presentes en los frutos maduros. Una vez en los tejidos, este hongo se desarrolla más o menos rápidamente y se multiplica en gran cantidad. La diseminación puede tener lugar de diferentes modos: por contacto de fruto enfermo a fruto sano, como consecuencia de salpicaduras de agua, a través de insectos y de los obreros durante sus intervenciones culturales. La presencia de frutos maduros heridos, en una atmósfera húmeda y una temperatura a 30°C, favorece el desarrollo de este hongo.



Figura 3.18. *Geotrichum candidum*. Fuente: Blancard (2011).

- *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* (Jones) Hauben *et al.*  
*Pectobacterium*, *Enterobacteriaceae*, Enterobacteriales, Proteobacteria,  
Bacteria.

### **Frecuencia e importancia de los daños.**

Esta podredumbre bacteriana con células bacterianas en forma de bastoncillo y Gram, está mundialmente extendida y ataca a una amplia gama de plantas, especialmente diversas hortalizas. Su presencia es señalada en numerosas zonas de producción del tomate repartidas en todos los continentes. En condiciones climáticas húmedas, puede provocar daños en el tallo y/o los frutos, tanto al aire libre como bajo cubierta, en suelo como sin suelo, durante el transporte de los tomates y durante su almacenamiento.

Esta bacteria ataca de forma esporádica, afectando a los tallos en los cultivos de espaldera bajo cubierta, y a los frutos en los cultivos no entutorados al aire libre, sobre todo destinados a la conservería.

### **Principales síntomas.**

Ataca en primer lugar al tallo y se desarrolla en el interior de éste. Así, lesiones húmedas y pardas se extienden hasta la médula; ésta se licúa bastante rápidamente, y un corte longitudinal o transversal permite constatar que está hueca. También nos podemos dar cuenta de esto apretándola. Esta bacteria puede extenderse hasta las capas externas del tallo y degradarlas. Así, lesiones longitudinales, de color pardo oscuro a negro, cubren y rodean el tallo en varios centímetros. Los tejidos en vía de descomposición son húmedos y blandos.

La alteración interna del tallo tiene sus consecuencias en el funcionamiento de las plantas, especialmente en el transporte del agua y de los elementos minerales. Estos elementos son limitados, lo que provoca el marchitamiento y amarilleo de las hojas, en particular en períodos climáticos más suaves y/o a partir de la recolección de los primeros frutos. Si las condiciones son favorables, la enfermedad evoluciona y las plantas pueden morir. Cuando éstas se ven afectadas débilmente, y cuando las condiciones mejoran, podrán producir sus frutos normalmente.

Cuando invade los frutos, esta bacteria es origen de una podredumbre húmeda, viscosa y blanda, que conducirá a la licuefacción total de los frutos. Al final, solamente subsistirán la epidermis y algunos restos de tejidos arrugados.

Es una bacteria ubicua, está presente en numerosos suelos, en los que persiste sin dificultad varios años, especialmente en los restos vegetales y en la fase acuosa. Se la encuentra también dentro de la filoflora del tomate. Polífaga, esta bacteria es susceptible de mantenerse en gran número de huéspedes cultivados o no, sobre todo dicotiledóneas herbáceas.

Las condiciones favorables para su desarrollo son esencialmente húmedas y cálidas. Los periodos nubosos y lluviosos aumentan los riesgos de proliferación de esta bacteria. Parece capaz de desarrollarse en temperaturas comprendidas entre 5 y 37°C, situándose su óptimo entre 25 y 30°C. En suelos secos, cuya humedad es inferior al 40%, el desarrollo de esta bacteria disminuye, y en ciertas condiciones desaparece.



**Figura 3.19.** *Pectobacterium carotovorum*. Fuente:  
<http://www.hortalizas.com/articulo/32128/3/5-enfermedades-poscosecha>.



## **CAPÍTULO 4**

# **LAS PODREDUMBRES GRISES DE LOS TOMATES**



## Capítulo 4. La podredumbre gris de tomate.

### 4.1. Descripción del hongo.

El género *Botrytis* comprende más de 20 especies (Beever y Weeds, 2004) y se ha clasificado dentro de la clase Deuteromicetes, tanto en las clasificaciones morfológicas clásicas como la recogida en la obra de Scagel *et al.* (1983), como en las más modernas como, por ejemplo, la de Hawksworth *et al.* (1995), que incluye esta última también aspectos taxonómicos relacionados con el genotipo (en esta última clasificación aparece como división Deuteromycota). Cuando este hongo se reproduce asexualmente en la naturaleza, lo hace produciendo unos típicos conidióforos que producen y portan los conidios o esporas de dispersión.

El taxón está descrito en la obra de Barnett y Hunter (1999) titulada “Illustrated Genera of Imperfect Fungi” que describe todos los géneros de hongos imperfectos clasificados como deuteromicetos. En este libro se describe este género *Botrytis* del siguiente modo:

*“Botrytis posee conidióforos largos, delgados, patentes, hialinos o pigmentados, ramificados irregularmente en la parte superior. Las células apicales de los conidióforos que producen los conidios (células conidiógenas) son alargadas o redondeadas y los conidios se disponen sobre éstas sobre apéndices muy cortos, pero no forman cadenas. Los conidios son hialinos y grisáceos en masa, unicelulares y ovalados con un extremo redondeado y el extremo opuesto algo puntiagudo, por donde se inserta a la célula conidiógena.”*

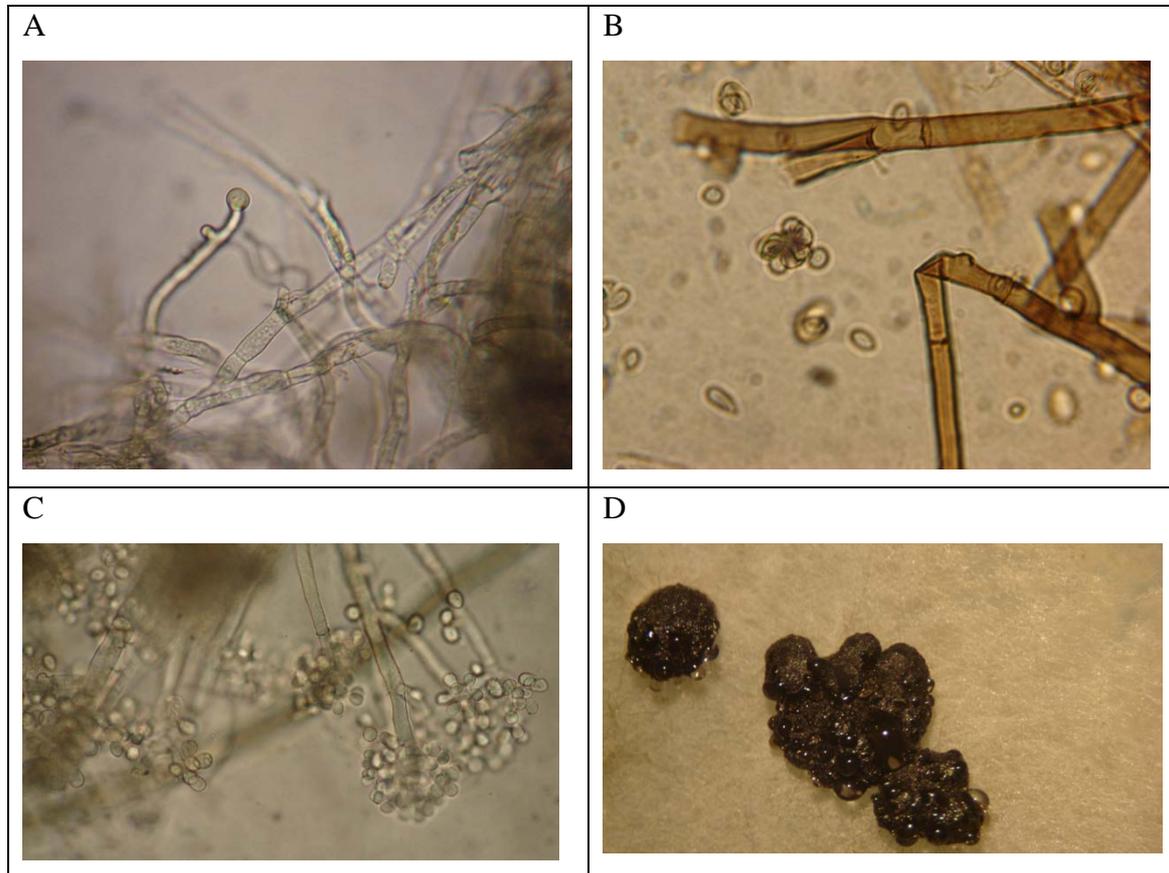
En el grupo de los hongos imperfectos o deuteromicetos se encuadran los hongos que no se reproducen de forma sexual o no se ha detectado este tipo de reproducción, siendo ésta de tipo asexual, generalmente por medio de la producción de conidios producidos por células conidiógenas situadas en hifas especiales denominadas conidióforos. Sin embargo, se ha detectado reproducción sexual en *Botrytis cinerea*, por lo que, tal y como ocurre en muchos hongos deuteromicetos, esta especie posee doble nombre: uno que hace referencia a la fase anamorfa, imperfecta o asexual denominada

*Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr. y otro a la fase teleomorfa, perfecta o sexual, llamada *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) Whetzel, sinónimo de *Sclerotinia fuckeliana* (De Bary) Fuckel (Tuset, 1987). La forma perfecta es raramente observada y forma apotecios sobre los esclerocios una vez han germinado (Daughtrey *et al.*, 2001). Estos apotecios tienen forma de disco cóncavo y son de color pardo-amarillento. Las ascas que se forman en ellos, contienen ocho ascosporas de elipsoidales a fusiformes y son uninucleadas. *Botryotinia* y *Sclerotinia* son géneros muy relacionados (Beever y Weeds, 2004) y concretamente hay una elevada similitud genotípica entre las especies *B. cinerea* y *S. sclerotiorum*, responsable este último de la podredumbre blanca (Amselem *et al.*, 2008). De hecho, algunas especies clasificadas dentro del género *Sclerotinia*, como es *S. veratri*, pueden ser especies de *Botryotinia*. Es de destacar en este punto, que no todas las especies de *Botrytis* tienen teleomorfos reconocidos (Beever y Weeds, 2004).

No obstante, cuando el hongo se describe a partir de su fase teleomorfa, se clasifica dentro de los ascomicetos, no en los deuteromicetos. Esta es la clasificación que se recoge en la descripción de los patógenos de plantas descritos en España (Melgarejo *et al.*, 2010). En el presente escrito nos vamos a referir siempre a este hongo en su fase anamorfa, es decir, como *Botrytis cinerea*, por lo que a este efecto, el hongo pertenece a los deuteromicetos. Ello es lógico puesto que es el estado en el que se encuentra en la mayoría de las plantas parasitadas.

La morfología que presenta la especie *Botrytis cinerea*, cuando crece como patógeno y en medio de cultivo sintético, se pone de manifiesto inicialmente por sus hifas hialinas tabicadas (Fig. 4.1. a). Posteriormente van apareciendo hifas largas, anchas muy poco ramificadas y septadas conocidas como hifas acintadas (Fig. 4.1. b), al mismo tiempo el micelio aéreo va cambiando de color blanco de las hifas hialinas en masa y algo pardusco, debido al color en masa de las hifas acintadas, al color grisáceo por la aparición de conidióforos o hifas reproductivas que portan las células conidiógenas o esporógenas portadoras de conidios hialinos y unicelulares de color gris en masa (Fig. 4.1. c). Cuando el micelio envejece las hifas se van agrupando para formar estructuras fúngicas compactas de color negro intenso denominadas esclerocios (Fig. 4.1. d) y que actúan como estructuras de resistencia. Los esclerocios son capaces

de sobrevivir varios meses en los suelos. Presentan una corteza pseudoparenquimatosa oscura de células casi isométricas, aproximadamente de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, que encierran una médula de hifas fuertemente tejidas, hialinas y de paredes gruesas. Cuando germinan producen micelio o dan lugar directamente a conidióforos con sus conidios, pero después de un apropiado preacodicionamiento y fertilización son capaces de producir unos basidiocarpos denominados apotecios que portan basidios. Sin embargo, *B. cinerea* es una especie que presenta una elevada variabilidad fenotípica, lo que se traduce en que diversos aislados de la misma especie pueden variar en sus características. La temperatura óptima de crecimiento es de 24 a 28°C, pero puede crecer entre los 0 y 35°C (Daughtrey *et al.*, 2001).



**Figura 4.1.** Aspecto microscópico de las estructuras somáticas (vegetativas) y reproductivas de *Botrytis cinerea*. a) hifas hialinas, b) hifas acintadas, c) conidióforos con conidios, d) esclerocios. Fotos: Juan Antonio Martínez López.

#### 4.2. Variabilidad fenotípica y genética de los diferentes aislados de *Botrytis cinerea*

*Botrytis* fue reconocido como género por Micheli en el año 1729. En estos primeros tiempos fue confundido con *Sclerotinia* spp., confusión que perduró hasta 1945. La conexión entre *Botrytis* y el teleomorfo *Botryotinia* fue establecida entre los años 1940 y 1950 (Groves y Loveland, 1953, citados por Elad *et al.*, 2004).

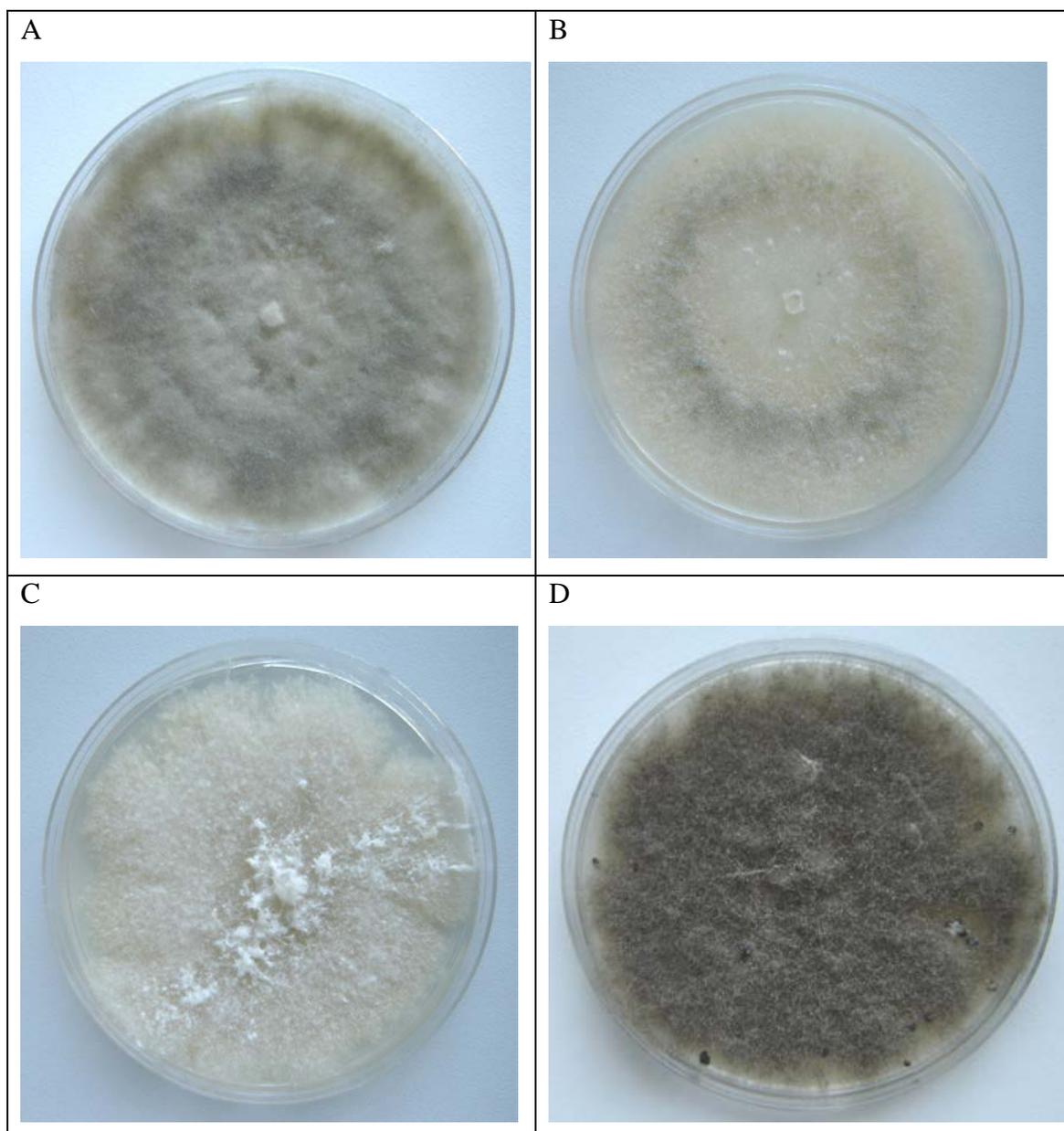
Los aislados de *Botrytis*, especialmente *B. cinerea*, tienen una inusual tendencia natural a cambiar constantemente durante generaciones sucesivas, tanto cuando crecen *in vitro*, sobre medio de cultivo sintético, como en la naturaleza, ya sea de forma libre o como patógenos sobre los hospederos. Por ello, la variación genotípica y fenotípica es muy común dentro de la especie. Sin embargo, los mecanismos envueltos en este proceso de variabilidad no son del todo conocidos (Beever y Weeds, 2004). Una de las razones de esta variabilidad y quizás la única que proporciona a esta especie su marcada reputación de especie variable, es la existencia de diferentes morfologías o aspecto del micelio. Generalmente hay dos morfologías básicas, la esporógena y la esclerótica, aunque se distinguen varios subtipos de ellas dos que han sido reportadas por Martínez *et al.* (2003). El uso de marcadores poblacionales de ADN y los estudios de compatibilidad vegetativa y sexual que se han desarrollado en los últimos años han revelado una clonación muy limitada en *B. cinerea* (Elad *et al.*, 2004). Los papeles que representan la reproducción sexual y de la heterocariosis en esta variabilidad está aún bajo estudio (por heterocariosis se entiende la fusión de hifas genéticamente distintas), pero, si bien la heterocariosis ha sido tradicionalmente considerada como un mecanismo de variabilidad, se ha demostrado que juega un papel de menor importancia en *B. cinerea* (Beever y Weeds, 2004). Los marcadores moleculares aplicados al estudio del hongo han demostrado unos niveles elevados de recombinación los cuales dan las limitaciones impuestas en heterocariosis por incompatibilidad vegetativa, probablemente como resultado de procesos sexuales más que parasexuales. Es probable que las mutaciones confieran una variación morfológica y una resistencia a los fungicidas (Beever y Weeds, 2004).

Se conoce que los diferentes morfotipos (diferentes aspectos de las colonias desarrolladas por el hongo) conocidos de *B. cinerea*, de los que se ha hablado en el

párrafo anterior, se mantienen tras sucesivas réplicas en medio sintético de cultivo cuando se utiliza una pequeña porción de micelio para realizar los subcultivos, pero cuando el subcultivo se realiza a partir de un cultivo monospórico del aislado (a partir de una única espora o conidio), las características de los aislados pueden variar tras sucesivas réplicas (Beever y Weeds, 2004). Por ello, es obvio que el micelio, los esclerocios y los conidios, presentan diferentes habilidades para sobrevivir y perpetuarse y que los papeles relativos de estas estructuras variarán enormemente dependiendo del ecosistema y de la estación del año.

*B. cinerea* se trata de la especie de hongo necrótrofo más estudiada en todo el mundo. Esto se debe a que causa grandes pérdidas económicas en las plantas cultivadas. El nivel de estudio es tal, que su genoma ha sido totalmente secuenciado hace no más de cuatro años y ahora hemos entrado en una nueva era en la investigación de este hongo, denominada era post-genómica. Adicionalmente, diversos investigadores han constatado la variabilidad fenotípica dentro de la misma especie, lo que quiere decir que diversos aislados de la misma especie pueden presentar distintos aspectos y otras características que varían entre ellos (Martínez *et al.*, 2003; Cotoras *et al.*, 2009). De esta manera, Martínez *et al.* (2008a) han constatado diferencias en distintos aislados de *B. cinerea* obtenidos de plantas ornamentales en relación al aspecto visual del micelio, tasa de crecimiento, tamaño de los conidios y producción de esclerocios cuando crecieron *in vitro* sobre medio sintético de cultivo (Fig. 4.2.). Estos aislados también mostraron diferencias en la respuesta a la aplicación de diversas sustancias reguladoras del crecimiento vegetal o con otros potenciales efectos sobre el crecimiento fúngico como son: paclobutrazol, un retardador del crecimiento vegetal con propiedades fungicidas, (Martínez *et al.*, 2010), ácido giberélico, una hormona vegetal presente en *B. cinerea* y otros hongos, (Martínez y Bañón, 2007; Martínez *et al.*, 2008b), ácido indol-3-acético, una potente auxina vegetal, (Martínez *et al.*, 2011a), cloruro cálcico (Martínez *et al.*, 2011b), y a la aplicación de la bacteria promotora del crecimiento vegetal denominada *Bacillus velezensis* (Martínez *et al.*, 2012). También se ha puesto de manifiesto una diferente respuesta de estos aislados a la temperatura de crecimiento (Martínez *et al.*, 2009a). Las diferentes respuestas de los aislados se manifestaron en la tasa de crecimiento del micelio, formación de conidios (conidiogénesis), formación de

esclerocios y tamaño de estos, masa de micelio aéreo y sumergido, tamaño de los conidios.



**Figura 4.2.** Aspecto morfológico de distintos aislados de *Botrytis cinerea* obtenidos de plantas ornamentales afectadas de “Botrytis blight”, creciendo en medio sintético de agar de patata y dextrosa (PDA) a 26°C. a) *Lantana camara*, b) *Lonicera japonica*, c) *Hydrangea macrophylla*, d) *Cyclamen persicum*. Fuente: Martínez *et al.* (2008a).

Se han realizado estudios de diversidad genética de diferentes poblaciones de *B. cinerea* parasitando diferentes cultivos en los invernaderos del sureste de España, concretamente en Almería. La colección de aislados se hizo en dos etapas. En la

primera de ellas, se muestreó en 23 invernaderos con típicos cultivos de invierno de la zona, tanto de levante como de poniente. En la segunda etapa, que se realizó tres meses después, se recolectaron 75 aislados obtenidos de 16 invernaderos de poniente. El análisis de la estructura de la población reveló que la diversidad genética dentro de las subpoblaciones de las dos etapas ascendió al 98% del total de la diversidad observada, mientras que la diversidad genética entre subpoblaciones representó sólo el 2% de la diversidad. Este resultado nos da una idea de que la diversidad es proporcional al distinto grado de aislamiento y convivencia entre los aislados del patógeno; es decir, las poblaciones que conviven en el espacio y en el tiempo son genéticamente más homogéneas (Alfonso *et al.*, 2000).

También se ha encontrado variabilidad en relación al desarrollo de resistencias a diversos fungicidas, de tal manera que hoy por hoy la especie *B. cinerea* puede tolerar los fungicidas a base de bencenos clorados (grupo fungicida general de los bencenos sustituidos). Además han surgido aislados resistentes a los benzimidazoles cuando empezaron a aplicarse masivamente (Bollen y Scholten, 1971; citados por Elad *et al.*, 2004). También se ha constatado resistencias a las dicarboximidias (Katan, 1982) Una década después se identificó la base molecular de estas mutaciones que dan lugar a las resistencias (Yarden y Katan, 1993). En la actualidad, la proliferación de aislados resistentes a los fungicidas de síntesis por parte de *B. cinerea* constituye un serio problema. Sin embargo, la prevención es la base de todo mecanismo de control y más o menos, se tienen claras las condiciones de los cultivos que permiten minimizar el desarrollo de la enfermedad. Está claro que para prevenir las enfermedades ocasionadas por *Botrytis*, se recomienda el desarrollo de prácticas culturales que permitan la suficiente ventilación y el secado rápido de las plantas después de una lluvia y un aporte suficiente de agua de riego (Elad y Shtienberg, 1995).

### 4.3. Importancia comercial de la podredumbre

#### 4.3.1. Incidencia e importancia de podredumbre gris en los cultivos.

Como se ha comentado con anterioridad, *B. cinerea* es un patógeno polífago, que ataca a la mayoría de las plantas cultivadas. Sin embargo, su débil actividad

patógena hace que las condiciones ambientales como la temperatura, humedad relativa, presencia de agua libre sobre los tejidos de las plantas, etc. sean especialmente importantes para que se desencadene la infección y colonización de los tejidos. El estado sanitario de las plantas, el efecto de algún estrés y el estado senescente de las plantas o de algún determinado órgano, juega, del mismo modo, un papel esencial en el establecimiento de la enfermedad, ya que las hace especialmente vulnerables a los ataques por este hongo.

*B. cinerea*, y otras especies del mismo género, son importantes patógenos de plantas de vivero, hortalizas, ornamentales, de cultivos y de los productos frescos almacenados, por tanto se están realizando numerosos esfuerzos desde hace bastantes años para intentar controlar a estos patógenos tanto económicos como a través de la investigación con el fin de entender los procesos patogénicos de este hongo y las interacción con múltiples factores biológicos y ambientales. En este momento, es uno de los problemas más graves de los cultivos protegidos y al aire libre del litoral mediterráneo. Sin duda, el mayor conocimiento sobre las especies *Botrytis* que ha tenido lugar y sigue teniendo lugar durante los últimos 25 años, tanto de su ciclo de vida, patogenicidad y epidemiología ha contribuido en una mayor comprensión a la hora de controlar las enfermedades de estos hongos (Elad *et al.*, 2004).

Entre los cultivos del sureste de España que son muy vulnerables a la podredumbre gris, cabe destacar la uva de mesa, el fresón, el tomate, la berenjena y el pimiento. Este hongo, en general, provoca importantes pérdidas en los cultivos de invierno de tomate, berenjena, pepino, calabacín, judía, pimiento, etc. debido a que en el interior de los invernaderos se dan las condiciones idóneas para el desarrollo de la enfermedad y en estas condiciones es muy difícil su control. Otra de las razones de las dificultades que presenta su control viene determinada por la presencia de resistencias a distintos grupos de fungicidas que se utilizan comúnmente.

*Botrytis* spp. causa enfermedades en plantas distribuidas en las zonas templadas del planeta. Sin embargo, las especies del género *Botrytis* crecen como patógenas en todos sus huéspedes independientemente de las zonas donde crezcan; de este modo, se han encontrado plantas afectadas desde zonas tropicales y subtropicales hasta áreas

frías, desde áreas húmedas a secas. Esto es debido a que los procesos de germinación de conidios, infección, crecimiento del micelio y conidiogénesis pueden ocurrir bajo un amplio rango de condiciones microclimáticas e incluso, en algunos casos no es necesaria una pequeña capa de agua sobre la superficie vegetal para que se produzca la germinación de los conidios, de ahí su importancia también en climas secos. Este es otro factor por el que este hongo puede causar enfermedades severas en las plantas distribuidas alrededor del mundo (Elad *et al.* 2004).

#### 4.3.2.- Interpretación del poder patógeno en la gravedad de las pérdidas ocasionadas por *Botrytis* spp.

Las enfermedades de las plantas son importantes para el ser humano debido a que perjudican a las plantas y sus productos. Para los millones de personas que habitan en las regiones más pobres del planeta y cuya existencia depende de los productos vegetales, las enfermedades de las plantas pueden marcar la diferencia entre una vida normal y una acosada por el hambre (Agrios, 2010).

El tipo y cantidad de las pérdidas ocasionadas por las enfermedades de las plantas varía de acuerdo a la especie de planta o de los productos que se obtienen de ellas, así como el agente patógeno, la localidad, el medio ambiente, las medidas de control practicadas, etc., o con base en la combinación de todos estos factores. La suma de pérdidas varía entre el 0% y el 100%, siendo la media a nivel mundial del 30%. Sin embargo, rara vez se obtiene el 0% y el 100% sólo puede ser alcanzado cuando se establece alguna epifitía en el cultivo. Se pueden alcanzar pérdidas normales del 25% en el cultivo de cereales y durante el almacenamiento frigorífico de los productos cosechados es habitual sobrepasar el 10% de pérdidas por deshidratación, alteraciones fisiológicas y podredumbres.

El carácter polífago y elevado poder patógeno, entendido éste como la suma de dos componentes: virulencia y agresividad, hace que *B. cinerea* puede desencadenar procesos de gravedad de la enfermedad que desembocan en unas consecuencias económicas importantes. La gravedad de la enfermedad se debe a la suma de dos factores regulados por el ambiente:

1. Los factores inherentes al patógeno.
2. Los factores inherentes al hospedador.

Dentro del apartado 1 se encuentran:

#### 1.1. Densidad del inóculo.

Dado que *B. cinerea* se disemina por el aire, la cantidad de conidios u otros propágulos infectivos que pueden alcanzar las plantas suelen ser muy elevados en número (masa conidial); especialmente porque las plantas afectadas pueden formar miles de estos conidios que en masa dota al micelio de color grisáceo.

#### 1.2. Capacidad infecciosa del inóculo.

Esta capacidad no es muy elevada, ya que la categoría patógena de *Botrytis* spp. es baja (ver apartados anteriores).

#### 1.3. Efectos del ambiente.

Las temperaturas moderadas y la alta humedad relativa favorecen las infecciones.

Entre los factores inherentes al hospedero, se distingue:

#### 2.1. Susceptibilidad propia del hospedante.

Esta susceptibilidad está ligada generalmente a la presencia de heridas y microheridas, plantas estresadas o senescentes.

#### 2.2. Predisposición del hospedante ligada al ambiente.

En el caso de *Botrytis* spp. está clara la influencia del ambiente para que se produzca la enfermedad.

Como consecuencia de los comentarios anteriores, se puede deducir que las enfermedades producidas por *Botrytis* spp. pueden tener una consecuencia grave, especialmente en plantas o tejidos estresados, senescentes y debilitados y si, al mismo tiempo, se dan condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad.

#### 4.3.3.- Algunos datos sobre las pérdidas causadas por *Botrytis* spp.

Es un hecho irrefutable que la podredumbre gris es la mayor causa de pérdidas en los viñedos de todo el mundo y es un problema tanto para los viticultores como para productores de vino, debido a que es muy rápida y resistente a los fungicidas. El daño causado por la podredumbre gris, tiene un impacto económico desastroso en numerosos cultivos, en los viñedos en particular, pero también produce cuantiosas pérdidas en el cultivo del fresón y de bulbos. Adicionalmente, se producen pérdidas muy elevadas en cultivos de tomate bajo malla cuando se producen períodos frecuentes de lluvias que provocan una elevada humedad relativa en el ambiente y, lo que es peor, un período continuado donde las plantas permanecen mojadas. Estas situaciones han provocado pérdidas de cosechas de tomate en la zona de Águilas, en Murcia, y en Andalucía. Para minimizar estas pérdidas un equipo investigador israelí ha desarrollado un modelo epidemiológico, denominado BOTMAN (BOTrytis MANAger), para predecir el riesgo desarrollo de la podredumbre gris en cultivos de invernadero y se basa en las siguientes variables que están íntimamente relacionadas con el momento de la infección del hongo: lluvias (cantidad y frecuencia), temperatura máxima y mínima, número de días con cielo cubierto y tiempo seco y caliente. Una vez que los valores de estas variables se introducen en el ordenador, el modelo evalúa el riesgo de infección y, por tanto, permite actuar con tratamientos preventivos sólo cuando estos sean necesarios.

Las pérdidas por la infección de la podredumbre gris representan el 20% de las cosechas de los cultivos afectados en el mundo, y su coste se estima en 10- 100 millones de euros al año. En el sector del vino causa pérdidas en los viñedos, equivalentes a un 15-40% de las cosechas en función de las condiciones climáticas.

Estas pérdidas superan los 15 mil millones de euros al año, es decir, se pierde el 25% de la facturación potencial debido a este problema. En los países tropicales, se pierde cerca del 25% de los productos hortofrutícolas entre la cosecha y consumo (Narayanasamy, 2006).

Otras pérdidas constatadas se estiman en el 20-25% de los cultivos de fresa en España, y el 20% de las flores cortadas en Holanda.

En postcosecha, las pérdidas son muy elevadas incluso en los países desarrollados y en buena parte están ligadas a los daños mecánicos que se producen durante el cultivo, cosecha, manipulación y transporte (Narayanasamy, 2006).

Las podredumbres por *Botrytis cinerea* son habituales en el almacenamiento de frutas como los cítricos (especialmente limones y mandarinas), manzanas, peras y fruta de pepita en general, uva, melocotones y fruta de hueso en general, fresas, etc. (Snowdon, 1990).

En los cítricos españoles, la podredumbre gris ocasiona pérdidas de entre el 8 y 25% total durante un almacenamiento refrigerado, ocupando la cuarta posición de incidencia en este tipo de frutos por debajo de *Penicillium digitatum*, *P. italicum* y *Alternaria citri* (Tuset, 1987).

Otros datos de pérdidas por podredumbre gris en postcosecha son los siguientes reportados por autores citados en la obra de Narayanasamy (2006) titulada "Postharvest Pathogens and Disease Management":

- 8 al 23% de manzanas en Francia (Narayanasamy, 2006).
- 10 al 15% de fresas en EE.UU. (Narayanasamy, 2006).
- 20 al 30% de kiwis en EE.UU. y Nueva Zelanda (Narayanasamy, 2006).

Contra todo este panorama es de destacar que los tratamientos fungicidas contra *B. cinerea* se ha cifrado en unos 540 millones de euros el año, lo que representa el 10% del mercado de fungicidas de todo mundo. A esto hay que sumar el grave problema de la aparición de aislados resistentes a los fungicidas más comunes. Esto hace que no todos los aislados de *B. cinerea* se vean afectados por los fungicidas utilizados tradicionalmente.

#### 4.4. Control de la podredumbre.

##### 4.4.1. Control químico.

La investigación sobre sustancias químicas de síntesis ha tenido como consecuencia el control de gran parte de las enfermedades postcosecha. Estas sustancias se denominadas fungicidas y bactericidas (letales para hongos y bacterias, respectivamente) o, también, fungistáticos y bacteristático (sustancias que inhiben el desarrollo fúngico y bacteriano, respectivamente). El producto químico actúa entrando en contacto con el patógeno; la concentración mínima efectiva depende de los patógenos y de otros factores muy numerosos. Los tratamientos químicos se pueden aplicar de acuerdo con diversas estrategias como son: a) aplicación antes de la cosecha para prevenir la infección en el campo; b) Uso de técnicas sanitarias para reducir el nivel de inóculo infectivo en el medio ambiente donde las frutas o vegetales están almacenadas; c) La aplicación de estas sustancias en postcosecha con el fin de prevenir la infección a través de heridas y para erradicar o atenuar las infecciones establecidas y para reducir el desarrollo y difusión durante el almacenamiento. Con el fin de elegir la estrategia adecuada para el control del deterioro, tenemos que entender el modo de infección del patógeno, el momento de la infección y los factores ambientales que pueden afectar el desarrollo de la enfermedad (Barkai-Golan, 2001).

Hay 370 sustancias catalogadas por la FDA (Food and Drug Administration, EE.UU.) como sustancias seguras para los alimentos (GRAS – “Generally Recognized as Safe”) (<http://www.fda.gov>). Estas sustancias se caracterizan por presentar una nula o escasa toxicidad (en dosis elevadas), por lo que están admitidas como aditivos alimentarios. De acuerdo con esta catalogación, el aceite esencial de clavo forma parte

de este tipo de compuestos. La FDA admite tres presentaciones distintas de los extractos de clavo como sustancias GRAS. Estos son: aceite de tallo, hoja y brotes. Se ha demostrado su seguridad en alimentos porque el aceite esencial de clavo contiene fundamentalmente eugenol que, administrado por vía oral, se absorbe y se excreta fácilmente sin acumulación (<http://www.fda.gov>).

El clavo es una especia proveniente de las plantas del género *Syzygium* spp. Ésta ha sido usada desde tiempos antiguos en la medicina tradicional, teniendo usos de expectorante, estimulante, analgésico, antiflatulento, etc. y en la odontología como antiséptico, por lo cual es común encontrarlo en gomas y en cremas dentales para el tratamiento y prevención de la caries (Chaieb *et al.*, 2007).

El aceite esencial proveniente del clavo está constituido por 36 componentes (Chaieb, *et al.*, 2007) y con altas concentraciones de: eugenol, - caryophyleno, - humuleno, epóxido de humuleno, etil hexanoato, 2-heptanona, humuleno, calacoreno y calameneno.

El eugenol pertenece al grupo de los fenilpropanos que son sustancias ampliamente distribuidas entre los vegetales y se caracterizan por un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos y derivados biosintéticamente del ácido shikímico 2-metoxi-4-(2-peopenil) fenol, los compuestos con estructura fenólica demostraron tener una actividad antimicrobiana superior debido a su carácter hidrofóbico. Estudios dan importancia al grupo hidroxilo y su localización en la estructura fenólica para obtener una mayor capacidad antimicrobiana.

Se teoriza sobre la posible interacción del grupo hidroxilo con proteínas inhibiendo su acción, concentraciones subletales de eugenol inhibieron la producción de las amilasas y proteasas de *B. cereus*. El deterioro de la pared celular y el alto grado de la lisis celular también se comprobó en otras investigaciones (Burt, 2004).

Algunos estudios han comprobado la eficacia del aceite esencial del clavo como antimicrobiano pero todavía no se conoce muy bien su forma de acción, pero se sabe que el componente responsable de esta actividad antimicrobiana es el eugenol. Kamel *et*

al. (2007), determinaron la acción antibacteriana del eugenol extraído del clavo sobre *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. fecalis*, *P. aureginosa*, *S. typhimurium* y *M. luteus*, y determinaron que el menor diámetro de inhibición fue de 8 mm. Para *L. monocytogenes* el halo de inhibición por parte del A.E. (aceite esencial) fue de 15 mm. con una DS (desviación estándar) de 0, dando un resultado muy bueno al compararlo con la gentamicina que dio como resultado un halo de 38 mm. sobre este mismo microorganismo.

En otro estudio, realizaron un estudio de la actividad antimicrobiana del clavo sobre *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aureginosa*, *B. subtilis* y *P. vulgaris* encontraron que a menor halo de inhibición fue de 9 mm. para *P. aureginosa* y el mayor fue de 18,2 mm para *P. vulgaris* lo cual fueron resultados óptimos teniendo como control la estreptomicina.

Entre los compuestos químicos de síntesis, existen varios fungicidas que actualmente están autorizados para el control de la podredumbre gris. Estos son los siguientes (<http://www.magrama.gob.es>):

- FENHEXAMIDA también se usa mezclado con TEBUCONAZOL. Se utiliza también para el control de *Monilia* y *Esclerotinia*.
- CLORTALONIL. También está autorizados su uso para combatir estas enfermedades: *Monilia*, *Helminthosporium*, *Septoria*, *Alternaria*, antracnosis, mildiu y chancro.
- CAPTAN. También está autorizado su uso para combatir estas plagas: roya, *Stemphylium*, *Fusarium*, *Phialophora*, *Rhizoctonia*, *Monilia*, *Alternaria*, antracnosis, mildiu y chancro.
- TIRAM. También está autorizado su uso para combatir estas plagas: *Monilia*, chancro, antracnosis, moteado y hongos del suelo.

- TEBUCONAZOL también se usa mezclado con FENHEXAMIDA. Se utiliza también para el control de: cladosporiosis, *Sclerotinia*, roya, *Helminthosporium*, *Piricularia*, oídio, *Septoria*, *Stemphylium* y repilo.
- IPRODIONA. También está autorizado su uso para combatir estas plagas: *Monilia*, antracnosis, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia* y *Mycogone*.
- MEPANIPIRIM.
- FOLPET también se usa mezclado con IMAZALIL o con CIMOXANILO o con SULFATO CUPROCALCICO y OXICLORURO DE COBRE o con METALAXIL y OXICLORURO DE COBRE. Se utiliza también para el control de: *Alternaria*, *Penicillium* y *Gloeosporium*.
- METIL TIOFANATO también se usa mezclado con MANCOZEB. Se utiliza también para el control de: roya, *Fusarium*, *Septoria*, cladosporiosis, *Monilia*, oídio, antracnosis, cribado, moteado y rabia.
- CIPRODINIL también se usa mezclado con FLUDIOXONIL. Se utiliza también para el control de: *Aspergillus*, *Monilia* y moteado.
- IMAZALIL también se usa mezclado con PIRIMETANIL o con FOLPET.
- DIETOFENCARB
- PIRIMETANIL también se usa mezclado con IMAZALIL.
- BOSCALIDA también se usa mezclado con PIRACLOSTROBIN. Se utiliza también para el control de: *Sclerotinia* y oídio.

- BACILLUS SUBTILIS. También está autorizado su uso para combatir estas plagas: *Sclerotinia*, *Monilia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, fuego bacteriano y moteado.
- AZOXISTROBIN. También está autorizados su uso para combatir estas plagas: oídio, *Mildiu*, *Didymella*, *Sclerotinia*, *Alternaria*, roya, *Helminthosporium*, *Septoria*, *Cercospora*, *Pycularia*, *Rincosporium*, *Mycosphaerella*, *Stemphylium*, antracnosis y oídio.
- PROCLORAZ.

#### 4.4.2. Métodos físicos.

Cada vez hay más conciencia pública sobre los inconvenientes potencialmente perjudiciales para los consumidores de los muchos tratamientos químicos aplicados a los productos hortícolas frescos para controlar sus pudriciones. Este hecho, junto con la posible consecuencia de que un número de productos químicos puede ser retirado de su uso, ha reavivado y el aumentado el interés en los tratamientos físicos que podrían servir como alternativas a los fungicidas. Almacenamiento en frío, calefacción, radiaciones ionizantes, luz ultravioleta y atmósferas controladas o modificadas son medios físicos para mantener la resistencia del huésped (Barkai-Golan, 2001).

Otros tratamientos físicos que se han integrado con éxito a nivel experimental con la aplicación de distintos antagonistas para el control de podredumbres son: la inmersión en agua caliente, el HWB y el recubrimiento individual de los frutos ya sea posterior a la aplicación del agente de biocontrol o siendo utilizado como elemento portador del mismo.

#### 4.4.3. Control biológico.

En un sentido estricto, el término control biológico de enfermedades vegetales se restringe a la utilización controlada de microorganismos que antagonizan con los

microorganismos patógenos. No se incluye, por tanto, el uso de sustancias naturales derivadas de plantas o animales ni la obtención de cultivares del huésped resistentes a las enfermedades.

Puede definirse como la manipulación directa o indirecta por parte del hombre de los agentes vivos (antagonistas) que de forma natural presentan capacidad de control de los agentes patógenos. La relación biológica entre los antagonistas y los patógenos suele ser bastante específica. Puesto que se trata de una interacción entre organismos vivos, este tipo de control presenta una serie de ventajas importante respecto a los sistemas físicos y químicos.

Básicamente, los factores que determinan las posibilidades de utilización de un antagonista contra patógenos de postcosecha son su supervivencia y su efectividad en condiciones ambientales y de frigoconservación. También es muy importante su capacidad de colonizar las heridas de la piel, que son los puntos de inicio de las infecciones. Además el hecho de que la fruta tratada se almacene en condiciones controladas de temperatura y humedad facilita la utilización de agentes de biocontrol, pues éstos no se encuentran sometidos a variaciones ambientales (Palou, 2007).

Con frecuencia se proponen métodos de control biológico como alternativa a los insecticidas sintéticos, para así reducir su impacto en el medio agrícola. En este contexto, se confía en los enemigos naturales de las plagas para limitar el daño ocasionado a los cultivos. Sin embargo, no debe olvidarse que los organismos viven en un contexto multitrófico, basado en interacciones quimiobiológicas, y han evolucionado en ese trasfondo. Por lo tanto, dicha medida, aunque deseable, conlleva complejidades y quizá sorpresas.

Los progresos alcanzados en el conocimiento de las respuestas inducidas en las plantas y su regulación, junto con la revolución en genómica y proteómica, prometen replantear la investigación en este campo para encaminarla hacia la explotación predecible de los mecanismos de resistencia endógena. Para comprender las interacciones planta-microorganismo-insecto en la naturaleza y en los ecosistemas agrícolas, se requiere mayor información sobre la fisiología y la genómica de los

insectos y sobre su genética poblacional. Una información que revestirá particular interés para reducir la velocidad a la cual los insectos herbívoros adquieren tolerancia natural a las plantas transgénicas.

El etileno y los ácidos salicílico y jasmónico no activan los sistemas de defensa de la planta en forma independiente a través de cascadas lineales, sino a través de complejas redes metabólicas y genéticas que determinan respuestas específicas. El conocimiento de estas interacciones puede aplicarse en el futuro a un diseño racional de plantas transgénicas con resistencia a las enfermedades y a los insectos (Vivanco, 2005).

#### **4.4.4. Aumento de la resistencia natural del hospedero.**

##### **4.4.4.1. Introducción.**

En los apartados anteriores se han descrito las diversas estrategias que presentan las plantas para contrarrestar el ataque de los organismos patógenos, con especial mención a la resistencia ofrecida contra *Botrytis* spp. Estas estrategias se están estudiando con el fin de utilizarlas a nivel comercial e intentar, de este modo, reducir el impacto ocasionado por el hongo en los cultivos por las cuantiosas pérdidas económicas que produce. En algunos casos ya se están utilizando, en otros están aún bajo estudio. No obstante, la aplicación comercial de muchos métodos de mejora de la resistencia está aún bajo estudios de mercado, porque en algunos casos pueden que no sean viables. De cualquier modo, los sistemas de agricultura integrada, agricultura ecológica, las buenas prácticas agrícolas no son más que la respuesta a la consecuencia que está teniendo el uso de las técnicas tradicionales utilizadas en los cultivos, especialmente, la utilización masiva de plaguicidas de síntesis que generan residuos intolerables con la consecuencia desastrosa que tienen contra el medio ambiente y la salud en general. En este ámbito, la utilización de sistemas que refuercen las defensas de las plantas contra los estreses bióticos y abióticos, no sólo es un tema de investigación muy interesante, sino que es lo que está demandando la sociedad.

Hay ya algunas vías de actuación para aumentar la resistencia a *Botrytis* spp. con el fin de reducir las pérdidas ocasionadas por este hongo polífago en los cultivos y en postcosecha. En el presente apartado se pretende describir someramente los distintos procedimientos que han mostrado su utilidad para aumentar la resistencia de las plantas y de sus órganos al ataque de este hongo. Estos procesos de aumento de resistencia se han probado a nivel experimental, interpretado con fundamento científico y en algunos casos son aplicados a nivel comercial.

#### **4.4.4.2. Retraso de la senescencia de las plantas y sus órganos. Manipulación de la biosíntesis de etileno.**

##### **4.4.4.2.1.- Retraso del deterioro de las membranas celulares.**

*B. cinerea* es un patógeno oportunista dotado de una fácil capacidad para invadir plantas y tejidos debilitados, dañados o senescentes. La resistencia a la podredumbre gris declina con la edad de la planta o la maduración de sus frutos y flores. La senescencia es un fenómeno fisiológico que se compone de envejecimiento, abscisión y muerte de la planta (si no es perenne) o de un órgano vegetal. Consiste en una cascada de procesos biológicos que están programados. La senescencia es el mecanismo por el cual el vegetal u órgano vegetal muere al cumplir ya su función (dispersión de semillas). El envejecimiento es el deterioro funcional que precede a la muerte y en los vegetales puede ser de dos tipos:

- Envejecimiento celular, cronológico o “aging”:
- Envejecimiento genético, programado o senescencia.

El envejecimiento celular es la acumulación de errores en la maquinaria celular producida por reacciones químicas inevitables o perjudiciales o por agentes físicos agresivos. Su velocidad depende de la bondad de los mecanismos reparadores.

El envejecimiento genético es la etapa normal de la ontogenia de la planta entera u órgano. Le afecta factores ambientales en su velocidad, como por ejemplo, las plantas

anuales, bianuales y estepicursoras, los frutos y cualquier órgano vegetal cuando se separa de la planta

En este ciclo biológico (crecimiento, maduración y senescencia), conforme se desarrolla el fruto disminuye su resistencia a los patógenos

Durante la senescencia se producen cambios en las membranas celulares. Las especies activas de oxígeno (AOS) son sintetizadas cuando las membranas se deterioran por senescencia, algún daño o estrés en general, incluido la infección provocada por *B. cinerea*. Las AOS y los radicales libres son sintetizados tanto por el patógeno como por el huésped. En algunos sistemas hospedero-patógeno, estos compuestos sirven para iniciar la cascada de reacciones que se producen para aumentar la resistencia de las plantas (Chen *et al.*, 1993, Hoffman y Heale, 1989, citados por Elad y Evensen, 1995). Cuando los mecanismos de defensa inducidos no están presentes, las AOS a menudo ayudan al desarrollo del patógeno reaccionando con los componentes celulares por medio de una serie de reacciones que generan radicales libres. Estos radicales inducen la peroxidación de los lípidos, la principal causa del deterioro de la membrana plasmática durante el “aging”. En cultivos *in vitro*, se ha comprobado que la habilidad que presenta *B. cinerea* para producir peróxido de hidrógeno está correlacionada con la capacidad de infectar hojas e plantas susceptibles. Esto se ha comprobado en órganos de plantas viejas, dañadas o senescentes (Droillard *et al.*, 1987, Mayak *et al.*, 1983, citados por Elad y Evensen, 1995). Los radicales libres generados durante este proceso pueden dañar las membranas y aumentar la susceptibilidad de la planta al patógeno. Los cambios producidos en el protoplasma celular al dañarse las membranas pueden contribuir a la hidrólisis de las paredes celulares y, por tanto, a la penetración de las toxinas del hongo provocando una rápida muerte celular. Por tanto, el deterioro de la membrana da lugar a compuestos tales como el peróxido de hidrógeno y compuestos producidos por la peroxidación de los lípidos que incrementan la susceptibilidad del hospedero al patógeno.

De todo lo anterior, se desprende que la utilización de secuestradores de radicales libres puede reducir la incidencia de podredumbre gris en varias plantas y órganos de ellas y los antioxidantes revierten el proceso de la podredumbre gris debido

a los efectos promotores del peróxido de hidrógeno (Elad y Evensen, 1995). Por ello, podría ser posible que todas las medidas encaminadas a fortalecer el sistema antioxidante en la plantas podría mejorar la resistencia a *B. cinerea*. De ahí la importancia de estudiar los sistemas de enzimas antioxidantes para ser utilizados con este fin.

#### 4.4.4.2.2.- Efecto del etileno en la interacción hospedero-patógeno.

El etileno es frecuentemente producido por los tejidos de las plantas en respuesta al ataque de patógenos y en general ante cualquier estrés biótico o abiótico. Se ha demostrado que muchos hongos fitopatógenos pueden producir etileno, entre ellos está *B. cinerea* (Sharon *et al.*, 2004); sin embargo, la producción de etileno durante la infección por este hongo es generalmente atribuida al hospedero (Imaseki *et al.*, 1968, Barkai-Golan *et al.*, 1989, citados por Elad y Evensen, 1995). El ácido aminoxiacético, es un inhibidor de la síntesis de etileno de las plantas, pero no en los hongos (Abeles *et al.*, 1992, citados por Elad y Evensen, 1995) y se ha comprobado que inhibe la síntesis de esta hormona durante la infección de *B. cinerea* a frutos de tomate y en pétalos de rosa (Elad y Evensen. 1995). La cantidad de etileno que se sintetiza en el proceso de una enfermedad depende de lo avanzado que esté la enfermedad que se manifiesta por su sintomatología. El tratamiento con etileno aumenta la susceptibilidad de una gran cantidad de frutas, hortalizas y flores al ataque de *B. cinerea*. En este punto nos podemos preguntar la dosis de etileno necesaria para promover el desarrollo de la podredumbre gris, pero es posible que el hongo induzca la producción de etileno que acelera la senescencia y por tanto favorezca el desarrollo de la enfermedad.

El tratamiento con antioxidantes reduce la síntesis de etileno y revierte el estímulo de promoción de la podredumbre gris debido al tratamiento con etefón (compuesto que desprende etileno que se utiliza en procesos de desverdización y maduración acelerada), por ello, se supone que el etileno promueve las reacciones oxidativas en las membranas y que la oxidación de ésta acelera la síntesis y acción del etileno. El etileno también regula la acción directa del patógeno. Se ha comprobado que la síntesis de etileno asociada al proceso de maduración de los frutos sirve de estímulo para la germinación de los conidios y la formación de los apresorios de *Colletotrichum*

spp. capaces de parasitar a los frutos climatéricos (Fraishman y Kolattukudy, 1994, citados por Elad y Evensen, 1995). El etileno también estimula la germinación de los conidios y el crecimiento de las hifas de *B. cinerea*, junto con la interacción de otros compuestos volátiles no hormonales.

Todo lo anterior sugiere que una estrategia para reforzar la resistencia del hospedero sería reducir la respuesta del etileno. Por ello, la utilización de absorbedores de etileno o inhibidores de su síntesis, que están en el mercado, inhiben el desarrollo de la podredumbre gris. Las especies y las variedades varían sensiblemente en cuanto a la tasa de producción de etileno y la susceptibilidad de la respuesta a esta hormona gaseosa. Se ha identificado variedades de clavel con una débil producción de etileno (Woltering *et al.*, 1993, citados por Elad y Evensen, 1995), lo que indica que la variabilidad genética que presenta los caracteres de la respuesta es disponible. Sin embargo, estas plantas no han sido estudiadas para probar su resistencia a *B. cinerea*. La inhibición de la biosíntesis de etileno en plantas de tomate por medio de la tecnología antisentido (“antisense technology”) o, tecnología de genética molecular en la que pequeños segmentos de ADN unicatenario llamados oligodeoxinucleótidos – ODNs son introducidos en un genoma de otra especie que finalmente se traduce en la síntesis de nuevas proteínas específicas en el organismo receptor), atrasa la senescencia de sus frutos por el retardo de su maduración. Esta técnica mantiene la resistencia de los frutos de tomate contra la podredumbre gris, por lo que es otra tecnología a tener en cuenta (Oeller *et al.*, 1991, citados por Elad y Evensen, 1995).

El etileno es una PGS o “Plant Growth Substance”, consecuentemente existen múltiples interacciones con otras PGSs de las plantas. Esto significa que hay otras hormonas que interfieren en la síntesis y acción del etileno, teniendo efectos indirectos sobre el desarrollo de la podredumbre gris. El ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), inhibe el desarrollo de la podredumbre gris en flores de rosa (Shaul *et al.* 1992, citados por Elad y Evensen, 1995). Esta giberelina retrasa la senescencia incrementando la permeabilidad de las membranas celulares de los pétalos de la rosa cuando se aplica como tratamiento postcosecha, por lo que tiene efectos favorables en el mantenimiento de la resistencia contra *Botrytis* spp. Martínez y Bañón (2007), pusieron de manifiesto

que el GA<sub>3</sub> afectó a la tasa de crecimiento del micelio y a la formación de esclerocios dependiendo del aislado obtenido de plantas ornamentales.

Las auxinas y las citoquininas vegetales también incrementan la resistencia a la podredumbre gris en rosas a dosis que no interfieren con la síntesis de etileno. Martínez *et al.* (2011a), demostraron que el AIA redujo ligeramente la tasa de crecimiento de *Botrytis cinerea in vitro*, pero la respuesta dependió del aislado. El ácido abscísico (ABA) acelera la senescencia e incrementa la sensibilidad al etileno. Los niveles de ABA suelen aumentar durante la senescencia y esta hormona es producida por *B. cinerea* cuando crece *in vitro* y también la producen los patógenos durante el proceso de infección. Esta hormona acelera la senescencia, pero tiene efectos reversibles con la aplicación de GA<sub>3</sub>.

El papel del ABA en la interacción hospedero-patógeno ha sido puesto de manifiesto en mutantes del tomate cv. Moneymaker, que reduce los niveles de ABA al mínimo y son mucho más resistentes a la podredumbre gris que el parental. La aplicación exógena de ABA restablece la susceptibilidad a *B. cinerea* en estos mutantes, mientras que por lo general esta susceptibilidad aumenta en plantas no mutantes de tomate.

La utilización de PGSs o PGRs (“Plant Growth Regulator”) en el aumento de la resistencia contra *B. cinerea* debe llevarse con sumo cuidado, puesto que las hormonas interfieren entre ellas y la dosis aplicada juega un papel fundamental en todo el proceso de interacción con otras hormonas, con el patógeno y con el huésped. La aplicación de secuestradores o absorbedores de etileno parece ser la aplicación más segura para mantener la resistencia del hospedero y para ralentizar su senescencia.

#### 4.4.4.3.- Activación de los mecanismos naturales de defensa de las plantas.

##### 4.4.4.3.1.- Activadores físicos.

##### 4.4.4.3.1.1.- Atmósferas modificadas.

Todas las condiciones físicas a las que son sometidas las frutas, las hortalizas y las flores tras su cosecha están encaminadas a retrasar la senescencia. De este modo la aplicación de temperaturas de refrigeración, las atmósferas modificadas y controladas son las técnicas de conservación que se utilizan habitualmente, especialmente las dos primeras que se usan conjuntamente y su objetivo es mantener la resistencia natural del hospedero el mayor tiempo posible retrasando su senescencia. El aumento del CO<sub>2</sub>, tanto en atmósfera controlada o modificada retrasa la maduración de los frutos. Cuando la maduración es ralentizada el compuesto dieno, que tiene propiedades antifúngicas según se ha argumentado en el capítulo anterior, permanece más tiempo estable, por lo que su degradación natural se ve disminuida. Esto se ha comprobado en la enfermedad postcosecha de la antracnosis ocasionada por *Colletotrichum gloeosporioides* en mango (Prusky *et al.*, 1991). Ardi *et al.* (1998), demostraron que la exposición de frutos de aguacate a atmósferas enriquecidas de CO<sub>2</sub> incrementaron la concentración del antioxidante epicatequina y de dieno en la piel, aumentando la resistencia contra los hongos porque mantiene las infecciones producidas en estado quiescente.

El decremento de la resistencia en la piel del aguacate durante su maduración ha sido atribuido a la actividad lipoxigenasa, que oxida los compuestos antifúngicos a compuestos inactivos, mientras que la actividad lipoxigenasa es regulada por la epicatequina (Barkai-Golan, 2001).

También se ha asociado una elevada concentración de CO<sub>2</sub> a un aumento de resorcinoles en los frutos de mango que tiene como consecuencia un aumento de la resistencia contra *Alternaria alternata* (Prusky and Keen, 1995).

Reyes (1990), reportó que la podredumbre gris podría ser reducida significativamente en berenjena por medio del uso de atmósfera modificada a una temperatura de 13°C durante 14 días. La atmósfera que mejores efectos tuvo fue: 7,5% CO (monóxido de carbono) + 1,5% de O<sub>2</sub>. Sin embargo, en el sector de la utilización de las atmósferas controladas, se tiene tendencia a no usar el CO por su extremada toxicidad contra los seres humanos a pesar de que presenta unas elevadas propiedades fungicidas.

Hammer *et al.* (1990), demostraron que el almacenamiento de la flores de rosa en una atmósfera con 10% de CO<sub>2</sub> a 2,5°C durante 5 días seguido de 2 días al aire redujo considerablemente la incidencia de podredumbre gris, es este caso es comúnmente llamada “Botrytis blight”.

Como se argumentó en el apartado anterior, los tratamientos con atmósferas enriquecidas en CO<sub>2</sub> presentan el inconveniente que contribuyen al efecto invernadero. Otro problema que presenta es que es costoso el mantenimiento de recintos cerrados con atmósferas generadas artificialmente (atmósferas controladas). Solamente el uso de las atmósferas modificadas generadas naturalmente por la respiración del producto y la permeabilidad del envase a los gases, permite el uso relativamente económico de la modificación de la atmósfera (Fig. 4.3). Las atmósferas con un contenido superior al 10% de CO<sub>2</sub>, ya permiten un efecto fungistático sobre la fruta, por lo que permite aumentar su resistencia de forma moderada siempre que el producto no sea muy sensible al CO<sub>2</sub>, como es la lechuga, a la que provoca lesiones fisiológicas.



**Figura 4.3.** Envasado de la lechuga iceberg en atmósfera modificada con el uso de una lámina o película plástica fina a base de polipropileno dotado de una permeabilidad selectiva a los gases metabólicos. Foto: J. A. Martínez López.

#### 4.4.4.3.1.2.- Tratamientos térmicos.

Los tratamientos térmicos pueden afectar a los procesos fisiológicos de los productos vivos cosechados como son las frutas, hortalizas y flores., aunque depende de varios factores como son la especie, variedad, edad fisiológica, y por otro lado, de la temperatura y tiempo de exposición al calor. Este tratamiento, bien aplicado, permite retardar el proceso de maduración y aumentar la resistencia del hospedero al patógeno. Adicionalmente, los tratamientos de calor tienen efectos beneficiosos en el control de las podredumbres, cicatrización de heridas y eliminación de virus, insectos y nematodos. Estos tratamientos presentan tres beneficios claros cuando son bien aplicados y concurren las otras condiciones enumeradas al principio de este párrafo son favorables. Estos beneficios son (Narayanasamy, 2006):

- 1.- Inhiben directamente el crecimiento del patógeno.
- 2.- Activan la resistencia natural del hospedero.
- 3.- Ralentizan el proceso de maduración.

El tratamiento térmico induce resistencia al hospedero porque provoca un estrés por calor que promueve la producción de fitoalexinas. Se ha comprobado que promueve la formación de cumarinas en la piel de los frutos cítricos que presenta actividad fungitóxica contra las especies patógenas de *Penicillium* en la postcosecha (Ben Yehoshua *et al.*, 1992). Los tratamientos térmicos también pueden inducir la formación de proteínas específicas conocidas como proteínas de choque térmico o inducidas por calor (“Heat Shock Proteins” - HSP) en los tejidos de las plantas (Barkai-Golan, 2001).

Los tratamientos postcosecha con calor se utilizan sólo durante cortos períodos de tiempo, de 3 a 5 minutos, porque los patógenos suelen estar en la superficie de los tejidos o, como mucho, en las primeras capas celulares, por ello, no es necesario que el calor alcance todo el tejido. Generalmente las frutas y hortalizas soportan temperaturas hasta los 50 o 60°C durante 5 o 10 minutos. Generalmente se aplican en baño de agua caliente.

Los baños de agua caliente en fresa no resultaron ser positivos en el control de la podredumbre gris, cuando se realizaron entre 40 y 48°C durante 3 a 15 minutos, ya que no afectaron al hongo e incluso llegaron a dañar los frutos (Narayanasamy, 2006).

La aplicación de los tratamientos térmicos aplicados en forma de curado (un tratamiento inicial a elevada temperatura durante varias horas), calentamientos intermitentes o enfriamientos intermitentes, tienen el inconveniente que requieren ser aplicados con sumo cuidado para evitar que el tratamiento sea contraproducentes porque las elevadas temperaturas aplicadas durante períodos no favorables pueden promover la senescencia, por lo que disminuiría la resistencia en vez de aumentarla. Además la respuesta dependería de muchos factores, por lo que los tratamientos de este tipo suponen ciertos riesgos.

#### 4.4.4.3.1.3.- Radiación gamma.

La radiación ionizante puede suprimir la infección y la colonización fúngica directamente por su efecto sobre las esporas y las hifas del hongo, pero también puede reducir las infecciones indirectamente porque retarda la maduración y senescencia de los frutos y contribuye al mantenimiento de la resistencia natural de las plantas a las infecciones y al desarrollo de los patógenos. Sin embargo, la radiación gamma actúa también como un estrés abiótico para la planta induciendo la síntesis de fitoalexinas como la escopoletina y la escoparona.

La aplicación de esta técnica se utiliza también para inducir mutaciones en las plantas que puedan generar plantas resistentes a enfermedades que puedan ser sometidas a un plan de mejora genética (ver apartados de modificación genética de las plantas). No obstante, los equipos industriales de radiación gamma son menos comunes que los de radiación UV.

#### 4.4.4.3.1.4.- Radiación ultravioleta.

La UV es otro tratamiento físico que puede inferir resistencia contra la infección fúngica. El efecto de la luz UV-C, de longitud de onda por debajo de 280 nm, ha sido demostrado que induce resistencia en una amplia variedad de frutas y hortalizas cuando se utilizada a bajas dosis. Este efecto beneficioso se ha comprobado en cebolla, zanahoria, pimiento, tomate, boniatos, melocotones, frutos cítricos y uva de mesa (Barkai-Golan, 2001). Su aplicación está limitada irradiar frutos tras la recolección, ya que todos los tipos de radiación UV, lo mismo que ocurre con la radiación  $\gamma$  provoca daños en el ADN de las células vegetales, siendo un factor importante de mutaciones, lesiones y muerte celular. Incluso puede crear reacciones indeseables en los órganos vegetales que reducen la supervivencia comercial de algunos de ellos, como las cebollas y boniatos (Narayanasamy, 2006). Sin embargo, una buena variedad de frutas y hortalizas responden favorablemente a la radiación UV, aumentando la resistencia a las enfermedades (Tabla 4.1.).

El efecto favorable sobre el aumento de la resistencia está promovido por la activación de varios sistemas de defensa en los tejidos del hospedero. El efecto más importante es la acumulación de fitoalexinas. En rodajas de zanahorias, la luz UV induce resistencia contra *B. cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* por la síntesis de la fitoalexina 6-metoximeleina (Mercier *et al.*, 1993). Este compuesto estuvo presente en los tejidos hasta una semana después de su inducción a la síntesis. Sin embargo, se pudo alargar el período de tiempo en el que este compuesto estuvo presente en los tejidos de la zanahoria incluso más de un mes manteniendo la temperatura de conservación lo más próximo posible a 0°C.

Se ha comprobado que la radiación con luz UV induce la síntesis de otras fitoalexinas como la escoparona (induce resistencia en frutos cítricos durante un mes después de la irradiación). Sin embargo, la resistencia inducida depende de la existencia de una fase latencia o de adaptación del patógeno antes de iniciar su crecimiento en la superficie de los frutos. De este modo, la luz UV puede inducir a que los conidios germinados puedan inducir su crecimiento, ya que el mayor pico de fitoalexinas suele alcanzarse 2 días después de la radiación, por lo que transcurrido este tiempo puede ser que el patógeno no vea alterado su desarrollo significativamente por efecto de la acumulación de las fitoalexinas. También hay que tener en cuenta que la radiación UV puede dañar los propágulos fúngicos siempre que se encuentren a nivel superficial en los tejidos vegetales y perfectamente expuestos al aire porque la luz UV presenta poca capacidad de penetración en los tejidos vegetales.

**Tabla 4.1.** Inducción de resistencia a las enfermedades postcosecha por medio de la irradiación de luz UV-C.

Cultivo	Patógeno	Referencia
Manzana	<i>Penicillium expansum</i>	Capdeville <i>et al.</i> , 2002
Judía	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Andebrhan y Wood, 1980
Col	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Brown <i>et al.</i> , 2001
Zanahoria	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Mercier <i>et al.</i> , 1993,2000
Frutos cítricos	<i>Penicillium digitatum</i>	Ben-Yehoshua <i>et al.</i> , 1992; Wilson <i>et al.</i> , 1994; Droby <i>et al.</i> , 1993; Porat <i>et al.</i> , 1999; D'hallewin <i>et al.</i> , 1999, 2000; Yildiz <i>et al.</i> , 2001; Kim y Ben-Yehoshua, 2001
Uva	<i>Botrytis cinerea</i>	Cia <i>et al.</i> , 2000
Cebolla	<i>Sclerotinia cepivorum</i>	Al-Safadi <i>et al.</i> , 2000
Melocotón	<i>Monilinia fructicola</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Lu <i>et al.</i> , 1993 Crisosto <i>et al.</i> , 1998; El Ghaouth <i>et al.</i> , 2003 <sup>a</sup>
Fresa	<i>Monilinia fructicola</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Nigro <i>et al.</i> , 2000; Marquenie <i>et al.</i> , 2002a,2003
Tomate	<i>Rhizopus stolonifer</i> <i>Alternaria alternata</i>	Liu <i>et al.</i> , 1993; Stevens <i>et al.</i> , 1998; Rong y Feng, 2001

Fuente: Narayanasamy (2006)

Además de la inducción de fitoalexinas, que se produce como consecuencia de la radiación UV, se ha comprobado que se estimula la síntesis del metabolismo secundario de las plantas hacia la síntesis de enzimas como la fenilalanina-amonioliasa (PAL) y la actividad peroxidasa. Ambos enzimas se consideran que juegan un papel esencial en la inducción de la resistencia de las plantas contra los patógenos (Barkai-Golan, 2001). La producción de quitinasa y glucanasa, proteínas PR, se ha observado en pomelos irradiados e inoculados posteriormente con conidios de

*Penicillium digitatum*. Estas dos PRs pueden hidrolizar los polímeros de las paredes celulares de los hongos (Porat *et al.*, 1999).

La radiación con luz UV-C ( $0,01 \text{ J cm}^{-2}$ ) redujo las podredumbres ocasionadas por *B. cinerea* en fresas. Esta radiación no se tradujo en daños a los frutos, incluso a dosis mucho más elevadas ( $6 \text{ J cm}^{-2}$ ) (Narayanasamy, 2006). *Monilia fuctigena* mostró una mayor sensibilidad a la luz UV-C que *B. cinerea*. Tras la irradiación, aumentó la actividad PAL relacionada con la biosíntesis de compuestos fenólicos, los cuales tienen propiedades antifúngicas. Adicionalmente la luz UV incrementa la producción de etileno que es proporcional a la dosis aplicada.

Nigro *et al.* (1998), comprobaron que tras irradiar uva de mesa con luz UV-C de  $0,125$  a  $4 \text{ kJ m}^{-2}$ , y después de inocular con *B. cinerea* aumento la resistencia de la uva a la podredumbre gris.

Aunque el potencial que presenta la irradiación con luz UV como inductor de la resistencia en frutas y hortalizas presenta un efecto favorable claro y es de fácil aplicación en recintos cerrados dotados con lámparas UV, donde se puede controlar la temperatura y la duración del tratamiento, también es cierto que estos tratamientos no superan el control de la podredumbres obtenidos por la utilización de los tradicionales fungicidas de síntesis. Lamentablemente, esto es un hecho cierto cuando se pretende utilizar tratamientos que aumente la resistencia de las plantas evitando la utilización de los fungicidas de síntesis. Sin duda, la opción que se está promoviendo en el presente es utilizar todas estas herramientas que nos ofrece la investigación en este campo, junto con la utilización de los fungicidas, pero dentro de un plan establecido que nos permitan evitar las enfermedades, reduciendo en la medida de lo posible el uso de los fungicidas. La investigación en este campo nos permite controlar la aplicación de estos fungicidas para que sean aplicados a dosis más bajas y únicamente cuando sean necesarios.

Los usos combinados de radiación UV junto con control biológico parecen prometedores porque se ha demostrado que la radiación UV no daña a los

microorganismos beneficiosos que se encuentran en la superficie de las plantas ni a los que dan buenos resultados en el control biológico.

#### 4.4.4.3.2.- Activadores químicos.

##### 4.4.4.3.2.1.- Inducción de etileno tras la respuesta hipersensible.

Algunas enfermedades de plantas ocasionadas por hongos, virus o bacterias restringen sus síntomas al punto de infección de la planta, donde aparecen lesiones necróticas. Este fenómeno es conocido como respuesta hipersensible (“hypersensitive reaction” – HR). Esto consiste en una necrosis provocada por la propia planta para aislar y detener el ataque del patógeno. El etileno está implicado en la respuesta de la HR. El tratamiento con esta hormona a los frutos cítricos puede causar una degradación de la clorofila y un incremento de los carotenos (proceso que se denomina desverdización), pero presenta el inconveniente de que estimula la formación de apresorios de *Colletotrichum gloeosporioides*. Sin embargo, cuando se eliminan los apresorios antes del tratamiento con etileno, los frutos desarrollan resistencia a la invasión del patógeno estimulando la reacción HR alrededor de los puntos de infección, desarrollando varias capas de células muertas alrededor de las hifas del hongo. Estas células se llenan de compuestos fenólicos que presentan propiedades antifúngicas, tal y como se describió en el capítulo anterior.

##### 4.4.4.3.2.2.- Quitosán.

El quitosán o quitosano es un derivado de la quitina, un polímero natural, y se ha demostrado que presenta actividad fungicida contra muchos hongos, incluidos los fitopatógenos. Debido a que se trata de un polímero natural éste se puede utilizar para cubrir los frutos con una especie de film semipermeable a los gases para permitir los intercambios gaseosos de los frutos. Un beneficio adicional que presenta es que crea una atmósfera modificada alrededor del fruto enriquecida en CO<sub>2</sub> y reducida en O<sub>2</sub>, cuyos niveles dependen de la permeabilidad a los gases metabólicos de la lámina de quitosán, de la actividad respiratoria del fruto y de la temperatura de almacenamiento.

El quitosán es adicionalmente un potente activador de fitoalexinas y de proteínas PR, tales como quitinasas, quitosanasas y p-1,3-glucanasas. Por ello, esta sustancia presenta *a priori* unas propiedades indiscutibles para aumentar la resistencia de los tejidos vegetales contra las enfermedades y aumentar la supervivencia comercial y la calidad de las frutas y hortalizas durante su almacenamiento. Las fitoalexinas y las PRs hidrolizan los principales componentes de la pared celular de las hifas.

Los estudios realizados en pimiento han demostrado que el quitosán es capaz de causar serios daños a las hifas de *B. cinerea* e interfiere en la capacidad del hongo de sintetizar poligalacturonasas. Estos enzimas provocan la maceración de los tejidos del hospedero porque degradan la pectina y la celulosa, componentes básicos de las paredes celulares de las células vegetales (El Ghaouth *et al.*, 1997).

Esta sustancia se ha probado aplicada a los cultivos; por ejemplo, en plantas de fresa cv. Seascape, que se pulverizaron con 2, 4 o 6 g L<sup>-1</sup> de quitosán en dos aplicaciones distanciadas 10 días. Los frutos de fresa cosechados se inocularon con *B. cinerea* y se almacenaron a 3 o 13°C. El tratamiento durante la cosecha con quitosán redujo significativamente las podredumbres de los frutos almacenados. La incidencia de podredumbres disminuyó con el aumento de la concentración del producto e incrementaron con la duración del almacenamiento y la temperatura Narayanasamy, 2006).

Se ha llegado a comparar efectos análogos de la cubierta de fresas y frambuesa con quitosán a los que presenta el tratamiento con tiabendazol. En efecto, fresas y frambuesa tratadas con quitosán y almacenadas a 13°C controló las podredumbres de las bayas por *B. cinerea* y *R. stolonifer* al mismo nivel que este potente fungicida de síntesis. Adicionalmente, la lámina de quitosán tuvo efectos beneficiosos en mantener la firmeza, la acidez, antocianinas y el contenido en vitamina C de las fresas y frambuesas almacenadas a 4°C (Zhang y Quantick, 1998, citados por Narayanasamy, 2006).

La inducción de enzimas líticos en tratamientos a base de quitosán de productos frescos cosechados permite aumentar la resistencia a las podredumbres. La

persistencia de los enzimas defensivos en los tejidos vegetales por la activación del quitosán, permite contribuir a retrasar la reactivación de las infecciones quiescentes. Por todo ello, esta sustancia es una de las más importantes para ser utilizada en el aumento de la resistencia de tipo químico de las plantas, por ello merece la pena la investigación en este campo y se ofrece como una alternativa que puede que sea muy eficaz en la reducción o eliminación de los fungicidas de síntesis.

#### 4.4.4.3.2.3.- Antioxidantes.

Los antioxidantes son compuestos capaces de reducir las podredumbres por aumentar la resistencia de las frutas y hortalizas. Dentro de este grupo podemos incluir el dieno. La lipoxigenasa es capaz de oxidar el dieno, perdiendo su efecto en la resistencia. La actividad de este enzima es regulada por la epicatequina, un antioxidante natural. El tratamiento con baño a diferentes dosis con antioxidantes:  $\alpha$ -tocoferol, butilhidroxitolueno, butyl-hidroxianisol y tert-butilhidroquinona, realizados a discos de frutos de aguacate, inhibió la actividad lipoxigenasa, retardando de este modo la degradación del dieno, esencial en el control de la antracnosis de estos frutos (Barkai-Golan, 2001).

Existen en el mercado ciertos formulados a base de antioxidantes que son utilizados para retardar las oxidaciones de los compuestos fenólicos de las frutas y hortalizas, que producen pardeamientos, y para aumentar la resistencia. Estos preparados no están muy extendidos, por lo que da una idea que su efectividad a veces está cuestionada y su uso no garantiza el control de las podredumbres. Nuevamente, debemos añadir que su uso, en principio debe ser complementario a la utilización de los métodos de control de enfermedades más potentes para el control de las enfermedades e las plantas: los fungicidas sintéticos.

Por último, los antioxidantes previenen la conversión de las infecciones quiescentes a activas; un proceso normal que ocurre durante la maduración de los frutos y reducen la resistencia a las enfermedades.

#### 4.4.4.3.2.4.- Ácido salicílico.

La respuesta hipersensible HR previene, como se ha comentado anteriormente la colonización de los tejidos por parte del patógeno, pero adicionalmente, la infección localizada puede inducir el aumento de la resistencia de la planta contra otras infecciones que pudieran producirse. Este fenómeno se conoce como sistema adquirido de resistencia. Mientras estos mecanismos son activados durante el ataque de un patógeno, el sistema de proteínas PR es activado, por ejemplo los enzimas p-1,3-glucanasas y las quitinasas. Las PR pueden ser también estimuladas por heridas en el tejido o por otros tipos de estreses que mimetizan la acción del patógeno aunque no existan patologías en ese momento. El ácido salicílico es un compuesto natural que es ya considerado como PGS u hormona vegetal (Arteca, 1996) que es capaz de inducir tales proteínas, incluso en ausencia del organismo patógeno. Se trata de un compuesto fenólico extendido por todo el reino vegetal, una de las razones que debe cumplir para que sea considerado como una PGS. La presencia de ácido salicílico endógeno en las plantas aumenta la resistencia de éstas contra el ataque de los patógenos. Por ello, la aplicación exógena de ácido salicílico ha sido estudiada con el fin de evaluar el aumento de la resistencia de las plantas. Algunos científicos han usado aspirina (ácido acetilsalicílico) en lugar de ác. salicílico, puesto que en un sistema acuoso, el ácido acetilsalicílico se hidroliza rápidamente a ác. salicílico. Sin embargo, la aspirina no se ha encontrado en las plantas como un producto natural. En esta línea, la aplicación exógena de ácido salicílico o aspirina induce la formación de proteínas PR en las hojas de algunas plantas (Barkai-Golan, 2001). No hay información en relación al efecto producido por estas dos sustancias en los frutos después de cosechados, en otras palabras, no se ha correlacionado la aplicación de estas sustancias con la aparición de proteínas PR. También se ha demostrado que el ác. salicílico puede actuar como un inhibidor de la biosíntesis de etileno bloqueando la conversión de ACC (ác. 1-aminociclopropano-1-carboxílico) a etileno, por tanto, la maduración de los frutos. Los estudios realizados con la aplicación de ác. salicílico a frutos de tomate han puesto de manifiesto que esta hormona favorece la expresión de los genes del ACC, especialmente en frutos dañados. Por ello, como inhibidor de la síntesis de etileno, este ácido podría actuar aumentando la resistencia de los tejidos antes de su maduración.

#### 4.4.4.3.2.5.- Calcio.

Se ha correlacionado el calcio (Ca) con la resistencia a las enfermedades de tal manera que el uso de las técnicas que aportan Ca a las plantas dotan, al mismo tiempo, de mayor resistencia a las enfermedades a ciertas alteraciones fisiológicas (podredumbre apical de sandías, tomate, pimiento, etc., necrosamiento marginal de la lechuga, etc.) u a los estreses en general.

Los tratamientos de calcio se pueden aplicar en el cultivo o en postcosecha. Los tratamientos precosecha de Ca reducen las pérdidas causadas por *Gloeosporium* spp. en manzanas, mientras que los tratamientos postcosecha en frutos de manzana reducen las podredumbres ocasionadas por *Penicillium expansum*. Sin embargo, la aplicación de Ca directamente a los frutos y hortalizas en forma de sal de calcio como el cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ ) es más efectiva en aumentar la resistencia a las podredumbres siempre que se aplique efectuando un vacío en el recinto de aplicación, con el fin de favorecer la absorción de este mineral (Narayanasamy, 2006). En este sentido, la infiltración de  $\text{CaCl}_2$  redujo las podredumbres ocasionadas por *B. cinerea* en manzanas y en uva de mesa inhibiendo la actividad poligalacturonasa del patógeno (Chardonnet *et al.*, 2000, citados por Narayanasamy, 2006).

Otros resultados favorables obtenidos en el control de la podredumbre gris por el tratamiento con Ca se han obtenido en racimos completos de uva, cuyo efecto fue la reducción de los ataques de *B. cinerea*. Un incremento del contenido de celulosa en las paredes celulares y en protopectina lleva asociado una estabilización de la estructura de estas paredes que inducen a un aumento de la resistencia contra *B. cinerea* (Narayanasamy, 2006).

El calcio induce resistencia en órganos almacenados a las enfermedades en postcosecha por la interacción entre ciertos componentes de la pared celular y los iones de Ca. El mecanismo de resistencia de los tejidos asociado con el Ca reduce la tasa de maceración de las paredes celulares por un mejoramiento en la integridad estructural de estas paredes de las células vegetales. Además, el Ca inhibe la actividad poligalacturonasa a concentraciones muy bajas (Narayanasamy, 2006).

Martínez *et al.* (2011b), reportaron que la aplicación *in vitro* de  $\text{CaCl}_2$  a varios aislados de *B. cinerea* obtenidos de plantas ornamentales modificaron, de una manera dependiente del aislado, las características fenotípicas del hongo relacionadas con la tasa de crecimiento, masa del micelio, número de esclerocios y conidiogénesis.

#### 4.4.4.3.2.6.- Laminarina.

La laminarina es un polisacárido a base de glucosa y manitol de reserva que acumulan las algas feófitas (algas pardas): Esta sustancia puede reforzar la resistencia contra *B. cinerea* en la uva porque incrementa la actividad quitinasa e induce a la producción de dos potentes fitoalexinas: reveratrol y  $\epsilon$ -viniferina. En efecto, la aplicación de laminarina a uva redujo las podredumbre gris en un 55% (Narayanasamy, 2006).

#### 4.4.4.3.3.- Activadores biológicos.

La habilidad de varios microorganismos antagonistas para actuar como alternativas a los fungicidas de síntesis está relacionada con su capacidad de segregar sustancias que alteren el crecimiento de los patógenos o por su poder de causar un daño directo sobre el patógeno. En muchos casos se ha hipotizado que estos microorganismos antagonistas, los cuales crecen rápidamente colonizando las heridas sin causar daño al huésped, compiten con los patógenos por el espacio y por los nutrientes. Sin embargo, algunas levaduras antagonistas solamente pueden actuar contra los patógenos potenciando la resistencia del hospedero. de esta manera se ha encontrado que la levadura *Pichia guilliermondii* induce la actividad enzimática PAL en la piel de los frutos cítricos potenciando, de este modo, la respuesta defensiva de los frutos. Tanto esta levadura como *Candida famata* son capaces de inducir la formación de fitoalexinas en la piel de los frutos cítricos como la escoparona y la escopoletina, respectivamente (Barkai-Golan, 2001).

Ippolito *et al.* (2000), encontraron que la levadura filamentosa *Aureobasidium pullulans* se multiplicó rápidamente en las heridas de la piel de la

manzana y redujo la incidencia de las podredumbres causadas por *B. cinerea* y *P. expansum* cuyos propágulos infectivos se inocularon a los frutos. Sin embargo, la levadura fue capaz de inducir la actividad p-1,3-glucanasa, quitinasa y peroxidasa. Esto se tradujo en un aumento significativo de la actividad enzimática. Las dos primeras enzimas son hidrolasas capaces de hidrolizar las células fúngicas, mientras que la peroxidasa está envuelta en la formación de lignina que se produce para taponar las heridas. *A. pullulans*, coloniza las heridas de los frutos y compite además por los nutrientes y por el espacio con los patógenos, por lo que está demostrado que exhibe varios mecanismos muy efectivos de control contra *B. cinerea*.

La eficacia de la levadura *Candida saitoana* en la inducción de resistencia de la manzana contra *B. cinerea* ha sido probada. En un experimento realizado por El Ghaouth *et al.* (2003, citados por Narayanasamy, 2006), comprobaron que la aplicación de esta levadura seguido de la inoculación de 48 a 72 horas después de *B. cinerea* a frutos de manzana, la lesión producida sobre las bayas se redujo de un 50 a un 70% respectivamente respecto al control inoculado con agua estéril. Adicionalmente, la levadura aumentó la actividad quitinasa y glucanasa, cuyos niveles van disminuyendo con el tiempo de almacenamiento. Estas enzimas inhibieron el desarrollo de *B. cinerea*.

Zahavi *et al.* (2000), establecieron que la levadura *Candida guilliermondii*, cepa A42 y el hongo filamentoso *Acremonium cephalosporium*, cepa B11, tuvieron efectos beneficiosos en el control de la podredumbre gris de la uva de mesa. La cepa A42 redujo un 8% la podredumbre y la cepa A42, un 16% a lo largo de toda la campaña. Estos microorganismos antagonistas trabajaron ejercieron bien su acción antagonista contra *B. cinerea* incluso a la temperatura de conservación de 0°C.

Martínez *et al.* (2012), demostraron que el enfrentamiento *in vitro* de la bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR), *Bacillus velezensis*, inhibe el crecimiento *in vitro* de distintos aislados de *Botrytis cinerea* obtenidos de plantas ornamentales de forma diferencial, siendo los aislados de *Cyclamen persicum* y de *Hydrangea macrophylla*, lo que se vieron más afectados. También pusieron de manifiesto la presencia de sustancias tóxicas difusibles producidas por la bacteria, capaces de soportar los 121°C, que fueron capaces de modificar el desarrollo del hongo,

reduciendo su conidiogénesis y la formación de esclerocios, pero el crecimiento no se vio afectado.

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, perteneciente al grupo de las PGPR o bacterias promotoras del crecimiento vegetal, es capaz de producir pioquelina (PCH), un sideróforo o molécula captadora de hierro, cuya función es disolver el  $Fe^{3+}$ , de poca solubilidad a pH neutro, por lo que de esta forma no puede ser utilizado por la bacteria. Se ha demostrado que este compuesto es un precursor de la síntesis del ácido salicílico, cuyos efectos ya se han descrito en el subapartado correspondiente. Además, la pioquelina es precursora de la piocianina, cuyo efecto es tóxico para *B. cinerea* (Narayanasamy, 2006).

En el mercado existen distintos preparados a base de microorganismos antagonistas vivos para aplicarlos a los cultivos para aumentar la resistencia contra *Botrytis* spp. Por ejemplo, *B. velezensis* se comercializa bajo la marca Botrybel y otra especie de *Bacillus*, *B. subtilis*, mucho más conocida por estos efectos beneficiosos que presenta, se comercializa bajo la marca Larminar o Serenade. La levadura *Aureobasidium pullulans* presenta del mismo modo preparados comerciales. Todos ellos se utilizan en el control de *Botrytis* en diversos cultivos, destacando los de la fresa y tomate.

#### **4.4.4.4.- Modificación genética de las plantas.**

##### **4.4.4.4.1.- Plantas transgénicas resistentes a enfermedades.**

La transformación genética de las plantas por introducción de caracteres para mejorar en comportamiento durante el cultivo, incrementar el tamaño o mejorar la resistencia de enfermedades no es un concepto nuevo. Los métodos clásicos de mejora con el fin de obtener nuevas variedades que transmitan las características deseadas se lleva haciendo desde hace muchos años, es decir, los métodos clásicos de mejora vegetal. Sin embargo, estos métodos clásicos de mejora son lentos e inexactos porque a menudo los patógenos mutan más rápidamente que lo que el desarrollo de los planes de mejora. Las técnicas de bioingeniería dan la oportunidad de modificar las plantas

creando plantas transgénicas que presentan una elevada resistencia a determinados patógenos de una manera mucho más rápida y eficaz que los métodos clásicos de mejora.

Una planta transgénica contiene dentro de su genoma un ADN de otra especie que ha sido introducido artificialmente por ingeniería genética. Incluye la introducción de genes de resistencia a enfermedades. Esta tecnología no sólo permite aumentar la diversidad genética sino también poder añadir múltiples y diversos genes de resistencias a una determinada variedad de plantas. De hecho, la creación de nuevas variedades de plantas que contengan genes de resistencia a enfermedades está considerada como la principal estrategia en un plan de lucha contra las enfermedades de fitopatología y, a corto plazo, es el procedimiento único para eliminar los fungicidas de síntesis.

Los genes diana más deseados para crear plantas transgénicas se aíslan de virus, bacterias, hongos y de otras plantas, dependiendo del carácter deseado que se quiera transmitir. Se utilizan mucho los genes que inhiben el crecimiento de los hongos que son inducidos tras el comienzo de la colonización de un hongo en una planta (Barkai-Golan, 2001). Sin embargo, la selección de genes diana beneficiosos para conseguir la resistencia del patógeno requiere un gran conocimiento de éste, del hospedero y de las interacción entre ellos. Conocimiento que se alcanza tras una larga investigación en genética y fisiología.

El desarrollo de variedades genéticamente resistentes a las enfermedades en postcosecha es considerado como el principal objetivo para combatirlas. Sin embargo, el principal obstáculo para alcanzar este objetivo es pérdida de la durabilidad de la resistencia. Esto es debido a la presión que ejerce los patógenos los cuales tienden adaptarse a las nuevas situaciones (Narayanasamy, 2006).

En apartados anteriores se ha puesto de manifiesto que la resistencia de los aguacates cosechados contra la antracnosis, radica en buena parte a la síntesis y acumulación del compuesto denominado dieno. La resistencia contra esta enfermedad radica en mantener los niveles de dieno sintetizados lo más elevados que sea posible y

la principal estrategia para ello es retardar la maduración, ya que este compuesto disminuye drásticamente durante este proceso y, adicionalmente, potenciar su síntesis. Se ha comprobado que la inoculación de aislados mutantes no patógenos de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causante de la enfermedad, incrementan los niveles de dieno, por los que los mutantes no patógenos del hongo contribuyen a aumentar los mecanismos de defensa contra la enfermedad, alargando el período quiescente del patógeno sobre la superficie de los frutos.

La mayoría de los estudios genéticos de *Botrytis* han sido realizados en *B. cinerea* (Beever y Weeds, 2004). El desarrollo de las técnicas de genética molecular a partir de 1980 ha tenido un papel revolucionario en el entendimiento de las estrategias patógenas de *Botrytis* spp. Esto ha permitido, por primera vez, la identificación inequívoca de genes de patogenicidad y de virulencia y, por tanto, la habilidad para definir moléculas diana para desarrollar nuevos fungicidas y la posibilidad de generar plantas resistentes a la enfermedad. Desde la primera exitosa transformación de *B. squamosa* (Huang *et al.*, 1989, citados por Elad *et al.*, 2004), se han estudiado las herramientas moleculares y las técnicas de este campo para adaptarlas a los requerimientos especiales de *Botrytis* spp. De hecho, las investigaciones realizadas en este campo han aumentado exponencialmente en los últimos años, especialmente en el campo de inactivación de genes diana y el análisis funcional de todos los factores de patogenicidad identificados en todo el conocimiento que se tiene ya en relación a la bioquímica, fisiología y datos genéticos de las últimas décadas. En *Botrytis* spp. se han identificado 45 genes relacionados con la patogenia (Tudzynski y Siewers, 2004). Sin embargo, sólo unos pocos genes candidatos “clásicos” han sobrevivido al riguroso muestreo molecular de los últimos años, con resultados inesperados.

#### 4.4.4.4.2.- Fuentes de genes para la bioingeniería de plantas.

Los primeros genes candidatos para mejorar la resistencia de las plantas fueron puntualizados por Mount y Berman (1994), citados por Barkai-Golan (2001), a partir de compuestos naturales que se conocían sus propiedades antimicrobianas y

antifúngicas contra hongos fitopatógenos o bacterias. Sin embargo, las plantas transgénicas con introducción de genes capaces de producir antibióticos presentan un gran problema y es que esto permite el desarrollo rápido de cepas resistentes a esos antibióticos.

Las quitinasas y las p-1,3-glucanasas son muy efectivas en hidrolizar las paredes celulares de los hongos. Se han identificado genes que codifican estas proteínas y se ha introducido el gen de la quitinasa en plantas de tabaco y de colza aumentando la resistencia contra *Rhizoctonia solani*, pero no contra *Cercospora nicotianae*. Esta conclusión sugiere que además de la quitinasa, hay otros factores que intervienen en la respuesta.

Un estudio posterior ha demostrado que la resistencia a las enfermedades fúngicas puede ser altamente favorecida con en plantas transgénicas que contienen los genes de la quitinasa y de la glucanasa al mismo tiempo (Zhu *et al.*, 1994, citados por Barkai-Golan, 2001). Otros genes han sido estudiados para su introducción en plantas transgénicas, como son los genes de la peroxidasa (Barkai-Golan, 2001).

El conocimiento y entendimiento de la etiología de las enfermedades postcosecha y de su fisiología es una estrategia fundamental para ayudar a la selección de nuevos genes que permitan desarrollar nuevas plantas transgénicas resistentes a las enfermedades en postcosecha. Para este proceso es fundamental alcanzar un gran entendimiento en la comprensión de los mecanismos de defensa que se inducen tras una herida, ya que la patología postcosecha está muy relacionada con la fisiología de los tejidos dañados. En este sentido, Eckert y Ratnayake (1994), promovieron la alteración genética de las plantas para hacerlas fisiológicamente más resistentes a los daños mecánicos o favorecer la síntesis de compuestos cicatrizantes. Del mismo modo, el mayor entendimiento de la actividad enzimática de la degradación de las paredes de las hifas de los hongos puede ser una buena herramienta para la creación de nuevas plantas transgénicas para las que la capacidad de producir poligalacturonasa (PG) (capacidad para degradar las paredes celulares de los vegetales) por parte del patógeno pueda ser suprimida. Stotz *et al.* (1993), estudiando la capacidad de la inhibición proteica de las PGs en peras, sugirió que estos frutos promueven la expresión de genes que se traducen

en la inhibición de *B. cinerea*. La caracterización del inhibidor de estas proteínas permitiría desarrollar por ingeniería genética nuevas plantas capaces de controlar la podredumbre gris por inhibición de la síntesis de PG. De hecho, Powell *et al.* (1994), reportaron que los frutos de tomate transgénico que expresan el gen de las glicoproteínas inhibidoras de la PG de la pera, fueron más resistentes a la podredumbre gris que los frutos controles.

#### 4.4.4.5.- Manipulación de la biosíntesis de etileno.

La importancia del etileno como hormona de la maduración en la aceleración de la maduración y la senescencia de los frutos cosechados y sus efectos sobre el acortamiento de la supervivencia comercial se ha convertido en uno de los principales objeto de estudio en postcosecha con el fin de disminuir todos sus efectos adversos de las frutas, hortalizas y flores durante la conservación. Entre las soluciones ofrecidas, está la de utilizar técnicas que puedan prevenir la producción de etileno o la de conseguir un mutante que no sea capaz de producir etileno y que sólo pueda madurar cuando es sometido a una fuente externa de esta hormona.

El conocimiento de la ruta de síntesis del etileno en plantas es una ventaja a la hora de encontrar mecanismos que puedan inhibir o manipular la síntesis de esta hormona en un punto determinado de su ruta biosintética. La forma más eficiente para prevenir la síntesis de etileno en frutos de tomate consiste en la inhibición de la ACC (ác. 1-aminociclopropano -1-carboxílico), el precursor inmediato del etileno, por medio de la técnica antisentido para anular el gen de la ACC sintetasa. Esta función permite inhibir casi por completo la síntesis del ACC sintetasa y se obtienen mutantes de plantas de tomate con frutos que no maduran. Si se utilizan plantas de tomates en las que la síntesis de los enzimas formadores de etileno ha sido inhibida por la utilización de genes antisentido, se ha demostrado que el grado de inhibición de la maduración depende del estado de desarrollo que presentan los frutos al ser cosechados. Este efecto es más claro si los frutos se cosechan antes del estado pintón. Entonces, si se aplica etileno a estos frutos la maduración no se produce porque falla, entre otros procesos la producción de licopeno que da el color rojo al tomate.

Otra forma de alterar genéticamente la biosíntesis de etileno fue reportada por Klee *et al.* (1991), quienes introdujeron un gen bacteriano que codifica un enzima que metaboliza el ACC en plantas de tomate. Como resultado de este proceso, se produce una inhibición de la acumulación del ACC y reducción de la producción de etileno con una consecuencia marcada en la inhibición de la maduración de los frutos de tomate.

La inhibición de la síntesis de etileno por manipulación genética, no solo tiene consecuencias beneficiosas en el alargamiento de la supervivencia comercial de los frutos, sino también presenta un efecto indirecto en el desarrollo de las podredumbres que van estrechamente ligada con los procesos de maduración y senescencia. La relación entre el estado de madurez y la resistencia de los frutos cosechados a las enfermedades en postcosecha está probablemente asociada con la pérdida de la habilidad de los tejidos maduros de producir compuestos defensivos y barreras estructurales. Adicionalmente, el patógeno es capaz de producir y activar enzimas pectinolíticas solamente durante la maduración del fruto, momento en que puede descomponer las paredes celulares de las células vegetales degradando los tejidos.

Se han realizado estudios a nivel genético encaminados a fortalecer directamente la resistencia de los frutos (Barkai-Golan, 2001). Esto puede ser conseguido en un sistema hospedero-patógeno en el que un gen de resistencia en la planta responde específicamente a un gen de virulencia del patógeno, por ejemplo en el sistema gen a gen. Tales interacciones han sido descritas para varios pares de planta-patógeno. La susceptibilidad a la enfermedad en un sistema hospedero-patógeno en el que uno de los dos genes, el de resistencia de la planta o el de virulencia del patógeno está ausente durante la interacción, Las plantas de tomate ofrecen ventajas para clonar genes de resistencia sobre la base de su posición en el mapa genético. Dado que el tomate ha sido sometido a estudios de mejora genética durante más de 50 años, muchos de sus loci que confieren resistencia a varios hongos, bacterias y virus han sido identificados.



## **CAPÍTULO 5**

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD  
FUNGISTÁTICA DE LOS EXTRACTOS DE  
ACEITES ESENCIALES DE MANDARINA,  
TOMILLO, CLAVO Y CANELA SOBRE EL  
DESARROLLO *in vitro* DE DISTINTOS  
AISLADOS DE *Botrytis cinerea***



## Capítulo 5. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD FUNGISTÁTICA DE LOS EXTRACTOS DE ACEITES ESENCIALES DE MANDARINA, TOMILLO, CLAVO Y CANELA SOBRE EL DESARROLLO *in vitro* DE DISTINTOS AISLADOS DE *Botrytis cinerea*

### 5.1. Introducción.

El objetivo del presente estudio ha sido comprobar la actividad de los aceites esenciales de clavo, tomillo, mandarina y canela, seleccionados en base a sus efectos antifúngicos descritos en la bibliografía, sobre el desarrollo del hongo *Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr. creciendo *in vitro*.

Este experimento se realizó con 4 aislados diferentes previamente purificados en sus correspondientes placas conteniendo agar de patata y dextrosa (PDA) y seleccionados bajo criterios en base al distinto aspecto morfológico que presentaba cada hongo. La procedencia de los aislados fueron de tomates es de los invernaderos de Don Miguel Sevilla Fructuoso en Mazarrón del que se cogieron muestras definitivas de dos de sus tomates y de los almacenes del Grupo G's España, de donde también se cogieron las muestras definitivas de dos de sus tomates.

Con este experimento lo que se quiere conseguir es seleccionar el mejor aceite esencial de los ensayados que mejor inhiba el crecimiento *in vitro* con el propósito de ser posteriormente seleccionados para aplicarlos en frutos de tomates con el fin de reducir o prevenir el desarrollo de sus podredumbres.

Según la bibliografía leída, hay muchos estudios que demuestran que los aceites elegidos tienen efectos positivos a la hora de inhibir el crecimiento de *B. cinerea*, a dosis muy bajas (Dafereraa *et al.*, 2003). En parte de esta bibliografía, se ha puesto de manifiesto que la producción de esporas de este hongo se redujo en más de un 70% por el aceite esencial de limón en una concentración de 25 mg/L, mientras en la mayor concentración (500 mg/L), el proceso de esporulación fue completamente inhibido. También se demostró que los aceites esenciales de tomillo (*Thymus capitatus* L.), clavo (*Syzygium aromaticum* L.) y menta (*Prostanthera rotundifolia*), redujeron

significativamente la germinación de conidios y crecimiento del tubo germinativo de este patógeno.

No olvidamos que el principal objetivo de este estudio es encontrar una alternativa a los fungicidas sintéticos que se utilizan actualmente en el control de hongos patógenos como es el caso de *Botrytis cinerea*, que es el agente causal de la enfermedad del moho gris del tomate o podredumbre gris. Pero se ha de tener en cuenta que los tratamientos del tomate con fungicidas de síntesis no están autorizados en postcosecha, no así las sustancias inocuas, por lo que en este caso la utilización de sustancias inocuas o de baja toxicidad (nula a dosis muy bajas) es una ventaja añadida para reducir las podredumbres de los tomates durante su almacenamiento.

Se ha investigado las diversas actividades antifúngicas de los aceites esenciales obtenidos a partir de las partes aéreas de las plantas aromáticas (como las de la familia *Lamiaceae*) contra *B. cinerea* y sus efectos perjudiciales se han generalizado contra el crecimiento de muchos hongos. Diversas observaciones microscópicas han revelado que los aceites esenciales pueden causar considerables degeneraciones morfológicas de las hifas de hongos, tales como la coagulación citoplásmica, arrugamiento de hifas, fugas de protoplastos y la pérdida de la formación de conidios. Hoy en día hay varios estudios que han demostrado que los aceites esenciales son agentes antifúngicos potenciales y prometedores, que podrían ser utilizados como biofungicida en la protección de tomate contra *B. cinerea*.

Ciertas especias como canela, clavo y mostaza con gran poder conservante inhiben el crecimiento de microorganismos. Destacando también pimienta, laurel, cilantro, comino, orégano, romero, salvia y tomillo, que tienen actividad intermedia. La función conservadora se debe a los aceites esenciales, en cuya composición poseen compuestos tipo eugenol o aldehído cinámico con poder antimicrobiano. También presentan actividad antimicrobiana las oleorresinas de estas especias (Petroni, 2002). La aplicación de aceites esenciales provenientes de orégano, cilantro (*Coriandrum sativum* L.) y tomillo, entre otros, se ha estudiado para controlar en tomate a los hongos incidentes en postcosecha, *R. stolonifer*, *B. cinerea*, *Alternaria arborescens* Simmons y

*Geotrichum candidum* Link. Los resultados han sido variables, en función del hongo y del tipo de extracto evaluado (Plotto *et al.*, 2003).

## 5.2. Materiales y métodos.

### 5.2.1. Material experimental y tratamientos.

Previo a la realización de las experiencias *in vitro* del presente capítulo, se recolectaron tomates en cinco zonas diferentes del Termino Municipal de Mazarrón:

- Los primeros tomates tenían su origen en Lorca (Polígono 84, Parcela 62; Diputación: Morata). Fueron suministrados por la empresa Agrimur S.A. (Crta. Mazarrón a Águilas Km 10 - 30876 - Los Cazadores - Mazarrón – Murcia) que se dedica a subastas y los tenía ya recolectados en el almacén cuando fueron entregados completamente sanos. Los tomates eran de la variedad Boludo (este es un tomate de larga vida que se caracteriza por tener mayor consistencia y supervivencia comercial de los frutos cara a su comercialización de período medio de 15-20 días a 20 °C. Son de superficie lisa y su coloración uniforme y roja. Se cosecharon el 18 de octubre de 2012.
- El segundo grupo de tomates fue entregado por un agricultor llamado Don Miguel Sevilla Fructuoso. Provinieron de un invernadero en la zona de Los Cazadores en Mazarrón. La variedad del tomate también Boludo. Éste fue el único que tenía tomates infectados de *Botrytis cinerea*. Los tomates situados próximos al suelo eran los que presentaban los síntomas de la podredumbre gris. La fecha de recolección fue del 19 de octubre de 2012.



**Figura 5.1.** Invernadero de Don Miguel Sevilla Fructuoso en la zona de Mazarrón.  
Fuente: María Almudena Fuentes López.

- El tercer grupo de tomates fueron entregados por un familiar de Don Miguel Sevilla Fructuoso: Don Antonio Fructuoso Pérez. Éste tenía en sus invernaderos la variedad Muchamiel (es una baya carnosa, esférica, rizada y de gran calibre, siendo verde al inicio y rojo-pintón cuando madura), situado en Cañada de Gallego. Los tomates no presentaban ningún síntoma de podredumbre gris. La fecha de recolección correspondió al 19 de octubre de 2012 19/10/12.
- El siguiente grupo de tomates fueron proporcionados por la empresa Perichán. Los frutos eran de la variedad Boludo y estaban ya recolectados. El invernadero de procedencia estaba situado en Cañada de Gallego, Mazarrón. La fecha de recolección fue del 19 de octubre de 2012.
- Finalmente se consiguió un ramillete de tomates verdes en rama en la empresa Grupo Hortofrutícola Paloma. Estos frutos aún estaban verdes, sin presentar aún viraje de color. Se consiguió su madurez en el laboratorio a temperatura ambiente, pero no llegaron a pudrirse por *B. cinerea*. La fecha de recolección fue del 19 de octubre de 2012.

Todos los tomates cosechados y que no tenían síntomas de podredumbre gris se mantuvieron en el laboratorio en cámara húmeda y a temperatura ambiente para que se

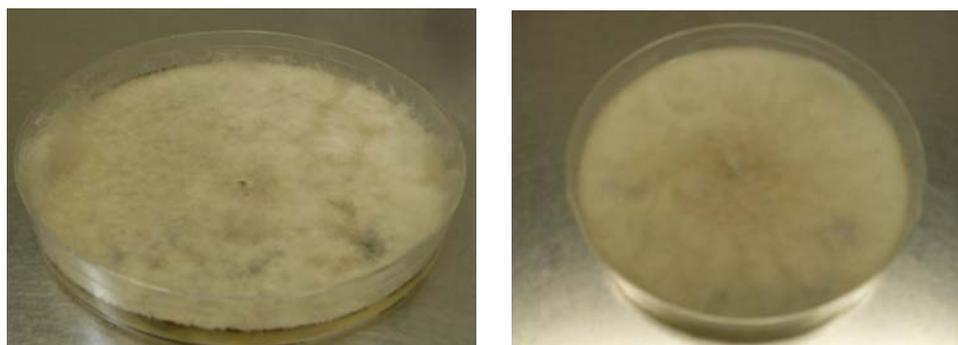
desarrollara la podredumbre gris con el fin de obtener diversos aislados de este hongo para estudiar su comportamiento en presencia de aceites esenciales. El día 2 de noviembre, algunos de los tomates no tenían hongo, por lo que se les realizó unas pequeñas heridas superficiales en condiciones asépticas con un bisturí sobre la piel del tomate y se roció agua para favorecer el desarrollo de las podredumbres. Aunque este procedimiento acelera el proceso de infección, se corre el riesgo de que se produzcan otras infecciones por otros hongos distintos a *B. cinerea*.

El día 8 de noviembre se cogieron muestras de frutos de tomate de un huerto privado de la localidad de Roche cosechados el mismo día. Los frutos estaban completamente sanos y no se pudo obtener posteriormente la podredumbre gris a partir de estos tomates. También se obtuvieron tomates de los almacenes del Grupo G's España, en Águilas.

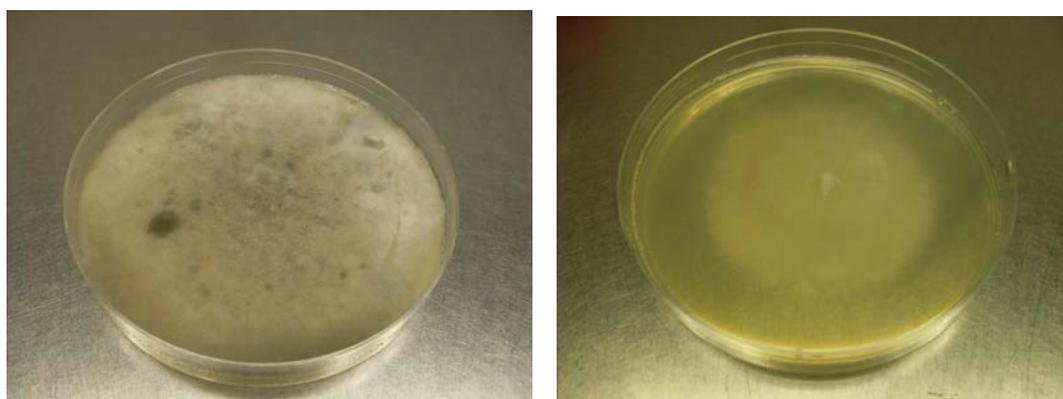
De todos estos grupos de tomate, sólo se obtuvo podredumbre gris en frutos de Don Miguel Sevilla Fructuoso y del grupo G's España. El resto de frutos se pudrieron de otros tipos de podredumbre. También encontramos muchas levaduras. Por lo tanto se capturaron cuatro aislados de *Botrytis cinerea*, dos obtenidos de un fruto de tomate de la zona de Mazarrón (*Solanum lycopersicum* (L.) var. Boludo), y los otros dos de un fruto de tomate de la zona de Águilas (*Solanum lycopersicum* (L.) var. Kumato). Se procedió del mismo modo con los cuatro aislados de *Botrytis cinerea*. Las muestras se recogieron en invernadero de Don Miguel Sevilla Fructuoso en la zona de Mazarrón, a partir de frutos recién cortados de la propia tomatera, el 19 de octubre de 2012; y los otros frutos se cogieron del destrío el 8 de noviembre de 2012 de los almacenes del Grupo G's España, habiéndose sido recolectados éstos el día anterior en Águilas. Se recogieron varias muestras de cada lugar y se transportaron el mismo día en que se recogieron en coche particular hasta el laboratorio de patología vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena. Estos frutos fueron introducidos el mismo día en que llegaron en cámara húmeda y a la mañana siguiente ya se veían frutos con síntomas de podredumbre gris. Ya que no se disponían de frutos podridos por podredumbre gris, el objetivo era desarrollar esta podredumbre a partir de los propágulos naturales presentes en la superficie de los frutos. Para ello, se pusieron los frutos en cámara húmeda a temperatura de 20°C y HR del 100%. Esta técnica consiste en colocar los tomates en

una bandeja con un recipiente lleno de agua en su interior. Es necesario mantener la bandeja introducida en una bolsa semicerrada para que los frutos puedan respirar normalmente. La muestra a colocar en el recipiente debe estar limpia para que los resultados no se vean alterados por posibles contaminantes, por esta razón, si teníamos algún tomate con galerías o algún daño provocados por algún insecto, estos fueron desechados. Después de prepararles la cámara húmeda a los tomates, estos fueron rociados con una pequeña capa de agua sobre los tomates con un pulverizador para favorecer el desarrollo de los propágulos. De este modo se favorece la germinación de los conidios de *Botrytis*, ya que los conidios de *Botrytis* necesitan una ligera capa de agua o rocío para germinar.

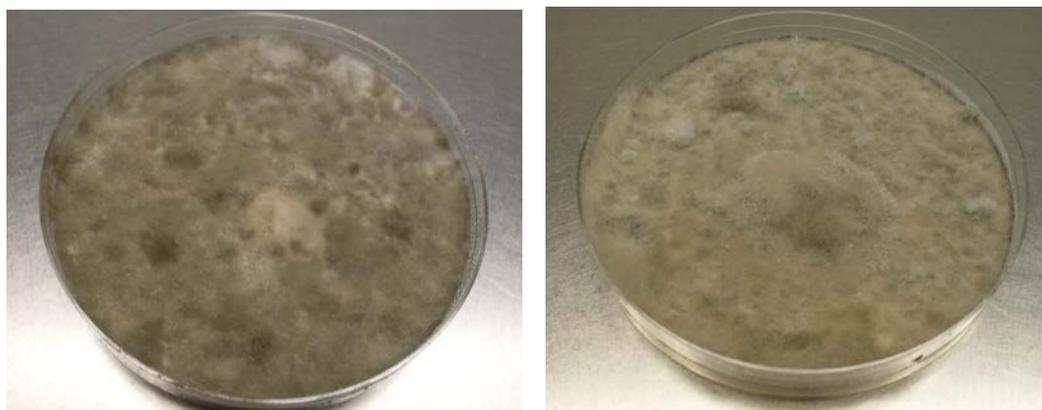
A partir de dos frutos con podredumbre gris de cada una de las procedencias se aisló *Botrytis* y posteriormente se purificaron los aislados para separarlos de levaduras y otros hongos asociados por el procedimiento que se ha descrito anteriormente. Este primer purificado de cada aislado constituye la placa madre que se conserva para hacer las siguientes réplicas antes de realizar el purificado final por medio del cultivo monospórico que se va a describir más adelante. Por ello tenemos 4 placas madres, 2 de ellas pertenecientes a dos aislados de G's y los otros dos pertenecientes a los aislados de Don Miguel Sevilla Fructuoso. De todas formas, como obtuvimos más aislados de *Botrytis* de las mismas procedencias, decidimos dejar solo dos aislados por procedencia para simplificar los experimentos que se van a realizar posteriormente. Los aislados dentro de la misma procedencia se eligieron en base a sus diferencias en aspecto visual. Las fotos de los aislados descartados se muestran a continuación en la Figs. 5.2.; 5.3.; 5.4.; y 5.5.



**Figura 5.2.** A la izquierda placa madre del Grupo G's España inoculada el 12 de noviembre y a su derecha su purificado realizado el 15 de noviembre. Fotos: María Almudena Fuentes López.

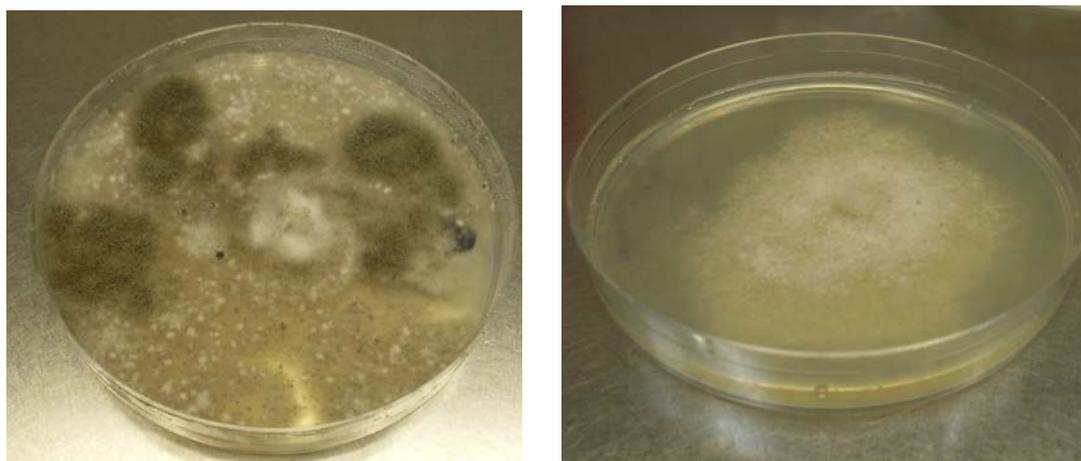


**Figura 5.3.** A la izquierda placa madre del Grupo G's España inoculada el 12 de noviembre y a su derecha su purificado realizado el 16 de noviembre. Fotos: María Almudena Fuentes López.



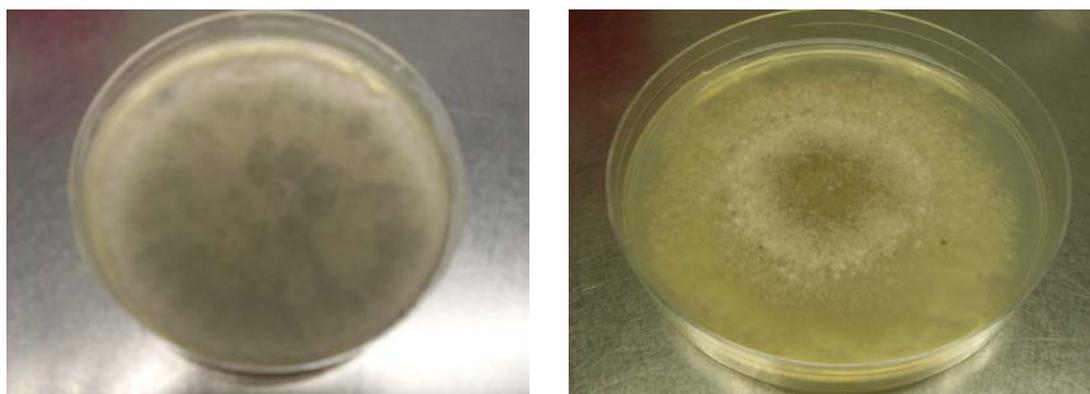
**Figura 5.4.** A la izquierda placa madre de Don Miguel Sevilla Fructuoso inoculada el 23 de octubre y a su derecha su purificado realizado el 6 de noviembre.

Fotos: María Almudena Fuentes López.

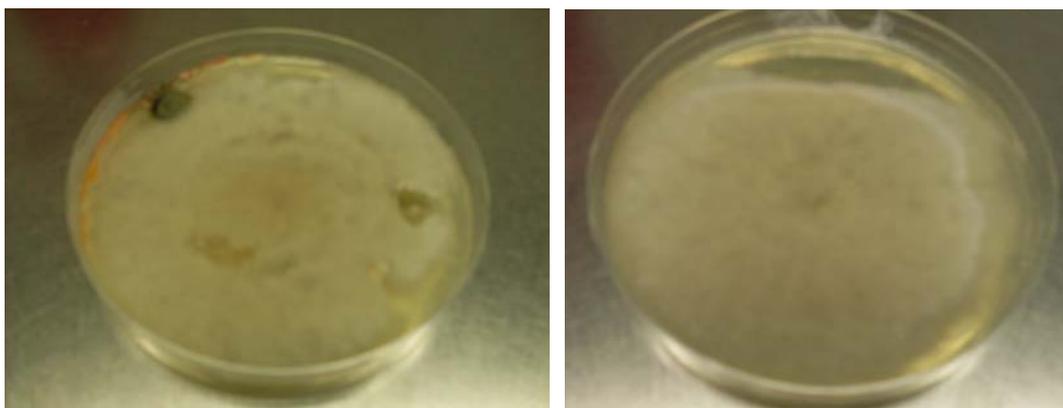


**Figura 5.5.** A la izquierda placa madre de Don Miguel Sevilla Fructuoso inoculada el 2 de noviembre y a su derecha su purificado realizado el 12 de noviembre.  
Fotos: María Almudena Fuentes López.

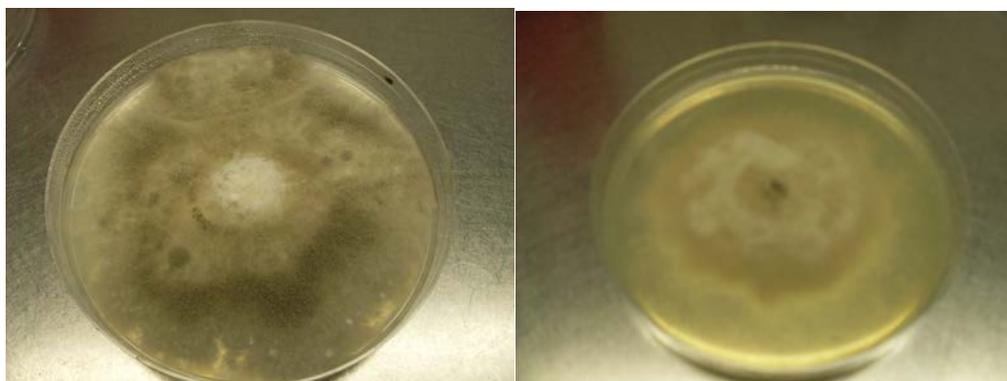
A continuación se procede a presentar las imágenes de los 4 aislados seleccionados en base al distinto aspecto morfológico que presentan. De los que seleccionamos dos madres y dos purificados de cada uno (en total 8 placas con las que realizar el cultivo monospórico). La primera purificación de los aislados de *Botrytis* se realizó eliminando de forma aséptica una pequeña porción cuadrada (aproximadamente de 2 x 2 mm.) justo del margen de la colonia del micelio desarrollado y colocándolo sobre otra placa que contenía PDA (Figs. 5.6; 5-7; 5-8 y 5-9).



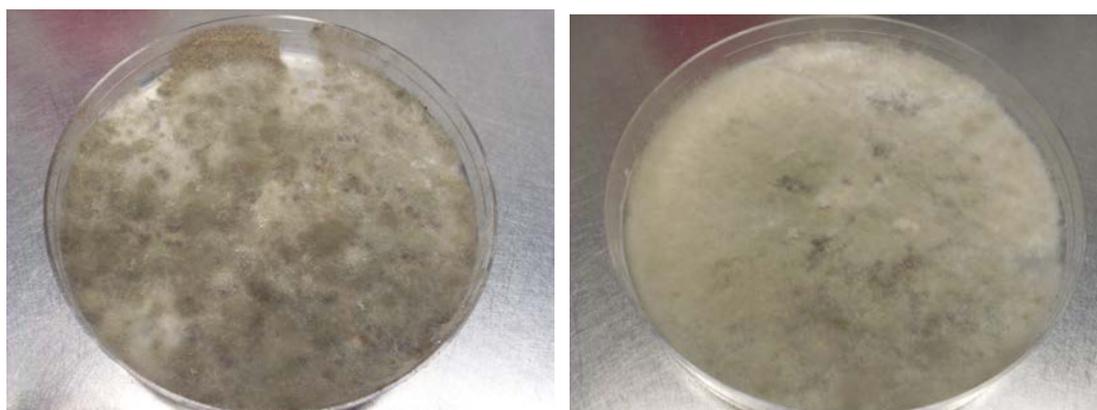
**Figura 5.6.** A la izquierda placa madre del Grupo G's España inoculada el 9 de noviembre y a su derecha su purificado realizado el 12 de noviembre. Fotos: María Almudena Fuentes López.



**Figura 5.7.** A la izquierda placa madre del Grupo G's España inoculada el 9 de noviembre y a su derecha su purificado realizado el 12 de noviembre. Fotos: María Almudena Fuentes López.



**Figura 5.8.** A la izquierda placa madre de Don Miguel Sevilla Fructuoso inoculada el 2 de noviembre y a su derecha su purificado realizado el 14 de noviembre.  
Fotos: María Almudena Fuentes López.



**Figura 5.9.** A la izquierda placa madre de Don Miguel Sevilla Fructuoso inoculada el 23 de octubre y a su derecha su purificado realizado el 6 de noviembre.  
Fotos: María Almudena Fuentes López.

Las placas se incubaron a 26°C hasta el desarrollo completo de los hongos (Fig. 5-10).



**Figura 5.10.** Incubadora programada a 26°C, dotada de ventilador y en oscuridad.  
Foto: María Almudena Fuentes López.

Con el fin de garantizar la pureza de los aislados se procedió a preparar el material para realizar un cultivo monospórico de cada uno de ellos. El cultivo monospórico consiste en hacer crecer cada aislado a partir de un único conidio haciendo diluciones sucesivas.

El material preparado fue el siguiente:

24 tubos de ensayo con sus correspondientes tapones, una caja de puntas de macropipetas azules de 1 mL, 4 puntas de macropipetas blancas de 5 mL y el frasco de vidrio que contiene 300 mL de agua destilada con 30  $\mu$ L de tween 80 (0,01 %). Todo este material fue esterilizado a 121°C en un autoclave.

El 21 de noviembre de 2012 se hizo un cultivo de conidios de cada uno de los cuatro aislados tocando con un asa de cultivo la masa conidiógena de cada uno de ellos y haciendo diluciones sucesivas en agua destilada esterilizada con tween 80 (0,01%) hasta la  $10^{-6}$ . Se hicieron siembras en PDA (0,2 mL) de la dilución sobre una placa conteniendo PDA solidificado y extensión posterior con el asa de siembra de punta redonda para dispersar el inóculo sobre el medio. Es el denominado método de la

extensión de aislamiento de microorganismos). De este modo se obtuvieron colonias aisladas obtenidas a partir de un conidio (cultivo monospórico). La purificación completa de los aislados se logró a partir de los cultivos monospóricos tras siembra de una pequeña porción de micelio de una colonia seleccionada en otra placa conteniendo PDA. De esta manera se obtuvieron los cultivos origen a partir de los cuales se hicieron las siembras para cada uno de los experimentos realizados con los extractos de aceites esenciales.

Los aislados y las podredumbres fueron identificados de acuerdo con Blancard *et al.*, 2011 y por medio de la secuencia de genes específicos de la especie. Con este último fin, para comprobar la identificación morfológica de los aislados se analizó por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) la región ITS (“Internal Transcribed Spacers”, espacios de transcripción interna) del ADN ribosomal.

El análisis de las secuencias de nucleótidos obtenidas resultaron homólogas a las siguientes secuencias depositadas en la base de datos del GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), con su correspondiente código de acceso:

*Botrytis* sp. HQ166555.1

*B. fuckeliana* HM849615.1

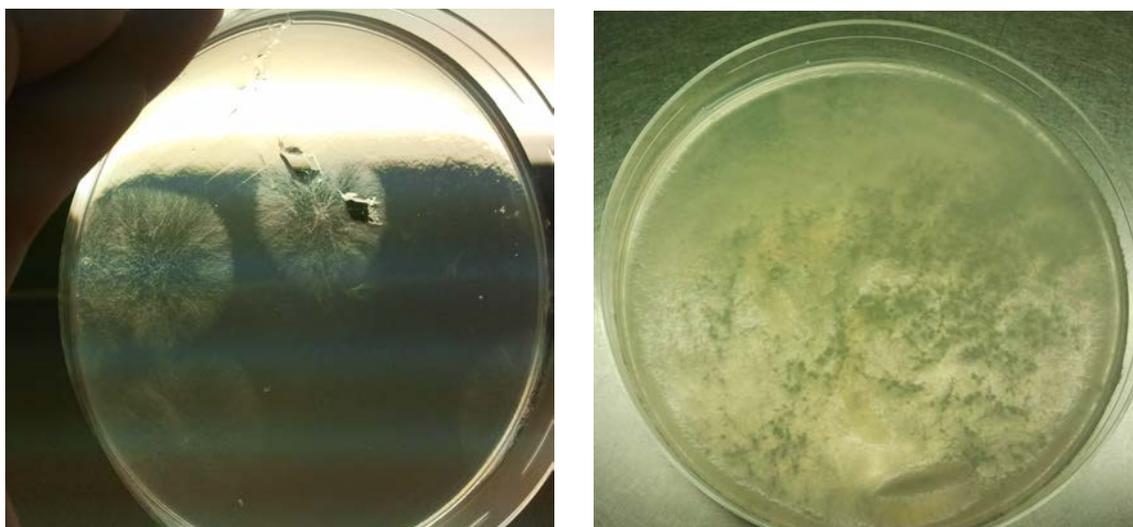
*B. fuckeliana* HM849047

*Botrytis* sp. UASWS0444

Los aislados sobre PDA se conservaron en frigorífico doméstico para su conservación y uso posterior (cultivos originales). En las Figuras 5-11 y 5-12 se muestran fotografías de frutos de tomate. y del aspecto de estos hongos creciendo en placas de Petri, respectivamente. Antes de proceder a su uso para las pruebas realizadas en el presente trabajo se realizaron subcultivos con idéntica forma de proceder.



**Figura 5.11.** Fruto de tomate afectados por podredumbre gris.  
Foto: María Almudena Fuentes López.



**Figura 5.12.** Aislado de *Botrytis cinerea*. Fotos: María Almudena Fuentes López.

Se realizaron los siguientes tratamientos para la prueba *in vitro*:

- Testigo. Contiene 19 mL de medio de cultivo PDA en la placa Petri con 1 mL de agua destilada esterilizada y 0,01% de tween 80 (v/v).
- Mandarina. 19 mL de medio de cultivo PDA en una placa Petri más 1 mL de extracto de aceites esenciales de mandarina (Herbarom®) a una concentración de 500  $\mu\text{L/L}$  y 0,01% de tween 80 (v/v) (equivalente a 500  $\mu\text{L}$  de extracto de aceites esenciales de mandarina en 1 L de medio de cultivo). La dosis correspondiente es de 10  $\mu\text{L/placa}$  Petri.

- Clavo. 19 mL de medio de cultivo PDA en una placa Petri más 1 mL de extracto de aceites esenciales de clavo (Herbarom®) a una concentración de 500  $\mu\text{L/L}$  y 0,01% de tween 80 (v/v) (equivalente a 500  $\mu\text{L}$  de extracto de aceites esenciales de clavo en 1 L de medio de cultivo). La dosis correspondiente es de 10  $\mu\text{L/placa Petri}$ .
- Tomillo. 19 mL de medio de cultivo PDA en una placa Petri más 1 mL de extracto de aceites esenciales de tomillo (Herbarom®), a una concentración de 500  $\mu\text{L/L}$  y 0,01% de tween 80 (v/v) (equivalente a 500  $\mu\text{L}$  de extracto de aceites esenciales de tomillo en 1 L de medio de cultivo). La dosis correspondiente es de 10  $\mu\text{L/placa Petri}$ .
- Canela. 19 mL de medio de cultivo PDA en una placa Petri más 1 mL de extracto de aceites esenciales de canela (Herbarom®), a una concentración de 500  $\mu\text{L/L}$  y 0,01% de tween 80 (v/v) (equivalente a 500  $\mu\text{L}$  de extracto de aceites esenciales de canela en 1 L de medio de cultivo). La dosis correspondiente es de 10  $\mu\text{L/placa Petri}$ .

La concentración de 500  $\mu\text{L/L}$  (dosis correspondiente de 10  $\mu\text{L/placa Petri}$ ) se escogió para tener un primer acercamiento en la evaluación del efecto de los extractos de aceites esenciales porque, de acuerdo con la bibliografía, es concentración es habitualmente utilizada para este tipo de compuestos cuando se estudian sus efectos antimicrobianos y antimicóticos (Shiva y Calvo, 2003).

### 5.2.2. Unidad de observación y número de repeticiones.

El procedimiento para la realización de la experiencia fue el siguiente:

La experiencia comenzó el día 23 de noviembre de 2012, y se extendió hasta el día 7 de diciembre de 2012, cuando la colonia transferida del hongo estaba próxima del borde de la placa de crecimiento. Para cada tratamiento se utilizó una única dosis y el tratamiento testigo tuvo ausencia de cualquier sustancia inhibidora. En el tratamiento con extractos de aceites esenciales de mandarina, clavo, tomillo y canela la concentración empleada fue 500  $\mu\text{L/L}$  (dosis correspondiente de 10  $\mu\text{L/placa Petri}$ ).

Para el tratamiento testigo se utilizaron 16 placas Petri, 4 placas fueron para el aislado de *Botrytis* en el tomate 1 de Don Miguel Sevilla Fructuoso (M1), otras 4 para el aislado de *Botrytis* en el tomate 2 de Don Miguel Sevilla Fructuoso (M2), otras 4 para el aislado de *Botrytis* en el tomate 1 del Grupo G's España (GS1), y otras 4 para el aislado de *Botrytis* en el tomate 2 del Grupo G's España (GS2). Para los tratamientos con extractos de aceites esenciales de mandarina, clavo, tomillo y canela se utilizaron en total 32 placas Petri: 16 para cada uno de los cuatro aislados. De estas 16 placas por hongo, se diferenciaron cuatro grupos de 4 placas Petri cada uno, para cada tratamiento. Es decir, se utilizaron 4 repeticiones por tratamiento y dosis que tuvieron valor de réplica. La unidad de observación o unidad experimental en este caso correspondía a una placa Petri, es decir, el lugar o recinto donde crece cada colonia individual de cada aislado bajo los efectos de los tratamientos. Cada una de ellas es independiente, pero las variables relacionadas con el crecimiento y tasa de crecimiento se miden sobre las mismas unidades de observación en función del tiempo.

Aunque se obtuvieron cuatro repeticiones de las variables medidas extraídas de cuatro unidades experimentales por tratamiento constituidas por cuatro placas de Petri independientes, en sentido estricto, estas repeticiones deben considerarse submuestras, más que réplicas, de acuerdo con Hammer (1981) porque no se maximiza el error experimental. Este error está minimizado, ya que todas las placas de cultivo se llenaron a partir del mismo medio de cultivo, se sembraron a partir de la misma colonia de cada uno de los aislados y se incubaron en la misma incubadora.

### 5.2.3. Definición, tipo y clasificación de las variables.

Las variables consideradas para valorar el efecto los extractos de aceites esenciales sobre cada uno de los aislados se definen a continuación:

**Área de crecimiento de la colonia (cm<sup>2</sup>).** Representa el área de la colonia desarrollada medida a intervalos diarios sobre la misma colonia (medidas repetidas). Esta medida se realiza generalmente como el diámetro de la colonia, pero consideramos que el diámetro de una colonia no caracteriza totalmente el crecimiento en los casos en los que la colonia no tiene un hábito de crecimiento totalmente circular. En algunos

casos no es fácil distinguir este proceso. La medición del área de la colonia se realizó, previa calibración con el diámetro de la placa Petri (8,5 cm), con fotografía digital de ésta y posterior análisis en el software ImageJ 1.42j for Mac, (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, Archivo JAR de Java). Esta variable es de tipo cuantitativa continua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

**Tasa de crecimiento (cm<sup>2</sup>/día).** Es el grado (velocidad) de crecimiento del hongo medido en su fase lineal de crecimiento cuando se desarrolla en un medio de cultivo sólido. La fase lineal de crecimiento es la fase en la que el hongo crece a pleno rendimiento una vez ha pasado la fase exponencial que suele durar solamente unas pocas horas y antes de entrar en la fase estacionaria donde la velocidad de crecimiento disminuye.

Esta variable se mide como la pendiente de la recta (fase lineal del desarrollo del hongo en placa Petri) obtenida cuando se representa en unos ejes cartesianos el tiempo (eje X) y el área o diámetro de la colonia (eje Y), obviando la fases de crecimiento que no corresponden a la fase lineal. También se obtiene aplicando la siguiente ecuación:

$$\mu \text{ (cm}^2\text{/día)} = \frac{A_{(t+1)} - A_t}{(t + 1) - t}$$

donde,

$\mu$  : Tasa de crecimiento (cm<sup>2</sup>/día),

$A_{(t+1)}$  : Área de la colonia un día determinado (cm<sup>2</sup>),

$A_t$  : Área de la colonia obtenida un día anterior previamente fijado a  $t + 1$  (cm<sup>2</sup>),

$t + 1$  : Un día determinado de medida de área (número de días) y,

$t$  : Un día anterior considerado a  $t + 1$  (días).

En el presente trabajo se ha calculado la tasa de crecimiento aplicando la ecuación anterior, generalmente entre los días 1 y 4 para el testigo (excepto en M2 que tuvo la fase lineal más larga, llegando incluso al día 8), y entre los días 3 y 7 como

media aproximada para los tratamientos con aceites, cuando de acuerdo con los gráficos obtenidos no había duda de que el hongo se encontraba en la fase lineal de crecimiento. Esta variable es cuantitativa continua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

**Duración de la fase lineal (días).** Esta variable representa los días transcurridos entre el final de la fase exponencial (generalmente la fase de latencia, ya que la exponencial suele pasar desapercibida, debido a que dura muy pocas horas) y el inicio de la fase estacionaria o de deceleración. Se obtiene a partir de los gráficos tiempo – área, detectando la zona lineal visualmente en el gráfico. Es una variable de tipo cuantitativa discontinua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

La duración fase lineal está comprendida desde que detectamos su inicio hasta que detectamos la fase estacionaria del hongo.

**Inhibición del crecimiento (%).** Representa el efecto del tratamiento retardador del crecimiento del desarrollo del hongo en función del crecimiento de éste cuando las sustancias retardadoras no están presentes. Se obtiene aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición del crecimiento (\%)} = \frac{A_{control} - A}{A_{control}}$$

donde,

$A_{control}$  : Área media de la colonia del tratamiento testigo (cm<sup>2</sup>) en un momento determinado.

$A$  : Área media de la colonia del tratamiento con una concentración determinada de aceite esencial de mandarina, tomillo, canela o clavo (cm<sup>2</sup>) al mismo tiempo de medida que el área anterior.

Es una variable de tipo cuantitativa continua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

#### 5.2.4. Establecimiento de las hipótesis.

Una hipótesis es una idea basada en un conjunto de conocimientos plausibles acerca de un problema o pregunta, por su naturaleza se trata de una conjetura o idea acerca de la posible relación entre dos o más fenómenos observables o variables. Una hipótesis estadística es una presunción acerca de parámetros de una población y el test estadístico de la hipótesis es la utilización de datos procedentes de una muestra para asumir o rechazar una presunción acerca de la población. Las hipótesis definen las características del plan de trabajo a desarrollar y el tipo de test estadístico que ha de ser utilizado para su aceptación o rechazo.

En el primer punto del presente capítulo se ha estudiado y puesto de manifiesto que ciertos extractos de aceites esenciales pueden influir en el crecimiento y desarrollo de ciertos hongos. Los experimentos que se van a desarrollar a continuación están planeados para poner de manifiesto ese posible efecto y poder medirlo sobre los aislados de *Botrytis* aislados de diferentes frutos de tomate. Con esto último se pretende poner de manifiesto si la respuesta depende del aislado.

Por lo anteriormente dicho, las hipótesis que se pretenden contrastar fueron las siguientes:

1.- Los aceites esenciales de mandarina, clavo, tomillo y canela ejercen influencia sobre el crecimiento *in vitro* de *Botrytis*.

2.- Los aislados de hongos patógenos obtenidos de distintas variedades de frutos de tomate, responden de manera distintas a los microbianos utilizados.

El análisis de estas hipótesis va a ser fundamental para establecer la eficacia de estos compuestos en su aplicación a los frutos. Evidentemente, el hecho de tener un efecto beneficioso *in vitro* no quiere decir que sea extrapolable a obtenerlo *in vivo*, lo que sí es evidente es que tras este experimento se podrá evaluar el efecto fungicida o fungistático como tal de los compuestos ensayados.

### 5.2.5. Análisis estadístico.

Dado que las hipótesis que se quieren contrastar, definen las características del plan de trabajo que se quiere trazar, hay que tener en cuenta que una de las hipótesis planteadas incluye el efecto del aislado sobre la respuesta que tienen las sustancias retardadoras sobre su crecimiento. Evidentemente el estudio es significativo pues con él se puede aumentar la posible variabilidad entre los aislados. Esto significa que el alcance de las conclusiones no va a ser crucial a la hora de caracterizar a la población de aislados de *Botrytis* de los tomates. Es por ello, por lo que se ha optado a realizar un análisis básico de los datos utilizando para ellos los estadísticos de la media aritmética como medida de centralización y la desviación estándar como medida de la dispersión. La utilización del ANOVA o análisis de la varianza se ha evitado fundamentalmente porque el tamaño de la muestra no es elevado ( $n=4$ ) y la falta del concepto réplica como tal que permitiría poner de manifiesto diferencias significativas cuando no las hay. El error se minimiza también, dado que las medidas de las áreas se tomaron de las mismas colonias en función del tiempo, es decir, es un caso de diseño de medidas repetidas. En este caso se requeriría otro tipo de análisis ANOVA, el denominado ANOVA de medidas repetidas.

Atendiendo al diseño del protocolo y la hipótesis a considerar, podemos definir que el experimento consta de las siguientes variables independientes controladas o factores: aislado (4 niveles) y tipo de retardador o inhibidor (aceites esenciales) con 4 niveles.

### 5.2.6. Protocolo de las mediciones.

Primeramente se preparó el medio de cultivo de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Después de su esterilización en autoclave, se dejó reposar en un baño termostático a 48°C. Las placas Petri se rotularon y dispusieron para agregar 1 mL de la emulsión a valorar convenientemente diluida en agua destilada esterilizada con tween 80 (0,01%) para aumentar la dispersión de los aceites lipofílicos en el medio de cultivo, que es hidrofílico. Al tratamiento testigo se agregó 1 mL de agua destilada esterilizada para que presentara la misma cantidad de medio de cultivo que presentaban las placas

con sustancias a tratar. Una vez que cada placa tenía 1 mL del compuesto correspondiente, 10  $\mu$ L de extracto de aceites, se procedió a rellenar las placas con 19 mL de medio de cultivo a 48°C. Las placas se movieron cuidadosamente en cruz y en giros alternos para homogenizar la emulsión con el medio de cultivo en toda la placa. Los extractos de aceites esenciales no se esterilizaron para evitar la desnaturalización de compuestos decisivos. Previamente comprobamos que no crecían bacterias ni hongos a partir de los extractos, probablemente porque ya venían esterilizados de fábrica o que se inactivaron todas las células de microorganismos presentes por la alta concentración de compuestos antimicrobianos presentes en los extractos puros.

Las placas se dejaron reposar durante un día dentro de la cabina de flujo para proceder a la inoculación del hongo anteriormente purificado y aislado. Para ello se partió de cultivos de los diferentes aislados realizados a partir de los aislados iniciales de los frutos o de las placas origen que se conservaban en el frigorífico. Entonces se depositó una pequeña porción de cultivo del hongo cortada asépticamente del borde de la colonia crecida de 6 días a 26°C con un bisturí en el centro de la placa nueva (subcultivo). Todo este procedimiento se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar, para asegurar la máxima asepsia en el trabajo, y después se depositaron las placas en la incubadora a 26°C durante los días necesarios hasta que el tratamiento testigo creció cerca del borde de la placa. Las placas se sacaban de la incubadora por pocos minutos para apuntar las observaciones y medir el tamaño de la colonia (proceso rápido porque se hizo con un montaje fotográfico). Para llevar a cabo la toma de medidas, se midió el tamaño de cada colonia, tomando fotos para luego medir el área con el programa informático ImageJ 1.42j.

Para la representación de los gráficos de evolución de crecimiento se tomó el valor medio por día de las cuatro repeticiones (submuestras en este caso) y se representó la desviación estándar de la medición por medio de una barra vertical pasando por el valor medio. Para el resto de las variables consideradas, como son la tasa de crecimiento, la duración de la fase lineal y la inhibición del crecimiento, definidas en el apartado 5.2.3., se elaboraron tablas con cada uno de los valores medios y su desviación estándar.

Para analizar la influencia de estos tratamientos sobre la masa de micelio de *Botrytis cinerea*, se procedió a extraer el micelio superficial (aéreo) y sumergido de cada placa, con ayuda de una espátula, introduciéndolo en tubos de ensayo. Posteriormente, fueron introducidos en una estufa a 78°C para la eliminación total del agua durante no menos de 24 horas, en este caso, ocho días. Por último, se procedió a pesar el micelio seco con una balanza de precisión.

Se observaron al microscopio el aspecto de las hifas y se compararon con las hifas del tratamiento testigo por si se observaba algún efecto del aceite esencial sobre la morfología del hongo.

También se procedió a realizar pruebas para observar la influencia de estos tratamientos sobre la conidiogénesis y el tamaño de los conidios.

Para el cálculo de los conidios por unidad de superficie se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{conidios/cm}^2 = \frac{(V.\text{agua} \cdot c)}{(0,00025 * A.\text{micelio})}$$

donde,

*V. agua*: volumen de agua (mL),

*c* : número medio de conidios en la unidad mínima de recuento (conidios),

0,00025: volumen de la unidad mínima de recuento (mm<sup>3</sup>),

*A micelio*: Área de micelio (cm<sup>2</sup>).

### 5.3. Resultados y discusión.

#### Efecto del tratamiento testigo y de los aceites esenciales de mandarina, clavo, tomillo y canela sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea*.

En las Figuras 5.13; 5.14; 5.15.; 5.16 y 5.17 se aprecia el crecimiento de *Botrytis cinerea* aislado de la podredumbre de tomate en placas tratadas con 500 µL/L de los

extractos de aceites esenciales de mandarina, clavo, tomillo y canela y tratamiento testigo.

El mayor grado de crecimiento se obtuvo con las placas tratadas con el extracto de mandarina, cuyos resultados fueron iguales a las tratadas con la solución testigo sin aceite esencial; además las placas tratadas con el extracto de canela también obtuvieron un crecimiento similar. Como se observa, el período de latencia o de adaptación del hongo fue de sólo dos días para la mayoría de los tratamientos. Sin embargo, en las placas tratadas con los extractos de clavo y tomillo se observó un crecimiento menor. Esto indica que, a una dosis de 500 µL/L de estos aceites esenciales, el crecimiento de *Botrytis cinerea* queda bastante reducido. Esto puede ser debido a que los aceites esenciales de clavo y tomillo presentan una elevada actividad antimicrobiana contra mohos, levaduras y bacterias patógenas como *Bacillus anthracis* (Davidson, 1997).

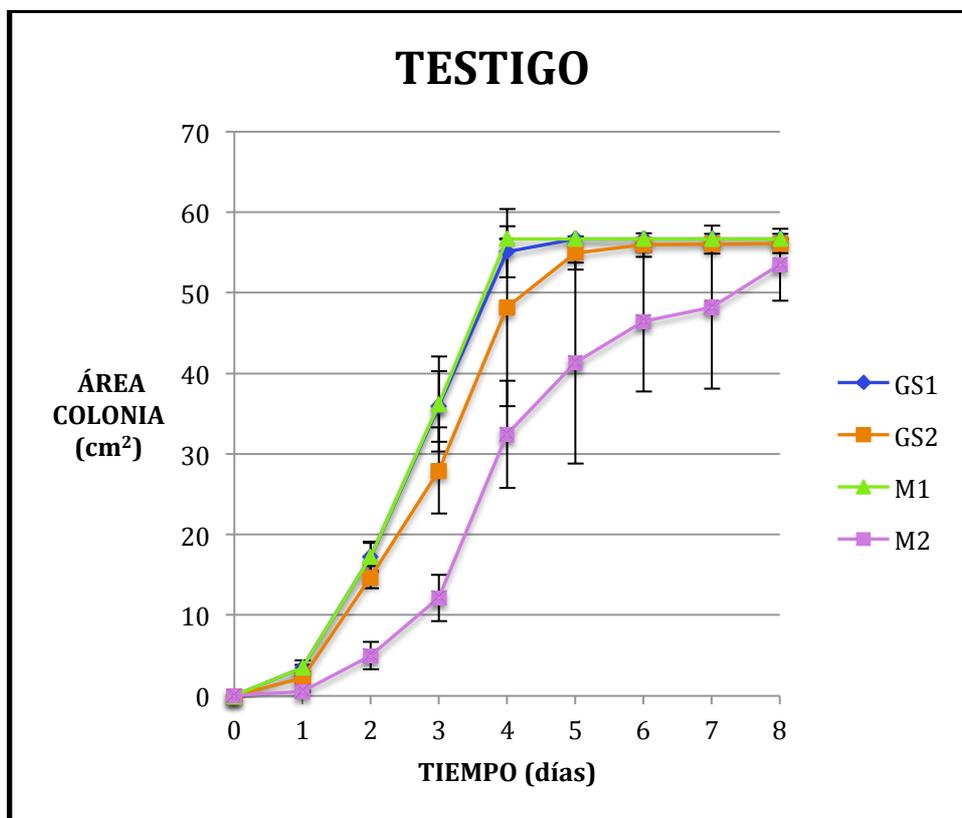
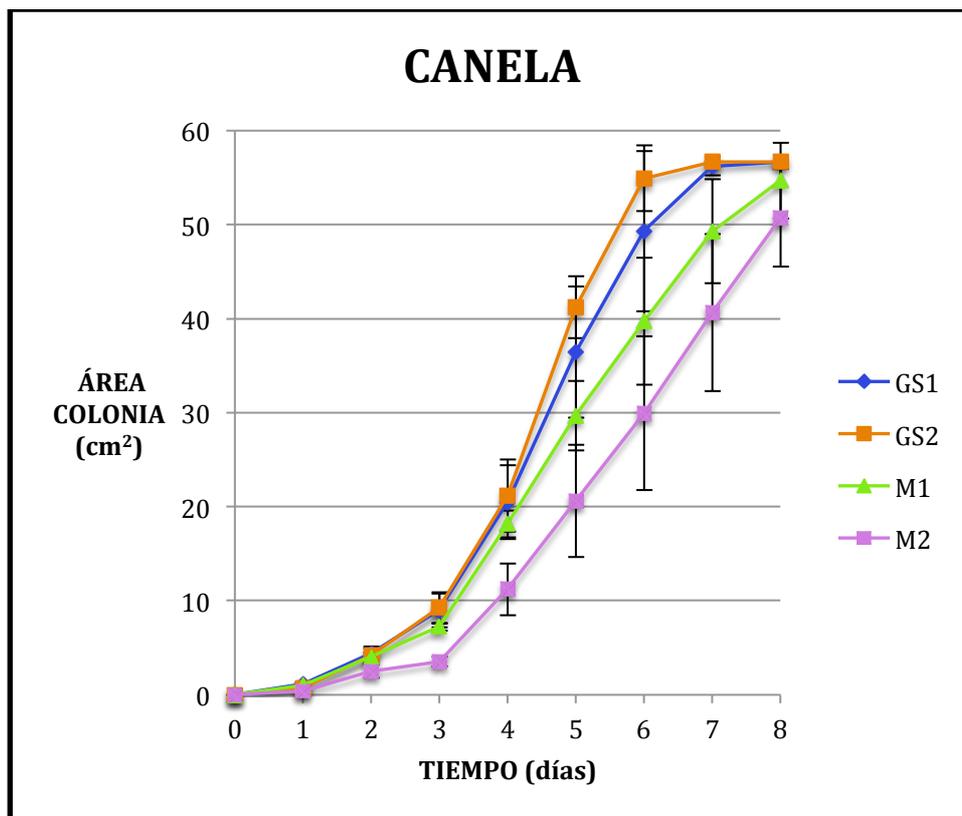


Figura 5.13. Efecto del tratamiento testigo sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* aislado de tomate en cada uno de los aislados. Las barras verticales son la desviación estándar.

En la Figura 5.13 se muestra la tasa de crecimiento del hongo para el tratamiento testigo, indicando la velocidad de crecimiento del hongo durante su fase de desarrollo en placa Petri.

La tasa de crecimiento del aislado 1 del Grupo G's España (GS1) y del aislado 1 de Don Miguel Sevilla Fructuoso (M1) presentaron un crecimiento casi idéntico y mayor que los del aislado 2 del Grupo G's España (GS2) y los del aislado 2 de Don Miguel Sevilla Fructuoso (M2). Aunque la mayor diferencia se apreció en M2 que fue el que menos crece.

La fase de latencia duró un día aproximadamente para todos. Excepto en M2, en que la fase de deceleración llegó a partir del 4º día de incubación.

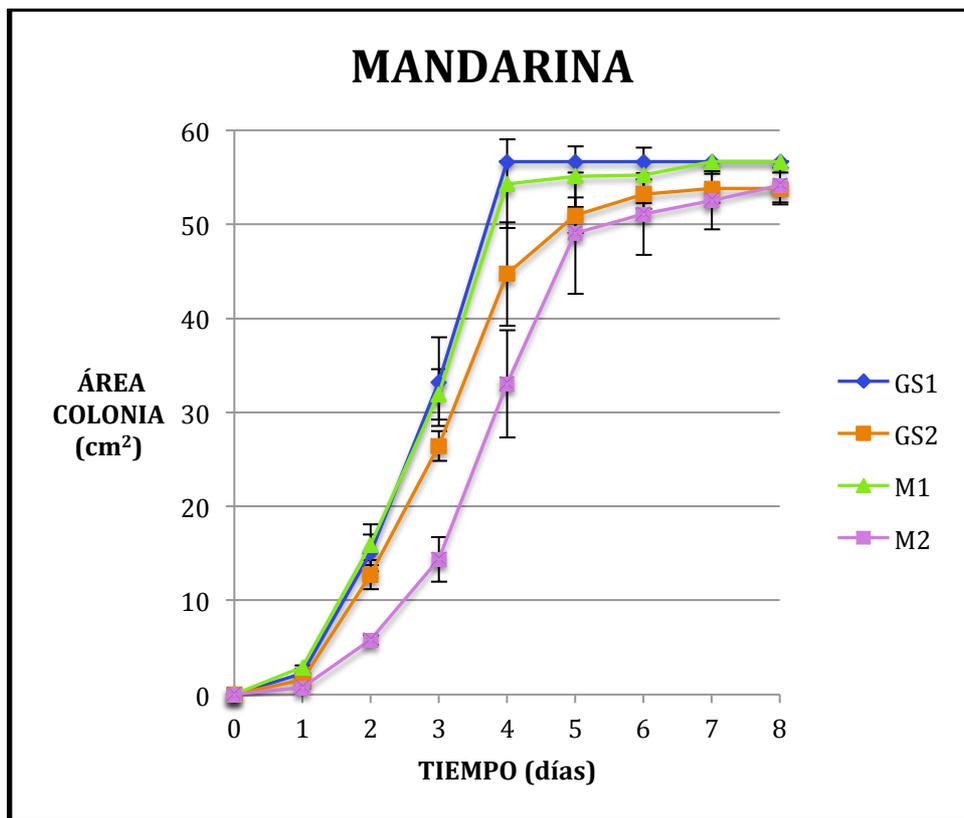


**Figura 5.14.** Efecto de 500  $\mu\text{L/L}$  de aceite esencial de canela sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* aislado de tomate en cada uno de los aislados. Las barras verticales son la desviación estándar.

En la Figura 5.14 se muestra la tasa de crecimiento del hongo para el tratamiento con canela, indicando la velocidad de crecimiento del hongo durante su fase de crecimiento lineal.

Los aislados de GS crecieron más que los de M. El aislado GS2 llegó a cubrir todo el área de la placa Petri en el sexto día.

No se notó el efecto retardador del aceite, ya que la fase de latencia duró 1 día igual que en el testigo, y debería de haber sido más larga. La fase de deceleración se apreció en el sexto día, y comparado con la gráfica del tratamiento testigo se concluye que la canela aceleró el crecimiento en esta dosis.

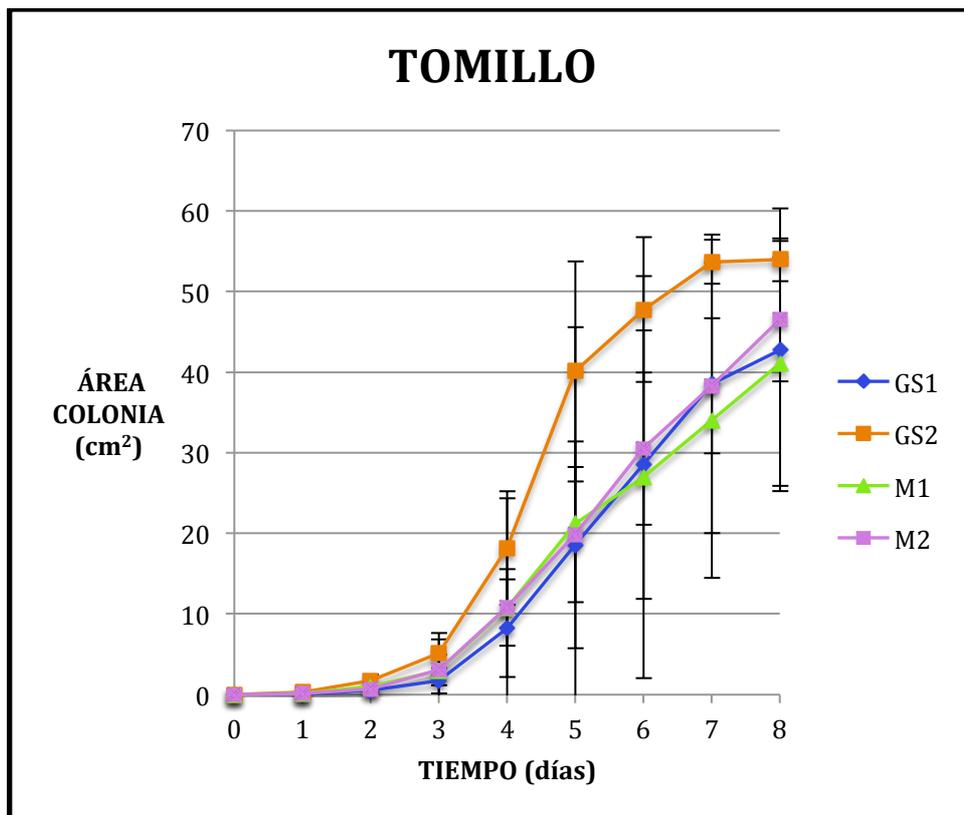


**Figura 5.15.** Efecto de 500  $\mu\text{L/L}$  de aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* aislado de tomate en cada uno de los aislados. Las barras verticales son la desviación estándar.

En la Figura 5.15 se muestra la tasa de crecimiento del hongo para el tratamiento con mandarina, indicando la velocidad de crecimiento del hongo durante su fase de crecimiento lineal.

En GS1 y M1 los aislados crecieron más deprisa, por lo que dependiendo del aislado, el hongo crece diferente tanto en cuanto a velocidad como a morfología. Este aceite induce un crecimiento lo más parecido al tratamiento testigo. Especialmente estimula el crecimiento en el aislado GS1 que, comparado con el tratamiento testigo, presentaba menos crecimiento.

La fase de deceleración empezó a partir del 4º día para GS1 y M1 y los otros dos a partir del 5º día. Se observa perfectamente la fase lineal de GS1 y M1 (Fig. 5.15). La mandarina sextuplicó el crecimiento de M2 en el tercer día respecto al testigo.

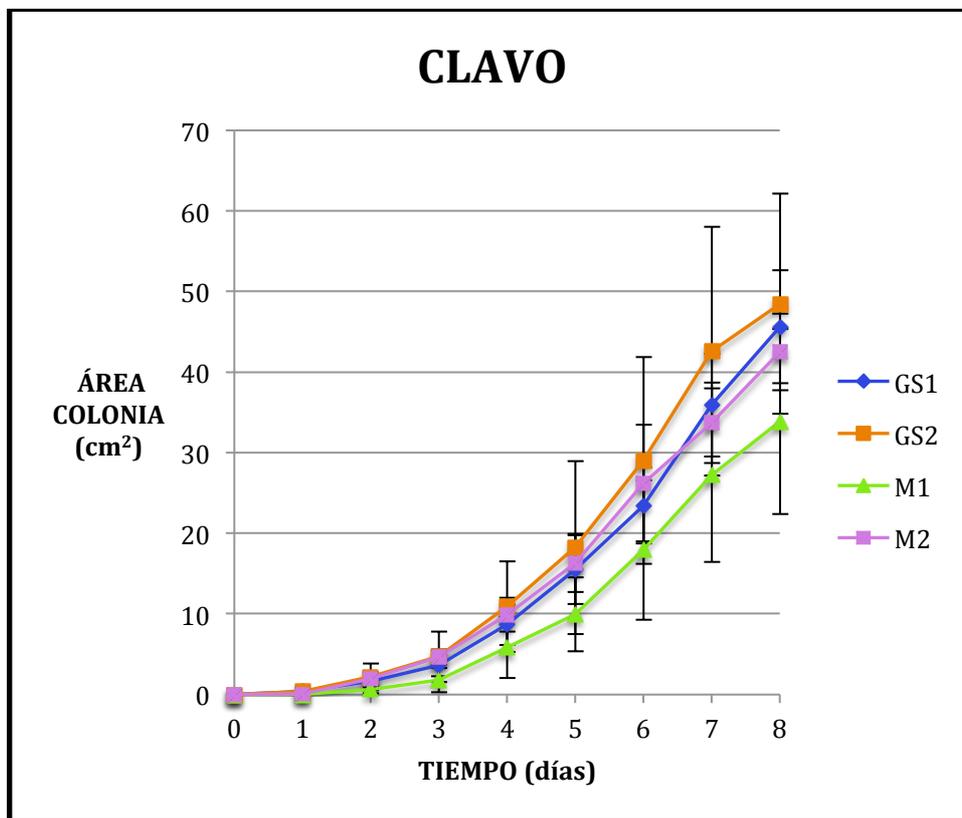


**Figura 5.16.** Efecto de 500 µL/L de aceite esencial de tomillo sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* aislado de tomate en cada uno de los aislados. Las barras verticales son la desviación estándar.

En la Figura 5.16 se muestra la tasa de crecimiento del hongo para el tratamiento con tomillo, indicando la velocidad de crecimiento del hongo durante su fase de crecimiento lineal.

El aceite esencial de tomillo estimuló el crecimiento en todos los aislados, especialmente el del aislado GS2, que fue casi el doble en el 5º día. Los otros tres tratamientos tuvieron un crecimiento muy parecido.

La fase de latencia duró casi dos días y en el tratamiento testigo apenas duraba un día.



**Figura 5.17.** Efecto de 500  $\mu\text{L/L}$  de aceite esencial de clavo sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* aislado de tomate en cada uno de los aislados. Las barras verticales son la desviación estándar.

En la Figura 5.17 se muestra la tasa de crecimiento del hongo para el tratamiento con clavo, indicando la velocidad de crecimiento del hongo durante su fase de crecimiento lineal.

La tasa de crecimiento de los aislados de GS fue mayor que los M, pero el que menos creció fue el aislado M1. La fase de latencia duró hasta casi el día 2 y a partir del día 2 se dio una fase de crecimiento lineal.

El aislado M1 presentó una cinética de crecimiento hasta el día 3 que demostró una adaptación al medio y un posterior inicio de la fase lineal a partir de este día. El aislado M1 presentó una fase de crecimiento lineal de menor pendiente porque se presentó un crecimiento más lento. Los aislados de M2 y GS1 y GS2 tuvieron una tasa de crecimiento pareja hasta el día 5, en la que la tasa de GS2 fue mayor a las otras dos. La tasa final de crecimiento de M1 fue menor de la mitad de las otras tres. Las barras de error elevadas de los aislados de GS demostraron una mayor variabilidad de respuesta entre las repeticiones, por tanto, menos precisión.

**Efecto del tratamiento testigo y de los aceites esenciales de mandarina, clavo, tomillo y canela sobre la tasa de crecimiento, la duración de la fase lineal y la inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea*.**

En las Tablas 5.1.; 5.2.; 5.3. y 5.4. se muestra la tasa de crecimiento del hongo para cada aislado que, como tal tasa, indica la velocidad de crecimiento del hongo durante su fase de crecimiento lineal. También incluye la duración de la fase lineal de crecimiento, expresada en días, y la inhibición del crecimiento en relación al tratamiento testigo, expresada en porcentaje. Esta última sólo se calculó para aquellos tratamientos en lo que se observó inhibición o reducción del crecimiento de *B. cinerea*.

**Tabla 5.1.** Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de *B. cinerea* aislado del tomate 1 del Grupo G's España para los diferentes tratamientos utilizados a base de 500 µL/L de los extractos de distintos aceites esenciales.

TRATAMIENTO GS1	TASA DE CRECIMIENTO (cm <sup>2</sup> /día)	DURACIÓN FASE LINEAL (días)	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)
TESTIGO	17,0 ± 1,0	3,0 ± 0,0	-
CANELA	14,0 ± 2,5	3,5 ± 0,5	62,5 ± 0,0
MANDARINA	18,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
TOMILLO	12,5 ± 4,5	2,0 ± 0,0	85,0 ± 0,0
CLAVO	9,0 ± 1,0	4,5 ± 0,5	84,5 ± 0,0

**Tabla 5.2.** Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de *B. cinerea* aislado del tomate 2 del Grupo G's España para los diferentes tratamientos utilizados a base de 500 µL/L de los extractos de distintos aceites esenciales.

TRATAMIENTO GS2	TASA DE CRECIMIENTO (cm <sup>2</sup> /día)	DURACIÓN FASE LINEAL (días)	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)
TESTIGO	16,0 ± 2,5	3,5 ± 0,5	-
CANELA	16,0 ± 0,5	3,0 ± 0,5	50,0 ± 0,0
MANDARINA	14,0 ± 2,0	3,5 ± 0,5	16,5 ± 0,0
TOMILLO	13,0 ± 0,5	4,0 ± 0,5	51,0 ± 0,5
CLAVO	10,5 ± 4,5	4,5 ± 1,0	71,0 ± 0,0

**Tabla 5.3.** Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de *B. cinerea* aislado del tomate 1 de Don Miguel Sevilla Fructuoso para los diferentes tratamientos utilizados a base de 500 µL/L de los extractos de distintos aceites esenciales.

TRATAMIENTO M1	TASA DE CRECIMIENTO (cm <sup>2</sup> /día)	DURACIÓN FASE LINEAL (días)	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)
TESTIGO	17,5 ± 0,0	3,0 ± 0,0	-
CANELA	10,0 ± 2,0	5,0 ± 0,5	68,0 ± 0,0
MANDARINA	17,0 ± 1,5	3,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0
TOMILLO	13,0 ± 6,5	3,0 ± 1,0	81,0 ± 0,0
CLAVO	6,5 ± 1,5	4,5 ± 1,0	85,0 ± 0,0

**Tabla 5.4.** Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de *B. cinerea* aislado del tomate 2 de Don Miguel Sevilla Fructuoso para los diferentes tratamientos utilizados a base de 500 µL/L de los extractos de distintos aceites esenciales.

TRATAMIENTO M2	TASA DE CRECIMIENTO (cm <sup>2</sup> /día)	DURACIÓN FASE LINEAL (días)	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)
TESTIGO	9,5 ± 3,5	6,0 ± 1,5	-
CANELA	9,5 ± 1,0	5,0 ± 0,0	20,5 ± 0,5
MANDARINA	12,0 ± 1,5	4,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
TOMILLO	9,0 ± 1,5	5,0 ± 0,0	31,0 ± 0,5
CLAVO	8,7 ± 0,5	3,0 ± 0,0	45,0 ± 0,5

En M2, las tasas de crecimiento fueron similares en el caso del testigo y el aceite esencial de canela porque las pendientes de las curvas en la fase lineal fueron muy parecidas. Sin embargo, la canela inhibió el 20%. Esto es porque cuando el control entra en la fase estacionaria, el hongo en el aceite esencial de canela está en pleno proceso lineal, es decir, lo que hace la canela es atrasar el inicio de la fase lineal, pero una vez que el hongo entra en ella, crece con la misma rapidez que el control. De ahí la diferencia. El efecto sería debido a que el aceite pierde su efecto rápidamente debido posiblemente a que se volatiliza.

El aceite esencial de canela retrasó el inicio de la fase lineal y una vez que entra en esta fase, sigue un crecimiento normal (como el testigo). El aceite esencial de la canela ejerce su efecto en los primeros días solo y quizás esto sea debido a que se volatilice con facilidad.

Esta situación ocurre en los cuatro tratamientos, salvo en M1, en que la canela retrasa bastante la tasa de crecimiento y a la vez la reduce. La tasa de crecimiento del testigo y la canela es prácticamente la misma en GS1 por lo que tiene algo de impedimento. La canela en GS2 presenta la misma tasa de crecimiento que el control y está inhibido el 50% por lo explicado anteriormente.

El aceite esencial de mandarina presentó poca inhibición y a veces la tasa de crecimiento es mayor que en la del testigo. No afecta prácticamente al desarrollo del

hongo excepto en GS2 que se vio ligeramente afectado y, también, en M2 que incluso aumentó la tasa de crecimiento.

El aceite esencial de mandarina no inhibió el crecimiento de *Botrytis cinerea*, sino que a veces hasta lo estimuló, puesto que tuvo una tasa de crecimiento superior a la solución testigo (12 cm<sup>2</sup>/día frente a 9,5 cm<sup>2</sup>/día, respectivamente, en el caso de M2). La explicación a este efecto puede deberse a que los extractos de aceites esenciales de mandarina pueden contener ciertas sustancias favorecedoras del crecimiento que enmascaran el escaso efecto inhibitor de las sustancias antimicrobianas que poseen. Un efecto similar fue observado por Saks y Barkai-Golan (1995), estudiando los efectos del gel de *Aloe vera* sobre el desarrollo de *P. digitatum*, *P. expansum*, *Alternari alternata* y *Botrytis cinerea*.

El aceite esencial de tomillo redujo la tasa de crecimiento en todos los aislados y presentó una inhibición del crecimiento bastante alta, de hasta el 85% en el caso de GS1. Este aceite alargó la fase lineal, pues ésta solio comenzar el día 3 a diferencia del aceite esencial de mandarina que comenzó el día 1. El aceite esencial de clavo, redujo el crecimiento casi el 50% en GS2, y presentó hasta un 85% de inhibición en M1. Presentó la fase lineal más larga, casi 4 días, por lo que no llegó a alcanzar la fase estacionaria durante el tiempo que duró el experimento. Sin embargo, en M2, aumentó la tasa de crecimiento, aunque retrasó la fase lineal a 3 días pero la inhibición del crecimiento alcanzó el 45%, por lo que el inicio de la fase lineal también lo atrasó.

El aceite esencial de clavo fue el mejor de todos los ensayados, ya que fue el que más inhibió el crecimiento del hongo. Este efecto fue superior en el aislado M1, seguido de GS1. En M2 el efecto es más reducido.

Efecto del tratamiento testigo y de los aceites esenciales de mandarina, clavo, tomillo y canela sobre la conidiogénesis y la longitud de los conidios de *Botrytis cinerea*.

En las Tablas 5.5; 5.6.; 5.7 y 5.8. se muestran las medias realizadas a un recuento de diez muestras por tratamiento para el cálculo de la conidiogénesis, y diez muestras para el tamaño de los conidios por cada uno de los cuatro aislados.

**Tabla 5.5.** Conidiogénesis (conidios/cm<sup>2</sup>) y tamaño de los conidios (µm) de *B. cinerea* aislado del tomate 1 de Don Miguel Sevilla Fructuoso para los diferentes tratamientos utilizados a base de 500 µL/L de los extractos de distintos aceites esenciales.

		M 1				
		TESTIGO	CANELA	MANDARINA	CLAVO	TOMILLO
Repetición 1	Conidiogénesis (conidios/cm <sup>2</sup> )	900	3.600	5.200	200	4.300
	Longitud conidios (µm)	10	11	12	7	13
Repetición 2	Conidiogénesis (conidios/cm <sup>2</sup> )	9.600	3.800	7.800	800	0
	Longitud conidios (µm)	13	12	12	10	0

**Tabla 5.6.** Conidiogénesis (conidios/cm<sup>2</sup>) y tamaño de los conidios (µm) de *B. cinerea* aislado del tomate 2 de Don Miguel Sevilla Fructuoso para los diferentes tratamientos utilizados a base de 500 µL/L de los extractos de distintos aceites esenciales.

		M 2				
		TESTIGO	CANELA	MANDARINA	CLAVO	TOMILLO
Repetición 1	Conidiogénesis (conidios/cm <sup>2</sup> )	600	1.200	2.300	100	2.500
	Longitud conidios (µm)	9	12	11	5	13
Repetición 2	Conidiogénesis (conidios/cm <sup>2</sup> )	400	2.300	4.500	0	0
	Longitud conidios (µm)	10	13	11	0	0

**Tabla 5.7.** Conidiogénesis (conidios/cm<sup>2</sup>) y tamaño de los conidios (µm) de *B. cinerea* aislado del tomate 1 del Grupo G's España para los diferentes tratamientos utilizados a base de 500 µL/L de los extractos de distintos aceites esenciales.

		GS 1				
		TESTIGO	CANELA	MANDARINA	CLAVO	TOMILLO
Repetición 1	Conidiogénesis (conidios/cm <sup>2</sup> )	2.200	1.700	4.400	0	600
	Longitud conidios (µm)	11	12	12	0	14
Repetición 2	Conidiogénesis (conidios/cm <sup>2</sup> )	3.000	2.900	3.400	200	0
	Longitud conidios (µm)	12	12	13	12	0

**Tabla 5.8.** Conidiogénesis (conidios/cm<sup>2</sup>) y tamaño de los conidios (µm) de *B. cinerea* aislado del tomate 2 del Grupo G's España para los diferentes tratamientos utilizados a base de 500 µL/L de los extractos de distintos aceites esenciales.

		GS 2				
		TESTIGO	CANELA	MANDARINA	CLAVO	TOMILLO
Repetición 1	Conidiogénesis (conidios/cm <sup>2</sup> )	1.200	2.400	5.100	0	100
	Longitud conidios (µm)	10	10	11	0	10
Repetición 2	Conidiogénesis (conidios/cm <sup>2</sup> )	1.400	2.200	2.700	300	0
	Longitud conidios (µm)	11	12	10	11	0

Como la variabilidad observada entre las dos repeticiones ha sido muy elevada, se ha decidido discutir los resultados sin agrupar las medidas individuales, salvo excepciones. No hacemos medias ya que hay mucha variabilidad y no mostraría significación alguna entre el efecto de los tratamientos. Esta variable se debe considerar

a nivel orientativo, especialmente para darse una idea de los valores absolutos observados.

Los conidios presentaron en su mayoría una forma elíptica típica de *B. cinerea* y un tamaño variable, con una longitud media aproximada de 10  $\mu\text{m}$ .

Donde se obtuvo mayor conidiogénesis fue con el uso del aceite esencial de mandarina que parece ser que la estimula. El aceite esencial de canela también estimula pero en menor medida que el de mandarina.

El aceite esencial de tomillo redujo la conidiogénesis en GS pero no en M. El aceite esencial de clavo redujo bastante la conidiogénesis. Mientras que el de clavo redujo, en los aislados de M, un tercio el tamaño de los conidios con respecto al testigo.

**Efecto del tratamiento testigo y de los aceites esenciales de mandarina, clavo, tomillo y canela sobre peso del micelio de *Botrytis cinerea*.**

En la Tabla 5.9 se muestra la influencia de los diferentes aceites esenciales frente a la solución testigo, sobre la masa de micelio de *B. cinerea* para los cuatro aislados estudiados (M1, M2, GS1 y GS2). Se tomaron valores de dos repeticiones por cada tratamiento (ya fuese testigo o cada uno de los cuatro aceites utilizados).

**Tabla 5.9.** Peso del micelio total (aéreo y sumergido) de *B. cinerea* aislado de los tomates 1 y 2 de Don Miguel Sevilla Fructuoso y los tomates 1 y 2 del Grupo G's España para los diferentes tratamientos utilizados a base de 500 µL/L de los extractos de distintos aceites esenciales.

	PESO DEL MICELIO (mg)			
	M1	M2	GS1	GS2
TESTIGO	456,9	211,8	324,9	373,7
TESTIGO	836	539,5	443,5	533,4
CLAVO	387	406,9	240,2	257,3
CLAVO	345,7	-	410,2	322,7
CANELA	229,5	352	395,7	98,8
CANELA	335,1	245	383,3	189
MANDARINA	462,1	493,2	466,4	328,8
MANDARINA	316,2	517,8	469,3	319,8
TOMILLO	431	455,5	487,2	393
TOMILLO	220,5	410	361,6	280,4

Las placas tratadas con el aceite esencial de mandarina obtuvieron una masa de micelio medida en miligramos muy similar a la de la solución testigo (agua destilada). Con los demás aceites si que se aprecia una disminución de la masa del micelio debido a que los inhibidores del desarrollo del hongo conllevan a un crecimiento menor del mismo.

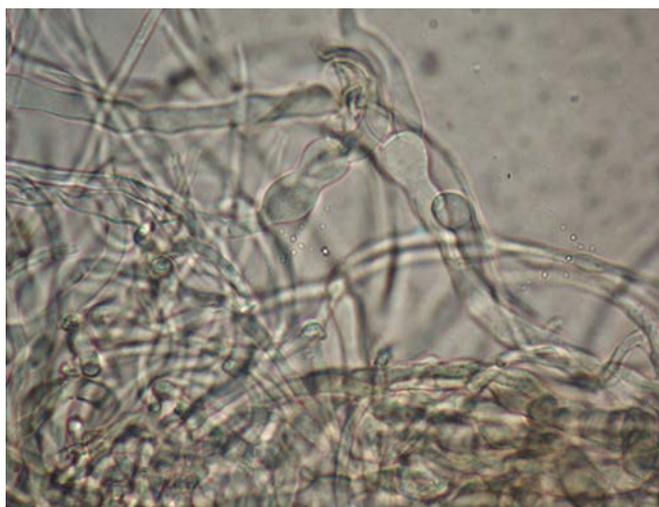
Esta acción inhibidora en el crecimiento de la masa de micelio de hongos fitopatógenos fue reportada por Bernal Alcocer *et al*, (2005) evaluando la actividad fungicida de metabolitos secundarios como los alcaloides, presentes en cerca del 20% de todas las especies de plantas. Estudiando el efecto de los alcaloides presentes en distintas especies de *Lupinus* observaron que el peso seco promedio del micelio de *S. rolfsii*, *A. solani* y *R. solani*, en todas las concentraciones del extracto, fue menor al

peso seco que se registró en el testigo (0 ppm), observándose una tendencia a incrementarse significativamente la inhibición del crecimiento micelial de 30 a 94% conforme aumentaron las concentraciones de extracto, pero sin diferencias significativas entre las concentraciones más altas (10.000 y 20.000 ppm). Sin embargo, a concentraciones más bajas se observó un mayor incremento en el peso seco del micelio con respecto al testigo (0 ppm).

**Efecto del tratamiento testigo y de los aceites esenciales de mandarina, clavo, tomillo y canela sobre el aspecto de las hifas de *Botrytis cinerea*.**

El 7 de diciembre de 2012 se observó el aspecto de las hifas de *B. cinerea* al microscopio y se compararon con las del testigo. Se observó que el aceite esencial inhibió el crecimiento provocando daños a las hifas a modo de ensanchamientos e irregularidades en las hifas (Fig. 5-18). En el testigo de GS1 apreciamos hifas hialinas muy largas y poco ramificadas, y con menos hifas acintadas.

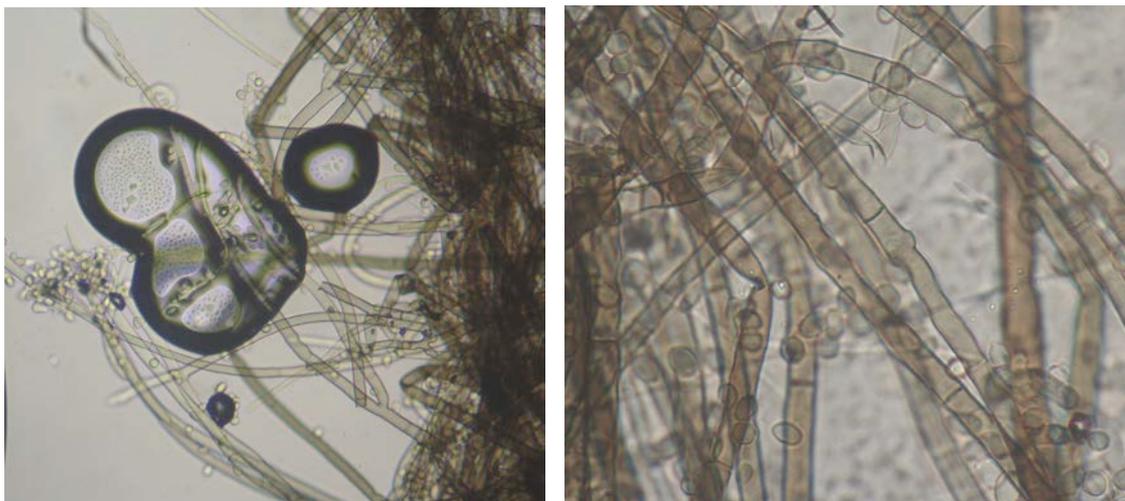
En la placa con aceite esencial de mandarina para GS1 se observaron hifas acintadas y algunas hialinas algo tortuosas. Con el uso de aceite esencial de canela se observaron más hifas acintadas que hialinas. En la placa con aceite esencial de tomillo, para GS1 también, se observaron hifas acintadas y algunas hialinas. En la placa con aceite esencial de clavo se observaron hifas tortuosas con ensanchamientos contiguos debido a que el aceite debió interferir sobre la formación de la pared celular de las hifas; no se observaron ni conidios ni hifas acintadas.



**Figura 5.18.** Hifas tortuosas del aislado 1 de *Botrytis cinerea* del Grupo G's España (GS1) tratadas con aceite esencial de clavo (500 µL/L).

En el testigo de GS2 se observaron hifas acintadas y algunas hialinas. También se apreciaron conidióforos. Mientras que en el hongo sometido al efecto del aceite esencial de mandarina se observaron hifas acintadas, algunas hialinas y conidios (Fig. 5-19).

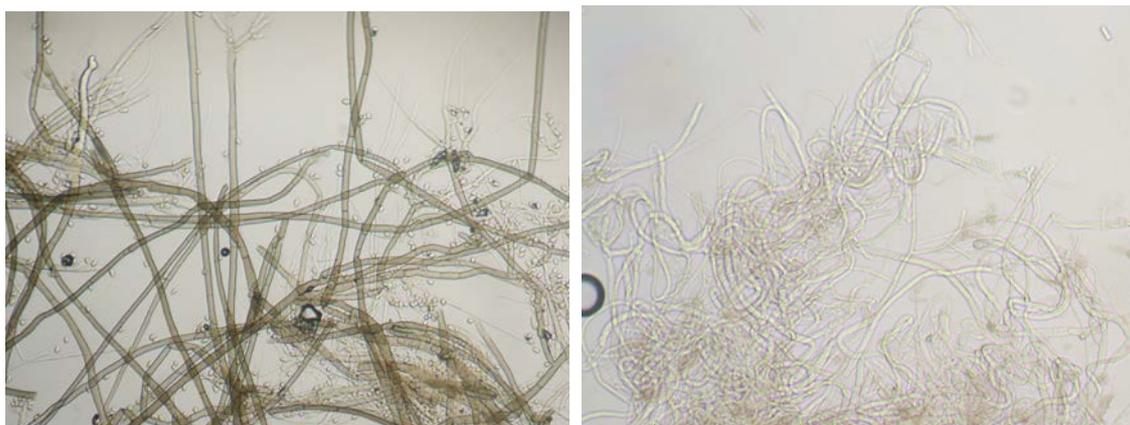
En la placa con aceite esencial de canela para se observaron más hifas acintadas que hialinas, lo que le dio al hongo un aspecto algo más pardo. Mientras que en el hongo sometido al efecto del aceite esencial de tomillo se observaron muchas hifas acintadas y pocas hialinas. No obstante, el efecto básico del aceite esencial se apreció en las hifas del hongo sometido al aceite esencial de clavo porque se apreciaron hifas hialinas muy ramificadas y tortuosas, y no se observaron conidios.



**Figura 5.19.** Hifas normales de la solución testigo del aislado 2 de *Botrytis cinerea* del Grupo G's España (GS2) (izquierda) e hifas tortuosas (derecha) tratadas con aceite esencial de mandarina (500 µL/L). Fotos: María Almudena Fuentes López.

El testigo de M1 presentó conidióforos, hifas hialinas e hifas acintadas marrones sin defectos en ninguna de ellas, lo que indicó un desarrollo normal del hongo y en la placa con aceite esencial de mandarina se observaron hifas acintadas y sólo algunas hialinas, que denotó a las colonias desarrolladas de un color algo más pardo.

El desarrollo del hongo bajo el aceite esencial de canela fue idéntico al testigo sin aceite esencial alguno y bajo el aceite esencial de tomillo se apreciaron hifas hialinas y pocas acintadas. Del mismo modo que ocurrió con el aceite anterior, en este caso se observaron muchas hifas hialinas, algo re3torcidas y pocas hifas acintadas.



**Figura 5.20.** Hifas normales de la solución testigo del aislado 1 de *Botrytis cinerea* de Don Miguel Sevilla Fructuoso (M1) (izquierda) e hifas tortuosas (derecha) tratadas con aceite esencial de tomillo (500 µL/L). Fotos: María Almudena Fuentes López.

En el testigo de M2 se observaron hifas acintadas y unas pocas hialinas. Pero no se apreciaron conidióforos. Bajo el efecto del aceite esencial de mandarina se aprecian el mismo número aproximadamente de hifas hialinas que de acintadas y pocas hifas tortuosas. Mientras que con aceite esencial de canela se apreciaron más hifas acintadas que hialinas.

En la placa con aceite esencial de tomillo destacaron las hifas acintadas sobre las hialinas y se ven conidios y conidióforos. Sin embargo, con el aceite esencial de clavo se apreciaron más hifas hialinas que acintadas.



**Figura 5.21.** Conidios y conidióforo del aislado 2 de *Botrytis cinerea* de Don Miguel Sevilla Fructuoso (M2) tratado con aceite esencial de tomillo (500 µL/L).  
Foto: María Almudena Fuentes López.

#### 5.4. Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos podemos concluir de la siguiente forma:

- Los tratamientos realizados con esencia de canela y mandarina no ejercieron apenas efecto antifúngico, permitiendo la adaptación del hongo al medio creciendo aproximadamente de igual manera que cuando creció de manera normal sin aceites esenciales. El efecto de la esencia de mandarina a la concentración de 500  $\mu\text{L/L}$  fue algo mayor que el de canela.
- En cuanto a la esencia de mandarina, la misma dosis produjo un efecto contrario al deseado, es decir, no inhibió el crecimiento de *Botrytis cinerea*, sino que lo estimuló. La explicación a este efecto puede deberse a que los extractos de aceites esenciales pueden contener ciertas sustancias favorecedoras del crecimiento que enmascaran el escaso efecto inhibitor de las sustancias antimicrobianas que poseen sobre los aislados ensayados en este estudio.
- Los tratamientos realizados con extractos de clavo y tomillo sí que tuvieron efecto antifúngico, arrojando una tasa de crecimiento de aproximadamente la mitad que la del hongo creciendo en condiciones normales. El efecto de la esencia de clavo a la concentración de 500  $\mu\text{L/L}$  (dosis de 10  $\mu\text{L/placa}$ ) fue algo mayor que con esencia de tomillo.

## **CAPÍTULO 6**

**EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE  
CLAVO SOBRE EL DESARROLLO *in*  
*vitro* DE DISTINTOS AISLADOS DE  
*Botrytis cinerea***



## Capítulo 6. EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE CLAVO SOBRE EL DESARROLLO *in vitro* DE DISTINTOS AISLADOS DE *Botrytis cinerea*

### 6.1. Introducción.

En la experiencia del capítulo anterior (Cap. 5) se puso de manifiesto la escasa capacidad fungistática de los extractos de aceites esenciales de tomillo, mandarina y canela sobre el desarrollo *in vitro* de distintos aislados de *Botrytis cinerea*. Sin embargo, con este primer experimento de escrutinio, se demostró un gran efecto de las sustancias antifúngicas presentes en el aceite esencial de clavo sobre el crecimiento de dicho hongo en estudio. De este modo, este aceite, que presentó mayor poder fungistático y fungicida, fue seleccionado para un estudio más profundo en el presente capítulo. Con este aceite se obtuvieron resultados de menor crecimiento del hongo, siendo incluso nulo en algunas de las dosis utilizadas.

El objetivo general de este estudio, es aportar datos para conseguir una producción integrada, con un control de las plagas y enfermedades basado en un menor uso de los medios químicos (productos antiparasitarios) potenciando los métodos culturales, biológicos, biotécnicos y físicos.

Para los parásitos animales (fundamentalmente ácaros e insectos), lo anterior es una constante ya establecida desde hace algunos años en muchas áreas de cultivo con resultados interesantes y prometedores, pero resulta menos conocida y, por ello, poco desarrollada e implantada para los parásitos vegetales (hongos especialmente) en la mayoría de los cultivos hortofrutícolas y frutícolas. Esto es mucho más llamativo en la postrecolección de frutas y hortalizas, donde el control integrado de los patógenos fúngicos es un tema incipiente y con una andadura inicial claramente vacilante que, en el momento actual, no ofrece garantías suficientes para conseguir una de las premisas clave de la producción integrada: la rentabilidad.

Por ello, se pretende la búsqueda de sustancias inocuas o de muy reducida toxicidad, como son los aceites esenciales, que resulten ser una alternativa válida al uso

de fungicidas sintéticos utilizados para el control de las podredumbres después de ser cosechados. En general, los plaguicidas de origen vegetal son biodegradables a productos no tóxicos y de baja persistencia, por lo tanto no presentan efectos negativos para el medio ambiente y desaparecen después de cumplir su función sin llegar a la cadena alimenticia del hombre. Además estas sustancias suelen ser activas contra un número limitado de especies diana específicas, con lo que es muy recomendable su uso como agentes de control de enfermedades (Sung-Eun *et al.*, 2001).

El aceite esencial de clavo, protagonista de este estudio, presenta una elevada actividad microbiana contra mohos, levaduras y bacterias patógenas como *Bacillus anthracis* (Davidson, 1997). Otras especies bacterianas afectadas son: *Escherichia coli*, *Enterobacter faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, entre otras muchas especies (Hernández, 2011). El aceite de clavo es eficaz contra especies de *Alternaria*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Septoria*, *Penicillium digitatum* y *Aspergillus* sp. (Llewellyn *et al.*, 1981; Kim *et al.*, 1995). El aceite de clavo inhibe el desarrollo de *Aspergillus niger* (Hernández, 2011) y se consideran compatibles con las frutas y sus derivados (Kim *et al.*, 1995).

El aceite esencial mayoritario del clavo es eugenol, derivado fenólico con propiedades medicinales, antimicrobianas y antifúngicas. El aceite de clavo contiene este compuesto entre aproximadamente 50 y 98% de la composición total de aceites esenciales. El eugenol está presente en otras plantas también, pero no a tan elevada proporción (Davidson, 1997; Martínez, 2012). Otros aceites con acción antifúngica que contiene el aceite de clavo es el  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno y acetato de eugenol (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

En definitiva, el objetivo fundamental de este estudio fue valorar el efecto de diferentes concentraciones del extracto puro del aceite esencial de clavo sobre el crecimiento *in vitro* de los aislados M1, M2, GS1 y GS2 de *Botrytis cinerea*, principal hongo causante de podredumbres en la comercialización del tomate.

## 6.2. Materiales y métodos.

### 6.2.1. Material experimental y tratamientos.

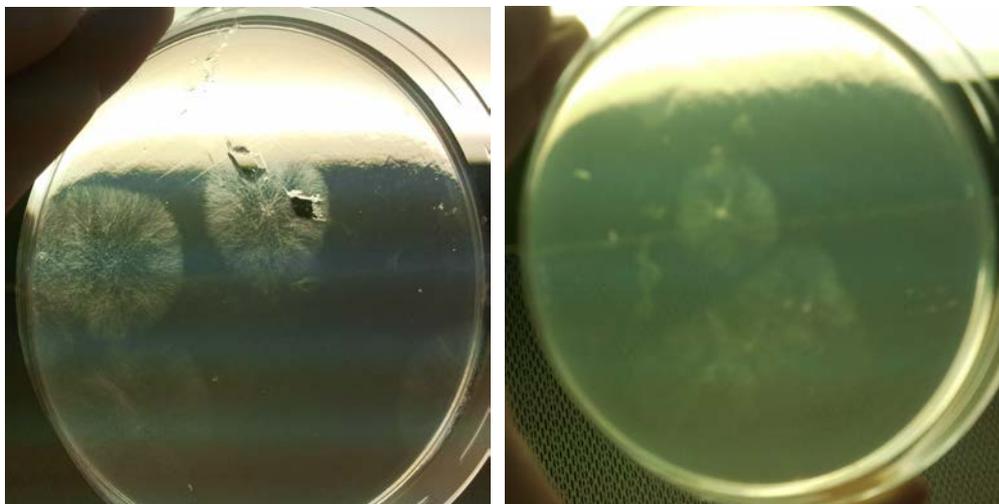
Se valoró la eficacia de extracto puro del aceite esencial ecológico de clavo (*Syzygium aromaticum* L. sinónimo de *Eugenia caryophyllata* Thunb.) Herbarom<sup>®</sup>, Galdana Innovacions, Manlleu, España (Figura 6.1) sobre el crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea*. Los compuestos mayoritarios de este aceite, de acuerdo con el fabricante, son eugenol y  $\beta$ -cariofileno.



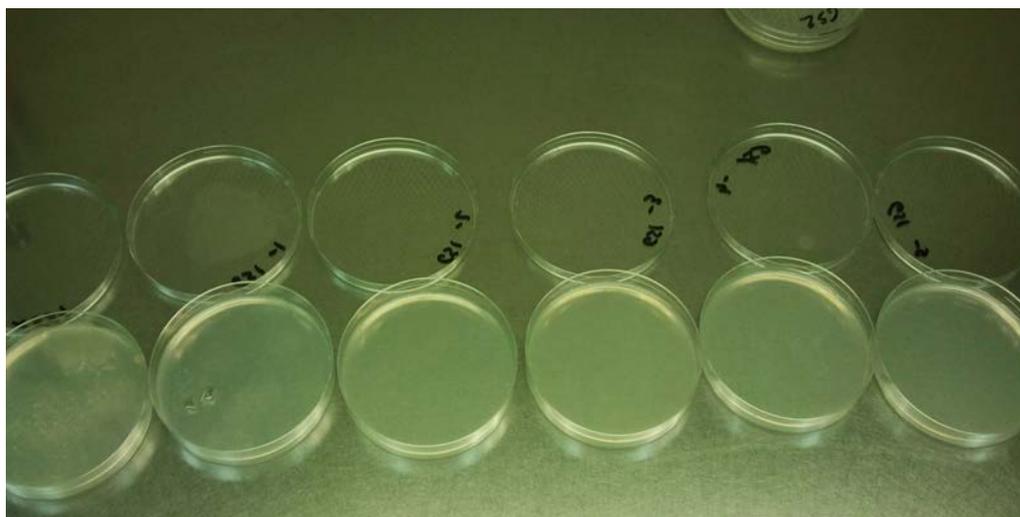
**Figura 6.1.** Aceites esenciales ecológicos de clavo (*Syzygium aromaticum* L. sinónimo de *Eugenia caryophyllata* Thunb.) Herbarom<sup>®</sup>, Galdana Innovacions, Manlleu, España

Los aislados de *Botrytis cinerea* se obtuvieron, como se ha comentado en el capítulo 5, en el mes de noviembre de 2012 de frutos de tomate recogidos de los invernaderos de Don Miguel Sevilla Fructuoso en Mazarrón y de los almacenes del Grupo G's España afectados de podredumbre gris. La sintomatología de las podredumbres coincidía con la descrita por Blancard *et al.*, 2011 y se corroboró la especie de hongo por medio de la PCR descrita en el capítulo 4. Los hongos se aislaron en medio de cultivo sintético agar de patata y dextrosa (PDA) (Scharlab<sup>®</sup>, Barcelona) y se purificaron posteriormente sobre el mismo medio de cultivo. A continuación, se realizaron cultivos monospóricos (Figura 6.2.) realizando diluciones sucesivas de una suspensión de conidios obtenida a partir de cada uno de los aislados purificados. Con este procedimiento conseguimos separar *B. cinerea* de otras especies. La purificación completa de los aislados se logró a partir de los cultivos monospóricos tras siembra de una pequeña porción de micelio de una colonia seleccionada en otra placa conteniendo PDA. De esta manera se obtuvieron los cultivos origen a partir de los cuales se hicieron

las siembras para cada uno de los experimentos realizados con el extracto de aceite esencial de clavo.



**Figura 6.2..** Cultivo monospórico de *Botrytis cinerea*. Colonias obtenidas a partir de un solo conidio. Fotos: María Almudena Fuentes López.



**Figura 6.3.** Cultivo monospórico de *Botrytis cinerea*. Batería de diluciones sucesivas. Foto: María Almudena Fuentes López.

Con el fin de valorar el efecto del aceite seleccionado sobre el crecimiento del hongo creciendo en condiciones idóneas, se realizaron los ensayos *in vitro*. Se seleccionaron las siguientes concentraciones reducidas de aceites, ya que la efectividad comercial reside no solo en su eficacia sino también en que esta efectividad sea patente a concentraciones muy bajas: 125, 250, 500 y 750  $\mu\text{L/L}$ . Se realizaron los siguientes tratamientos para la prueba *in vitro*:

- Testigo. Contiene 19 mL de medio de cultivo PDA en la placa Petri con 1 mL de agua destilada esterilizada y 0,01% tween 80 (v/v).
- Clavo. 19 mL de medio de cultivo PDA en una placa Petri más 1 mL de extracto de aceites esenciales de clavo (Herbarom<sup>®</sup>), a las concentraciones de 125, 250, 500 y 750  $\mu\text{L/L}$  (equivalente a 125, 250, 500 y 750  $\mu\text{L}$  de extracto de aceite esencial de clavo en 1 L de medio de cultivo). La dosis correspondiente es de 2,5; 5; 10 y 15  $\mu\text{L/placa Petri}$ , respectivamente. A todas ellas se añadió 0,01% tween 80 (v/v).

Estas concentraciones se escogieron para evaluar el efecto del extracto de aceite esencial de clavo porque, de acuerdo con la bibliografía, son el rango habitualmente utilizado para este tipo de compuestos cuando se estudian sus efectos antimicrobianos y antimicóticos.

### 6.2.2. Unidad de observación y número de repeticiones.

El procedimiento para la realización de la experiencia fue el siguiente:

La experiencia comenzó el día 23 de diciembre de 2012, y se extendió hasta el día 31 de diciembre de 2012. Para cada tratamiento se utilizaron diferentes dosis y el tratamiento testigo tuvo ausencia de cualquier sustancia inhibidora (0  $\mu\text{L/placa}$  de aceite esencial). En el tratamiento con extracto de aceite esencial de clavo las concentraciones empleadas fueron de 125, 250, 500 y 750  $\mu\text{L/L}$  (dosis correspondiente de 2,5; 5; 10 y 15  $\mu\text{L/placa Petri}$ , respectivamente).

Para el tratamiento testigo se utilizaron 24 placas Petri, 6 placas para el aislado del tomate 1 de Don Miguel Sevilla Fructuoso (M1), otras 6 para el aislado del tomate 2 de Don Miguel Sevilla Fructuoso (M2), y lo mismo para los tomates 1 y 2 de los aislados del Grupo G's España (GS1 y GS2). De la misma forma, para los tratamientos con extracto de aceite esencial de clavo se utilizaron 24 placas Petri por cada una de las dosis empleadas. Es decir, se utilizaron 6 repeticiones por aislado y dosis que podrían considerarse como réplica, aunque, más bien, eran repeticiones o submuestras. La

unidad de observación correspondía a una placa Petri. Cada una de ellas es independiente, pero las variables relacionadas con el crecimiento y tasa de crecimiento se miden sobre las mismas unidades de observación en función del tiempo.

Hay que destacar que de las 6 placas utilizadas por dosis y aislado, 3 de ellas se utilizaron para determinar el peso del micelio y otras 3 para hacer el recuento del número de esclerocios, por lo que el tamaño de la muestra para las variables de tasa de crecimiento, área de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento correspondió a 6 y el tamaño fue de 3 en las variables peso del micelio y recuento de esclerocios.

Aunque se obtuvieron 3 o 6 repeticiones de las variables medidas extraídas de 3 o 6 unidades experimentales por tratamiento constituidas por cuatro placas de Petri independientes, en sentido estricto, estas repeticiones deben considerarse submuestras, más que réplicas, de acuerdo con Hammer (1981) porque no se maximiza el error experimental. Este error está minimizado, ya que todas las placas de cultivo se llenaron a partir del mismo medio de cultivo, se sembraron a partir de la misma colonia de cada uno de los aislados y se incubaron en la misma incubadora.

### 6.2.3. Definición, tipo y clasificación de las variables

Las variables principales consideradas para valorar el efecto de los extractos de aceites esenciales sobre cada uno de los aislados se definen a continuación:

**Área de crecimiento de la colonia (cm<sup>2</sup>).** Representa el área de la colonia desarrollada medida a intervalos diarios sobre la misma colonia (medidas repetidas). Esta medida se realiza generalmente como el diámetro de la colonia, pero consideramos que el diámetro de una colonia no caracteriza totalmente el crecimiento en los casos en los que la colonia no tiene un hábito de crecimiento totalmente circular. *Botrytis cinerea* crece casi como un círculo perfecto, En algunos casos no es fácil distinguir este proceso. La medición del área de la colonia se realizó, previa calibración con el diámetro de la placa Petri, con fotografía digital de ésta y posterior análisis en el software ImageJ 1.42j for Mac, (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, Archivo JAR de Java). Esta variable es de tipo cuantitativa continua de acuerdo con la

escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

**Tasa de crecimiento (cm<sup>2</sup>/día).** Es el grado (velocidad) de crecimiento del hongo medido en su fase lineal de crecimiento cuando se desarrolla en un medio de cultivo sólido. La fase lineal de crecimiento es la fase en la que el hongo crece a pleno rendimiento una vez ha pasado la fase exponencial que suele durar solamente unas pocas horas y antes de entrar en la fase estacionaria donde la velocidad de crecimiento disminuye.

Esta variable se mide como la pendiente de la recta (fase lineal) obtenida cuando se representa en unos ejes cartesianos el tiempo (eje de abscisas) y el área o diámetro de la colonia (eje de ordenadas), obviando las fases de crecimiento que no corresponden a la fase lineal. También se obtiene aplicando la siguiente ecuación:

$$\mu \text{ (cm}^2\text{/día)} = \frac{A_{(t+1)} - A_t}{(t + 1) - t}$$

donde,

$\mu$  : Tasa de crecimiento (cm<sup>2</sup>/día),

$A_{(t+1)}$  : Área de la colonia un día determinado (cm<sup>2</sup>),

$A_t$  : Área de la colonia obtenida un día anterior previamente fijado a  $t + 1$  (cm<sup>2</sup>),

$t + 1$  : Un día determinado de medida de área (número de días) y,

$t$  : Un día anterior considerado a  $t + 1$  (días).

En el presente trabajo, se ha calculado la tasa de crecimiento aplicando la ecuación anterior, generalmente entre los días 3 y 5, para *B. cinerea*, cuando de acuerdo con los gráficos obtenidos no había duda de que el hongo se encontraba en la fase lineal de crecimiento. Esta variable es cuantitativa continua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

**Duración de la fase lineal (días).** Esta variable representa los días transcurridos entre el final de la fase exponencial (generalmente la fase de latencia, ya que la

exponencial suele pasar desapercibida, debido a que dura muy pocas horas) y el inicio de la fase estacionaria o de deceleración. Se obtiene a partir de los gráficos tiempo – área, detectando la zona lineal visualmente en el gráfico. Es una variable de tipo cuantitativa discontinua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

**Inhibición del crecimiento (%).** Representa el efecto del tratamiento retardador del crecimiento del desarrollo del hongo en función del crecimiento de éste cuando las sustancias retardadoras no están presentes. Se obtiene aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición del crecimiento (\%)} = \frac{A_{control} - A}{A_{control}}$$

donde,

$A_{control}$  : Área media de la colonia del tratamiento testigo (cm<sup>2</sup>),

$A$  : Área media de la colonia del tratamiento con una concentración determinada de aceite esencial de canela o clavo (cm<sup>2</sup>) realizada el mismo día que la anterior.

Es una variable de tipo cuantitativa continua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

#### 6.2.4. Establecimiento de las hipótesis

Una hipótesis es una idea basada en un conjunto de conocimientos plausibles acerca de un problema o pregunta, por su naturaleza se trata de una conjetura o idea acerca de la posible relación entre dos o más fenómenos observables o variables. Una hipótesis estadística es una presunción acerca de parámetros de una población y el test estadístico de la hipótesis es la utilización de datos procedentes de una muestra para asumir o rechazar una presunción acerca de la población. Las hipótesis definen las características del plan de trabajo a desarrollar y el tipo de test estadístico que ha de ser utilizado para su aceptación o rechazo.

En el anterior capítulo se ha estudiado y puesto de manifiesto que los extractos de aceite esencial de clavo puede influir en el crecimiento y desarrollo de *B. cinerea*. Los experimentos que se van a desarrollar a continuación están planeados para poner de manifiesto ese efecto y averiguar cual es la mínima dosis de estos aceites con efecto fungicida sobre los cuatro aislados de *B. cinerea* aislados de diferentes tomates distintos. Con esto último se pretende poner de manifiesto si la respuesta depende del aislado.

Por lo anteriormente dicho, las hipótesis que se pretenden contrastar fueron las siguientes:

- 1.- El aceite esencial de clavo ejerce influencia sobre el crecimiento *in vitro* del hongo *B. cinerea*.
- 2.- El aceite esencial de clavo ejerce influencia sobre la conidiogénesis del hongo *B. cinerea*.
- 3.- El aceite esencial de clavo ejerce influencia sobre el tamaño de los conidios del hongo *B. cinerea*.
- 4.- El aceite esencial de clavo ejerce influencia sobre la masa de micelio del hongo *B. cinerea*.
- 5.- El aceite esencial de clavo ejerce influencia sobre la germinación del hongo *B. cinerea*.

El análisis de estas hipótesis va a ser fundamental para establecer la eficacia de estos compuestos en su aplicación a los frutos. Evidentemente, el hecho de tener un efecto beneficioso *in vitro* no quiere decir que sea extrapolable a obtenerlo *in vivo*, lo que sí es evidente es que tras este experimento se podrá evaluar el efecto fungicida o fungistático como tal de los compuestos ensayados.

### 6.2.5. Análisis estadístico.

Dado que las hipótesis que se quieren contrastar definen las características del plan de trabajo que se quiere trazar, hay que tener en cuenta que una de las hipótesis planteadas incluye el efecto del aislado sobre la respuesta que tienen las sustancias retardadoras sobre su crecimiento. Partimos de cuatro aislados distintos por hongo para la especie fúngica estudiada, por lo que es bastante significativo porque se obtuvieron de diferentes variedades de tomate (Kumato y Boludo), hecho que puede aumentar la posible variabilidad entre los aislados. Esto significa que el alcance de las conclusiones no va a ser crucial a la hora de caracterizar a la población de aislados de *Botrytis* del tomate. Es por ello, por lo que se ha optado a realizar un análisis básico de los datos utilizando para ellos los estadísticos de la media aritmética como medida de centralización y la desviación estándar como medida de la dispersión. La utilización del ANOVA o análisis de la varianza se ha evitado fundamentalmente porque el tamaño de la muestra no es elevado ( $n=3$  o  $6$ ) y la falta del concepto réplica como tal que permitiría poner de manifiesto diferencias significativas cuando no las hay. El error se minimiza también, dado que las medidas de las áreas se tomaron de las mismas colonias en función del tiempo, es decir, es un caso de diseño de medidas repetidas. En este caso se requeriría otro tipo de análisis ANOVA, el denominado ANOVA de medidas repetidas.

Atendiendo al diseño del protocolo y la hipótesis a considerar, podemos definir que el experimento consta de las siguientes variables independientes controladas o factores: aislado (4 niveles) y extracto de aceite (5 niveles).

### 6.2.6. Protocolo de las mediciones

Primeramente se preparó el medio de cultivo de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Después de su esterilización en autoclave, se dejó reposar en un baño termostático a  $48^{\circ}\text{C}$ . Las placas Petri se rotularon y dispusieron para agregar 1 mL de la emulsión a valorar convenientemente diluida en agua destilada esterilizada con tween 80 (0,01%) para aumentar la dispersión del aceite lipofílico en el medio de cultivo, que es hidrofílico. Al tratamiento testigo se agregó 1 mL de agua destilada esterilizada para que presentara la misma cantidad de medio de cultivo que presentaban las placas con

sustancias a tratar. Una vez que cada placa tenía 1 mL del compuesto correspondiente, a las dosis de 2,5; 5; 10 y 15  $\mu\text{L}$  de extracto de aceite de clavo, se procedió a rellenar las placas con 19 mL de medio de cultivo a 48°C. Las placas se movieron cuidadosamente en cruz y en giros alternos para homogenizar la emulsión con el medio de cultivo en toda la placa. Los extractos de aceite esencial no se esterilizaron para evitar la desnaturalización de compuestos decisivos. Previamente comprobamos que no crecían bacterias ni hongos a partir de los extractos, probablemente porque ya venían esterilizados de fábrica o que se inactivaron todas las células de microorganismos presentes por la alta concentración de compuestos antimicrobianos presentes en los extractos puros.

Resumiendo, se puede decir que para el control se pipeteó 1 mL de agua destilada + tween 80 (0,01%) y en las demás dosis con clavo también se pipeteó 1 mL por placa, pero se añadió al agua destilada + tween 80 (0,01%), la concentración de aceite que para cada caso fue de:

- Para la concentración de 125  $\mu\text{L/L}$ , se pipetearon 0,25 mL de aceite esencial de clavo por los 100 mL de agua destilada + tween 80 (0,01%).
- Para la concentración de 250  $\mu\text{L/L}$ , se pipetearon 0,5 mL de aceite esencial de clavo por los 100 mL de agua destilada + tween 80 (0,01%).
- Para la concentración de 500  $\mu\text{L/L}$ , se pipeteó 1 mL de aceite esencial de clavo por los 100 mL de agua destilada + tween 80 (0,01%).
- Para la concentración de 750  $\mu\text{L/L}$ , se pipetearon 1,5 mL de aceite esencial de clavo por los 100 mL de agua destilada + tween 80 (0,01%).

Las placas se dejaron reposar no menos de 15 horas dentro de la cabina de flujo para proceder a la inoculación del hongo anteriormente purificado y aislado. Para ello se partió de cultivos de los diferentes aislados realizados a partir de los aislados iniciales de los frutos o de las placas origen que se conservaban en el frigorífico. Entonces se depositó una pequeña porción de cultivo del hongo cortada asépticamente del borde de

la colonia crecida de dos días a 26°C con un bisturí en el centro de la placa nueva (subcultivo). Todo este procedimiento se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar, para asegurar la máxima asepsia en el trabajo, y después se depositaron las placas en la incubadora a 26°C durante los días necesarios hasta que el tratamiento testigo creció cerca del borde de la placa. Las placas se sacaban de la incubadora diariamente por pocos minutos para apuntar las observaciones y medir el tamaño de la colonia (proceso rápido porque se hizo con un montaje fotográfico). Para llevar a cabo la toma de medidas, se midió el tamaño de cada colonia, cada uno de los días que duró el experimento, tomando fotos para luego medir el área con el programa informático ImageJ 1.42j.

Para la representación de los gráficos de evolución de crecimiento se tomó el valor medio por día de 6 de repeticiones (submuestras en este caso) y se representó la desviación estándar de la medición por medio de una barra vertical pasando por el valor medio. Para el resto de las variables consideradas, como son la tasa de crecimiento, la duración de la fase lineal y la inhibición del crecimiento, definidas en el apartado 6.2.3., se elaboraron tablas con cada uno de los valores medios y su desviación estándar.

Posteriormente, una vez que ya no hubo variaciones en el área de las colonias de *Botrytis* para cada tratamiento, es decir, cuando llegó a su límite de crecimiento, se procedió a realizar las pruebas restantes para observar la influencia de estos tratamientos sobre la masa de micelio y la germinación de los hongos en estudio. Para ello, cada una de las muestras de 6 placas por dosis de aceite, se dividieron, como se ha descrito anteriormente, en 3 placas para cada una de las pruebas. 6 placas destinadas para la medida de crecimiento, de las cuales se tomaran fotos cada día; 3 placas se congelaron para calcular el peso de micelio total, y otras 3 placas para dejarlas envejecer y contar a los 30 días la cantidad de esclerocios formados.

La visualización del aspecto de las hifas, el recuento de conidios producidos y el tamaño de éstos fueron determinados con el microscopio de contraste de fases con la utilización de una cámara de recuento Thoma y un ocular micrométrico adaptado a uno de los oculares.

Para analizar la influencia de estos tratamientos sobre la masa de micelio de *Botrytis cinerea*, se procedió a extraer el micelio superficial (aéreo) y sumergido de cada placa, con ayuda de una espátula, introduciéndolo en tubos de ensayo. Posteriormente, el micelio fue introducido en una estufa a 78°C para la eliminación total del agua durante no menos de 24 horas, hasta comprobar peso constante. Por último, se procedió a pesar el micelio seco con una balanza de precisión.

En el caso de averiguar el efecto que las diferentes dosis del aceite esencial de clavo ejerció sobre la conidiogénesis de los aislados de *Botrytis*, el procedimiento realizado para contabilizar los conidios que crecieron por unidad de superficie se muestra en las siguientes imágenes, Figura 6.5. y 6.6.



**Figura 6.5.** Triturado del micelio en bolsa de Stomacher con la adición de un volumen medido de agua destilada. Con el fin de extraer los conidios de las hifas.

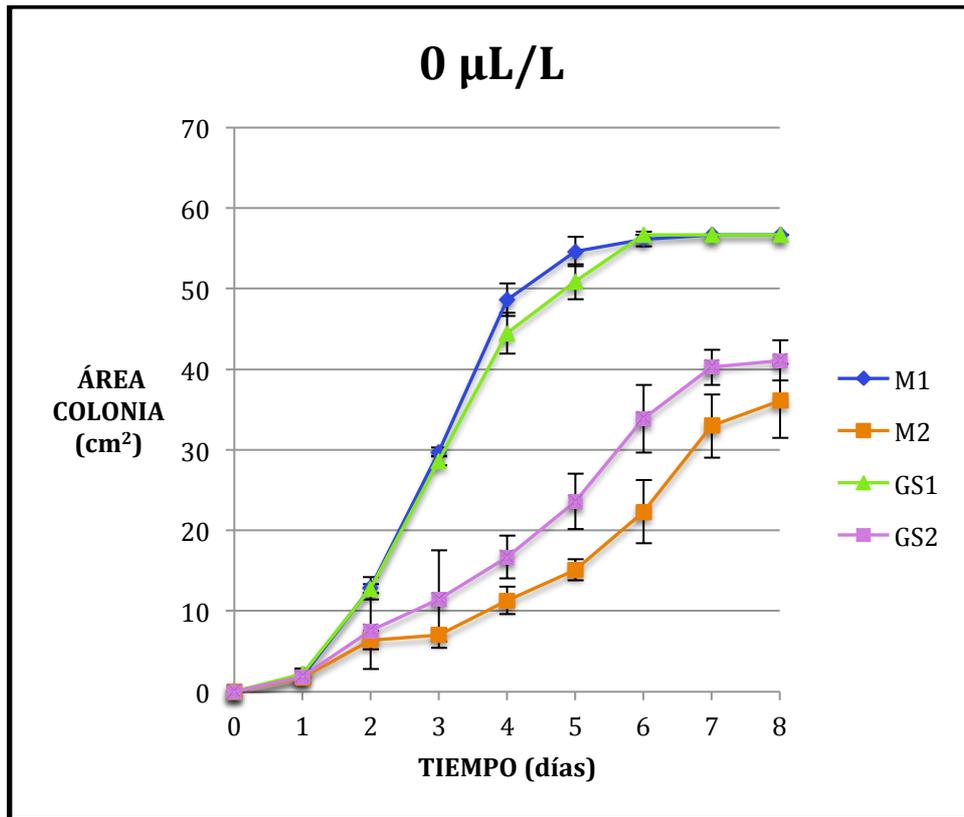


**Figura 6.6.** Detalle de la cámara de recuento Thoma con conidios de *Botrytis cinerea* bajo el microscopio de contraste de fases.

### 6.3. Resultados y discusión.

#### Efecto de diferentes concentraciones del aceite esencial de clavo sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea*.

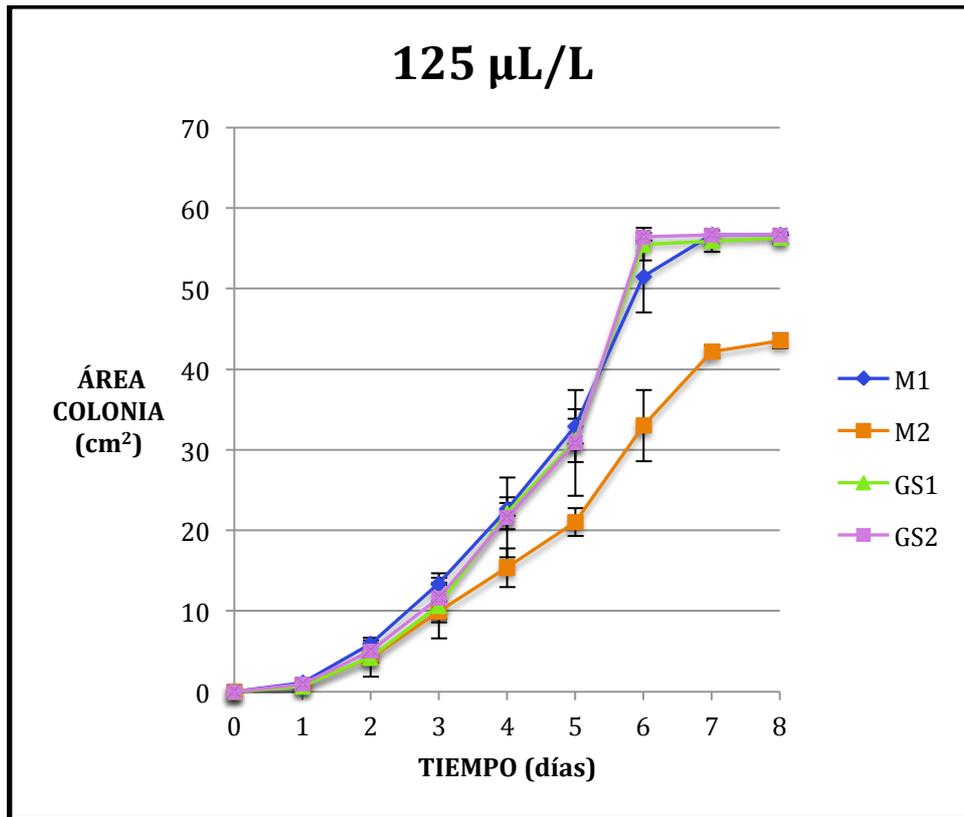
En las siguientes figuras (6.7; 6.8; 6.9; 6.10 y 6.11) se puede apreciar el crecimiento de *Botrytis cinerea* aislado de tomate en placas tratadas con solución testigo (agua destilada) y las tratadas con el extracto de aceite esencial de clavo con las concentraciones utilizadas (de 125, 250, 500 y 750  $\mu$ L de extracto de aceite esencial de clavo en 1 L de medio de cultivo).



**Figura 6.7.** Crecimiento de distintos aislados de *Botrytis cinerea* de frutos de tomate. Las barras verticales son la desviación estándar.

La Figura 6.7. muestra un crecimiento muy igualado entre los aislados M1 y GS1. Mientras que GS2 y M2 crecieron menos, aproximadamente la mitad. El aislado que menos creció fue M2. Es evidente que desde el primer día se marcaron dos tendencias diferentes de crecimiento, por un lado M1 y GS1, y por el otro M2 y GS2.

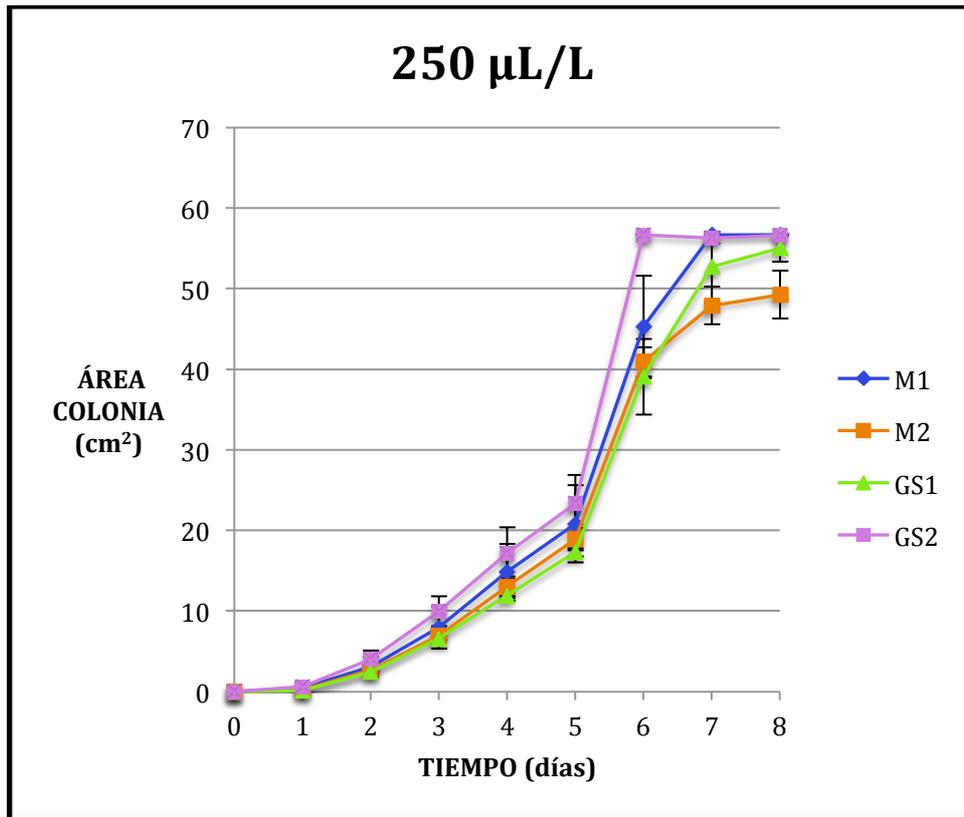
La fase lineal estuvo comprendida para todos los aislados entre el día 1 el día 6, excepto para GS2 y M2 que acabó su fase lineal un día mas tarde.



**Figura 6.8.** Efecto de la concentración de 125 µL de extracto de aceite esencial de clavo en 1L de medio de cultivo sobre el crecimiento de varios aislados de *Botrytis cinerea* de frutos de tomate. Las barras verticales son la desviación estándar.

La Figura 6.8. muestra un crecimiento casi idéntico para los aislados M1, GS1 y GS2. Sin embargo M2 presentó una sexta parte menos de crecimiento que los mencionados primeramente. Los cuatro aislados crecieron de forma pareja, pero a partir del tercer día el aislado M2 comenzó a crecer más lento.

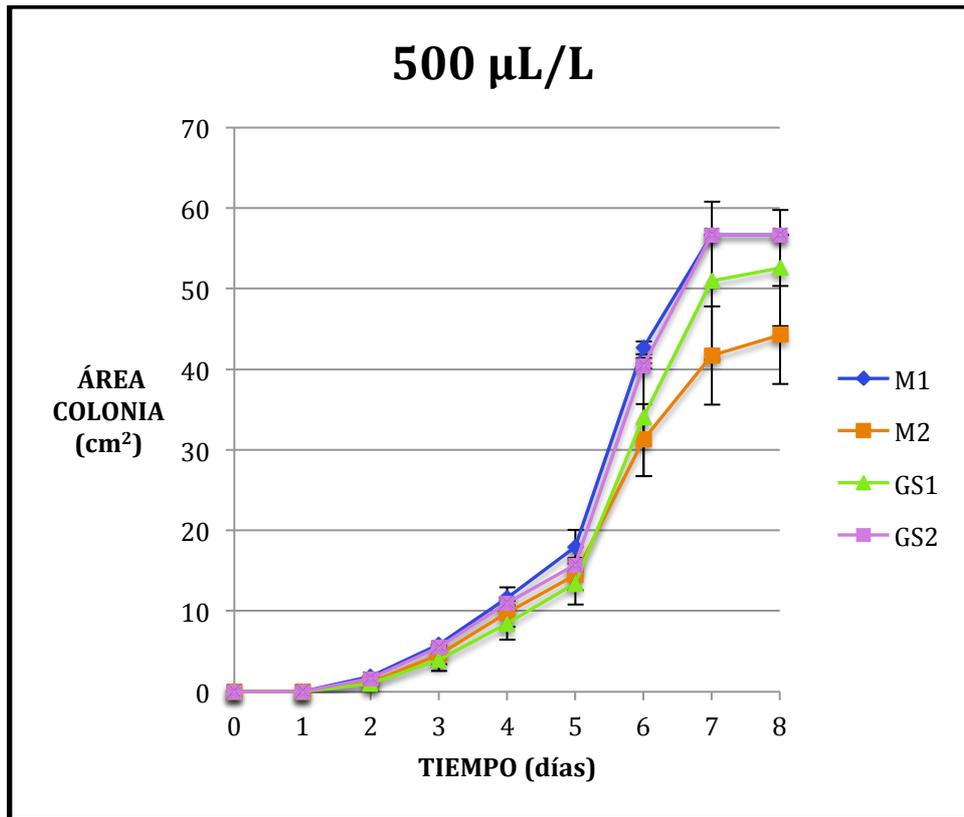
La fase lineal de crecimiento, observada comúnmente cuando el hongo crece en placa Petri, estuvo comprendida para todos los aislados entre los días 2 al 6, excepto para el aislado M2 que acabó su fase lineal un día más tarde.



**Figura 6.9.** Efecto de la concentración de 250 µL de extracto de aceite esencial de clavo en 1L de medio de cultivo sobre el crecimiento de varios aislados de *Botrytis cinerea* de frutos de tomate. Las barras verticales son la desviación estándar.

La Figura 6.9. muestra que hubo un crecimiento casi idéntico para los cuatro aislados (M1, M2, GS1 y GS2). El que creció más rápido fue el aislado GS2, y el más lento fue GS1.

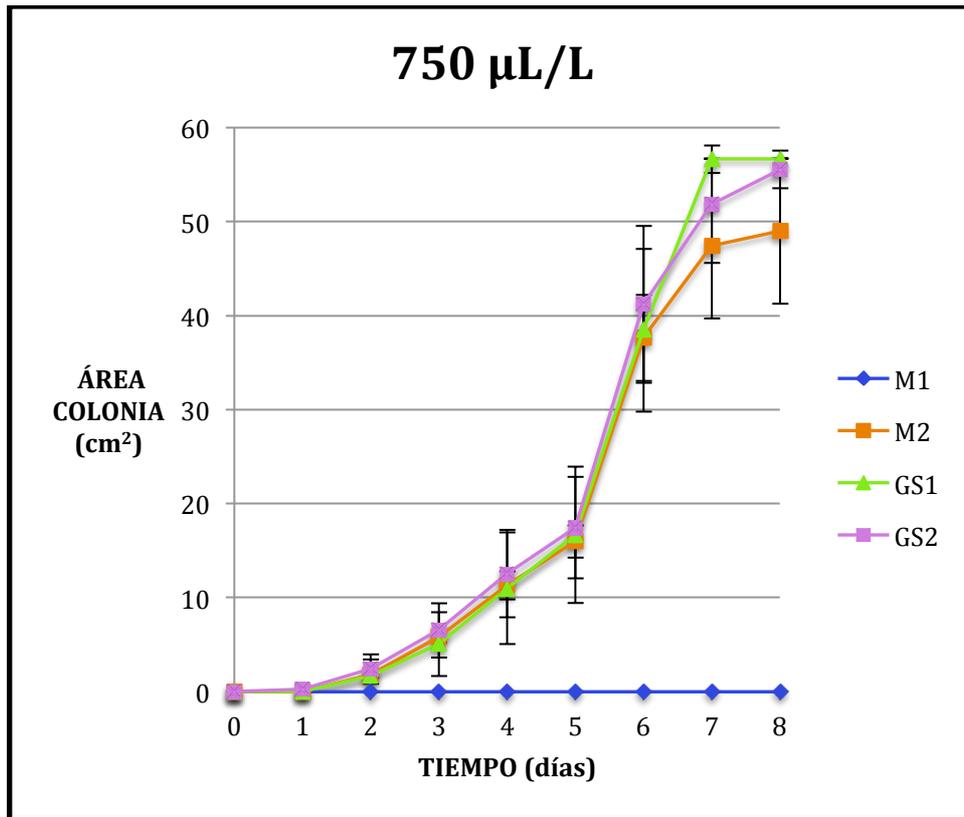
La fase lineal de crecimiento, observada comúnmente cuando el hongo crece en placa Petri, estuvo comprendida para todos los aislados entre los días 2 al 7, excepto para el aislado GS2 que acabó su fase lineal un día antes.



**Figura 6.10.** Efecto de la concentración de 500 µL de extracto de aceite esencial de clavo en 1L de medio de cultivo sobre el crecimiento de varios aislados de *Botrytis cinerea* de frutos de tomate. Las barras verticales son la desviación estándar.

La Figura 6.10. muestra un crecimiento casi idéntico para los cuatro aislados (M1, M2, GS1 y GS2); creciendo muy igualados M1 y GS2, y siendo el más lento el crecimiento de M2.

La fase lineal estuvo comprendida en todos los casos desde el día 2 al 7.



**Figura 6.11.** Efecto de la concentración de 750 µL de extracto de aceite esencial de clavo en 1L de medio de cultivo sobre el crecimiento de varios aislados de *Botrytis cinerea* de frutos de tomate. Las barras verticales son la desviación estándar.

La Figura 6.11. muestra un crecimiento muy igualado para tres de los aislados (M2, GS1 y GS2). El aislado M1 no creció supuestamente por el efecto de la elevada dosis de aceite esencial.

La fase lineal estuvo comprendida, para los tres aislados que crecieron, entre día 2 y 7.

**Efecto de diferentes concentraciones del aceite esencial de clavo sobre la tasa de crecimiento, la duración de la fase lineal y la inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea*.**

**Tabla 6.1.** Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de varios aislados de *B. cinerea* de frutos de tomate 1 del Grupo G's España para los diferentes tratamientos utilizados a base de 0, 125, 250, 500 y 750  $\mu\text{L}$  del extracto de aceite esencial de clavo.

TRATAMIENTO GS1	TASA DE CRECIMIENTO ( $\text{cm}^2/\text{día}$ )	DURACIÓN FASE LINEAL (días)	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)
0 $\mu\text{L/L}$	11,0 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0	-
125 $\mu\text{L/L}$	11,5 $\pm$ 1,0	4,5 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 0,0
250 $\mu\text{L/L}$	10,0 $\pm$ 1,5	5,5 $\pm$ 0,5	31,0 $\pm$ 0,0
500 $\mu\text{L/L}$	12,0 $\pm$ 2,0	4,0 $\pm$ 0,0	40,0 $\pm$ 0,0
750 $\mu\text{L/L}$	12,5 $\pm$ 1,5	4,5 $\pm$ 0,5	32,0 $\pm$ 0,0

**Tabla 6.2.** Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de varios aislados de *B. cinerea* de frutos de tomate 2 del Grupo G's España para los diferentes tratamientos utilizados a base de 0, 125, 250, 500 y 750  $\mu\text{L}$  del extracto de aceite esencial de clavo.

TRATAMIENTO GS2	TASA DE CRECIMIENTO ( $\text{cm}^2/\text{día}$ )	DURACIÓN FASE LINEAL (días)	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)
0 $\mu\text{L/L}$	7,5 $\pm$ 1,5	5,0 $\pm$ 1,0	-
125 $\mu\text{L/L}$	16,0 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 0,0	-
250 $\mu\text{L/L}$	13,0 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 0,0	-
500 $\mu\text{L/L}$	11,0 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0	-
750 $\mu\text{L/L}$	10,5 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,0	-

**Tabla 6.3.** Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de varios aislados de *B. cinerea* de frutos de tomate 1 de Don Miguel Sevilla Fructuoso para los diferentes tratamientos utilizados a base de 0, 125, 250, 500 y 750  $\mu\text{L}$  del extracto de aceite esencial de clavo.

TRATAMIENTO M1	TASA DE CRECIMIENTO ( $\text{cm}^2/\text{día}$ )	DURACIÓN FASE LINEAL (días)	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)
0 $\mu\text{L/L}$	15,0 $\pm$ 1,0	3,5 $\pm$ 0,5	-
125 $\mu\text{L/L}$	10,0 $\pm$ 1,0	5,5 $\pm$ 0,5	49,0 $\pm$ 0,0
250 $\mu\text{L/L}$	16,0 $\pm$ 3,5	3,5 $\pm$ 0,5	67,5 $\pm$ 0,0
500 $\mu\text{L/L}$	11,0 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0	73,0 $\pm$ 0,0
750 $\mu\text{L/L}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0

**Tabla 6.4.** Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de varios aislados de *B. cinerea* de frutos de tomate 2 de Don Miguel Sevilla Fructuoso para los diferentes tratamientos utilizados a base de 0, 125, 250, 500 y 750  $\mu\text{L}$  del extracto de aceite esencial de clavo.

TRATAMIENTO M2	TASA DE CRECIMIENTO ( $\text{cm}^2/\text{día}$ )	DURACIÓN FASE LINEAL (días)	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)
0 $\mu\text{L/L}$	5,0 $\pm$ 0,5	7,0 $\pm$ 0,0	-
125 $\mu\text{L/L}$	7,0 $\pm$ 0,5	5,5 $\pm$ 0,5	-
250 $\mu\text{L/L}$	9,5 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 0,0	-
500 $\mu\text{L/L}$	9,5 $\pm$ 1,0	5,0 $\pm$ 0,0	-
750 $\mu\text{L/L}$	10,5 $\pm$ 1,5	5,0 $\pm$ 0,5	-

Las Tablas 6.1; 6.2; 6.3 y 6.4 revelan que, como se ha comentado anteriormente, el tratamiento que mejores resultados arrojó fue el realizado con extracto de clavo a la concentración de 500  $\mu\text{L/L}$ , con una inhibición del crecimiento de *B. cinerea* de hasta el 73% en el caso de M1.

Se ha comprobado, para los aislados GS2 y M2 de *B. cinerea*, que cualquiera de las concentraciones estudiadas del aceite esencial de clavo demostró un efecto opuesto al esperado, es decir, estimularon el crecimiento hifal durante la fase lineal que tiene lugar cuando el hongo presenta la mayor tasa de crecimiento si exceptuamos la fase exponencial que precede a la lineal y que generalmente no se observa porque dura muy pocas horas. Es decir, se obtenían porcentajes negativos de inhibición del crecimiento porque el tratamiento con aceite tiene mas área que el control.

#### **Efecto de las diferentes concentraciones del aceite esencial de clavo sobre el peso del micelio de los distintos aislados de *Botrytis cinerea*.**

En la Tabla 6.5. se muestra la influencia de las diferentes concentraciones del aceite esencial de clavo, sobre la masa de micelio de *B. cinerea* para los cuatro aislados estudiados (M1, M2, GS1 y GS2). Se tomaron valores de tres repeticiones por cada tratamiento.

**Tabla 6.5.** Peso del micelio total (aéreo y sumergido) de varios aislados de *B. cinerea* de los frutos de tomates 1 y 2 de Don Miguel Sevilla Fructuoso y los tomates 1 y 2 del Grupo G's España para las diferentes concentraciones del aceite esencial de clavo (0, 125, 250, 500 y 750  $\mu\text{L}$ ).

	PESO DEL MICELIO (mg/placa)			
	M1	M2	GS1	GS2
0 $\mu\text{L/L}$	0,391	0,815	0,432	0,657
0 $\mu\text{L/L}$	0,487	0,612	0,396	1,420
0 $\mu\text{L/L}$	0,361	0,816	0,760	2,980
125 $\mu\text{L/L}$	0,490	0,701	0,590	0,518
125 $\mu\text{L/L}$	0,463	0,669	0,486	0,449
125 $\mu\text{L/L}$	0,470	-	0,397	0,626
250 $\mu\text{L/L}$	0,437	0,539	0,295	0,474
250 $\mu\text{L/L}$	0,460	0,359	0,563	0,529
250 $\mu\text{L/L}$	0,646	0,417	0,328	-
500 $\mu\text{L/L}$	0,593	0,506	0,471	0,541
500 $\mu\text{L/L}$	0,581	0,674	0,375	0,338
500 $\mu\text{L/L}$	0,259	-	-	0,586
750 $\mu\text{L/L}$	0,414	0,520	0,391	0,374
750 $\mu\text{L/L}$	0,690	0,367	0,6381	0,4585
750 $\mu\text{L/L}$	-	-	0,7098	-

De acuerdo con los resultados de la Tabla 6.5, se observó que la masa de micelio de *B. cinerea* siguió prácticamente la misma tendencia con las diferentes concentraciones utilizadas del aceite esencial de clavo, es decir, se obtuvo más masa de micelio a menor cantidad de aceite usado, lo que demostró una vez más el efecto patente del aceite esencial en la reducción del crecimiento. Destacar también, que en el aislado M1 parece que no se vio afectado; hecho evidente porque este aislado ha presentado una alta tasa de crecimiento y prácticamente no se ha visto afectado por el aceite esencial de clavo.

**Efecto de las diferentes concentraciones del aceite esencial de clavo sobre la formación de esclerocios de los distintos aislados de *Botrytis cinerea*.**

**Tabla 6.6.** Media y desviación estándar de la cantidad de esclerocios, medida en tres placas diferentes, de varios aislados de *B. cinerea* de los frutos de tomates 1 y 2 de Don Miguel Sevilla Fructuoso y los tomates 1 y 2 del Grupo G's España para las diferentes concentraciones del aceite esencial de clavo (0, 125, 250, 500 y 750  $\mu\text{L}$ ).

	M1		M2		GS1		GS2	
	Media	Desvest	Media	Desvest	Media	Desvest	Media	Desvest
0 $\mu\text{L/L}$	119	21	41	8	80	4	133	28
125 $\mu\text{L/L}$	81	6	29	3	119	45	47	13
250 $\mu\text{L/L}$	99	8	43	7	109	16	43	2
500 $\mu\text{L/L}$	62	6	51	23	62	12	39	10
750 $\mu\text{L/L}$	59	4	40	6	53	14	32	17

Media: media aritmética

Desvest: desviación estándar

Los resultados son muy variables (Tabla 6.6), por lo que la primera conclusión que podemos extraer es que los aceites esenciales no influyeron en la formación de esclerocios. Pero analizando más en detalle los resultados sí que podemos apreciar diferencias en la aplicación del aceite esencial y el desarrollo de estas estructuras. Los esclerocios constituyen una de las mejores estrategias para la perpetuación y dispersión del hongo, y reduciéndola, disminuye la probabilidad de supervivencia del hongo. Esta estructura de resistencia sirve principalmente para perpetuar la especie.

De acuerdo con los resultados obtenidos, queda claramente reflejado la variabilidad del hongo pues cada aislado presenta distinta respuesta a la formación de esclerocios.

En ausencia de aceite esencial (0  $\mu\text{L/L}$ ), el mayor número de esclerocios se dio en el aislado GS2, seguido de M1, pues ambos arrojaron resultados muy parecidos; y aunque, por lo general, el aceite esencial de clavo redujo la formación de esclerocios, la dosis no fue un factor relevante. En ausencia de aceite esencial, la desviación estándar fue muy baja, lo que demuestra poca variabilidad y uniformidad en la producción de

esclerocios por parte de las diferentes submuestras. En la dosis de 500  $\mu\text{L/L}$  es cuando se empezaron a formar esclerocios de manera más uniforme entre los distintos aislados (mayor similitud entre aislados). En el aislado GS1 hubo más esclerocios en las dosis más bajas de clavo pero su desviación estándar fue alta lo que denotó una fuerte variabilidad que dificulta la extracción de conclusiones. En M2 no hubo diferencias, pues presentó la misma cantidad de esclerocios independientemente de la concentración de aceite usada.

Es de esperar que se vea reducida la formación de esclerocios ya que se ha puesto de manifiesto que el aceite esencial de clavo se opuso al desarrollo del hongo, y la producción de esclerocios es la fase final del desarrollo de esta especie, donde el tejido fúngico es reorganizado para formar esas masas negras y duras que perviven durante meses soportando condiciones adversas.

#### 6.4. Conclusiones.

A la vista de los resultados obtenidos podemos concluir de la siguiente forma:

- Se observó una tendencia descendente en la cantidad de conidios que se desarrollaron en todos los aislados de *Botrytis cinerea* conforme se aumentó la concentración del aceite esencial de clavo.
- Se redujo considerablemente el crecimiento en masa del micelio de *Botrytis cinerea*, de manera proporcional a la dosis aplicada de aceite, en todos los aislados, exceptuando el aislado M1 que obtuvo pesos variables e independientes de la dosis aplicada.
- La formación de esclerocios se vio afectada ya que el aceite esencial de clavo redujo el desarrollo del hongo. En la dosis de 500  $\mu\text{L/L}$  es cuando se empezaron a formar esclerocios de manera más uniforme entre los aislados (número similar de esclerocios en todos los aislados testados).

- La concentración de 750  $\mu\text{L/L}$  inhibió completamente el desarrollo del hongo en el caso del aislado M1.



## **CAPÍTULO 7**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA  
APLICACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE  
CLAVO EN EL CONTROL DE LAS  
PODREDUMBRES DE FRUTOS DE TOMATE**



## Capítulo 7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE CLAVO EN EL CONTROL DE LAS PODREDUMBRES DE FRUTOS DE TOMATE

### 7.1. Introducción

Los ensayos *in vitro* consistieron en poner en contacto directo diversos aceites, con potencial efecto fungicida, con el hongo en condiciones óptimas de crecimiento en relación a nutrientes, temperatura, etc. para ver cómo afectaba a su crecimiento. La evaluación de la eficacia de los productos con potenciales propiedades antifúngicas durante el almacenamiento de los productos hortofrutícolas, tiene muchas más interferencias y resulta más complejo; por lo que una primera evaluación *in vitro* siempre nos dirige hacia los productos que podrían ser más eficaces en el control de la podredumbres. Por tanto, un producto que es eficaz *in vitro* no necesariamente lo será durante el almacenamiento del producto hortofrutícola que se aplica, pues influyen numerosos factores como la degradabilidad y persistencia de la sustancia testada, resistencia del fruto, etc. Por ello se deduce fácilmente que si un producto no es útil *in vitro* difícilmente lo será *in vivo*.

El ensayo basado en el estudio del efecto de un producto sobre el crecimiento del hongo es de fácil aplicación cuando el hongo crece bien sobre medios de cultivo y se basa en la confrontación del hongo con concentraciones crecientes de diversas sustancias con potencial efecto fungicida añadidas al medio de cultivo de manera que la medida del crecimiento del micelio (cuerpo vegetativo del hongo) nos permite estimar el efecto del producto.

Posteriormente, una vez que hallamos una sustancia con un efecto fungicida *in vitro* satisfactorio se determina la dosis óptima necesaria para inhibir el crecimiento fúngico del hongo.

En esta tercera y última fase de este estudio se procederá a la inoculación del propágulo del patógeno sobre los frutos de tomate con el producto y concentración idónea que optimizamos en los capítulos anteriores. Tras los resultados de este ensayo

se podrá comprobar finalmente si la sustancia biológica probada es realmente efectiva o no aplicada a frutos de tomate, pero hay que tener en cuenta que en tomates no está autorizado el uso de fungicidas de síntesis en postcosecha, por lo que quizás, la aplicación de sustancias inocuas pueda ser un hecho a tener en cuenta en el futuro para aumentar la supervivencia comercial de este tipo de frutos.

La inoculación de propágulos del patógeno es un sistema muy eficaz e imprescindible para poner de manifiesto la bondad de un tratamiento antifúngico en el laboratorio. La inoculación de propágulos, de hecho, es una de las etapas fundamentales en los postulados de Koch para confirmar e identificar una determinada patología (Vélez, 2006).

La inoculación siempre es un método drástico de hacer presente un posible microorganismo patógeno en presencia de su huésped. Entre las ventajas que presenta están (Vélez, 2006):

1. La identificación precisa del tipo de propágulo y concentración de éste.
2. El lugar exacto donde se encuentra el inóculo infectivo en el material vegetal en caso de que se realice una inoculación localizada.
3. La utilización de dosis infectivas del propágulo que en condiciones favorables darán lugar a la enfermedad (alrededor de  $10^7$  conidios/mL).

Los experimentos de inoculación ponen de manifiesto la capacidad del crecimiento del patógeno sobre el vegetal. Este sistema trata de asemejarse lo más posible a las condiciones reales que se va a encontrar el propágulo del patógeno cuando se encuentre sobre el vegetal, teniendo en cuenta que éste, en la mayoría de los casos tratará de defenderse del posible crecimiento del propágulo. En un experimento *in vitro* no hay resistencia alguna por parte del medio de cultivo y condiciones de crecimiento, ya que éstas se hacen propicias para permitir el crecimiento del propágulo depositado. No es de extrañar pues, que un determinado antifúngico a probar presente alta efectividad *in vitro*, pero una efectividad muy diferente *in vivo* una vez inoculada, tal y como ya hemos comentado.

Las defensas contra la infección que se encuentran en los tejidos vegetales son muy variadas. Las principales son las de tipo físico, principalmente la cutícula y epidermis intacta. De este modo sólo los patógenos muy especializados son capaces de penetrar al tejido vegetal intacto. Por otro lado se encuentran las defensas de tipo químico que inhiben el desarrollo del hongo. Hay compuestos variados, entre ellos los compuestos fenólicos y los aceites esenciales. También hay otros compuestos que son de síntesis inducida cuando se produce la infección, los principales son las fitoalexinas. Estas defensas se pueden ver comprometidas en postcosecha, especialmente cuando el vegetal se encuentra en estado senescente (Vélez, 2006).

Con la aplicación de antifúngicos de tipo químico se pretende tener una mínima garantía de que las podredumbres se retardarán al menos durante un cierto período de tiempo antes de que puedan proliferar. Pero de acuerdo con la tendencia actual de reducir los productos contaminantes, en el control de las enfermedades se debe conducir a un menor uso de los medios químicos potenciando los métodos culturales, biológicos, biotécnicos y físicos. En definitiva, la actividad biológica debe de ser siempre respetuosa con el medio ambiente y este es el objetivo principal en la realización de este estudio.

## 7.2. Materiales y métodos.

### 7.2.1. Material experimental y tratamientos.

Para la realización de las experiencias del presente capítulo, se aisló y purificó el hongo de *Botrytis cinerea* obtenido en el mes de noviembre de 2012 de cuatro frutos de tomate diferentes, dos de un invernadero en Mazarrón propiedad de Don Miguel Sevilla Fructuoso y dos del destrío de los almacenes del Grupo G's España (recolectados en Águilas), todos afectados por podredumbre gris.

Las pruebas de patogeneicidad se realizaron sobre frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*), variedad Boludo para los aislados de Don Miguel Sevilla Fructuoso y variedad Kumato para los aislados del Grupo G's España. El 10 de enero de 2013 se cosecharon frutos maduros en el término municipal de Mazarrón (Murcia) y en el

término municipal de Águilas (Murcia), pero los de Águilas fueron recogidos, el mismo día en el que fueron cosechados, de la empresa G's España y pocas horas después se transportaron a los laboratorios de la Universidad Politécnica de Cartagena, por transporte convencional.

La experiencia empezó el día 11 de enero de 2013, efectuándose las inoculaciones ese mismo día, y se dio por finalizada el 22 de abril de ese mismo año. Los frutos inoculados con el hongo permanecieron almacenados en el laboratorio a una temperatura en torno a 19°C y una HR en torno al 90%.

Los tratamientos antifúngicos realizados fueron los siguientes:

- a) Agua de la red urbana con 0% de aceite esencial de clavo + 0,1 mL/L de tween 80 (testigo) ( $T^a$  del agua del tratamiento 15°C y pH 7,3). Los frutos se sumergieron durante 5 minutos.
- b) Agua de la red urbana con 750 $\mu$ L/L de aceite esencial de clavo + 0,1 mL/L de tween 80 ( $T^a$  del agua 15 °C y pH 7,7). Los frutos se sumergieron durante 5 minutos.

### 7.2.2. Unidad de observación y número de repeticiones

Para la experiencia de inoculación se tomaron 120 tomates seleccionados y libres de defectos. Los tomates fueron separados en 4 grupos, dos grupos para el tratamiento testigo (un grupo con 30 tomates pertenecientes al Grupo G's España y el otro con 30 tomates pertenecientes a los invernaderos de Don Miguel Sevilla Fructuoso) y otros dos grupos para el tratamiento con 750  $\mu$ L/L de aceite esencial de clavo + 0,1 mL/L de tween 80 (al igual que el anterior, 30 tomates pertenecientes al Grupo G's España y los otros 30 a Don Miguel Sevilla Fructuoso). Estos frutos fueron introducidos en cajas de cartón de 5 o 10 frutos cada una para su inoculación, utilizándose un total de 30 cajas de cartón. El experimento en total contó con 16 cajas: 8 cajas con frutos de Don Miguel Sevilla Fructuoso (4 de ellas sin tratar y las otras 4 tratadas con 750 $\mu$ L/L de aceite esencial de clavo + 0,1 mL/L de tween 80) y 8 cajas con frutos del Grupo G's

España (distribuidas igual que las de Don Miguel Sevilla Fructuoso). Los 120 frutos fueron inoculados con *Botrytis cinerea*. Cada tomate era una unidad experimental que se agrupaban en grupos de 5 o 10. Se realizaron cuatro lavados por separado.

Todos los tomates fueron inoculados con agua esterilizada con una suspensión de conidios de los aislados correspondientes a cada tomate. La dosis se ajustó a una concentración de  $1,0 \times 10^7$  conidios/mL y no se mezclaron en una misma caja los tomates tratados con aceite esencial de clavo con los que estaban sin tratar.



**Figura 7.1.** Tomates variedad Kumato en cajas en grupos de diez unidades. Son dos de las tres repeticiones que hay por aislado y tratamiento.

### 7.2.3. Definición, tipo y clasificación de las variables

Las variables consideradas para valorar el efecto del extracto de aceite esencial de clavo sobre el control de las podredumbres de tomates se definen a continuación:

La variable objeto de estudio en esta prueba fue el número de tomates afectados de podredumbre gris tras la inoculación de *Botrytis cinerea*; pero debido al escaso desarrollo de este hongo y sobre todo a partir del punto de inoculación se procedió a realizar un estudio sobre el porcentaje total de frutos afectados por cualquier podredumbre con el fin de poner de manifiesto la efectividad del aceite esencial de clavo sobre el desarrollo de las podredumbres típicas del tomate.

En las experiencias de patogenicidad, además de contabilizar el número de tomates afectados por cualquier podredumbre, se observó la evolución de *Botrytis*, que mide la maduración del hongo en el fruto, y el Índice de Efectividad del Tratamiento (IET), que incluye incidencia y severidad del desarrollo de *Botrytis* en función de la efectividad del tratamiento con aceite esencial de clavo. Para este caso se diferenció entre las diferentes puntos de infección de *Botrytis* en el fruto dando especial importancia en el punto de inoculación. El cálculo del Índice de Efectividad del Tratamiento (IET) se realizó aplicando la siguiente ecuación:

$$IET = \{[(PI \times 1) + (PNI \times 0,5)]/T\} / TF$$

donde: PI es el número de frutos afectados por *Botrytis* en el punto de inoculación; PNI es el número de frutos afectados por *Botrytis* fuera del punto de inoculación. T es el tiempo de aparición de la podredumbre en meses. TF es el total de frutos. Los valores considerados de T fueron los siguientes:

T: 0-1 mes = 1

T: >1-2 mes = 2

T: >2-3 mes = 3

T: >3-4 mes = 4

#### 7.2.4. Establecimiento de las hipótesis.

La hipótesis a contrastar fue que el tratamiento antifúngico aplicado en este ensayo, influye en cierto modo en el desarrollo de las podredumbre gris de frutos de tomate inoculados con *Botrytis cinerea* y en el desarrollo de podredumbres en general debidas a otros hongos.

#### 7.2.5. Análisis estadístico.

Se realizó un análisis básico de los resultados. La incidencia de las podredumbres se anotó contabilizando el número de frutos podridos tanto en el punto de inoculación como en el resto del tomate, a intervalos casi diarios dentro de cada bandeja y el grado de desarrollo de la podredumbre diferenciando entre frutos con *Alternaria*, *Botrytis*, *Stemphylium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* y podredumbres mixtas en un mismo tomate. Cuando los frutos se iban pudriendo generalmente se fueron eliminando el mismo día para evitar la contaminación del resto de los frutos de la bandeja, especialmente si el fruto se encontraba muy afectado.

#### 7.2.6. Protocolo de las mediciones.

El mismo día de su recepción, los frutos fueron seleccionados libres de alteraciones y defectos y se lavaron bajo el grifo de agua potable de abastecimiento. Posteriormente, sin escurrir, se realizaron los lavados en las distintos tratamientos a base de aceite esencial de clavo durante 5 minutos, respectivamente, en continua agitación en los siguientes preparados realizados con agua de abastecimiento: a) 0% esencia de clavo + 0,1 mL/L de tween 80 (testigo) (T<sup>a</sup> 15 °C; pH 7,3), b) 500 µL/L de aceite esencial de clavo + 0,1 mL/L de tween 80 (T<sup>a</sup> 15 °C; pH 7,7). Los frutos se dejaron secar al aire antes de su inoculación y almacenamiento.

Una vez que los frutos estaban ya secos (menos de 2 horas tras el tratamiento), se inocularon en la zona ecuatorial por la técnica del pinchazo descrita por Andrés-Yeves *et al.* (1991). La inoculación se realizó efectuando un pequeño pinchazo con una aguja estéril de jeringuilla hipodérmica, no muy profundo, hasta perforar la fina piel, sobre la superficie del fruto (Figura 7.2.). De este modo se genera sobre el tejido vegetal una vía artificial por donde penetró el propágulo de *Botrytis*. De esta manera podemos

reproducir los síntomas de dicho patógeno que necesita de heridas en la piel del fruto para poder ocasionar podredumbre. Por ello, es también factor importante considerar la densidad del inóculo infectivo compuesto a base de conidios suspendidos en agua destilada esterilizada que previamente ha sido cuantificado, hasta alcanzar una suspensión de conidios de *Botrytis cinerea* equivalente a  $1,0 \times 10^7$  conidios/mL. Se inoculó el aislado correspondiente a cada tomate. La concentración de conidios fue ajustada con una cámara de recuento de tipo Thoma bajo el microscopio de contraste de fases (ver Cap. anterior) y obtenidos de cultivos jóvenes de cinco días creciendo a 26°C.



**Figura 7.2.** Inoculación en la zona ecuatorial por la técnica del pinchazo descrita por Andrés-Yeves *et al.* (1991).

El punto de inoculación fue marcado en un punto próximo realizado con un marcador permanente para identificar la aparición de podredumbre con el hongo inoculado. Se confeccionaron 2 cajas (una de 5 y otra de 10 frutos) por tratamiento. Los frutos se almacenaron durante 95 días a una temperatura media de 19°C y una humedad relativa media del 90%. Durante este tiempo todos los frutos llegaron a podrirse.

Creamos un ambiente húmedo para facilitar el desarrollo de las podredumbres colocando, sobre las cajas de cartón, una bolsa de polipropileno sin sellarla, para así facilitar el intercambio de gases producidos por la respiración de los frutos, y un bote

con agua en su interior (Figura 7.3.). De esta manera, se reducen las pérdidas de peso de los frutos y se mantienen turgentes, ya que no debemos pasar por alto que el hongo sólo coloniza el tejido vegetal con un determinado contenido mínimo de agua libre, y una atmósfera húmeda facilita la colonización del hongo.



**Figura 7.3.** Bolsa de polipropileno y bote de agua en las cajas de cartón para aumentar la humedad relativa.

Además de la humedad ambiente, también es un factor importante la temperatura. Los frutos se almacenaron a una temperatura favorable para el desarrollo de las podredumbres. La temperatura óptima para el desarrollo y crecimiento de los hongos que causan podredumbres en postcosecha ronda alrededor de los 25°C, temperatura que sólo se puede alcanzar en determinados momentos debido a la época en la que tuvo lugar el ensayo (de enero a abril) en que la temperatura ambiental es más fresca. Esta menor temperatura de almacenamiento dentro del laboratorio conllevó a que aparecieran los síntomas de podredumbre más tarde.

Posteriormente se contabilizó el número de frutos podridos en total a intervalos casi diarios dentro de cada bandeja, diferenciando las diversas podredumbres que afectaron a los frutos.

En el caso de desarrollo de síntomas tipo podredumbre blanda bacteriana se procedió a aislar bacterias del interior del tejido afectado en agar de recuento total (PCA) y a realizar las pruebas fenotípicas básicas para poner de manifiesto si podría tratarse de la especie que causa esta podredumbre en tomates: *Erwinia carotovora*. Esta bacteria es anaerobia facultativa (metabolismo de la glucosa) y pectinolítica (prueba de la patata). Estas dos pruebas realizadas se describen a continuación:

## METABOLISMO OXIDATIVO-FERMENTATIVO

### Fundamento

El objetivo de esta prueba es determinar el tipo de metabolismo (oxidativo o fermentativo) de un azúcar determinado. En nuestro caso hemos tomado la glucosa que se añade al medio de cultivo una vez está ya reconstituido (10 g/L).

El medio de cultivo utilizado es el de Hugh-Leifson de pH neutro. Este medio incorpora el azul de bromotimol, un colorante verde originalmente que torna a amarillo cuando desciende significativamente el pH por el metabolismo de la glucosa.

### Procedimiento

1. Utilizar dos tubos conteniendo el medio de cultivo O/F por especie bacteriana.
2. Sembrar por picadura en los dos tubos.
3. Tapar uno de los tubos manteniéndolo erguido (tubo O: aeróbico), en el otro agregar entre 5 y 10 mL de agar de sellado anaeróbico con el fin de provocar condiciones anaeróbicas (tubo F: fermentativo).
4. Incubar a la temperatura adecuada durante 2 o 3 días.

Interpretación de resultados:

El tubo da positivo si el color del medio cambia a amarillo, y negativo cuando permanece de color inicial (verde) o cambia a azul. La tabla de interpretación es la siguiente:

O	F	Interpretación
+	+	Degradación fermentativa. Anaerobio facultativo
+	-	Degradación oxidativa. Aerobio
-	+	Degradación fermentativa. Anaerobio estricto
-	-	No degrada el azúcar utilizado (en este caso glucosa)

## COMPROBACIÓN RÁPIDA DE ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA DE ESPECIES DE LOS GÉNEROS *Erwinia* y *Pseudomonas*

### INTRODUCCIÓN

Para comprobar si una bacteria contiene enzimas pectinolíticas (protopectinasas: que hidrolizan pectinas) capaces de degradar las paredes de las células vegetales y producir podredumbre blanda bacteriana, se puede hacer una primera aproximación con el siguiente procedimiento descrito. Es necesario considerar que no todas las especies del género *Erwinia* son pectinolíticas y que este carácter no es exclusivo de este género, por ejemplo, las *pseudomonas* fluorescentes más típicas la producen también, pero más lentamente que las *erwinias* que la pueden producir.

### PROCEDIMIENTO

1. En una placa petri estéril introducir unos recortes de papel de filtro cubriendo el fondo.
2. Humedecer bastante el papel hasta su saturación con el fin de crear una cámara húmeda.

3. Partir con un bisturí flameado una rodaja de patata y depositarla encima del papel humedecido con las pinzas.
4. Tomar un inóculo de la bacteria problema con el asa de siembra flameada y situarlo en el centro de la rodaja de patata.
5. Hacer un ligero corte en la superficie de la patata con el bisturí justo encima del inóculo bacteriano.
6. Cerrar la placa y sellarla con parafilm.
7. Incubar a 25 °C durante un período máximo de 48 horas. El test es positivo si se produce podredumbre blanda bacteriana en menos de 48 horas (erwinias pectinolíticas). Más de 48 horas pueden ser las mismas y/o pseudomonas fluorescentes).

### 7.3. Resultados y discusión.

Los frutos de tomate inoculados con suspensiones infectivas de *Botrytis cinera* mostraron síntomas de varias podredumbres con incidencia y severidad variable independiente del tratamiento utilizado (Tablas 7.1.; 7.2.; 7.3. y 7.4.). El hongo que tuvo mayor incidencia fue *Penicillium* para los tomates del Grupo G's España y *Alternaria* para los de Don Miguel Sevilla Fructuoso. En cambio, *Botrytis* afectó en todos los aislados pero su incidencia más alta fue de un 33,3%, mientras que *Penicillium* alcanzó un 60% en los tomates del Grupo G's España y *Alternaria* llegó a alcanzar otro 60% de incidencia en los tomates de Don Miguel Sevilla Fructuoso; siendo estos porcentajes casi el doble de la causada por *Botrytis*.

**Tabla 7.1.** Evolución de las podredumbres en el aislado 1 del tomate de Don Miguel Sevilla Fructuoso tratados con y sin aceite esencial de clavo e inoculados con conidios de *Botrytis cinera*, durante su almacenamiento de 81 días a 19°C y una humedad relativa del 90%.

Días	M1	% de podredumbres								
		B	C	P	A	S	B/S	C/P	A/C/S	A/S
29/01/13	CONTROL									
	CLAVO				6,7					
05/02/13	CONTROL	6,7								
	CLAVO				13,3					
13/02/13	CONTROL	6,7			20,0					
	CLAVO				20,0					
22/02/13	CONTROL	6,7			20,0					
	CLAVO				40,0					
25/02/13	CONTROL	6,7			26,7					6,7
	CLAVO				46,7			6,7		
01/03/13	CONTROL	6,7			26,7					6,7
	CLAVO				46,7			6,7		
05/03/13	CONTROL	6,7			26,7	6,7		6,7		13,3
	CLAVO				53,3			6,7		
11/03/13	CONTROL	6,7			26,7	6,7		6,7		13,3
	CLAVO				53,3			6,7		
14/03/13	CONTROL	13,3		6,7	33,3	6,7		6,7		13,3
	CLAVO				53,3		13,3	6,7	6,7	
18/03/13	CONTROL	13,3		6,7	33,3	6,7		6,7		13,3
	CLAVO		6,7		53,3		13,3	6,7	6,7	
26/03/13	CONTROL	13,3		6,7	33,3	6,7		6,7		13,3
	CLAVO		6,7		53,3		13,3	6,7	6,7	
01/04/13	CONTROL	13,3	13,3	6,7	33,3	6,7		6,7		13,3
	CLAVO		6,7		53,3		13,3	13,3	6,7	
04/04/13	CONTROL	13,3	13,3	6,7	33,3	6,7		6,7		13,3
	CLAVO		6,7		53,3		13,3	13,3	6,7	
08/04/13	CONTROL	13,3	13,3	13,3	33,3	6,7		6,7		13,3
	CLAVO		6,7		60,0		13,3	13,3	6,7	

S: *Stemphylium*  
A: *Alternaria*  
B: *Botrytis*  
C: *Cladosporium*  
P: *Penicillium*  
B/S: *Botrytis* y *Stemphylium*

Continúa de pág. anterior:

**C/P:** *Cladosporium* y *Penicillium*

**A/S:** *Alternaria* y *Stemphylium*

**A/C/S:** *Alternaria*, *Cladosporium* y *Stemphylium*

Los hongos: *Stemphylium*, *Botrytis* y *Penicillium*; y las podredumbres mixtas ocasionadas por los hongos *Alternaria* y *Stemphylium* afectaron sólo en el tratamiento testigo en las medidas: 6,7%; 13,3%; 13,3%; y 13,3%. Por otro lado, hubo 2 tipos de podredumbres mixtas que sólo afectaron al tratamiento con aceite esencial de clavo y fueron: *Botrytis* y *Stemphylium* (en un 13,3%) y *Alternaria*, *Cladosporium* y *Stemphylium* (en un 6,7%).

Luego hay dos hongos y una podredumbre mixta causada por dos hongos que afectaron tanto a los tomates tratados con la solución testigo como los tratados con aceite esencial en los siguientes valores: *Alternaria*, con un 33,3% y un 60%, respectivamente; *Cladosporium* con un 13,3% y un 6,7% respectivamente; y *Cladosporium* y *Penicillium* con un 6,7% y un 13,3% respectivamente. *Alternaria* tuvo un porcentaje bastante alto de incidencia con respecto a los otros hongos.

**Tabla 7.2.** Evolución de las podredumbres en el aislado 2 del tomate de Don Miguel Sevilla Fructuoso tratados con y sin aceite esencial de clavo e inoculados con conidios de *Botrytis cinera*, durante su almacenamiento de 95 días a 19°C y una humedad relativa del 90%.

Días	M2	% de podredumbres												
		B	S	A	B/C	C/S	C/A	B/A	P/S/me	C/S/B	As/B	B/S	P/C/B	P/S/B
18/01/13	CONTROL													
	CLAVO	6,7												
05/02/13	CONTROL													
	CLAVO	6,7		6,7										
13/02/13	CONTROL			6,7										
	CLAVO	6,7		6,7										
22/02/13	CONTROL			13,3										
	CLAVO	6,7	6,7	33,3										
25/02/13	CONTROL			13,3										
	CLAVO	6,7	6,7	46,7										
01/03/13	CONTROL			13,3										
	CLAVO	6,7	6,7	46,7										
05/03/13	CONTROL			13,3										
	CLAVO	13,3	6,7	46,7				6,7						
11/03/13	CONTROL			13,3									6,7	
	CLAVO	13,3	6,7	46,7				6,7						
14/03/13	CONTROL	20,0		13,3				6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	
	CLAVO	13,3	6,7	46,7	6,7			6,7						
18/03/13	CONTROL	20,0		13,3				6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
	CLAVO	13,3	6,7	53,3	13,3			6,7						
26/03/13	CONTROL	20,0		13,3				6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
	CLAVO	13,3	6,7	53,3	13,3			6,7						
01/04/13	CONTROL	33,3		13,3		6,7		6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
	CLAVO	13,3	6,7	53,3	13,3		6,7	6,7						
04/04/13	CONTROL	33,3		13,3		6,7		6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
	CLAVO	13,3	6,7	53,3	13,3		6,7	6,7						
22/04/13	CONTROL	33,3		13,3		6,7		6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
	CLAVO	13,3	6,7	53,3	13,3		6,7	6,7						

A: *Alternaria*

B: *Botrytis*

S: *Stemphylium*

B/C: *Botrytis* y *Cladosporium*

B/A: *Botrytis* y *Alternaria*

C/A: *Cladosporium* y *Alternaria*

C/S: *Cladosporium* y *Stemphylium*

P/S/me: *Penicillium*, *Stemphylium* y micelio esteril

C/S/B: *Cladosporium*, *Stemphylium* y *Botrytis*

As/B: *Aspergillus* y *Botrytis*

Continúa de pág. anterior:

**B/S:** *Botrytis* y *Stemphylium*

**P/C/B:** *Penicillium*, *Cladosporium* y *Botrytis*

**P/S/B:** *Penicillium*, *Stemphylium* y *Botrytis*

Hubo un hongo y dos podredumbres mixtas de hongos que sólo afectaron a los tomates tratados con aceite esencial de clavo. Éstas fueron: *Stemphylium*, *Botrytis* y *Cladosporium*, y *Cladosporium* y *Alternaria* en un 6,7%, 13,3%, y 6,7%, respectivamente.

Hubo también 7 podredumbres mixtas que sólo afectaron a los tomates en el tratamiento testigo en un 6,7% y éstas fueron: *Cladosporium* y *Stemphylium*; *Penicillium*, *Stemphylium* y micelio estéril; *Cladosporium*, *Stemphylium* y *Botrytis*; *Aspergillus* y *Botrytis*; *Botrytis* y *Stemphylium*; *Penicillium*, *Cladosporium* y *Botrytis*; *Penicillium*, *Stemphylium* y *Botrytis*.

Finalmente hubo dos hongos y una podredumbre mixta entre ambos hongos que afectó tanto a los tomates tratados con la solución testigo como a los tratados con aceite esencial de clavo. Éstos fueron: *Alternaria*, *Botrytis*, y *Botrytis* y *Alternaria* con los valores siguientes: 13,3% y 53,3%; 33,3% y 13,3%; y 6,7% y 6,7%; respectivamente. Siendo de nuevo *Alternaria* el hongo que mayor porcentaje de incidencia presentó.

**Tabla 7.3.** Evolución de las podredumbres en el aislado 1 del tomate del Grupo G's España tratados con y sin aceite esencial de clavo e inoculados con conidios de *Botrytis cinera*, durante su almacenamiento de 77 días a 19°C y una humedad relativa del 90%.

Días	GS1	% de podredumbres						
		B	C	P	B/P	C/P	C/P/B	As/P
05/02/13	CONTROL							
	CLAVO	6,7	6,7					
13/02/13	CONTROL							
	CLAVO	6,7	6,7					
22/02/13	CONTROL							
	CLAVO	6,7	6,7					
25/02/13	CONTROL			13,3				
	CLAVO	13,3	6,7					
01/03/13	CONTROL			13,3				
	CLAVO	20,0	6,7					
05/03/13	CONTROL			13,3				6,7
	CLAVO	26,7	6,7		13,3			
08/03/13	CONTROL			46,7	6,7	13,3		6,7
	CLAVO	26,7	6,7		13,3			
11/03/13	CONTROL			53,3	6,7	13,3		6,7
	CLAVO	33,3	6,7		13,3	20,0	13,3	
14/03/13	CONTROL			60,0	6,7	13,3		6,7
	CLAVO	33,3	6,7		13,3	20,0	13,3	
18/03/13	CONTROL			60,0	6,7	20,0		6,7
	CLAVO	33,3	6,7		13,3	26,7	13,3	6,7
21/03/13	CONTROL			60,0	6,7	26,7		6,7
	CLAVO	33,3	6,7		13,3	26,7	13,3	6,7
26/03/13	CONTROL			60,0	6,7	26,7		6,7
	CLAVO	33,3	6,7		13,3	26,7	13,3	6,7
01/04/13	CONTROL			60,0	6,7	26,7		6,7
	CLAVO	33,3	6,7		13,3	26,7	13,3	6,7
04/04/13	CONTROL			60,0	6,7	26,7		6,7
	CLAVO	33,3	6,7		13,3	26,7	13,3	6,7

**B:** *Botrytis*

**C:** *Cladosporium*

**P:** *Penicillium*

**B/P:** *Botrytis* y *Penicillium*

**C/P:** *Cladosporium* y *Penicillium*

**C/P/B:** *Cladosporium*, *Penicillium* y *Botrytis*

**As/P:** *Aspergillus* y *Penicillium*

En el tratamiento testigo ningún tomate presentó *Botrytis* ni *Cladosporium* ni podredumbres mixtas de los hongos: *Cladosporium*, *Penicillium* y *Botrytis*; sin embargo, en el tratamiento con aceite esencial de clavo, éstos sí que aparecieron en los siguientes valores: 33,3 %, 6,7 % y 13,3 %, respectivamente.

Por otro lado, se dio en un alto porcentaje (60%) la aparición de *Penicillium* en los tomates tratados con la solución testigo. Este hongo afectó con más de la mitad de intensidad que cualquier otro.

Finalmente, aparecieron podredumbres mixtas ocasionadas por varios hongos que afectaron casi de manera igualada a los tomates tratados con la solución testigo y a los tratados con aceite esencial. Estos hongos fueron: *Botrytis* y *Penicillium*, *Cladosporium* y *Penicillium*, y, *Aspergillus* y *Penicillium*; éstos aparecieron con los siguientes valores: 6,7% y 13,3%; 26,7% y 26,7%; y, 6,7% y 6,7%, respectivamente (para tomates tratados con la solución testigo y para los tratados con aceite esencial de clavo).

**Tabla 7.4.** Evolución de las podredumbres en el aislado 2 del tomate del Grupo G's España tratados con y sin aceite esencial de clavo e inoculados con conidios de *Botrytis cinera*, durante su almacenamiento de 77 días a 19°C y una humedad relativa del 90%.

Días	GS2	% de podredumbres						
		B	C	P	A	B/P	C/P	A/P
05/02/13	CONTROL							
	CLAVO							
13/02/13	CONTROL							
	CLAVO							
22/02/13	CONTROL				6,7			
	CLAVO				13,3			
25/02/13	CONTROL		13,3		6,7			
	CLAVO				13,3			
01/03/13	CONTROL		13,3		6,7			
	CLAVO				13,3			
05/03/13	CONTROL	6,7	26,7	6,7	6,7	13,3	20,0	
	CLAVO			6,7	13,3	6,7		20,0
11/03/13	CONTROL	6,7	26,7	6,7	6,7	13,3	20,0	
	CLAVO			33,3	13,3	6,7	6,7	20,0
14/03/13	CONTROL	13,3	26,7	13,3	6,7	13,3	20,0	
	CLAVO			33,3	13,3	6,7	6,7	20,0
18/03/13	CONTROL	13,3	26,7	13,3	6,7	13,3	20,0	
	CLAVO			33,3	13,3	6,7	6,7	20,0
26/03/13	CONTROL	13,3	26,7	20,0	6,7	13,3	20,0	
	CLAVO	6,7		46,7	13,3	6,7	6,7	20,0
01/04/13	CONTROL	13,3	26,7	20,0	6,7	13,3	20,0	
	CLAVO	6,7		46,7	13,3	6,7	6,7	20,0
04/04/13	CONTROL	13,3	26,7	20,0	6,7	13,3	20,0	
	CLAVO	6,7		46,7	13,3	6,7	6,7	20,0

A: *Alternaria*

B: *Botrytis*

C: *Cladosporium*

P: *Penicillium*

B/P: *Botrytis* y *Penicillium*

C/P: *Cladosporium* y *Penicillium*

A/P: *Alternaria* y *Penicillium*

*Cladosporium* fue el hongo que afectó de manera solitaria en un 26,7% a los tomates tratados con la solución testigo.

La mezcla de *Alternaria* y *Penicillium* afectó en un 20% a los tomates tratados con aceite esencial de clavo.

Los hongos: *Alternaria*, *Botrytis* y *Penicillium* afectaron tanto a los tomates tratados con la solución testigo como los tratados con aceite con valores de: 6,7% y 13,3%; 13,3% y 6,7%; y 20% y 46,7%, respectivamente. Siendo *Penicillium* el hongo que con más incidencia afectó a los tomates. Seguido de dos podredumbres mixtas ocasionadas por: *Botrytis* con *Penicillium*, y *Cladosporium* con *Penicillium* que afectaron también tanto a los tomates tratados con la solución testigo como los tratados con aceite con los valores siguientes: 13,3% y 6,7%; y 20% y 6,7%.

Los primeros días, las únicas podredumbres que presentaban los frutos tratados con aceite esencial de clavo, eran síntomas de reblandecimiento y los frutos estaban exentos de micelio.



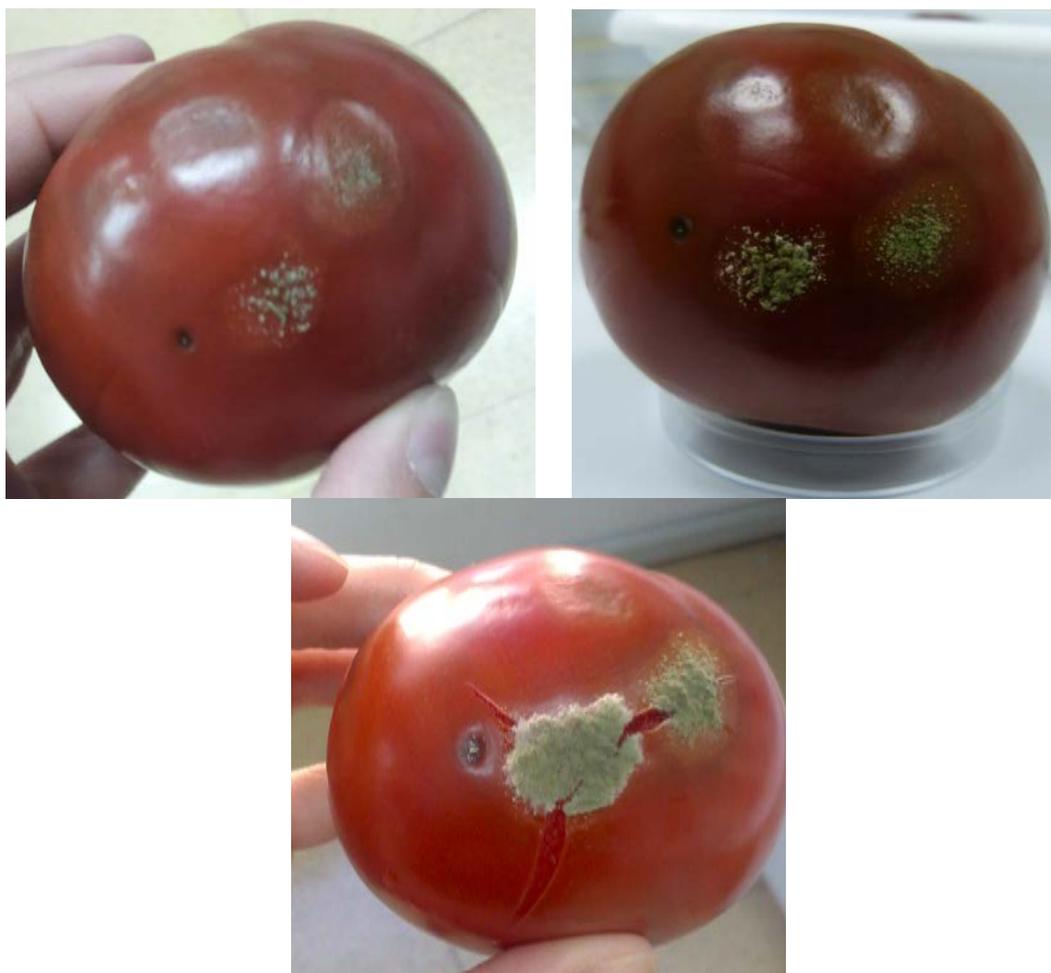
**Figura 7.4.** Manchas en la piel del fruto causadas por el aceite esencial de clavo.

Las podredumbres fueron identificadas de acuerdo a las guías de Snowdon 1991 y Blancard *et al.* 2011 en relación a las características morfológicas del hongo. Fue realizado un estudio fotográfico casi diario de los síntomas que fueron presentando los tomates. A continuación se presentan algunas de las evoluciones que tuvieron los

tomates con las enfermedades de mayor incidencia (no se muestran podredumbres mixtas).



**Figura 7.5.** Tomate con *Alternaria* propiedad de Don Miguel Sevilla Fructuoso tratado con aceite esencial de clavo (del 29 de enero de 2013 al 5 de febrero de 2013).



**Figura 7.6.** Tomate con *Cladosporium* propiedad del Grupo G's España tratado con la solución testigo (del 25 de febrero de 2013 al 5 de marzo de 2013).





**Figura 7.7.** Tomate con *Botrytis* propiedad del Grupo G's España tratado con aceite esencial de clavo (del 25 de febrero de 2013 al 5 de marzo de 2013).



**Figura 7.8.** Tomate con *Penicillium* propiedad del Grupo G's España tratado con la solución testigo (del 27 de febrero de 2013 al 5 de marzo de 2013).

Algunos de los tomates aparecían muy descompuestos por lo que se hicieron las pruebas de actividad pectinolítica de la patata y la del metabolismo anaerobio-aerobio

de la glucosa en medio de cultivo O/F. Con estas pruebas se quería comprobar si los causantes de estas podredumbres eran bacterias, y concretamente se quiso detectar la presencia de *Erwinia carotovora*, pero la prueba de actividad pectinolítica salió negativa y la del metabolismo anaerobio-aerobio dio un resultado aerobio; por lo que se concluyó que la bacteria era de tipo saprófito y que crecía al mismo tiempo que los hongos causando podredumbre.

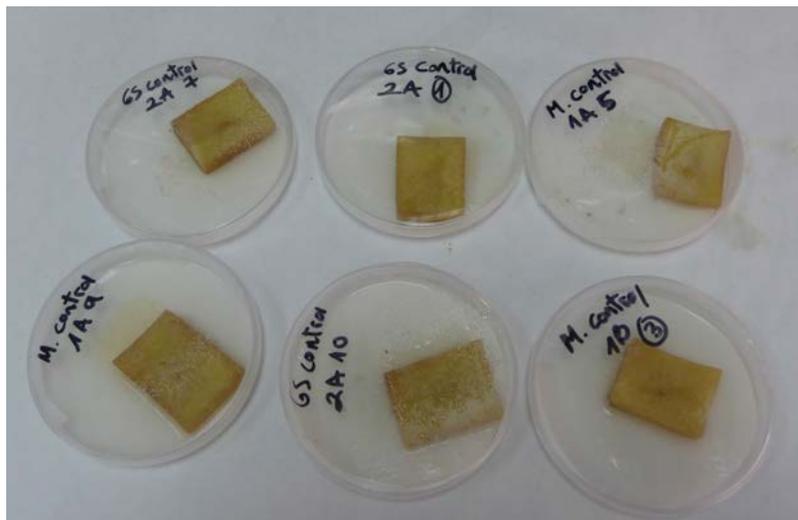


Figura 7.9. Prueba de actividad pectinolítica de la patata.

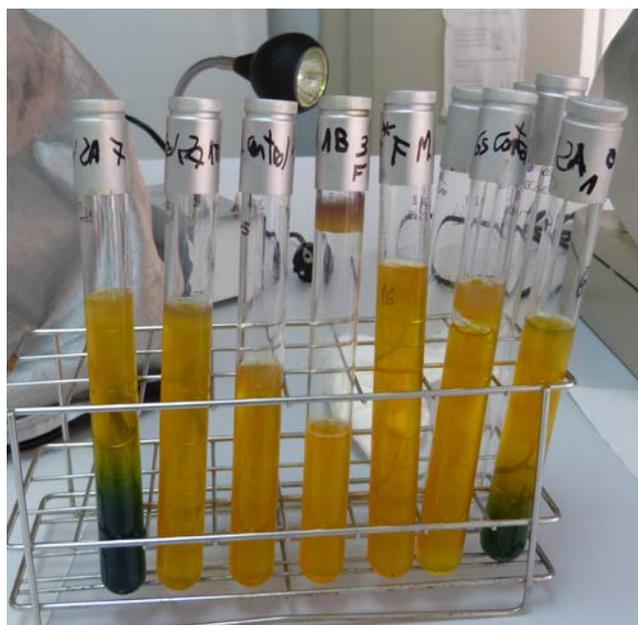
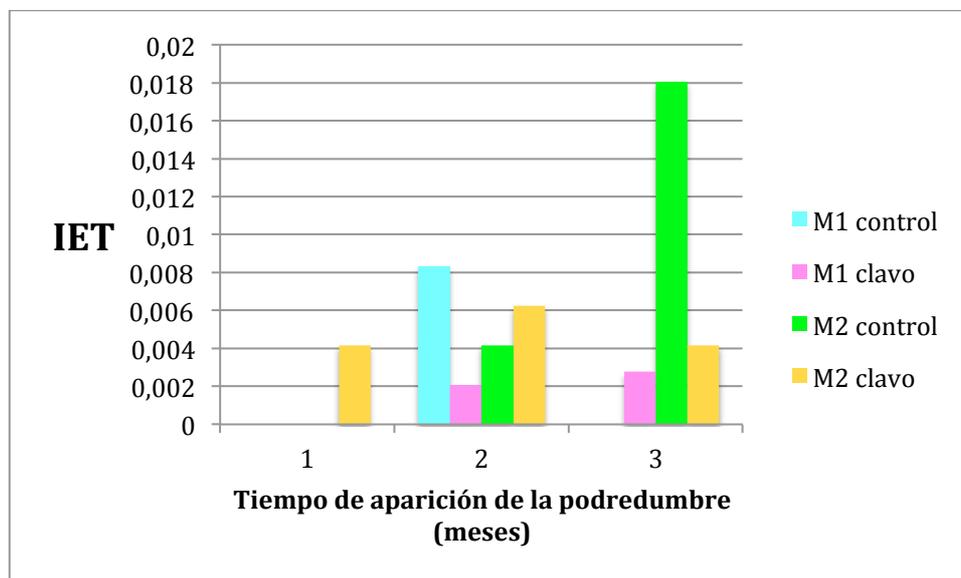
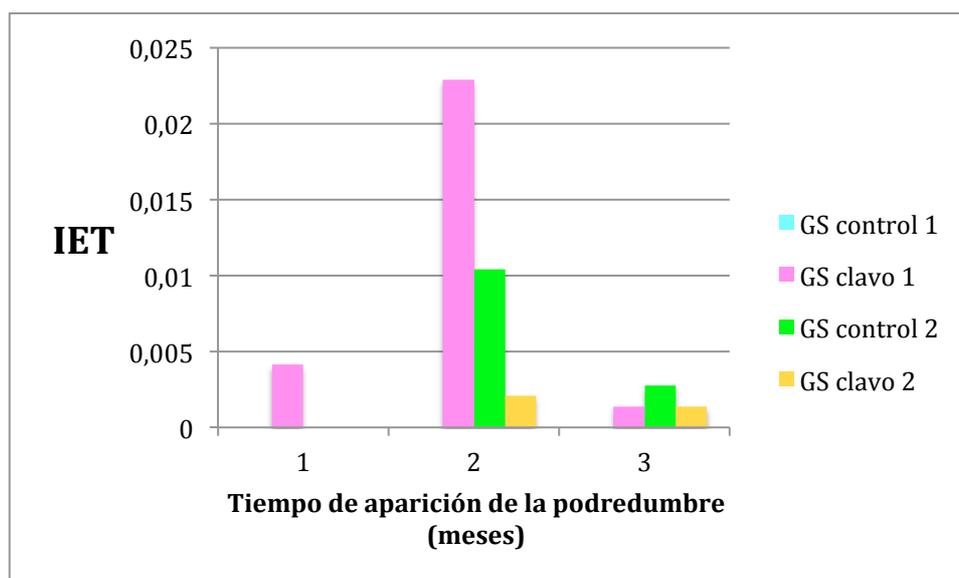


Figura 7.10. Prueba del metabolismo anaerobio-aerobio de la glucosa en medio de cultivo O/F.

Al analizar los datos conjuntamente (incidencia y severidad) de la podredumbre gris se utilizó el Índice de Efectividad del Tratamiento (IET) (Figuras 7.11. y 7.12). En estos gráficos, se puede apreciar que el tratamiento con aceite esencial aplicado no redujo la podredumbre significativamente, además produjo manchas en la piel del fruto. Se comprobó que el tratamiento no retardó el desarrollo de la podredumbre, sobre todo para los tomates del Grupo G's España donde, durante el segundo mes, se presentó una altísima IET, mostrando la escasa efectividad del tratamiento con aceite esencial de clavo.



**Figura 7.11.** Evolución de *Botrytis cinerea* con los valores medios de incidencia y severidad, expresada como Índice de Efectividad del Tratamiento (IET), en los tomates de Don Miguel Sevilla Fructuoso inoculados con conidios de *Botrytis cinerea* y sometidos a un tratamiento testigo y a otro con aceite esencial de clavo, tras su almacenamiento durante 95 días con 19°C y una humedad relativa del 90%.



**Figura 7.12.** Evolución de *Botrytis cinerea* con los valores medios de incidencia y severidad, expresada como Índice de Efectividad del Tratamiento (IET), en los tomates del Grupo G's España inoculados con conidios de *Botrytis cinerea* y sometidos a un tratamiento testigo y a otro con aceite esencial de clavo, tras su almacenamiento durante 95 días con 19°C y una humedad relativa del 90%.

#### 7.4. Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos podemos concluir de la siguiente forma:

- Los hongos que tuvieron mayor incidencia fueron *Penicillium* para los tomates del Grupo G's España y *Alternaria* para los de Don Miguel Sevilla Fructuoso. En cambio, *Botrytis* afectó en todos los aislados pero su incidencia más alta fue de un 33,3%, mientras que *Penicillium* alcanzó un 60% de incidencia en los tomates del Grupo G's España. *Alternaria* llegó a alcanzar otro 60% de incidencia en los tomates de Don Miguel Sevilla Fructuoso; siendo estos porcentajes casi el doble de incidencia causada por *Botrytis*.
- Al analizar los datos conjuntamente (incidencia y severidad) a partir del Índice de Efectividad del Tratamiento (IET) se apreció que el tratamiento con aceite esencial de clavo aplicado no redujo de manera significativa la podredumbre; es decir, este tratamiento no controló bien el desarrollo de la podredumbre gris. Sin

embargo, sí que lo hizo en el experimento *in vitro*. Esto demostró que la aplicación del aceite a los tomates no presentó efectividad, por lo que habría que optimizar el método de aplicación o bien investigar otros tipos de aceites que mostraran una alta eficiencia *in vitro* a dosis muy bajas. También se ha comprobado el alto efecto que tiene el tipo de aislado de *B. cinerea*, que repercute a la hora de tomar una solución única en el control de la podredumbre gris en tomate.



## **CAPÍTULO 8**

### **CONCLUSIONES**



## Capítulo 8. CONCLUSIONES

Basándonos en que los extractos o esencias de plantas constituyen una expectativa esperanzadora de futuro debido a su baja toxicidad para el medio ambiente y a sus propiedades antifúngicas y tras los estudios realizados con la aplicación de aceites esenciales de canela, tomillo, clavo y mandarina para el control de la podredumbre gris en tomate, concluimos lo siguiente:

- Los tratamientos realizados con esencia de canela y mandarina no ejercieron apenas efecto antifúngico, permitiendo la adaptación al medio del hongo y creciendo aproximadamente de igual manera que la solución testigo, sin tratamiento alguno. El efecto de la esencia de mandarina a la concentración de 500  $\mu\text{L/L}$  fue algo mayor que el de canela.
- En cuanto a la esencia de mandarina, la misma dosis produjo un efecto contrario al deseado, es decir, no inhibió el crecimiento de *Botrytis cinerea*, sino que lo estimuló. La explicación a este efecto puede deberse a que los extractos de aceites esenciales pueden contener ciertas sustancias favorecedoras del crecimiento que enmascaran el escaso efecto inhibitor de las sustancias antimicrobianas que poseen sobre los aislados ensayados en este estudio.
- Los tratamientos realizados con extractos de clavo y tomillo si tuvieron efecto antifúngico teniendo una tasa de crecimiento de aproximadamente la mitad que la solución testigo. El efecto de la esencia de clavo a la concentración de 500  $\mu\text{L/L}$  (dosis de 10  $\mu\text{L/placa}$ ) fue algo mayor que con esencia de tomillo.
- Se observó una tendencia descendente en la cantidad de conidios que crecieron por  $\text{cm}^2$  en todos los aislados de *Botrytis cinerea* conforme se aumentó la concentración del aceite esencial de clavo.
- Se redujeron considerablemente el crecimiento en masa del micelio de *Botrytis cinerea*, de manera proporcional a la dosis aplicada de aceite, en todos los

aislados, exceptuando el aislado M1 que obtuvo pesos variables e independientes de la dosis aplicada.

- La formación de esclerocios se vio reducida ya que el aceite esencial de clavo se opone al desarrollo del hongo. En la dosis de 500  $\mu\text{L/L}$  es cuando se empiezan a formar esclerocios de manera más uniforme.
- La concentración de 750  $\mu\text{L/L}$  inhibió completamente el desarrollo del hongo en el caso del aislado M1.
- El hongo que con más incidencia afectó fue *Penicillium* para los tomates del Grupo G's España y *Alternaria* para los de Don Miguel Sevilla Fructuoso. En cambio, *Botrytis* afectó en todos los aislados pero su incidencia más alta fue de un 33,3%, mientras que *Penicillium* alcanzó un 60% de incidencia en los tomates del Grupo G's España y *Alternaria* llegó a alcanzar otro 60% de incidencia en los tomates de Don Miguel Sevilla Fructuoso; siendo estos porcentajes casi el doble de incidencia causada por *Botrytis*.
- Al analizar los datos conjuntamente (incidencia y severidad) a partir del Índice de Efectividad del Tratamiento (IET) se apreció que el tratamiento con aceite esencial de clavo aplicado no redujo de manera significativa la podredumbre; es decir, este tratamiento no controló bien el desarrollo de la podredumbre.

## **CAPÍTULO 9**

# **BIBLIOGRAFÍA**



## Capítulo 9. BIBLIOGRAFÍA

- Aceites esenciales. [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com) . Acceso en enero de 2013.
- Aceite esencial. <http://es.wikipedia.org/wiki/> . Acceso en diciembre de 2012.
- Agrios, G.N. 2010. Fitopatología, 2ª ed., Ed. Limusa. 838 p.
- Alfonso, C., Raposo, R., Melgarejo, P. 2000. Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. *Plant Pathology* 49: 243-251.
- Alternaria tomatophila* en tomate. [www.vegetablemdonline.ppath.cornell.edu](http://www.vegetablemdonline.ppath.cornell.edu) . Acceso en marzo de 2013.
- Amselem, J., Billault, A., Choquer, M., Couloux, A., Cuomo, C., De Caprio, D., Dickman, M., Fillinger, S., Fournier, E., Galagan, J., Giraud, C., Kodira, C., Kohn, L., Levis, C., Mauceli, E., Pommier, C., Pradier, J.-M., Quevillon, E., Rollins, J., Segurens, B., Simon, A., Viaud, M., Weissenbach, J., Wincker, P., Lebrun, M-H. 2008. Whole genome sequencing of the fungal plants pathogens *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. 3<sup>rd</sup> Botrytis Genome Workshop. 25-27 septiembre 2008. Tenerife, España.
- Andrés-Yeves, M. F. y otros, 1991. Manual de laboratorio, diagnóstico de hongos, bacterias y nemátodos fitopatógenos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Ardi, R., Kobiler, I., Jacoby, B., Keen, N.T., Prusky, D. 1998. Involvement of epicatechin biosynthesis in the activation of the mechanism of resistance of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 53: 269-285.
- Arteca, R.N. 1996. Plant Growth Substances. Principles and Applications. Chapman & Hall, New York, USA, 332 p.
- Barkai-Golan, R. 2001. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. Development and Control. Elsevier, Amsterdam, Holanda. 418 p.
- Barnett H.L., Hunter B.B. 1999. Illustrated Genera of Imperfect Fungi (4<sup>o</sup> ed.). APS – The American Phytopathological Society Press – St. Paul, MN, EE.UU. 218 p.
- Beever R.S. & Weeds P.L. 2004. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. En: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N. (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 29-52.

- Ben-Yehosua, S., Rodov, V., Kim, J.J., Carmeli, S. 1992. Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 1217-1221.
- Blancard, D. 2011. Enfermedades del tomate. Identificar, conocer, controlar. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 679 p.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223–253.
- Cotoras M., García C., Mendoza L. 2009. *Botrytis cinerea* isolates collected from grapes present different requirements for conidia germination. *Mycologia*, 101(3):287-295.
- Datos estadísticos del tomate. [www.magrama.gob.es/es/](http://www.magrama.gob.es/es/) . Estadísticas de Comercio Exterior de España. Agencia Estatal de Administración Tributaria. Acceso en enero de 2012.
- Daughtrey M.L., WICK R.L. AND PETERSON J.L. (1995). Compendium of Flowering Potted Plant Diseases. APS – The American Phytopathological Society Press – St. Paul, MN, USA. 90p.
- Davidson, P.M. 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. En: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.). *Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Whashington D.C., EE.UU., 520-556.
- Eckert, J.W., Ratmayake, M. 1994. Role of volatile compounds from wounded oranges in induction of germination of *Penicillium digitatum* conidia. *Phytopathology*, 84: 764-750.
- Elad, Y., Evensen, K. 1995. Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 85(6): 637-643.
- Elad, Y., Shtienberg, D. 1995. *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. *Integrated Pest Management Reviews* 1: 15-19.
- ELAD Y., WILLIAMSON B., TUDZYNSKI P. AND DELEN N. (2004). *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems – an introduction. In: ELAD Y., WILLIAMSON B., TUDZYNSKI P. AND DELEN N. (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-8.
- El cultivo del tomate. [www.infoagro.com](http://www.infoagro.com) . Infoagro Systems. S.L. Madrid. Acceso en marzo de 2013.
- El tomate en la Región de Murcia. [www.proexport.es](http://www.proexport.es) . Acceso en febrero de 2013.

- El Ghaouth, A., Arul, J., Wilson, C., Benhamou, N. 1997. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 12: 183-194.
- Enfermedades de los vegetales. [www.ag.arizona.edu](http://www.ag.arizona.edu) . Acceso en febrero de 2013.
- Estudios sobre los aceites esenciales. [www.postharvest.com.au/](http://www.postharvest.com.au/) . Sydney Postharvest Laboratory Information Sheet. Essential Oils: A new idea for postharvest disease control. Acceso en diciembre de 2012.
- Fusarium oxysporum* en tomatera. [www.broadinstitute.org/news/1439](http://www.broadinstitute.org/news/1439) . Acceso en diciembre de 2012.
- Hammer, P.E., Yang, S.F., Reid, M.S., Marois, J.J. 1990. Postharvest control of *Botrytis cinerea* infections on cut roses using fungistatic storage atmospheres. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115(1): 102-107.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler, D.N. 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 8th ed. Wallingford: CAB International. 616 p.
- Hernández, M. C.. 2011. Evaluación de la esencia de tomillo (*Thymus vulgaris*) y la esencia de enebro (*Juniperus communis*) como alternativa a los fungicidas tradicionales en el control de las podredumbres de naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Trabajo fin de carrera, Escuela Técnico Superior de Ingeniería Agronómica, Cartagena.
- Ippolito, A., El Ghaouth, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M. 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology*, 19: 265-272.
- Katan, T. 1982. Resistance to 3,5-dichlorophenyl-N-cyclic imide ('dicarboximide') fungicides in the grey mould pathogen *Botrytis cinerea* on protected crops. *Plant Pathology*, 31: 133-141.
- Klee, H.J., hayford, M.B., Kretzner, K.A., Barry, G.F., Kishore, G.M. 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell*, 3: 1187-1193.
- Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2839-2845.
- Maroto, J. V., 1997. Etiología y descripción de las principales fisiopatías de la horticultura mediterránea. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. 96 p.
- Martínez, J.A. 2012. Natural Fungicides Obtained from Plants, Fungicides for Plant and Animal Diseases, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), ISBN: 978-953-307-804-5, InTech, Con acceso en: <http://www.intechopen.com/books/fungicides-for-plant-and-animal-diseases/natural-fungicides-obtained-from-plants>.

- Martínez J.A., Bañón S. 2007. Differential effects of gibberellic acid on the growth of *Botrytis cinerea* isolated from various ornamental plants. *XVI International Plant Protection Congress*, Glasgow, Scotland, UK, 15-18 October 2007. Congress Proceedings, volume 2:780-781.
- Martínez F., Blancard D., Lecomte P., Levis C., Dubos B., Fermaud M. 2003. Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 109:479-488.
- Martínez J.A., Gómez-Bellot M.J., Bañón S. (2009a). Temperature-dependent growth of *Botrytis cinerea* isolates from potted plants. *Comm. Appl. Biol. Ghent University*, 74(3):729-738.
- Martínez J.A., Gómez-Bellot M.J., Bañón S. (2011b). Effects of calcium chloride on *Botrytis cinerea* isolates obtained from ornamental plants. International Congress of Postharvest Pathology, Lleida, Spain, 11-14 abril 2011.
- Martínez, J.A., González, R. 2012. Control de las podredumbres verde y azul de los cítricos con extractos de aceites esenciales de clavo y canela. *Levante Agrícola. Especial Postcosecha*: 202-209.
- Martínez, J.A., Roca, M., Bañón, S. 2012. *Bacillus velezensis* affects growth of *Botrytis cinerea* isolates obtained from potted plants. *64th International Symposium on Crop Protection (ISCP 2012)*, Ghent, Belgium, 22<sup>nd</sup> mayo 2012.
- Martínez J.A., Valdés R., Vicente M.J., Bañón S. 2008a. Phenotypical differences among *B. cinerea* isolates from ornamental plants. *Comm. Appl. Biol. Ghent University*, 73(2):121-129.
- Martínez, J.A., Valdés, R., Ochoa, J., Bañón, S. 2008b. Influencia del ácido giberélico en el desarrollo de *Botrytis cinerea* aislado de plantas ornamentales. *Cuadernos de Fitopatología*, 95: 15-24.
- Martínez J.A., Valdés R., Bañón S. 2010. Effects of paclobutrazol on *Botrytis cinerea* isolates obtained from potted plants. *Comm. Appl. Biol. Ghent University*, 75(4):709-719.
- Martínez, J.A., Valdés, R., Gómez-Bellot, M.J., Bañón, S. 2011a. Effects of índole-3-acetic acid on *Botrytis cinerea* isolates obtained from potted plants. *Comm. Appl. Biol. Ghent University*, 76(4): 643-651.
- Medidas preventivas y curativas. <http://www.syngenta.com/> . Acceso en diciembre de 2012.
- Melgarejo, P., García-Jiménez, J., Jordá, M.C., López, M.M., Andrés, M.F., Duran-Vila, N. 2010 Patógenos de Plantas Descritos en España (2ª ed.). Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, 854 p.

- Mercier, J. Arul, J., Ponnanapalan, R., Boulet, M. 1993. Induction of 6-methoxymellein and resistance to storage pathogens in carrot slices by UV-C. *J. Phytopathol.*, 137: 44-54.
- Mount, M.S., Berman, P.M. 1994. Genetic manipulation of plants to improve postharvest disease resistance. *HortScience*, 29: 762-768.
- Mucor hiemales* en tomate. [www.flickriver.com](http://www.flickriver.com) Acceso en enero de 2013.
- Narayanasamy, P. (2006). Postharvest Pathogens and Disease Management. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA, 578 p.
- Nigro, F., Ippolito, A., Lima, G. 1998. Use of UV-C to reduce *Botrytis* storage rot of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 13: 171-181.
- Normas internacionales de salubridad en instalaciones industriales (Eurepgap/BRC/IFS).  
[www.cetpenedes.es/cet/index.php?option=com\\_content&view=article&id=132:sistemas-de-gestio-agroalimentaria-iso-22000brcifseurepgap&catid=61:medi-ambient-qualitat-i-prevencio&Itemid=371&lang=es](http://www.cetpenedes.es/cet/index.php?option=com_content&view=article&id=132:sistemas-de-gestio-agroalimentaria-iso-22000brcifseurepgap&catid=61:medi-ambient-qualitat-i-prevencio&Itemid=371&lang=es) . Acceso en noviembre de 2012.
- Llewellyn, G.C., Burkett, M.L., Eadie, T. 1981. Potential mould growth, aflatoxin production, and antimycotic activity of selected natural spices and herbs. *J. Assoc. Off Anal Chem.*, 64(4): 955-960.
- Palou, L. 2007. Evaluación de alternativas para el tratamiento antifúngico en poscosecha de cítricos de Producción Integrada. *Horticultura*, Vol. XXV, núm. 3 junio 2007, pág. 82 - pág. 93
- Pectobacterium carotovorum* en tomate. [www.hortalizas.com/articulo/32128/3/5-enfermedades-poscosecha](http://www.hortalizas.com/articulo/32128/3/5-enfermedades-poscosecha). Acceso en diciembre de 2012.
- Porat, R., Lers, A., Dori, S., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A., Wilson, C.L., Droby, S. 1999. Induction of chitinase and  $\beta$ -1,3-endoglucanase proteins by UV irradiation and wounding in grapefruit peel tissue. *Phytoparasitica*, 27: 233-238.
- Powell, A.L.T., D'Hallewin, G., Hall, B.D., Stotz, H., Labavitch, J.M., Bennett, A.B. 1994. Glycoprotein inhibitors of fungal polygalacturonases: expression of pear PGIP improves resistance in transgenic tomatoes. *Plant Physiol.*, 105: 159.
- Plotto, A., D. D. Roberts, and R. G. Roberts. 2003. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Acta Hort.* 628:737-745
- Principales síntomas de *Mycovellosiella fulva*.  
[www.sinavimo.gov.ar/plaga/cladosporium-fulvum](http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/cladosporium-fulvum). Acceso en diciembre de 2012.

- Prusky, D., Keen, N.T. 1995. Inducible preformed compounds and their involvement in the resistance of plants to pathogens. En: Reuveni, R. (ed.), Novel Approaches to Integrated Management, Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, pp. 139-152.
- Prusky, D., Plumbley, R.A., Kobiler, I. 1991. Modulation of natural resistance of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides* by CO<sub>2</sub> treatment. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 39: 325- 334.
- Regnault-Roger, C., Philogéne, B.J.R., Vicent, C. 2004. Biopesticidas de origen vegetal. 1ª Edición en español. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Reyes, A.A. 1990. Pathogenicity, growth, and sporulation of *Mucor mucedo* and *Botrytis cinerea* in cold or CA storage. *HortScience*, 25(5): 549-552.
- Rhizopus stolonifer* en tomate. [www.agritech.tnau.ac.in/crop\\_protection/crop\\_prot\\_crop%20diseases\\_postharvest\\_tomato.html](http://www.agritech.tnau.ac.in/crop_protection/crop_prot_crop%20diseases_postharvest_tomato.html) . Acceso en diciembre de 2012.
- Scagel, R.F. 1983. El Reino Vegetal. Ed. Omega, España. 778 p.
- Sharon A., Elad Y., Barakat R., Tudzynski P. 2004. Phytohormones in *Botrytis*-plant interactions. En: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 163-179.
- Shiva, C.M., Calvo, M.A. 2003. Aspectos sobre la capacidad antibacteriana de extractos naturales y ácidos orgánicos. *Anales de la Real Academia de Doctores de España*, 7: 121-129.
- Snowdon, A.L. 1990. A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Volume 1: General Introduction and Fruits. Wolfe Scientific Ltd., Cambridge, Reino Unido, 302 p.
- Snowdon, A.L. 1991. A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Volume 2: Vegetables. Wolfe Scientific Ltd., Cambridge, Reino Unido, 416 p.
- Solanum lycopersicum*. <http://es.wikipedia.org/wiki/> . Acceso en noviembre de 2012.
- Stotz, H.U., Powell, A.L.T., Damon, S.E., Greve, C.L., Bennett, A.B., Labavitch, J.M. 1993. Molecular characterization of polygalacturonase inhibitor from *Pyrus communis* L. cv. Barlett. *Plant Physiol.*, 102: 133-138.
- Sustancias catalogadas por la FDA (Food and Drug Administration, EE.UU.) como sustancias seguras para los alimentos (GRAS – “Generally Recognized as Safe”) <http://www.fda.gov>. Acceso en marzo de 2013.

- Tudzynski, P., Siewers, V. 2004. Approaches to molecular genetics and genomics of *Botrytis*. En: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 53-66.
- Tuset, J.J. 1987. Podredumbre de los Frutos Cítricos. Consejería de Agricultura y Pesca. Generalitat Valenciana, 206 p.
- Variedad Boludo. [www.seminis.com](http://www.seminis.com) . Acceso en noviembre de 2012.
- Variedad Kumato. <http://www.kumato.com/en.aspx> . Acceso en diciembre de 2012.
- Vélez, M. J.. 2006. Evaluación de diversas sustancias como alternativa a los fungicidas tradicionales en el control de las podredumbres de limón (*Citrus limon* L., Burm).
- Viñas, I., Teixidó, N., Abadias, M., Torres, R., Usall, J. 2005. Resistencias a fungicidas en postcosecha de fruta. Situación actual y perspectivas. *Phytoma España*, 173: 29-34.
- Vivanco, J.M., Cosio, E., Loyola-Vargas, V.M., Flores, H.E. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia*, febrero: 68-75.
- Yarden, O., Katan, T. 1993. Mutations leading to substitution at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strain of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 83: 1478-1483.
- Zahavi, T., Cohen, L., Weiss, B., Schena, L., Daus, A., Kaplunov, T., Zutkhi, J., Ben-Aire, R., Droby, S. 2000. Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biology and technology*, 20: 115-124.