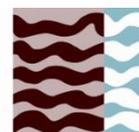




Universidad
Politécnica
de Cartagena



TAI+DAA
Máster y Doctorado
Universidad Politécnica de Cartagena



ETSia
Cartagena

**Máster Universitario en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo
Agrícola y Agroalimentario**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Estudio de la patogenicidad y sensibilidad a fungicidas de la microbiota penicílica asociada a frutos cítricos

Alumna: Raquel Pérez Duque

Tutores: Juan Antonio Martínez López y M^a Ángeles Parra Sáez

Cartagena, 19 de octubre de 2018



La investigación desarrollada en el presente trabajo está encuadrada dentro del Proyecto de Máster en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Agroalimentario de la **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA** titulado:

“ESTUDIO DE LA PATOGENICIDAD Y SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS DE LA MICROBIOTA PENICÍLICA ASOCIADA A FRUTOS CÍTRICOS”

Proyecto que es dirigido por el Dr. Juan Antonio Martínez López e Ing. M^a Ángeles Parra Sáez del Grupo de Investigación Protección de Cultivos

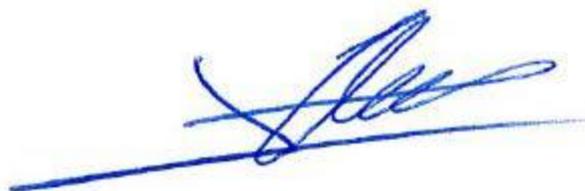
AUTORIZACIÓN DE LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

D. Juan Antonio Martínez López

EN CALIDAD DE DIRECTOR INFORMA:

Que el trabajo titulado **“Estudio de la patogenicidad y sensibilidad a fungicidas de la microbiota penicílica asociada a frutos cítricos”** ha sido realizado por **D^a. Raquel Pérez Duque**, bajo la dirección y supervisión de D. Juan Antonio Martínez López y que se autoriza al alumno a la defensa del mismo.

En Cartagena, a 16 de junio de 2014



Fdo.: Juan Antonio Martínez López



AGRADECIMIENTOS

Dar las gracias al Dr. Juan Antonio Martínez López, director y tutor de este Trabajo Fin de Estudios, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo dentro del Grupo de Protección de Cultivos de la Universidad Politécnica de Cartagena, y por la estimada ayuda en la corrección del documento.

A la Ing. M^a Ángeles Parra Sáez por la ayuda prestada, dedicación y profesionalidad.

ABREVIATURAS

μ : Tasa de crecimiento ($\text{cm}^2/\text{día}$)

μL : Microlitros

0.0025: Volumen de la unidad mínima de recuento (mm^3)

$A(t+1)$: Área de la colonia un día determinado (cm^2)

A_{micelio} : Área de micelio (cm^2)

A_t : Área de la colonia el día anterior o días anteriores considerados a $t + 1$ (cm^2)

c : Número medio de conidios en unidad mínima de recuento (*conidios*)

C: Conidiogénesis

HR: Humedad Relativa

mg: Miligramo

mil: Millones

mL: Mililitro

P/v : *Peso/Volumen*

PYR: Pirimetanil

T^a : Temperatura

$t + 1$: Un día determinado (días)

TBZ: Tiabendazol

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

T_{max} . Temperatura máxima

T_{min} . Temperatura mínima

UPCT. Universidad Politécnica de Cartagena

V_{agua} : Volumen de agua (mL)

RESUMEN

Las enfermedades poscosecha ocasionadas por el género *Penicillium* constituyen uno de los principales problemas del sector cítrico en España. *P. digitatum* y *P. italicum* son los fitopatógenos más importantes en cítricos, causando graves problemas económicos. El objetivo de este trabajo fue valorar la posible patogenicidad de varias especies del género *Penicillium* (*P. digitatum*, *P. italicum*, *P. citrinum*, *P. solitum*, *P. ulaiense*, *P. adametzoides* y *P. brevicompactum*), obtenidas de la microbiota de los principales frutos cítricos producidos en España: limón, naranja, mandarina y pomelo. Para ello, se llevó a cabo un estudio *in vitro* previo en cultivo de agar albedo obtenido de la corteza de los distintos frutos cítricos seleccionados, con el fin de estudiar el desarrollo de estos hongos sobre este tipo de sustrato y descartar, de este modo, aquellos que no fuesen capaces de crecer. Seguidamente, se realizó un estudio *in vivo* con aquellos organismos capaces de crecer en medio de albedo, para estudiar la posible patogenicidad de cada una de las especies fúngicas sobre cada tipo de fruto cítrico. De todas las especies estudiadas, *P. ulaiense* demostró ser capaz de producir podredumbre en limón, naranja y mandarina. Al tratarse de un nuevo patógeno de frutos cítricos no descrito anteriormente en España, se propuso un ensayo *in vitro* para conocer su comportamiento a los fungicidas tiabendazol y pirimetanil, empleados para el control de podredumbre verde y azul de cítricos. El control de la podredumbre gris originada por *P. ulaiense* mediante el empleo de tiabendazol permitió observar un retardo en el crecimiento del patógeno en todos los casos de estudio, incluso a dosis bajas del fungicida. En el medio de cultivo con pirimetanil, el patógeno era capaz de crecer a dosis altas de fungicida. Del mismo modo, la conidiogénesis de *P. ulaiense* se ve mermada en mayor medida cuando es sometido a un medio de cultivo con TBZ.

Palabras clave: agar albedo, *Penicillium ulaiense*, pirimetanil, podredumbre, tiabendazol.

ABSTRACT

Post-harvest diseases caused by the genus *Penicillium* are one of the main problems of the citrus sector in Spain. *P. digitatum* and *P. italicum* are the most important phytopathogens in citrus.

The objective of this work was to evaluate the possible pathogenicity of several species of the genus *Penicillium* (*P. digitatum*, *P. italicum*, *P. citrinum*, *P. solitum*, *P. ulaiense*, *P. adametzoides* and *P. brevicompactum*), obtained from the microbiota of the main citrus fruits produced in Spain: lemon, orange, tangerine and grapefruit. To this end, a previous *in vitro* study was carried out on the culture of albedo agar obtained from the bark of the different selected citrus fruits, in order to study the development of these fungi on this type of substrate and discard, in this way, those who were not able to grow. Next, an *in vivo* study was carried out with those organisms able to believe in albedo medium, to study the possible pathogenicity of each of the fungal species on each type of citrus fruit. Of all the species studied, *P. ulaiense* proved capable of producing rot in lemon, orange and tangerine. Being a new citrus fruit pathogen not previously described in Spain, an *in vitro* test was proposed to know its behavior to the fungicides thiabendazole and pyrimethanil, used to control green and blue rot of citrus fruits. The control of the gray rot originated by *P. ulaiense* by the use of thiabendazole allowed observing retardation in the growth of the pathogen in all the cases of study, even at low doses of the fungicide. In the culture medium with pyrimethanil, the pathogen was able to grow at high doses of fungicide. In the same way, conidiogenesis of *P. ulaiense* is diminished to a greater extent when it is subjected to a culture medium with TBZ.

Key words: albedo agar, *Penicillium ulaiense*, pyrimethanil, rot, thiabendazole.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Generalidades del género <i>Citrus</i>	1
1.2. El sector cítrico.....	2
1.3. Pérdidas poscosecha en cítricos.....	2
1.4. Generalidades del género <i>Penicillium</i>	4
1.4.1. Especies del género <i>Penicillium</i> objeto de estudio.....	6
1.4.1.1. <i>Penicillium digitatum</i> (Pers.: Fr) Sacc.....	6
1.4.1.2. <i>Penicillium italicum</i> Wehner.....	6
1.4.1.3. <i>Penicillium ulaiense</i> H.M. Hsieh.....	7
1.4.1.4. <i>Penicillium citrinum</i> Thom.....	7
1.4.1.5. <i>Penicillium solitum</i>	7
1.4.1.6. <i>Penicillium adametzoides</i>	8
1.4.1.7. <i>Penicillium brevicompactum</i>	8
1.4.2. Empleo de fungicidas para disminuir las pérdidas poscosecha en cítricos.	8
1.4.2.1. Tiabendazol (TBZ).....	9
1.4.2.2. Pirimetanil (PYR).....	9
2. OBJETIVO.....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. Material vegetal y material fúngico.....	11
3.1.1. Material vegetal.....	11
3.1.2. Material fúngico.....	11
3.2. Estudio <i>in vitro</i> del crecimiento en medio de cultivo con albedo.....	12
3.2.1. Preparación de medio de cultivo con albedo.....	13
3.2.2. Siembra en medio con albedo.....	14
3.3. Estudio <i>in vivo</i> de la patogenicidad de las especies de <i>Penicillium</i>	15
3.3.1. Preparación de los frutos.....	15
3.3.2. Obtención de la suspensión de conidios para inoculación.....	16

3.3.3.	Inoculación en fruto	17
3.4.	Estudio <i>in vivo</i> de la patogenicidad de <i>Penicillium ulaiense</i> en pomelo.....	17
3.4.1.	Preparación de los frutos de pomelo	18
3.4.2.	Obtención de la suspensión de conidios de <i>P. ulaiense</i>	18
3.4.3.	Inoculación de la suspensión de conidios en pomelos.....	18
3.5.	Efecto del tiabendazol y pirimetanil sobre el desarrollo de <i>P. ulaiense</i>	19
3.6.	Caracterización del crecimiento de <i>P. ulaiense</i>	21
3.6.1.	Masa de micelio y conidiogénesis.....	21
3.6.1.1.	Micelio aéreo	22
3.6.1.2.	Conidiogénesis (<i>C</i>).....	22
3.6.1.3.	Micelio sumergido	23
3.6.2.	Área de crecimiento de la colonia (cm ²)	24
3.6.3.	Tasa de crecimiento (cm ² /día).....	24
3.6.4.	Duración de la fase lineal (días).....	25
4.	RESULTADOS	26
4.1.	Estudio <i>in vitro</i> del crecimiento en medio de cultivo con albedo	26
4.2.	Estudio <i>in vivo</i> de la patogenicidad de especies del género <i>Penicillium</i> en frutos cítricos	26
4.2.1.	Prueba de viabilidad de la suspensión de conidios	29
4.2.2.	Estudio <i>in vivo</i> de la patogenicidad de <i>P. ulaiense</i> en pomelo	29
4.3.1.	Micelio aéreo (g).....	30
4.3.2.	Micelio sumergido (g)	32
4.3.3.	Conidiogénesis (conidios/cm ²).....	34
4.3.4.	Área de crecimiento de la colonia (cm ²)	35
5.	DISCUSIÓN.....	39
5.1.	Estudio <i>in vitro</i> del crecimiento en medio de cultivo con albedo	39
5.2.	Estudio <i>in vivo</i> de la patogenicidad de especies del género <i>Penicillium</i> en frutos cítricos	39
5.3.	Estudio <i>in vivo</i> de la patogenicidad de <i>P. ulaiense</i> en pomelo.....	40

5.4. Caracterización de <i>P. ulaiense</i>	41
5.5. Caracterización de <i>P. ulaiense</i> en presencia de fungicidas	42
5.6. Perspectiva del desarrollo completo de la investigación en curso	42
6. CONCLUSIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXO I.....	1
ANEXO II.....	3

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del género *Citrus*

El género *Citrus* está englobado en la *Clase Magnoliopsida*, perteneciente al *Orden Geraniales* dentro de la Familia de las Rutáceas. De todas las especies de cítricos, el limonero (*Citrus limon*), naranjo (*Citrus sinensis*), mandarino (*Citrus reticulata*) y pomelo (*Citrus paradisi*) son de especial interés en el sureste de España.

El fruto en cítricos, también denominado hesperidio, presenta dos partes bien diferenciadas: corteza y gajos.

- La corteza es la parte externa del fruto y se distingue en dos tejidos: epicarpio y mesocarpio. El epicarpio es la parte más externa de la corteza, englobando la epidermis y la dermis. El mesocarpio se diferencia en mesocarpio interno y mesocarpio externo. La zona pigmentada del hesperidio está formada por el epicarpio y el mesocarpio externo, la cual recibe el nombre de flavedo y es de color amarillo, verde o naranja dependiendo de la especie. El mesocarpio interno recibe el nombre de albedo, es un tejido formado por células dispuestas en forma de red, con grandes espacios vacíos que dan a la corteza un aspecto esponjoso, de color blanquecino por la ausencia de cromatóforos (García et al., 2003).
- La parte comestible del hesperidio es la zona más interna compuesta por el endocarpio, gajos o pulpa, envueltos por membranas carpelares. La pulpa de los frutos tiene color amarillo, verdoso, naranja o rojizo, dependiendo de diversos factores como la especie, variedad, temperatura, posición del fruto en el árbol, temperatura, luz y riego (García et al., 2003).

Los frutos cítricos presentan una curva evolutiva de crecimiento y desarrollo caracterizado por un aumento lento en la fase inicial, seguida de un periodo de fuerte incremento dimensional. En la etapa de maduración, los valores son prácticamente constantes (García et al., 2003). Metabólicamente, el hesperidio se clasifica dentro de los frutos no climatérico cuya madurez completa es alcanzada en el árbol y tras su recolección, no se registran cambios drásticos en la intensidad respiratoria y producción de etileno (Salvador et al., 2007). En la fase de senescencia, el hesperidio disminuye progresivamente su tamaño y calidad.

1.2. El sector citrícola

Las áreas más importantes de producción y distribución de cítricos se corresponden a las regiones tropicales, subtropicales y áridas, donde las condiciones climáticas son idóneas para este tipo de cultivo. Según el informe de la FAO (2016), “*Citrus Fruit: Fresh and processed*”, a nivel mundial los principales productores de cítricos son: China con 32705,9 mil toneladas, Brasil con 16555,1 mil toneladas, la India con 9755,8 mil toneladas, Estados Unidos con 7829 mil toneladas y España, con una producción de 6882 mil toneladas.

A pesar de posicionarse en quinto lugar en producción mundial, España se coloca a la cabeza en exportación de cítricos, y principal productor dentro de la Unión Europea, por delante de Turquía (3652,1 mil toneladas) e Italia (3150,2 mil toneladas). De las 6882 mil toneladas producidas en el año 2016, 4114,1 mil toneladas fueron exportadas a diferentes regiones del mundo. España es el primer exportador mundial de cítricos para el consumo en fresco, con aproximadamente el 80% de la producción destinada a comercio dentro de la propia Unión Europea. En España, el cultivo de cítricos se produce en zonas costeras del este y sur de la península, zonas del litoral y valle, donde el riesgo de heladas es menor y las condiciones edafoclimáticas son idóneas para estas especies. Sin embargo, unas temperaturas generalmente cálidas a lo largo de todo el año favorecen la proliferación de fitopatógenos asociados al cultivo (Palou, 2012).

1.3. Pérdidas poscosecha en cítricos

Las pérdidas económicas ocasionadas por las patologías poscosecha constituyen uno de los principales problemas del sector de cítricos en España y en todo el mundo. En el periodo de tiempo desde que los frutos son recolectados hasta que llegan al consumidor, se produce un elevado porcentaje de pérdidas de producto debido a factores bióticos (Palou, 2012). Se estima que más de la mitad de los frutos cosechados se pierden debido a la descomposición originada por hongos y plagas en el mundo. En los últimos años, el empleo de nuevas tecnologías, la mejora del almacenamiento tras la cosecha, el uso de fungicidas y un mayor conocimiento por parte de los agricultores han permitido disminuir considerablemente dichas pérdidas (Pimenta et al., 2008).

Los factores que determinan la pérdida de calidad en la poscosecha son diversos y no únicamente se centran en poscosecha. Las condiciones en precosecha son de gran

importancia en este sentido: nutrición de la planta, factores climáticos (heladas, viento, cambios bruscos de temperatura), estado de madurez de la planta en el momento de la producción del fruto, etc. Al mismo tiempo, es esencial llevar a cabo unas buenas prácticas agrícolas que minimicen los posibles daños físicos durante el proceso de recogida y transporte. En la poscosecha, los factores que influyen en la calidad del producto están repartidos entre unas adecuadas prácticas de manejo y los procesos metabólicos del fruto: respiración y temperatura (Salvador et al., 2007). En los frutos cítricos la principal causa de deterioro físico es el estrés de agua producido tras la separación de la planta madre. El aumento de la tasa de transpiración causa desecación, arrugamiento y ablandamiento, además de acelerar el proceso de senescencia. En aquellos frutos con una relación superficie/volumen alto, junto a un menor espesor de la corteza, el proceso de transpiración es mayor (Salvador et al., 2007). En poscosecha, el principal factor que limita la vida útil de un producto es la presencia de microorganismos patógenos.

Según la FAO (2004), los hongos constituyen el grupo de organismos más importante desde el punto de vista económico en cuanto a pérdidas producidas en los cultivos de todo el mundo. Constituyen un amplio grupo de organismos eucariotas de nutrición heterótrofa. Existen unas 100.000 especies de las que aproximadamente el 10% son capaces de colonizar tejidos vegetales, capaces de afectar a diferentes órganos de la planta, desde las hojas, pasando por el fruto, el tallo y finalmente el sistema radicular. La sintomatología que producen es muy variada, no solo entre familias o géneros, sino dentro de una misma especie es posible observar diferente comportamiento del patógeno según las condiciones ambientales.

El sector cítrico ha crecido en los últimos años. Los cítricos se consideran productos frescos capaces de permanecer en buen estado bajo condiciones de conservación óptimas, durante elevados periodos de tiempo. Este hecho, ha permitido realizar exportaciones a largas distancias. Sin embargo, la aceptación de la fruta en los mercados importadores está supeditada a la calidad y al estado sanitario en el momento de la recepción. Dentro de las causas sanitarias, las podredumbres ocasionadas por patógenos poscosecha, constituyen un importante factor de rechazo de las partidas. *Penicillium* constituye el género que mayores pérdidas poscosecha genera en este sector.

1.4. Generalidades del género *Penicillium*

La clasificación taxonómica de *Penicillium* spp. es compleja. La existencia de un modo alternativo de mezcla genética (parasexualidad) ha hecho posible que algunos grupos de hongos hayan ido reduciendo progresivamente la importancia de la reproducción sexual, hasta llegar a desaparecer. Por ello, surgió la necesidad de clasificar todas estas especies según una nueva categoría taxonómica, llamada categoría de anamorfo, ya que las características que se observaron no eran compatibles con la clasificación clásica de especies basada en el tipo de reproducción sexual. La Clase Anamórfica *Deuteromycetes* se trata de un sistema poco convencional pues sólo se basa en caracteres de la reproducción asexual como son: tipo de conidiogénesis y tipo de conidios (Izco et al., 2004).

Conociendo este hecho, el género *Penicillium* pertenece del Phylum *Ascomycota*, Clase *Deuteromycetes*, Orden *Eurociales*, de la Familia *Trichocomaceae*. Atendiendo a los caracteres de la reproducción asexual, *Penicillium* spp., presenta conidiogénesis enteroblástica, en general, portadores de fiálides (células conidiogénicas que producen conidios blásticos en posición basípeta), que originan conidios secos, a menudo formando largas cadenas. El conidióforo de este género es ramificado con aspecto de pincel. Se trata de un género constituido por cerca de 354 especies, capaces de colonizar hábitats muy diversos, desde el suelo hasta la vegetación, aire, alimentos, etc. Las especies que lo componen desempeñan un papel fundamental como descomponedores de materia orgánica, sin embargo, generan podredumbres devastadoras como patógenos poscosecha (Visagie et al., 2014), en el caso de cítricos, las especies más importantes son *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*.

Los conidios son las estructuras de diseminación de *Penicillium* spp., y pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo en estado de latencia hasta que las condiciones ambientales son idóneas para el crecimiento. Esto supone un problema para la industria alimenticia, ya que los conidios son capaces de permanecer viables en el suelo, dentro de las cámaras de almacenamiento o empaquetadoras, pudiendo resistir la desecación, alta temperatura o acción química, y germinar cuando las condiciones son favorables para la infección. La contaminación se produce por ligeras corrientes de aire debido a la estructura característica del conidióforo en forma de pincel, que permite una rápida diseminación. La transmisión puede ocurrir en el cultivo, cuando los frutos son

jóvenes por suspensión de conidios en la corteza de los mismos, en el transporte, en la empaquetadora, cámaras de refrigeración, durante la distribución o en el lugar de destino del producto final. La germinación de conidios de *Penicillium* spp., se produce en presencia de humedad relativa (citándose como niveles críticos entre el 70 y 80% de humedad relativa), con temperaturas óptimas fluctúa entre 17 y 27°C, pudiendo variar de unas especies a otras.

La predisposición del fruto a la infección de *Penicillium* spp., depende de su estado de madurez y/o la presencia de algún tipo de herida en la corteza. Los frutos son más susceptibles al ataque por fitopatógenos después de su recolección debido a la pérdida de resistencia intrínseca de la planta que los protege, y el aumento en la cantidad de agua y nutrientes fácilmente asimilables por el patógeno (Cantu et al., 2008). La madurez del fruto influye en gran medida en su predisposición a la infección. En estadios jóvenes, el fruto presenta defensas naturales capaces de hacer frente a la invasión de patógenos. En este sentido, el exocarpo o corteza juega un papel esencial. La cutícula del fruto actúa como defensa natural realizando la función de barrera física entre el exterior y el interior y presentando moléculas con actividad antimicrobiana que actúan como barrera bioquímica evitando la proliferación externa del patógeno. A pesar de ello, a medida que avanza el proceso de senescencia, se produce una degradación natural de los principales polisacáridos de la pared celular, contribuyendo significativamente en el reblandecimiento del fruto y al incremento de la susceptibilidad frente al patógeno (Cantu et al., 2008).

El daño mecánico durante la poscosecha se produce principalmente por: mala manipulación durante la recolección del producto o malas prácticas durante el proceso de empaquetado. La alteración de la corteza del fruto conlleva la aparición de una zona susceptible a la entrada del patógeno. Las defensas bioquímicas del fruto se sitúan en el flavedo, cuando se produce una herida, el albedo, ausente de cualquier tipo de defensa y rico en nutrientes de fácil asimilación, se ve expuesto a una posible infección.

Cuando *Penicillium* spp., ha penetrado en el interior del fruto, su desarrollo depende de la degradación de la pared celular mediante la acción de enzimas y la producción de nutrientes esenciales para su crecimiento. Los hongos del género *Penicillium* provocan podredumbres en cítricos por la producción de enzimas pectolíticas que ocasionan la

degradación de la lámina media de las paredes celulares, generando pérdida en la turgencia y dando un aspecto acuoso al fruto. Ese aspecto acuoso del fruto se observa inicialmente en una zona concreta y posteriormente, se extiende por todo el fruto con un desarrollo radial. Después, se observa el crecimiento de micelio de color blanquecino sobre la superficie de la zona dañada. La esporulación se produce posteriormente, dando lugar a conidios coloreados muy característicos del género por su aspecto seco (Smoot et al., 1971).

1.4.1. Especies del género *Penicillium* objeto de estudio

1.4.1.1. *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr) Sacc

P. digitatum es un fitopatógeno poscosecha que se encuentra distribuido por todo el mundo ya que es capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas entre 6-37°C (Carrillo, 2003). Es muy común en climas cálidos donde se dan las condiciones óptimas de temperatura y humedad relativa altas para su crecimiento, causando la denominada podredumbre verde de los cítricos, afectando al fruto. El color verde oliva de los conidios es característico de la podredumbre que produce. El aspecto “seco” de las colonias de *P. digitatum* es debido a la disposición en hilera de los conidios sobre los conidióforos, siendo ésta a su vez la causa de su rápida dispersión.

Su control es global en todas las etapas: en precosecha disminuyendo la carga microbiana al descartar los frutos caídos y empleando fungicidas específicos para el patógeno; en poscosecha, eliminando aquellos frutos dañados, ya que son los más vulnerables, además del empleo de fungicidas poscosecha específicos.

1.4.1.2. *Penicillium italicum* Wehner

P. italicum es un fitopatógeno poscosecha de frutos cítricos conocido a nivel mundial por causar la denominada podredumbre azul de los cítricos. De modo característico. *P. italicum* produce conidios de color azul, siendo fácilmente diferenciable de *P. digitatum*. Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 20-27°C, sin embargo, *P. italicum* es capaz de desarrollarse a temperaturas próximas a 5°C.

P. italicum al igual que *P. digitatum* afectan al fruto cuando éste se encuentra debilitado por la separación del árbol. La presencia de aceites esenciales en el exocarpo del hesperidio evita que estos patógenos sean capaces de proliferar en la superficie, por ello,

requieren una herida a través de la cual puedan solventar esa barrera natural y acceder al albedo. El control de *P. italicum* durante toda la línea de producción es idéntico al descrito anteriormente para *P. digitatum*. En ambos casos, los fungicidas comúnmente empleados para el control de la esporulación fúngica son tiabendazol, imazalil y más recientemente pirimetanil (Holmes et al., 1999).

1.4.1.3. *Penicillium ulaiense* H.M. Hsieh

P. ulaiense ha sido catalogado recientemente como fitopatógeno de frutos cítricos en Egipto (Youssef et al., 2010), Japón (Tahiro et al., 2012), Túnez (Rouissi et al., 2015) y Pakistán (Khan et al., 2017). Previamente, *P. ulaiense* había sido identificado en Estados Unidos (Holmes et al., 1993), Australia, Italia, Nueva Zelanda, Sudáfrica (Holmes et al., 1994) y Argentina (Carrillo, 1995). Sin embargo, hasta el momento no se había citado como patógeno de los frutos cítricos en España.

Se trata de un patógeno de cítricos que causa podredumbre de color verde con subtono gris. Su característica distintiva es la capacidad de formar una estructura macroscópica denominada coremio o sirema, con tallos largos blancos, dispuestos en círculos concéntricos alrededor de la colonia (Rouissi et al., 2015). Por esta característica, *P. ulaiense* es conocido comúnmente como “moho de los bigotes” (Holmes et al., 1993).

1.4.1.4. *Penicillium citrinum* Thom

Se trata de un organismo mesófilo, capaz de producir citrinina, una micotoxina moderadamente tóxica para el sistema renal de animales domésticos (Bailly et al, 2005). Se encuentra ampliamente extendido a nivel mundial por su adaptabilidad a crecer dentro un amplio rango de temperatura (5-37°C). El intervalo óptimo de crecimiento oscila entre 26-30°C. Ha sido aislado de casi todos los grupos de alimentos, siendo principalmente común en cereales como la cebada, trigo, maíz (Aziz et al, 2006) o carnes crudas y fermentadas.

1.4.1.5. *Penicillium solitum*

P. solitum es un fitopatógeno en cultivo de manzanas y peras principalmente. Organismo mesófilo capaz de crecer a baja temperatura, sin embargo, su crecimiento se ve limitado cuando la temperatura está en torno a 30°C (Lund et al., 1995). Es capaz de crecer en medios con hasta un 5% de NaCl y puede usar la creatina como única fuente

de nitrógeno. *P. solitum* ha sido aislado de un gran repertorio de alimento: manzana, pera, productos cárnicos curados, quesos y vegetales, entre otros.

1.4.1.6. Penicillium adametzoides

P. adametzoides es un hongo saprófito relacionado con la podredumbre de la vid, ya que ha sido aislado de la microbiota de frutos afectados y por ello, se asocia como factor desencadenante de la enfermedad (Lorenzini et al. 2018). Sin embargo, la bibliografía asociada a esta especie es escasa.

1.4.1.7. Penicillium brevicompactum

P. brevicompactum es un organismo mesófilo y halotolerante, ya que es capaz de crecer en medio con un 5% de NaCl (Frisvad et al., 2004). Su temperatura de crecimiento oscila entre 12-30°C siendo su temperatura óptima de crecimiento 23°C (Carrillo, 2003)

P. brevicompactum se encuentra distribuido a nivel mundial. Ha sido aislado de suelos tanto de ambientes secos como bosques húmedos, así como de una gran variedad de alimentos como nueces, pimienta, margarina, soja, productos de panadería, curry o purés de fruta (Pitt et al., 2009).

1.4.2. Empleo de fungicidas para disminuir las pérdidas poscosecha en cítricos.

El control de las enfermedades ocasionadas por microorganismos se puede realizar mediante fungicidas y bactericidas capaces de destruir el patógeno, o fungistáticos o bacteriostáticos si actúan inhibiendo su crecimiento/desarrollo y/o germinación. Estos tratamientos se pueden aplicar en precosecha o en poscosecha como parte de la prevención, tratamiento de lavado, confección y conservación. El control de patógenos poscosecha en cítricos se produce mediante fungicidas sintéticos principalmente.

El empleo de fungicidas requiere un amplio conocimiento de la epidemiología tanto del patógeno en sí, como de las condiciones y factores que deben existir para que se desarrolle la enfermedad. Debido a la importancia del sector citrícola en España, cualquier programa de control de enfermedades poscosecha en cítricos debe establecerse como prioritario debido al peso que ejerce sobre la economía del país (Palou, 2012). En España, se han empleado tradicionalmente fungicidas químicos para

disminuir la incidencia de podredumbre tras la cosecha. Los tratamientos con fungicidas convencionales son típicamente persistentes, con acción curativa frente a hongos y preventivos frente a posibles infecciones futuras. Además, muchos presentan acción antiesporulante de modo que, permiten romper con el ciclo de infección del patógeno (Palou, 2012). Por todo ello, el empleo de fungicidas ha sido eficiente para disminuir las pérdidas debidas al deterior de alimentos tras la cosecha.

1.4.2.1. Tiabendazol (TBZ)

El tiabendazol (2-tiazol-4-il-1H-benzimidazol) es un fungicida derivado del benzimidazol y puede emplearse de forma preventiva y/o curativa contra un amplio espectro de hongos patógenos, entre ellos *P. digitatum* y *P. italicum* (Eckert et al., 1989). Este fungicida sistémico, se empezó a usar en los años sesenta (1972) y desde entonces, se sigue empleando como tratamiento fungicida poscosecha.

El TBZ es absorbido por las raíces y hojas de la planta y actúa a nivel del proceso de mitosis, uniéndose a la β -tubulina de los microtúbulos del citoesqueleto. Al unirse a la β -tubulina, los microtúbulos no se forman correctamente y no se puede generar el huso mitótico, impidiendo la mitosis del hongo (Davidse, 1986).

1.4.2.2. Pirimetanil (PYR)

Se trata de un fungicida introducido al mercado de forma reciente como posible suplente a otros fungicidas poscosecha, aunque anteriormente se empleaba como tratamiento precosecha en diversos cultivos. El pirimetanil (*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il) anilina), es una anilinopirimidina con actividad fungicida. Se trata de un fungicida de síntesis con aplicación foliar. Las anilinopirimidinas tienen poco efecto sobre la germinación de las esporas, pero inhiben la germinación del tubo de germinación y el crecimiento del micelio.

Comúnmente se emplea como fungicida contra la podredumbre ocasionada por *Botrytis* spp. en cultivo de tomate, pero existen diversos estudios que determinan una respuesta positiva cuando se aplican sobre especies del género *Penicillium* en cítricos (Sholberg et al, 2005), por ello desde hace unos años (2006) es empleado para el control de la podredumbre verde de cítricos.

2. OBJETIVO

Las enfermedades precosecha y poscosecha constituyen uno de los principales factores que limitan la producción de cualquier cultivo. En numerosas ocasiones, el no tener un adecuado conocimiento de los posibles precursores desencadenantes de las patologías, de origen biótico o abiótico, el no saber distinguir claramente la sintomatología que producen diversas fisiopatías, determinados hongos, bacterias o virus, inducen a error en la aplicación del tratamiento. En precosecha, el conocimiento de todas las distintas patologías que puede sufrir el cultivo en cuestión, permite al agricultor anticiparse a la enfermedad y en caso de infección o déficit nutricional, saber actuar rápido y certeramente. En poscosecha, se habla de un organismo vivo en proceso de senescencia, que paulatinamente va perdiendo sus defensas naturales. En estas circunstancias, la probabilidad de infección por patógenos aumenta, por lo que es esencial conocer qué patógenos pueden afectar al producto, en qué momento, bajo qué condiciones, cómo se puede evitar la infección y cómo se podría evitar el contagio.

En este estudio, se pretende valorar diferentes especies del género *Penicillium*, como posibles patógenos de frutos de cítricos: naranja, limón, mandarina y pomelo. De las especies estudiadas, se observó que una de ellas producía enfermedad en limón, naranja y mandarina. Esta especie, no ha sido nombrada previamente en España, de modo que resultó de interés su identificación, caracterización del crecimiento y control, con el objetivo de obtener un mayor conocimiento de este nuevo patógeno de cítricos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal y material fúngico

3.1.1. Material vegetal

En este estudio se emplearon frutos de limonero, naranjo y mandarino suministrados por el GRUPO CFM, y pomelo suministrado por EL LIMONAR DE SANTOMERA, al Laboratorio de Fitopatología del Grupo Protección de Cultivos de la UPCT, a lo largo del mes de enero de 2018. En total, se emplearon 60 limones, 60 naranjas, 62 mandarinas y 87 pomelos, distribuidos en los distintos ensayos realizados según se muestra en la [Figura 1](#). Las piezas procedían de cultivos de la Región de Murcia y las piezas suministradas por EL LIMONAR DE SANTOMAERA procedían de cultivos ecológicos.

Fruto	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Total
Limón	4	56	0	0	60
Naranja	4	56	0	0	60
Mandarina	6	56	0	0	62
Pomelo	3	56	28	0	87

Tabla 1. Total de frutos empleados en los distintos ensayos realizados en este trabajo.

3.1.2. Material fúngico

Las especies de *Penicillium* spp. seleccionadas para este estudio, procedían de la colección MAPYS del Grupo de Protección de Cultivos de la Universidad Politécnica de Cartagena.

Las especies objeto de estudio son: *P. digitatum*, *P. italicum*, *P. ulaiense*, *P. citrinum*, *P. solitum*, *P. adametzoides* y *P. brevicompactum*. De todos ellos, *Penicillium digitatum* y *P. italicum* fueron empleados como organismo control en todos los ensayos, ya que se trata de dos patógenos de cítricos ya establecidos y bien caracterizados en diversos estudios previos realizados por el Grupo de Protección de Cultivos de la UPTC.

Los cultivos originales, debidamente rotulados e identificados a nivel de género (*Penicillium*) y especie (*P. digitatum*, *P. italicum*, *P. ulaiense*, *P. solitum*, *P. citrinum*, *P. adametzoides* y *P. brevicompactum*) habían sido conservados en refrigeración a 5°C en medio de cultivo sintético de agar de patata y dextrosa (PDA) de Scharlab®

(Barcelona). Se obtuvo un cultivo inicial de cada una de las especies, a partir de los cultivos originales para uso exclusivo de este estudio y se realizó por duplicado.

El procedimiento para realizar el cultivo inicial a partir de los cultivos originales fue el siguiente:

- 1- Preparación de medio de cultivo sintético de PDA sin adición de fungicida u otros químicos y esterilización del medio en autoclave durante 20 minutos a 121°C. Se preparó 1 litro de medio de cultivo y posteriormente, se procedió al vertido en placa de Petri. Todo el procedimiento se llevó a cabo en cabina de flujo laminar y se empleó materia estéril para evitar una posible contaminación del medio.
- 2- Empleando un bisturí flameado, bajo condiciones de esterilidad, se realiza un corte de una sección cuadrada de 5x5 mm aproximadamente. El inóculo se obtiene de la zona existente entre el frente de crecimiento del micelio y la zona donde se han desarrollado los conidios.
- 3- Siembra del inóculo en placa de Petri con medio PDA previamente etiquetada con la especie, el medio de cultivo y la fecha de la siembra.

Las condiciones de incubación del cultivo inicial fueron de 6 días a temperatura ambiente, con temperatura máxima (T_{max}) de 25 °C y temperatura mínima (T_{min}) de 18°C. Las siembras se realizaron el día 10 de enero de 2018.

3.2. Estudio *in vitro* del crecimiento en medio de cultivo con albedo

El albedo se corresponde con el mesocarpo interno del hesperidio, compuesto por glucósidos y azúcares como la glucosa, fructosa y sacarosa. Estos azúcares pueden ser empleados por hongos como fuente de carbono y energía para sus procesos metabólicos. El objetivo perseguido en este primer ensayo, fue comprobar si, eliminando el flavedo del fruto y por tanto, su principal barrera de defensa, las especies de estudios son capaces proliferar. Con esta finalidad, se procedió a realizar un ensayo *in vitro* empleando un medio de cultivo que únicamente contuviese albedo de limón, naranja, mandarina o pomelo como fuente de nutrientes y energía. Aquellas especies que fuesen capaces de proliferar en un medio compuesto únicamente por albedo de los cítricos descritos, podrían ser capaces de infectar al fruto y desencadenar podredumbre.

La experiencia comenzó el día 16 de enero de 2018 y finalizó el día 22 de enero del mismo año, momento en el cual se analizaron los resultados.

3.2.1. Preparación de medio de cultivo con albedo

Se preparó medio de cultivo con albedo con una composición de 30g de albedo y 15g de agar-agar por cada litro de agua destilada, para lo cual fueron necesarios 4 limones, 4 naranjas, 6 mandarinas y 3 pomelos. Se realizó un medio de cultivo para cada uno de los frutos a estudiar y se etiquetaron como: 1 para albedo de limón, 2 para medio con albedo de naranja, 3 para medio con albedo de mandarina y 4 para medio con albedo de pomelo. El procedimiento se detalla a continuación:

- 1- Enjuague con agua para eliminar la suciedad exterior del fruto.
- 2- Pelado del flavedo empleando un cuchillo, para dejar al descubierto el albedo y poder extraerlo.
- 3- Pesar 30g de albedo y 15g de agar-agar. Añadir los 30g de albedo en un vaso de cristal y añadir agua destilada hasta cubrir por completo la muestra de albedo. Posteriormente, con una batidora eléctrica, batir hasta conseguir una suspensión homogénea en cuanto a color y textura.
- 4- Añadir en un bote de cristal la solución homogénea de albedo y los 15g de agar-agar. Posteriormente, añadir agua destilada hasta completar el litro.
- 5- Autoclavado a 121°C durante 20 minutos y posterior vertido en placa de Petri dentro de una cabina de flujo laminar para evitar contaminación del medio.



Figura 1. Preparación de medio de cultivo con albedo. A) Número de frutos empleados para cada litro de medio. B) Albedo extraído de cada uno de los frutos. C) Medios de cultivo preparados antes del autoclavado

3.2.2. Siembra en medio con albedo

Debido a la facilidad de proliferación de las especies de estudio, con finalidad de evitar una posible contaminación y por tanto, falsos positivos, se establecieron siete puestos diferentes de trabajo dentro de dos laboratorios diferentes ubicados en la UPCT. Bajo condiciones de esterilidad y empleando material previamente esterilizado, se procedió a la siembra en placa de Petri con medio de cultivo con albedo.

La siembra de cada uno de los posibles patógenos se realizó colocando un pequeño fragmento cuadrado de aproximadamente 5x5 mm, en el centro de la placa de Petri con medio con albedo de limón, naranja, mandarina o pomelo. El fragmento seleccionado del cultivo inicial (fecha de siembra 10/01/2018) debe contener el punto de unión entre la zona de crecimiento del micelio blanquecino y la zona de proliferación asexual que contiene los conidios.

Se hicieron 4 placas por medio de cultivo, incubadas durante 6 días a una temperatura comprendida entre una Tmax de 25°C y una Tmin de 22°C, y humedad relativa (HR) comprendida entre una HR máxima (HRmax) de 43% y una HR mínima (HRmin) de 38%.

3.3. Estudio *in vivo* de la patogenicidad de las especies de *Penicillium*

En este experimento se llevó a cabo una prueba *in vivo* para determinar la patogenicidad de las especies de *Penicillium* en el fruto de limón, naranja, mandarina y pomelo. *A priori*, la capacidad infectiva de las especies *in vivo* debería diferir de la capacidad infectiva *in vitro*, ya que el fruto dispone de sus defensas naturales intactas.

La experiencia comenzó el día 25 de enero de 2018 y finalizó el día 15 de febrero del mismo año.

3.3.1. Preparación de los frutos

Para cada combinación fruto-“patógeno” se realizaron 4 réplicas, fueron empleadas 56 piezas de cada uno de los frutos, generando un total de 224 piezas. El procedimiento para la preparación del material se detalla a continuación:

- 1- Preparación de un baño de agua de grifo con lejía comercial para proceder a la desinfección de los frutos. Al baño se añaden 25 litros de agua del grifo y 1 litro de lejía comercial. Una vez preparado el baño, se incorporan los frutos y se lavan durante 3 minutos vigorosamente para eliminar contaminación.
- 2- Una vez transcurrido el tiempo de lavado, se quita el tapón, se enjuagan los frutos con agua y se secan con papel de secado. Se emplean 14 bandejas en las cuales se colocan 24 bandejas de menor tamaño (4 en cada bandeja grande). En total se emplean 4 frutos de cada una de las variedades de cítricos a estudiar y se colocaron dos en cada una de las bandejas pequeñas. Las bandejas grandes habían sido previamente limpiadas con etanol al 96% y correctamente etiquetadas con el nombre del hongo y variedad de cítrico.
- 3- Los frutos fueron colocados en las bandejas pequeñas empleando como soporte placas RODAC abiertas. Se colocaron de modo que el pedicelo quedase orientado hacia arriba. Una vez colocado cada fruto, se dispuso a limpiar con un algodón empapado en etanol al 96%, la zona del inóculo y posteriormente, con un rotulador indeleble, se procedió a marcar con un círculo dicha zona.



Figura 2. Frutos de limón, naranja, mandarina y pomelo antes de la inoculación.

3.3.2. Obtención de la suspensión de conidios para inoculación

A partir de la placa de cultivo inicial de cada uno de las especies de *Penicillium* objeto de estudio, se obtuvo una suspensión de conidios para realizar posteriormente la inoculación en frutos. El procedimiento para obtener cada suspensión de conidios fue el siguiente:

- 1- En una duquesita, se vierte agua destilada hasta la mitad del envase.
- 2- Con un asa de Kolle previamente esterilizada y trabajando en condiciones de esterilidad dentro de una cabina de flujo laminar, se extrae una pequeña muestra de conidios de uno de los cultivos iniciales (fecha de siembra 10/01/18). La muestra se toma de la zona central donde el desarrollo de conidios es mayor.
- 3- La muestra se introduce en la duquesita con agua destilada y se agita suavemente el asa de Kolle para facilitar la dispersión de los conidios en el agua.
- 4- Con la pipeta de 1000 μL , se extrae una muestra de la duquesita y se incorpora en una cámara de recuento Thoma con un cubreobjetos.
- 5- Observación al microscopio óptico de contraste de fase OLYMPUS BX41, modelo BX41TF, y recuento de conidios en cámara Thoma, empleando el objetivo de 10X para localizar la zona de recuento y el objetivo de 40X para el recuento. De los 10 recuentos, se hace la media y se obtiene el número de conidios por recuadro pequeño de la cámara.

*En el caso de no tener una muestra con 20 a 25 conidios de media, se debe diluir la muestra inicial presente en la duquesita y volver a hacer el recuento hasta alcanzar ese valor.

La cuadrícula de recuento de la cámara Thoma está formada por un cuadrado grande que contienen 16 cuadrados medianos, cada uno de ellos con 25 cuadrados pequeños. En el recuento realizado durante la observación al microscopio óptico de contraste de fases, se realizó el recuento de 10 cuadrados pequeños y posteriormente se obtuvo la media aritmética para obtener conidios/cuadrado. Los cálculos realizados para obtener *conidios/mL* fueron los siguientes (E1, E2 y E3):

$$\text{Área de muestreo} = 0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} = \text{mm}^2 \quad (\text{E1})$$

$$\text{Volumen de muestreo} = 0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = \text{mm}^3 \quad (\text{E2})$$

$$\text{Conidios/mL} = \text{Media conidios} \times \frac{\text{Número de cuadrados de la cámara}}{\text{Volumen de la cámara}} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} \quad (\text{E3})$$

3.3.3. Inoculación en fruto

Una vez dispuesto todo el material necesario, se realizó la inoculación en cada uno de los frutos. En primer lugar, se realizó una pequeña incisión de menos de centímetro de profundidad en la corteza, justo en la zona marcada con un rotulador indeleble, empleando un punzón previamente flameado. La incisión no debe llegar a la pulpa del fruto, por lo que se tuvo especial cuidado en la inoculación de mandarinas ya que disponen de un epicarpo más fino que el resto de cítricos seleccionados. Posteriormente, mediante una micropipeta se inoculó una muestra de 10 μL en la herida realizada, evitando el derrame del contenido. Finalmente, se procedió a tapar con una bolsa de plástico de forma no hermética cada una de las bandejas grandes, permitiendo el intercambio de gases y protegiendo de la contaminación externa.

3.4. Estudio *in vivo* de la patogenicidad de *Penicillium ulaiense* en pomelo

A raíz de los resultados obtenidos en el ensayo 2, se decidió realizar un experimento para comprobar que los datos obtenidos en el ensayo *in vivo* anteriormente mencionado, eran correctos. El objetivo de este ensayo es comprobar si *Penicillium ulaiense* es un organismo patógeno de pomelo cuando éste ha sido separado del árbol y bajo condiciones óptimas para el desarrollo fúngico.

El test de inoculación de una suspensión de conidios de *P. ulaiense* en frutos sanos de pomelo comenzó el día 21 de febrero de 2018 y finalizó el 11 de mayo. Al finalizar el test se llevó a cabo un re-aislado de todos los frutos inoculados para asegurar que el hongo que se encuentra en pomelo es *P. ulaiense*.

3.4.1. Preparación de los frutos de pomelo

Los pomelos fueron recolectados un día antes del ensayo y fueron transportados al Laboratorio del Grupo de Protección de Cultivos en transporte convencional. Se emplearon 28 pomelos sanos. El procedimiento para la preparación del material se detalla a continuación:

- 1- Preparación de un baño de agua de grifo con lejía comercial para proceder a la desinfección de los fruto. El baño se prepara bajo las mismas condiciones que las detalladas en el [Apartado 3.3.1](#).
- 2- Enjuagado con agua de grifo y secado.
- 3- Se emplean 4 bandejas previamente desinfectadas con etanol al 96%. En cada una de las bandejas se colocan 7 frutos mantenidos con una placa RODAC abierta, de modo que el pedicelo quede ubicado hacia arriba.
- 4- Con un algodón empapado en etanol al 96%, se limpia la zona de inoculación y posteriormente se marca con un círculo empleando un rotulador indeleble.

3.4.2. Obtención de la suspensión de conidios de *P. ulaiense*

Para tomar la muestra de conidios se emplea la placa inicial de cultivo en PDA de *P. ulaiense* con fecha de siembra del 10/01/18. El procedimiento para obtener el inóculo infectivo conidios se realizó de la misma forma que en el [Apartado 3.3.2](#).

3.4.3. Inoculación de la suspensión de conidios en pomelos

La inoculación de la suspensión de conidios de *P. ulaiense* en los frutos de pomelo se realizó de forma idéntica a la descrita en el [Apartado 3.3.3](#).

Para alcanzar las condiciones óptimas de crecimiento del hongo se procedió a aumentar la humedad relativa. Dos de las cuatro bandejas se convirtieron en cámaras húmedas introduciendo un vaso lleno de agua en el interior y cubriéndolas parcialmente con una bolsa de plástico para permitir el intercambio gaseoso. En total se emplearon 4 bandejas, dos de las cuales estarán bajo condiciones de alta humedad relativa y dos de

ellas exentas de dichas condiciones. Con esta diferenciación de atmósferas es posible comprobar bajo qué condiciones se produce el desarrollo de la podredumbre causada por *P. ulaiense* en pomelo.



Figura 3. A) Bandeja con pomelos inoculados con *P. ulaiense* en cámara seca. B) Bandeja con pomelos inoculados con *P. ulaiense* en cámara húmeda.

3.5. Efecto del tiabendazol y pirimetanil sobre el desarrollo de *P. ulaiense*

En este estudio se quiso observar las diferencias y similitudes de *P. ulaiense* con dos especies patógenas de cítricos globalmente conocidas: *P. digitatum* y *P. italicum*. Para ello, se realizaron siembras en medio de cultivo con PDA junto con una dosis determinada de fungicida empleado comúnmente para el control de la podredumbre verde o azul en cítricos: tiabendazol y pirimetanil.

El test de resistencia a fungicidas tubo inicio el día 26 de febrero de 2018 y finalizó el día 9 de marzo del mismo año. El día 19 de febrero se realizó una siembra de los organismos patógenos en medio de PDA a partir de los medios de cultivo iniciales (fecha para *P. ulaiense* del 10/01/18 y para *P. digitatum* y *P. italicum* del 12/01/17).

Entre los días 26 y 28 de febrero se preparó el material necesario y el día 1 de marzo se realizó la siembra.

Para conocer la dosis mínima a la cual el fungicida no interfiere en el crecimiento y la conidiogénesis del hongo se realizaron 6 medios de cultivo en PDA, cada uno con una dosis específica del fungicida (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}). Para ello, se realizaron diluciones seriadas partir del producto comercial Textar® 60-T (TBZ) al 60%

p/v y DECCO PYR (PYR) al 40% de p/v. El procedimiento empleado se detalla a continuación:

- 1- Verter 18 mL de agua destilada en una duquesita (preparar 13 duquesitas, una por cada una de las diluciones a realizar). Posteriormente, en la dilución 10^{-1} se añade 2 mL del producto comercial (TBZ o PYR) previamente agitado para asegurar una dosis uniforme en la muestra extraída. Seguidamente, se extraen 2 mL de la dilución 10^{-1} y se transfiere a la dilución 10^{-2} y así sucesivamente hasta la dosis 10^{-6} . Cada dilución tendrá un volumen de 18 mL, de modo que a la dilución 10^{-6} se le extraen 2 mL.
- 2- Prepara medio de cultivo de agar de patata y dextrosa (PDA). Se prepara 480 mL, para lo cual se emplean 14,8 g de PDA en 480 mL de agua destilada. Una vez preparados se esterilizan mediante autoclave a 121°C durante 20 minutos. En total se preparan 12 medios de cultivo, uno por cada dilución seriada realizada (6 por cada fungicida empleado) y 1 medio control al que no se le añade fungicida.
- 3- Siembra en placa de *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. ulaiense*. Se realizan 4 repeticiones por patógeno y tratamiento con fungicida. En el caso del control, únicamente se realizaron 4 siembras por patógeno-control. En total realizaron 156 siembras en placa de Petri. A partir de los cultivos del día 19/02/18 se extrajo una sección cuadrada de aproximadamente 5x5 mm. La muestra se siembra en los medios con PDA+TBZ o PDA+PYR situándola en la zona central de la placa. Las siembras fueron realizadas en condiciones estériles bajo mechero Bunsen y empleando materiales previamente esterilizados.
- 4- Control fotográfico del crecimiento diario de las colonias empleando una cámara fotográfica Panasonic modelo Lunix.

El objetivo de este ensayo fue conocer la dosis mínima a la cual el fungicida no interfiere en el crecimiento del hongo ni en la conidiogénesis, y por tanto, conocer la dosis efectiva de fungicida que se requiere para controlar a *P. ulaiense* en poscosecha. Con ello, se pone de manifiesto si la respuesta de *P. ulaiense* a los fungicidas empleados para el control de *P. digitatum* y *P. italicum* es similar.

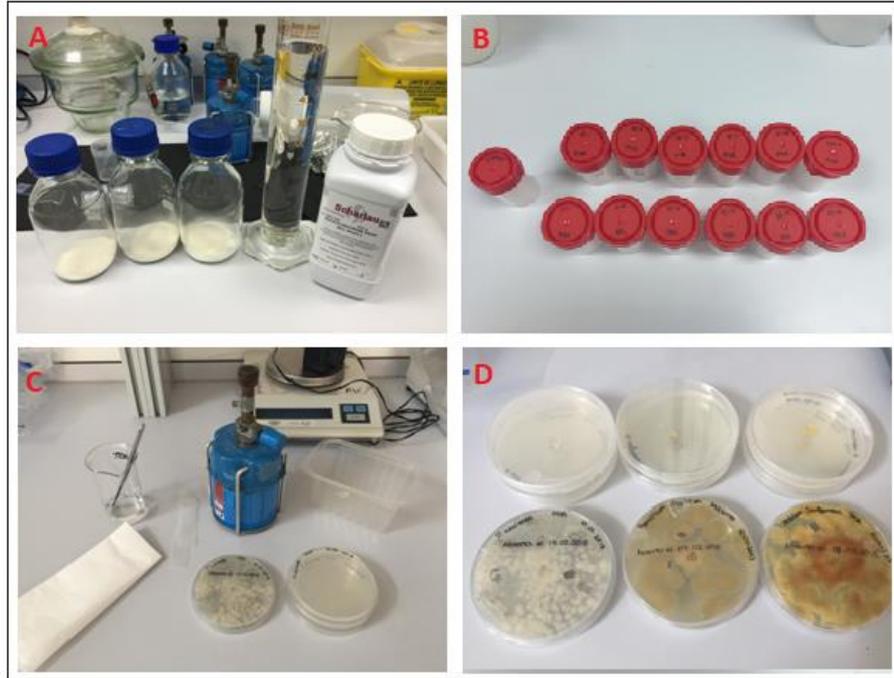


Figura 4. Protocolo para obtener medios de cultivo en PDA a diferentes concentraciones de fungicida. A) Preparación de medio de cultivo en PDA. B) Diluciones de los fungicidas empleados. C) Siembra en medio con PDA del día 19/02/18. D) Siembras de *P. ulaiense*, *P. digitatum* y *P. italicum* en PDA.

3.6. Caracterización del crecimiento de *P. ulaiense*

Una vez han transcurrido los días pertinentes para el crecimiento *in vitro* de *P. ulaiense*, se procedió a ultracongelar todos los cultivos realizados con medio de PDA y TBZ o PYR a una temperatura de -80°C . Las muestras fueron procesadas en bloques de 8.

El estudio completo de caracterización se realizó entre el 19 de marzo de 2018 y el 6 de abril del mismo año en el Laboratorio del Grupo de Protección de Cultivos de la UPCT.

3.6.1. Masa de micelio y conidiogénesis

La masa de micelio (*mg*) mide el peso de micelio total que ha crecido en la placa de Petri. El micelio total se compone de la suma del micelio sumergido y micelio aéreo. El micelio sumergido es aquel que se encuentra inmerso en el medio de cultivo, mientras que el micelio aéreo hace referencia a la masa de micelio que se encuentra por encima del medio de cultivo y porta la parte reproductiva del hongo formada por los conidióforos y los conidios.

3.6.1.1. Micelio aéreo

El procedimiento para obtener el micelio aéreo es descrito a continuación:

- 1- Verter 10 mL con una micropipeta de 5 mL sobre el medio de cultivo (PDA + TBZ o PYR).
- 2- Raspado de la masa aérea hasta conseguir que la totalidad de la misma se encuentre suspendida en el agua. Dependiendo de la cantidad de micelio aéreo presente en la placa de Petri, se deberá añadir 10 o 15 mL.
- 3- Verter en una duquesita la suspensión obtenida tras el raspado del medio. Previamente, se anota el peso inicial de la duquesita para poder conocer el peso total de micelio aéreo. En aquellos casos en los que se vierte 10 mL sobre el medio de cultivo, se añaden 5 mL más en la duquesita para estandarizar el volumen total a 15 mL.
- 4- Se coge una muestra para estimar el número de conidios que contiene.
- 5- Introducir la duquesita destapada en una estufa a 65°C durante 24 horas.
- 6- Transcurrido el tiempo de secado, se procede al pesado de cada duquesita para conocer el peso total de micelio aéreo de cada uno de los tratamientos.

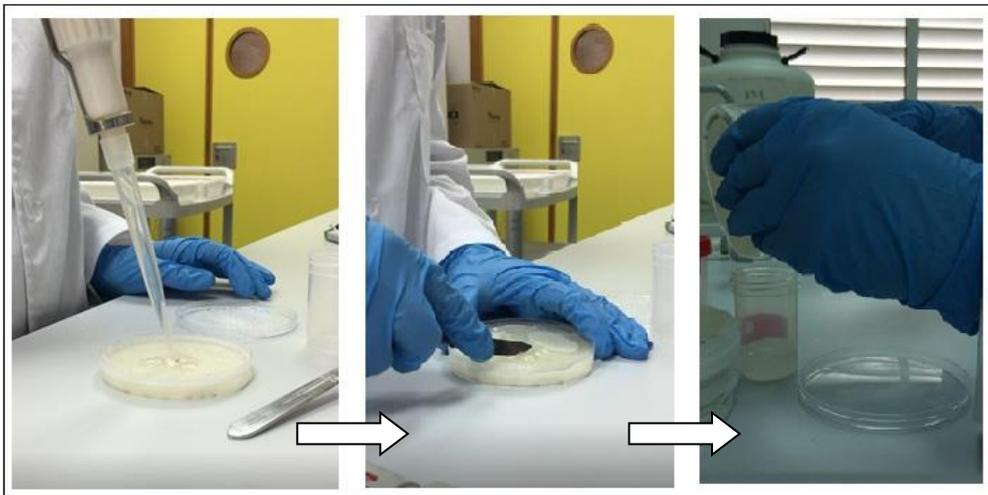


Figura 5. Procedimiento para obtener el micelio aéreo.

3.6.1.2. Conidiogénesis (C)

La conidiogénesis es el proceso de formación de conidios. Su determinación permite conocer el número de conidios por unidad de superficie (*conidios/cm²*). Por tanto, mide la cantidad de conidios producidos.

Para conocer el número medio de conidios en unidad mínima de recuento de cada uno de los tratamientos, se emplea una muestra, obtenida con una micropipeta, del micelio aéreo suspendido en agua (ver [Apartado 3.6.1.1](#)). Posteriormente, se realiza un recuento de conidios empleando una cámara de recuento Thoma. La observación al microscopio se realiza con un microscopio óptico de contraste de fases OLYMPUS BX41, modelo BX41TF, y recuento de conidios, empleando el objetivo de 10X para localizar la zona de recuento y el objetivo de 40X para el recuento. Se hizo la media del recuento obtenido en 10 cuadrados pequeños. Para el cálculo de la conidiogénesis se empleó la siguiente ecuación (E5):

$$C = (Vagua \cdot c) / (0,00025 \cdot Amicelio) \quad (E5)$$

Donde,

Vagua: Volumen de agua (*mL*)

c: Número medio de conidios en unidad mínima de recuento (*conidios*)

0,00025: Volumen de la unidad mínima de recuento (*mL*)

Amicelio: Área de micelio (*cm²*)

3.6.1.3. Micelio sumergido

Una vez extraído el micelio aéreo es posible obtener el micelio sumergido. El procedimiento es el siguiente:

- 1- Calentar el medio de cultivo empleando un microondas suministrando pulsos de calor de 10 a 20 segundos como máximo. Dar tantos pulsos de calor como sea necesario hasta que el medio para a estado líquido.
- 2- Verter el contenido de la placa de Petri sobre un embudo con un filtro de malla. De este modo se elimina todo el medio de cultivo (PDA) y mantenemos sobre el filtro las hifas del hongo, que presentan un aspecto blanquecino.
- 3- Añadir el micelio sumergido en una placa RODAC previamente pesada para conocer su peso inicial y posteriormente conocer el peso neto del micelio sumergido.
- 4- Introducir las muestras en una estufa a 65°C durante 24 horas.
- 5- Pesado de las muestras para conocer el peso neto de micelio sumergido. Se emplea la diferencia de peso entre la placa RODAC final y la placa ROCAC inicial para conocer el peso neto de micelio sumergido.

3.6.2. Área de crecimiento de la colonia (cm^2)

El área de crecimiento de la colonia representa el área (cm^2) de la colonia medida a intervalos diarios (medidas repetidas). Esta medida se obtiene a partir de la medición diaria del diámetro de la colonia, sin embargo, en aquellos casos en los cuales la colonia no presenta un crecimiento totalmente circular, la medición del diámetro no se corresponde totalmente con la realidad. Por ello, la medición del área de la colonia fue obtenida a partir de las fotografías digitales diarias empleando el software Image Tool for Windows, versión 3.0 (Texas, EE.UU).

La medición se realizó previa calibración con el diámetro de la placa de Petri. Una vez obtenidos los datos del área de crecimiento de la colonia, estos fueron procesados empleando el programa Excel de Windows.

3.6.3. Tasa de crecimiento ($\text{cm}^2/\text{día}$)

La tasa de crecimiento es el grado de crecimiento de un microorganismo cuando se desarrolla en medio de cultivo sólido. Se trata de la velocidad a la cual un microorganismo aumento su área de crecimiento, por ello se expresa en unidades de espacio ($\text{cm}^2/\text{tiempo}$ (*días*)). Conociendo la tasa de crecimiento de un microorganismo se puede obtener su curva de crecimiento y de este modo, conocer las fases de latencia, fase exponencial, fase lineal, fase estacionaria y fase de declive o muerte.

En nuestro caso de estudio, es de interés conocer la fase lineal de crecimiento del hongo. La fase lineal es la fase en la cual el hongo crece a pleno crecimiento una vez finaliza la fase exponencial, que suele durar unas pocas horas, y antes de entrar en la fase estacionaria, donde no se observa crecimiento aparente debido a que el número de microorganismos que se reproducen es similar al número de microorganismos que mueren.

Para obtener la tasa de crecimiento se utilizaron los datos del área de crecimiento descrito en el [Apartado 3.6.2](#), y se utilizó la ecuación (E4) descrita a continuación. El cálculo se realizó de acuerdo con los gráficos obtenidos, no había duda de que el hongo se encontraba en fase lineal):

$$\mu \left(\frac{\text{cm}^2}{\text{día}} \right) = A \cdot (t + 1) / At \cdot (t - 1) \quad (\text{E4})$$

Donde,

μ : Tasa de crecimiento (cm²/día)

$A(t+1)$: Área de la colonia un día determinado (cm²)

At : Área de la colonia el día anterior o días anteriores considerados a $t + 1$ (cm²)

$t + 1$: Un día determinado (días)

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

Los datos fueron procesados a partir del programa Excel para Windows.

3.6.4. 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 fase 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 (cálculos descritos anteriormente en el [Apartado 3.6.3](#)), detectando la zona lineal visualmente en el gráfico.

4. RESULTADOS

4.1. Estudio *in vitro* del crecimiento en medio de cultivo con albedo

De las siembras obtenidas de los posibles patógenos estudiados en medio con PDA y albedo de limón (1), naranja (2), mandarina (3) o pomelo (4), se observó un resultado unánime. Todos los casos mostraron crecimiento, siendo indiferente el medio en el que se encontrase el hongo (1, 2, 3 o 4). De la visualización directa de las siembras realizadas se pudo observar diferencias en el tipo de crecimiento, tamaño, morfología y coloración de la colonia y coloración o no del medio de cultivo. Se observó un halo blanquecino alrededor del inóculo inicial de escasos milímetros de longitud correspondiente al micelio sumergido del hongo. En todos los casos se observó crecimiento del micelio sumergido y micelio aéreo con producción de conidios.

Especie \ Medio					Posible fitopatógeno de frutos cítricos
	Limón	Naranja	Mandarina	Pomelo	
	1	2	3	4	
<i>P. digitatum</i>	X	X	X	X	Sí
<i>P. italicum</i>	X	X	X	X	Sí
<i>P. ulaiense</i>	X	X	X	X	Sí
<i>P. citrinum</i>	X	X	X	X	Sí
<i>P. solitum</i>	X	X	X	X	Sí
<i>P. adametzoides</i>	X	X	X	X	Sí
<i>P. brevicompactum</i>	X	X	X	X	Sí

Tabla 2. Crecimiento de diversas especies de la microbiota penicílica de frutos cítricos en agar albedo obtenido a partir de diversas especies de frutos.

*Los resultados obtenidos para las diferentes especies estudiadas se muestran en el Figura 6 presente en el Anexo II.

4.2. Estudio *in vivo* de la patogenicidad de especies del género *Penicillium* en frutos cítricos

El estudio *in vivo* del crecimiento de las especies seleccionadas reveló diferencias en cuanto a la capacidad infectiva de cada una de ellas en frutos cítricos. La inoculación de *P. ulaiense* en frutos cítricos mostró una clara capacidad infectiva e invasiva del hongo sobre limón naranja y mandarina, no siendo tan obvio su crecimiento en pomelo. El comportamiento de *P. ulaiense* en limón fue el más agresivo. Se observó crecimiento al octavo día de inoculación y se procedió a realizar fotografía de la podredumbre causada,

tanto de la zona externa como del interior del fruto, para comprobar la capacidad colonizadora del patógeno. Posteriormente, los frutos fueron desechados para evitar contaminaciones cruzadas.

Medio Especie					Posible fitopatógeno de frutos cítricos
	Limón	Naranja	Mandarina	Pomelo	
	1	2	3	4	
<i>P. digitatum. Control</i>	X	X	X	X	Sí
<i>P. italicum. Control</i>	X	X	X	X	Sí
<i>P. ulaiense</i>	X	X	X	-	Sí
<i>P. citrinum</i>	-	-	-	-	No
<i>P. solitum</i>	-	-	-	-	No
<i>P. adametzoides</i>	-	-	-	-	No
<i>P. brevicompactum</i>	-	-	-	-	No

Tabla 3. Crecimiento de diversas especies de la microbiota penicífica de frutos cítricos sobre distintas especies de frutos cítricos.

La podredumbre causada por *P. ulaiense* en limón mostraba cierto color azulado que contrastaba con el color gris observado *in vitro*. La inoculación de *P. ulaiense* y *P. italicum* se realizó en dos laboratorios separados para evitar contaminación. Se realizó un aislado en medio con PDA de la podredumbre observada en limón para esclarecer si realmente se trataba de *P. ulaiense* y si la colonia *in vitro* muestra un color gris o azulado. Los resultados obtenidos revelaron que *P. ulaiense* era el causante de la enfermedad en el limón inoculado ya que se pudo observar la existencia coremios que se disponía alrededor de la colonia.

La podredumbre causada por *P. ulaiense* en limón comenzó con un cambio de color y aspecto húmedo en el flavedo existente alrededor del punto de inoculación. A los pocos días, fue apreciable el micelio aéreo, inicialmente en la zona central de la infección como un punto de color blanco, que posteriormente fue aumentando su diámetro y dando lugar, en su zona central, a una coloración verde azulada correspondiente a la masa de conidios. La sección longitudinal de los frutos de limón mostró la existencia de podredumbre interna, denotada por un cambio de color interno más oscuro que la zona del fruto sana, debido al cambio de turgencia producida por las enzimas pectinolíticas del hongo.

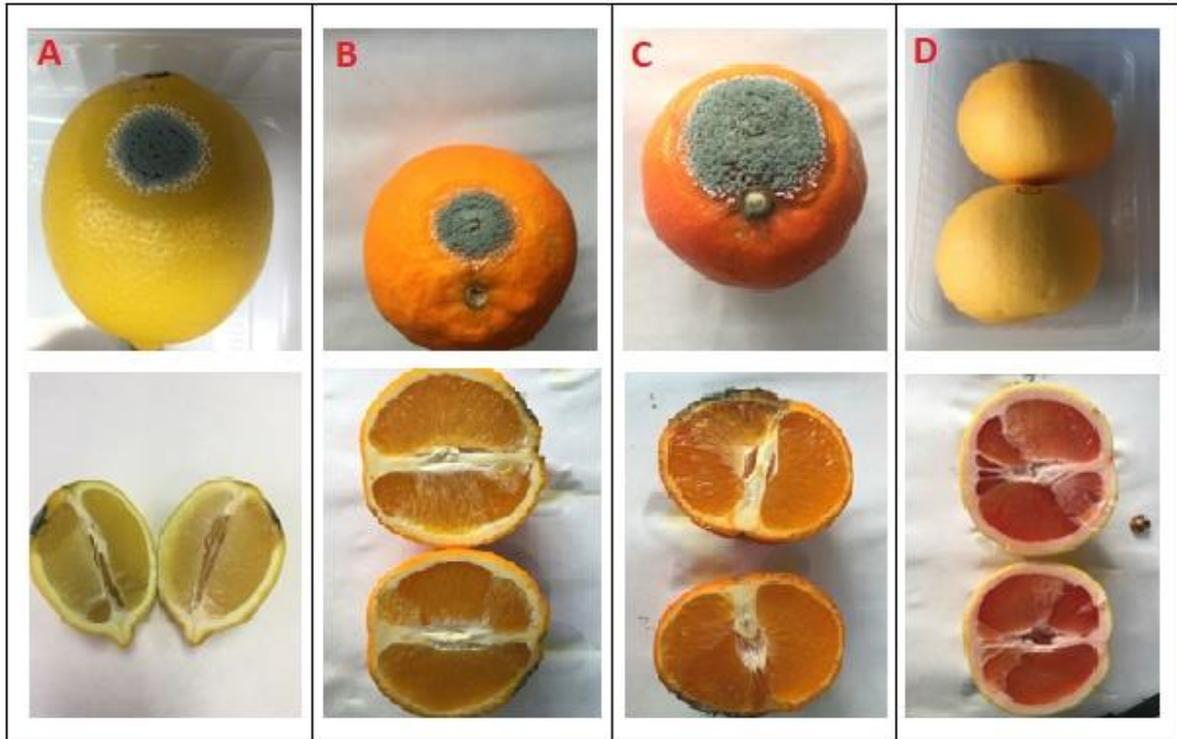


Figura 7. Resultados ensayo *in vivo* de inoculación de *P. ulaiense* a distintas especies de frutos cítricos. A) Crecimiento de *P. ulaiense* en limón. B) Crecimiento de *P. ulaiense* en naranja. C) Crecimiento de *P. ulaiense* en mandarina. D) Pomelo inoculado con *P. ulaiense*, donde se muestra ausencia de capacidad infectiva.

En naranja, *P. ulaiense* mostró crecimiento en todos los frutos inoculados. La podredumbre causada en naranja mostraba un color esperado para este patógeno, grisáceo en el centro, rodeado del micelio aéreo de color blanquecino y este a su vez, rodeado por el frente de podredumbre que le daba al flavedo un aspecto húmedo y de color más oscuro que el color de la corteza. La sección longitudinal del fruto mostró podredumbre interna observable por una tonalidad más oscura que el resto de pulpa.

P. ulaiense mostró crecimiento en todos los frutos de mandarina inoculados, con un cambio apreciable de color en el albedo y la pulpa cuando se realizó el corte longitudinal. La pérdida de textura interna se mostró por un aspecto húmedo más pronunciado que los observados en limón y naranja. Por otro lado, el halo de podredumbre en el flavedo se observó menos pronunciado que en el caso del limón y naranja. La masa de conidios existente denotó un color verde grisáceo al igual que en naranja.

P. ulaiense no mostró crecimiento cuando fue inoculado en frutos de pomelo, en contraposición de lo observado en el estudio *in vitro* donde el organismo creció sin problema. En el fruto no se observó halo de podredumbre, ni micelio sumergido en el interior del fruto cuando se realizó la sección longitudinal del mismo. Alrededor del punto de inoculación se observó un cambio de color de blanco (propio del albedo) a rosado, debido a una acción protectora de tipo cicatrizante del fruto ante un daño mecánico producido por el punzón, pero en ningún caso se mostraron indicios de una posible acción infectiva del hongo. Durante el estudio no se observó contaminación de ninguno de los frutos.

*Los resultados obtenidos para el resto de especies estudiadas se muestran en las Figuras 8, 9, 10 y 11 presentes en el Anexo II.

4.2.1. Prueba de viabilidad de la suspensión de conidios

Para comprobar si realmente la suspensión de conidios generada era viable, se realizaron siembras en medio de cultivo con PDA. Se comprobó que todas las suspensiones realizadas presentaban viabilidad *in vitro* (ver Figura 12 presente en el Anexo II).

4.2.2. Estudio *in vivo* de la patogenicidad de *P. ulaiense* en pomelo

Los resultados obtenidos en el ensayo 2 en relación a *P. ulaiense* como posible patógeno de cítricos, planteó la duda de si realmente se había realizado correctamente el procedimiento de inoculación del hongo en pomelo, ya que en limón, naranja y mandarina el resultado había sido positivo. Al realizar un nuevo ensayo *in vivo* se observó que *P. ulaiense* no desarrollaba enfermedad en pomelo cuando fue inoculado a una dosis baja y en condiciones de alta humedad relativa (ver Figura 13.A). Uno de los pomelos presentaba podredumbre en el punto de inoculación, con un desarrollo lento de micelio, por lo que se descartó la posibilidad de que se tratase de *P. digitatum*. Se realizó un re-aislado de la colonia en medio con PDA para comprobar la naturaleza del hongo causante de la podredumbre (ver Figura 14 en Anexo II). El resultado obtenido de la siembra en PDA mostró que era *P. ulaiense* el causante de la podredumbre observada. En cámara no húmeda, no se observó podredumbre por *P. ulaiense* en ninguno de los frutos empleados para el estudio (ver Figura 13.B).

Durante el ensayo fueron retirados varios frutos por contaminación, todos ellos por *P. digitatum*: En cámara húmeda fueron retirados 4 pomelos y en cámara no húmeda fueron retirados 3 pomelos.

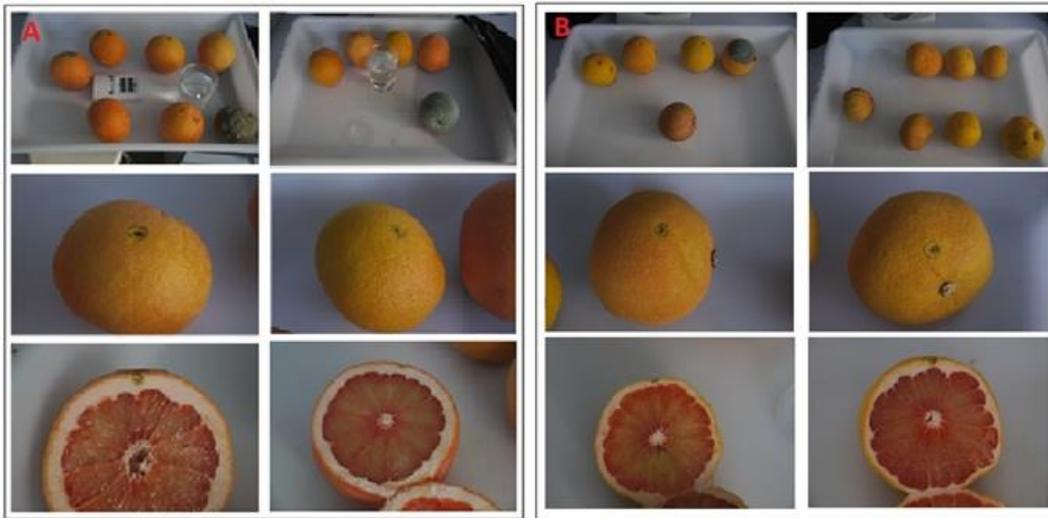


Figura 13. Estudio de patogénesis de *P. ulaiense* en pomelo. A) Resultados cámara húmeda. B) Resultados cámara no húmeda

4.3. Caracterización de *P. ulaiense* y experiencia con fungicidas

4.3.1. Micelio aéreo (g)

Los resultados obtenidos del estudio sobre el micelio aéreo de *P. ulaiense* mostraron, en condiciones óptimas para el crecimiento (temperatura óptima y ausencia de estrés químico que delimite el desarrollo normal), menor masa de micelio aéreo que los organismos control (*P. digitatum* y *P. italicum*).

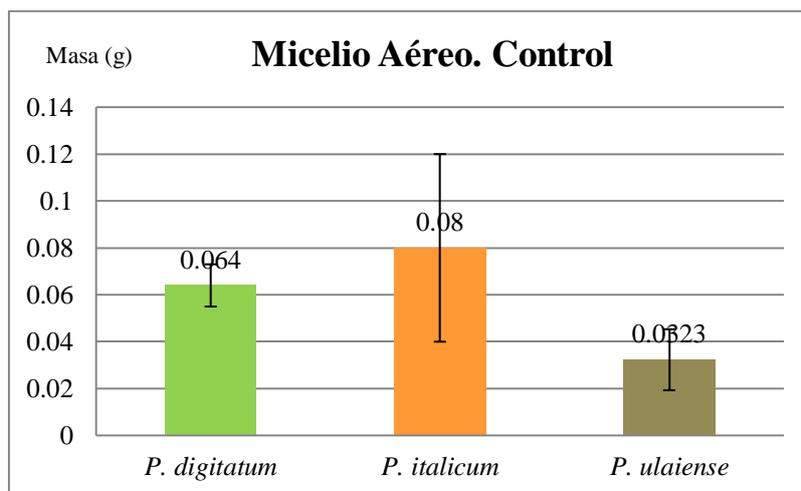


Figura 15. Masa de micelio aéreo obtenida tras 9 días de incubación en medio agar PDA, en ausencia de fungicidas y a temperatura óptima de crecimiento. Resultados obtenidos de la comparativa entre los organismos control (*P. digitatum* y *P. italicum*) y el organismo modelo de estudio (*P. ulaiense*).

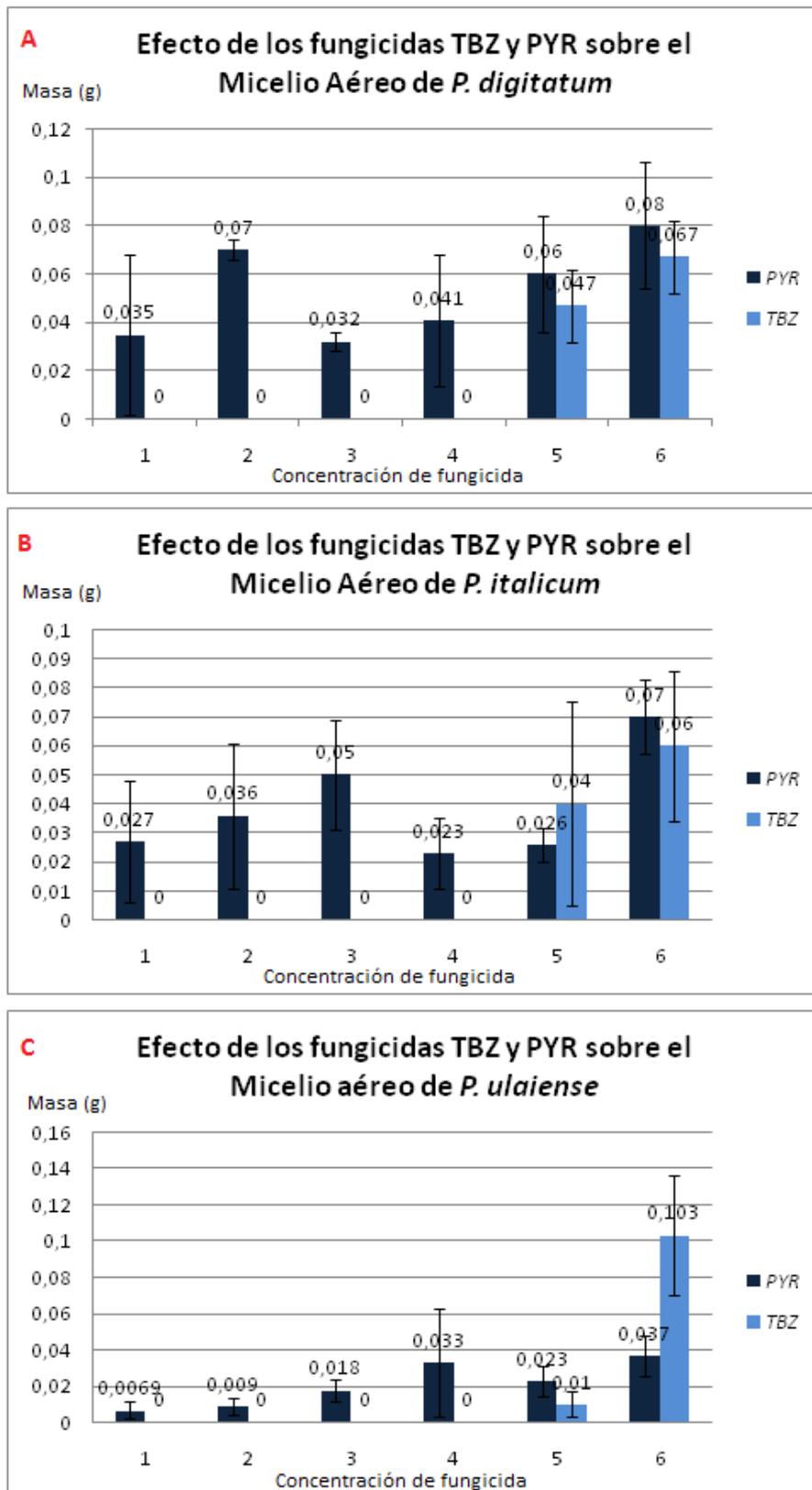


Figura 16. Efecto de los fungicidas TBZ y PYR sobre la masa de micelio aéreo de *P. digitatum* (A), *P. italicum* (B) y *P. ulaiense* (C).

Los resultados obtenidos de la medición del micelio aéreo de *P. ulaiense* mostraron menor masa de micelio aéreo en el caso del crecimiento en medio de cultivo con TBZ que en medio de cultivo con PYR. El fungicida TBZ era capaz de inhibir el crecimiento de *P. ulaiense* hasta la dilución 10^{-5} , a partir de la cual se observa crecimiento de micelio aéreo. El fungicida PYR, actúa ralentizando el crecimiento del patógeno sin llegar a inhibir por completo el desarrollo, ni a la mayor concentración de fungicida (dilución 10^{-1}).

4.3.2. Micelio sumergido (g)

Los resultados obtenidos del estudio sobre el micelio sumergido de *P. ulaiense* mostraron, en condiciones óptimas para el crecimiento, menor masa de micelio aéreo que *P. italicum*. Al comprar los resultados con *P. digitatum*, *P. ulaiense* presentaba valores muy similares a los observados en el organismo control.

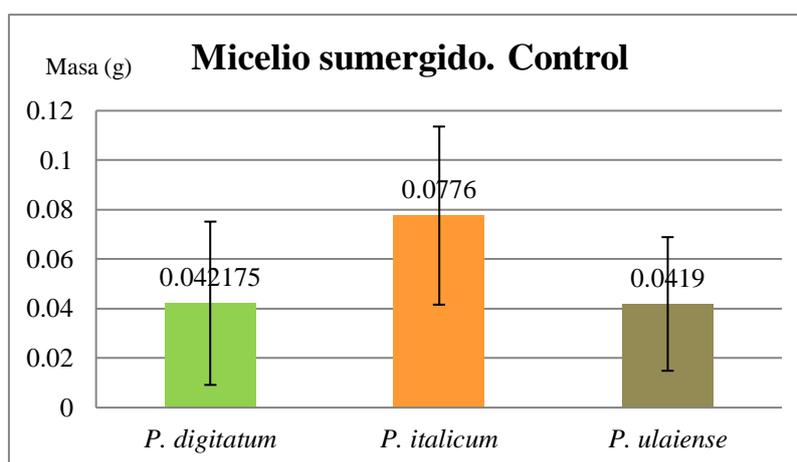


Figura 17. Masa de micelio sumergido obtenida tras 9 días de incubación en medio agar PDA, en ausencia de fungicidas y a temperatura óptima de crecimiento. Resultados obtenidos de la comparativa entre los organismos control (*P. digitatum* y *P. italicum*) y el organismo modelo de estudio (*P. ulaiense*).

La masa de micelio sumergido hace referencia al entramado de hifas dentro del medio de cultivo, generado por el hongo con el fin de obtener nutrientes de su entorno. El fungicida PYR no ha dado buenos resultados en cuanto al control del desarrollo del micelio sumergido de *P. ulaiense*, ya que a altas concentraciones de producto, se observa la misma masa de micelio que en el estudio control (valores próximos a 0,04g). El empleo del fungicida TBZ sin embargo, sí controló el crecimiento del micelio sumergido a bajas concentraciones de producto (hasta la dilución 10^{-5} .)

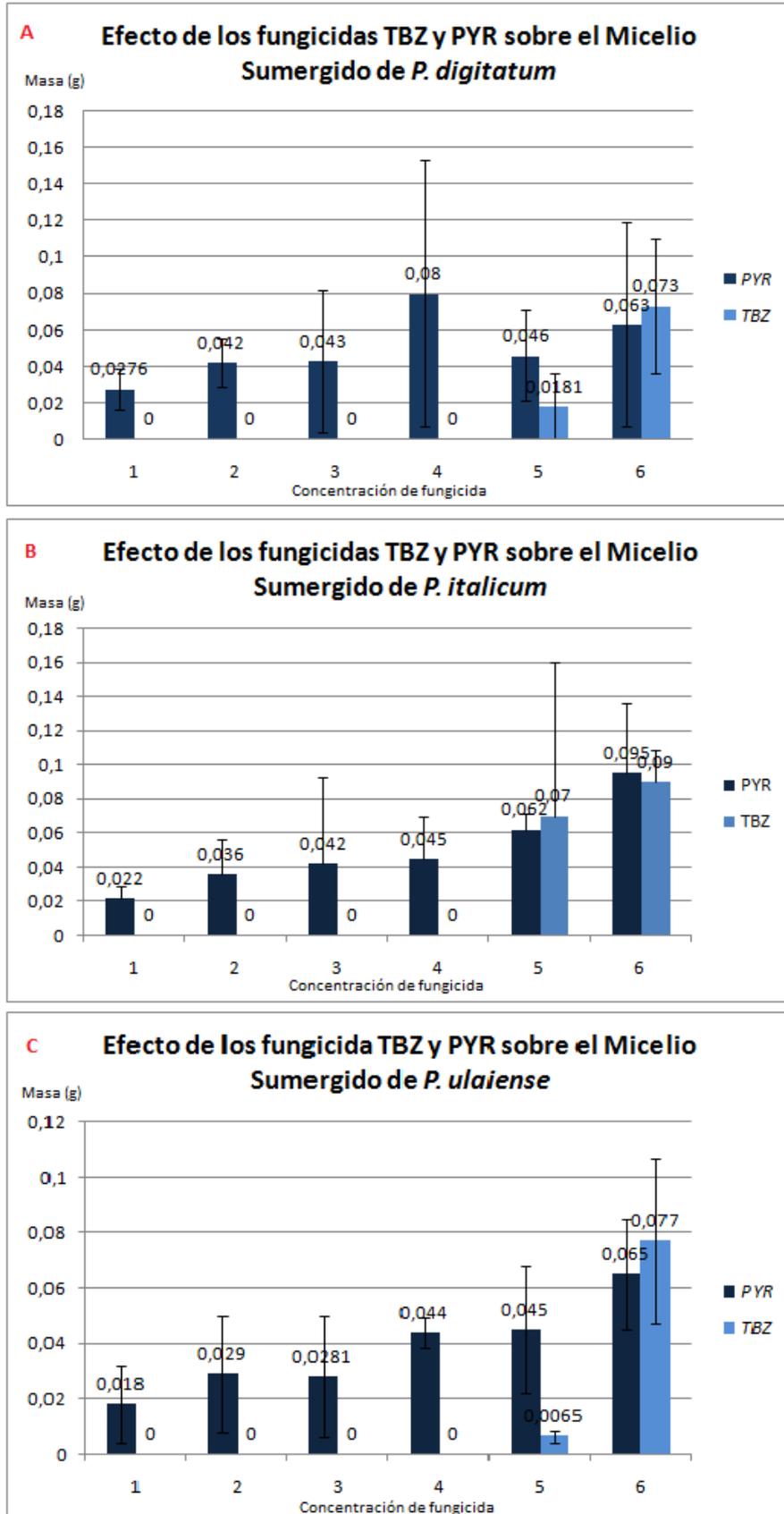


Figura 18. Efecto de los fungicidas TBZ y PYR sobre la masa de micelio sumergido de *P. digitatum* (A), *P. italicum* (B) y *P. ulaiense* (C).

4.3.3. Conidiogénesis (conidios/cm²)

El estudio control de la conidiogénesis de *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. ulaiense* mostró una mayor producción de conidios por cm² de crecimiento en el caso de *P. digitatum*, mientras que *P. ulaiense* y *P. italicum* obtuvieron valores similares.

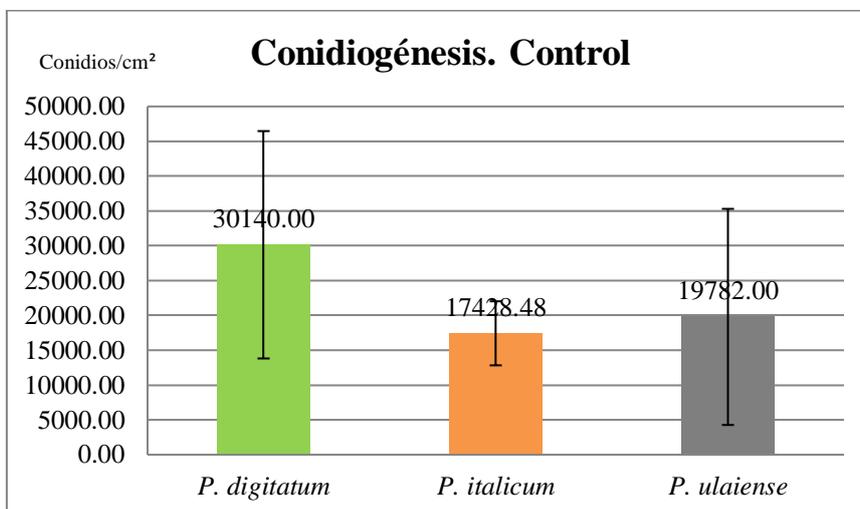


Figura 19. Resultados obtenidos del estudio de la conidiogénesis de *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. ulaiense* en condiciones normales de crecimiento, en ausencia de fungicidas.

Los resultados obtenidos permitieron observar como el fungicida TBZ era capaz de controlar la producción de conidios en los tres organismos estudiados hasta la dilución 10^{-5} . *P. ulaiense* se ve afectado en mayor medida que los organismos control, mostrando menor producción de conidios por cm² en las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} .

El fungicida PYR, por su parte, controló la producción de conidios en los tres casos, manteniendo niveles por debajo del control en las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , sin embargo, a partir de la dilución 10^{-3} en el caso de *P. italicum* y 10^{-4} en el caso de *P. digitatum* y *P. ulaiense* la producción de conidios/cm² aumenta, acercándose a los valores del estudio control (ver Figura 19). *P. ulaiense* muestra producción de conidios en todas las concentraciones estudiadas de fungicida PYR, aumentando progresivamente al mismo tiempo que disminuye la dosis de fungicida en el medio de cultivo.

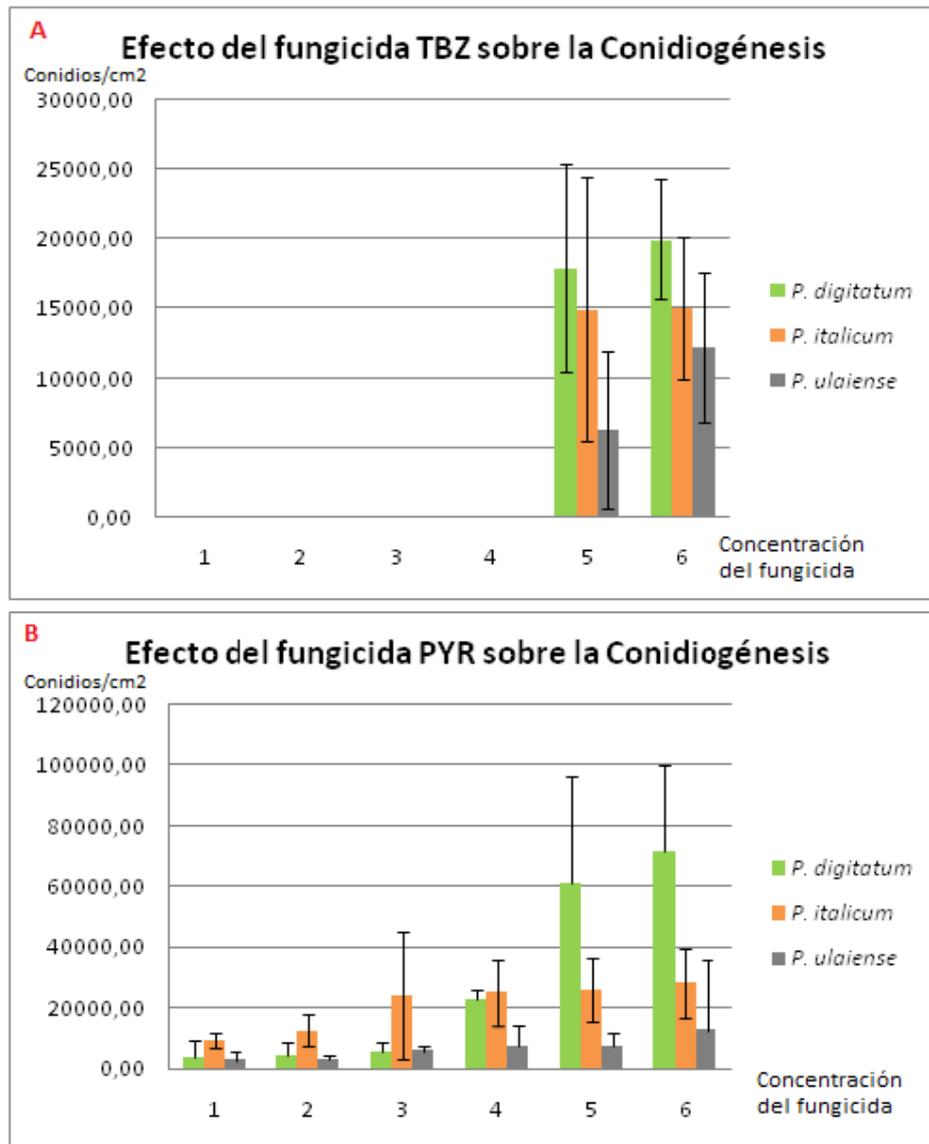


Figura 20. Efecto de los fungicidas TBZ (A) y PYR (B) sobre la conidiogénesis (conidios/cm²) de *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. ulaiense*.

4.3.4. Área de crecimiento de la colonia (cm²)

El control de la cinética de crecimiento de *P. ulaiense* en medio de cultivo sin fungicidas mostró un crecimiento progresivo del patógeno, en comparación con los organismos control estudiados. Mientras que *P. digitatum* y *P. italicum* alcanzaron la fase estacionaria al cuarto y tercer día respectivamente, *P. ulaiense* mantiene la fase de crecimiento durante los 9 días de incubación (ver Figura 21)

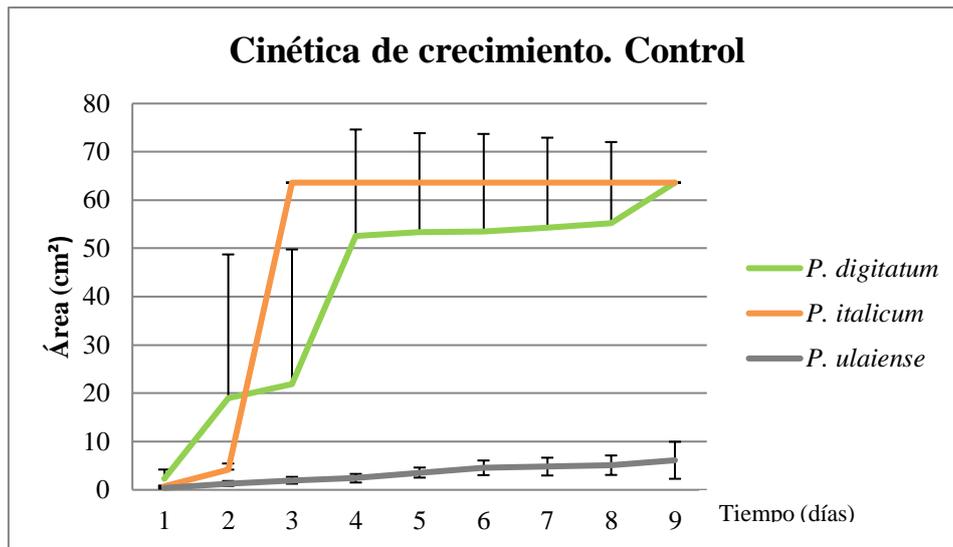


Figura 21. Cinética de crecimiento de tres aislados de *Penicillium* de distintas especies, creciendo sobre PDA en medio de cultivo control sin fungicidas (15-25°C).

Los resultados obtenidos del estudio de la cinética de crecimiento para *P. ulaiense* en presencia de TBZ muestran ausencia de crecimiento a altas concentraciones de fungicida, incluso en la dosis comercial (10^{-3}). En todos los casos, *P. ulaiense* muestra un menor crecimiento que los organismos control.

En el caso del fungicida PYR, *P. ulaiense* comienza a crecer a concentraciones altas de fungicida, siendo a partir de la dilución 10^{-3} cuando se observa un crecimiento constante del patógeno, aunque menor que en el caso del medio control.

En la dilución 10^{-6} de ambos fungicidas estudiados, *P. ulaiense* muestra una cinética de crecimiento similar al medio control (ausencia de fungicida.)

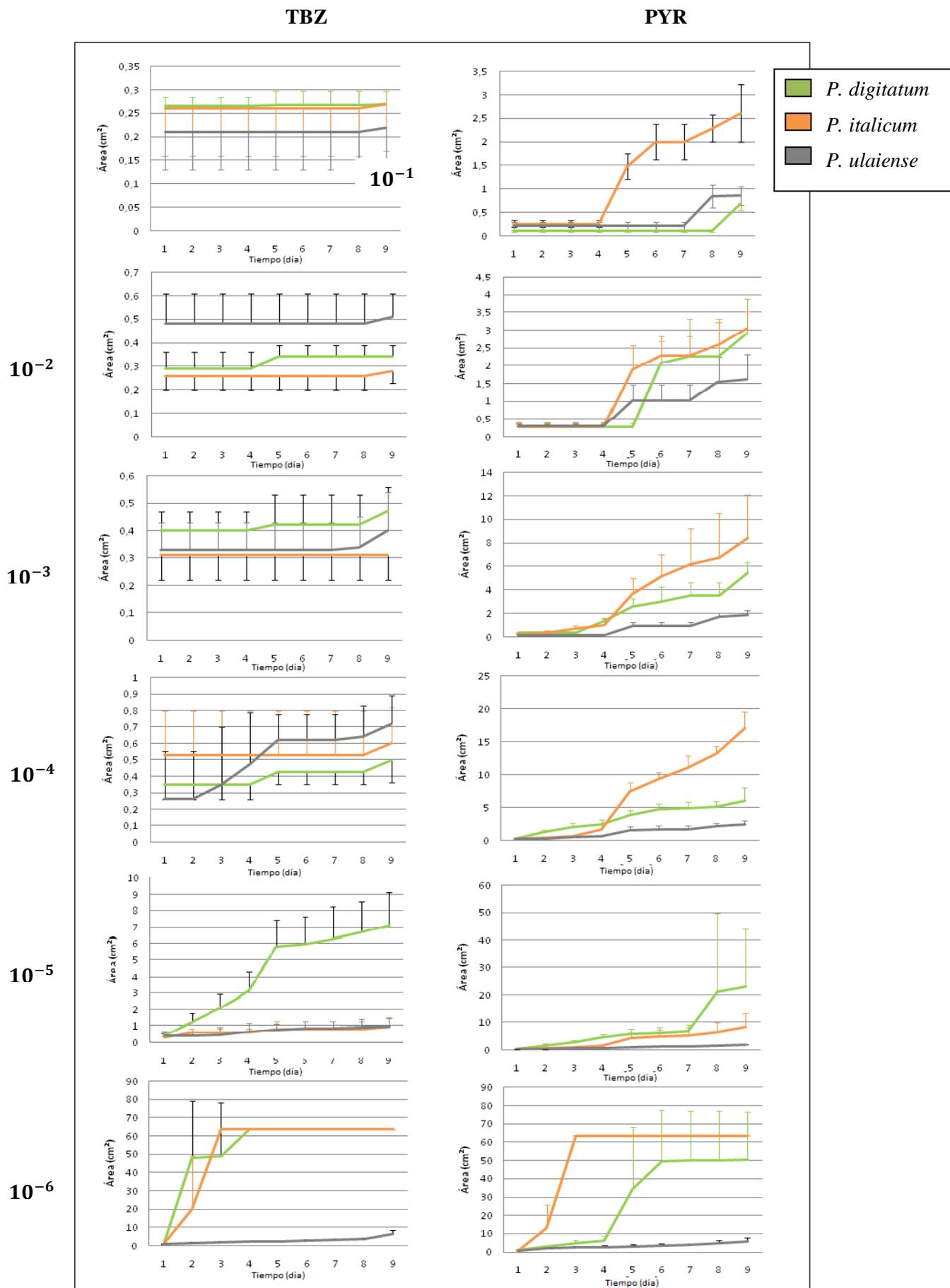


Figura 22. Cinética de crecimiento de tres aislados de *Penicillium* de distintas especies, creciendo sobre PDA a distintas concentraciones de fungicida TBZ (izquierda) y PYR (derecha), de los tres organismos estudiados (15-25°C).

4.3.5. Tasa de crecimiento (cm²/días) y Duración de la Fase Lineal (días)

Los resultados obtenidos de la tasa de crecimiento muestran un desarrollo progresivo de la colonia durante los 9 días de incubación, no se observan cambios en el crecimiento que indiquen el paso de la fase lineal a la fase estacionaria de crecimiento. En comparación con *P. digitatum* y *P. italicum*, *P. ulaiense* presenta un desarrollo más lento. La duración de la fase lineal no se ha determinado con exactitud ya que no se ha podido estimar el momento en el que el patógeno termina la fase de crecimiento lineal y comienza la fase estacionaria. Para obtener este dato es necesario realizar un ensayo más largo en el tiempo.

En todos los casos se observa un crecimiento progresivo que no se adapta a la cinética de crecimiento observable en los organismos control. *P. ulaiense* presenta un crecimiento lento y progresivo. El estudio se realizó en el plazo de 9 días, para obtener unos valores de tasa de crecimiento reales para el patógeno, sería conveniente prolongar el estudio el doble de tiempo.

5. DISCUSIÓN

5.1. Estudio *in vitro* del crecimiento en medio de cultivo con albedo

Los resultados del estudio *in vitro* del crecimiento en los distintos medios de albedo (1, 2, 3 y 4) mostraron desarrollo del hongo inoculado en todos los casos. El albedo de los frutos cítricos seleccionados para este estudio es, por tanto, un tejido favorable para el crecimiento de las especies del género *Penicillium* estudiadas: *P. digitatum*, *P. italicum*, *P. ulaiense*, *P. citrinum*, *P. solitum*, *P. adametzoides* y *P. brevicompactum*. En ausencia de defensas naturales presentes en el exocarpo del fruto, el hongo es capaz de proliferar sin ningún tipo de limitación, pues en todos los casos el crecimiento observable es similar al desarrollo de la colonia control (crecimiento en PDA). No se observaron diferencia significativa en cuanto al crecimiento según el medio de cultivo. Por ello, concluimos que todas las especies ensayadas podrían ser potenciales patógenas de los frutos cítricos y que no requerían nutrientes especiales que no contenga los tejidos de albedo.

Todas las especies estudiadas presentan una rápida propagación de conidios y colonización del medio de cultivo, ya que, en todos los casos, se observan colonias secundarias en toda el área de la placa de Petri, es decir, los conidios eran capaces de germinar en contacto con el albedo. El aspecto global de las placas muestra un parecido general en la morfología de las colonias, con ligeros matices que distinguen una especie de otra. Bien es cierto que, cada una de las especies parecía tener preferencia por alguno de los medios estudiados, ya que se podía observar mayor crecimiento de la colonia y pigmentación del medio de cultivo como es el caso de *P. adametzoides*. El medio de cultivo que resulta ser más conveniente es el medio con albedo de limón, pues en todos los casos se observa crecimiento de la colonia inicial y desarrollo de colonias secundarias. Mientras que el medio de cultivo con PDA y albedo de naranja parece ser el menos conveniente para las especies de *Penicillium* estudiadas.

5.2. Estudio *in vivo* de la patogenicidad de especies del género *Penicillium* en frutos cítricos

El estudio *in vivo* del crecimiento de las especies seleccionadas en frutos sanos de limón, naranja, mandarina y pomelo, mostró diferencias en cuanto a la capacidad infectiva de cada una de ellas. En el primer ensayo realizado *in vitro*, todas las especies

eran capaces de crecer en medio con albedo de los cítricos seleccionados, sin mostrar distinción entre ellos; sin embargo, el estudio *in vivo* mostró un resultado diferente. Bajo las mismas condiciones de incubación, (T^a, luz y humedad), *P. ulaiense* fue el único organismo que mostró una clara capacidad infectiva de los frutos y capacidad de producción de podredumbre en limón, naranja y mandarina. En pomelo no se observó crecimiento en este primer ensayo *in vivo*.

Los resultados obtenidos muestran una clara capacidad infectiva de *P. ulaiense* sobre frutos de limonero, naranjo y mandarino. Al igual que *P. digitatum* y *P. italicum*, *P. ulaiense* precisa de la existencia de una herida superficial del fruto para producir podredumbre. Bajo esta premisa, el *modus operandi* de *P. ulaiense* es muy similar al de los dos fitopatógenos mencionados. En todos los frutos de limón, naranja y mandarina se observó la misma coloración gris, característica de los conidios de *P. ulaiense*. La podredumbre producida fue similar en todos los casos: al inicio, se observa una coloración parda en la zona de inoculación, seguida por la pérdida de turgencia apreciable en el fruto debido a la acción de enzimas degradativas del mismo. Seguidamente, aparece un halo de color blanco que se corresponde al micelio aéreo y posteriormente, se observa la coloración gris por la producción de conidios.

5.3. Estudio *in vivo* de la patogenicidad de *P. ulaiense* en pomelo

Para descartar posibles errores en la determinación de *P. ulaiense* como un posible patógeno de pomelo, se realizó un posterior estudio *in vivo* únicamente con pomelos, en condiciones de alta humedad relativa.

Al contrario de lo observado en el ensayo *in vitro*, donde *P. ulaiense* es capaz de crecer en medio de cultivo con PDA y albedo de pomelo, los resultados obtenidos en el estudio *in vivo* mostraron que *P. ulaiense* no desarrollaba enfermedad en pomelos sanos cuando era inoculado a una dosis baja y en condiciones de alta humedad relativa.

Las defensas propias del fruto actúan como barrera protectora frente a la infección de *P. ulaiense*. Cuando el fruto se encuentra debilitado debido al proceso natural de senescencia, *P. ulaiense* es capaz de solventar dichas barreras y emplear el albedo de pomelo como medio de crecimiento. En este caso, *P. ulaiense* no actúa como patógeno en frutos de pomelo, sino como un organismo saprófito.

5.4. Caracterización de *P. ulaiense*

Los resultados obtenidos sitúan a *P. ulaiense* en la categoría de fitopatógeno de cítricos, generando enfermedad cuando el fruto ha sido recolectado, es decir, se trata de un patógeno poscosecha, al igual que los ya conocidos fitopatógenos *P. digitatum* y *P. italicum*. Tras las diferentes pruebas realizadas con el objetivo de obtener una mejor caracterización de *P. ulaiense*, fue posible establecer diferencias entre el organismo de estudio y los organismos controles.

En ausencia de fungicida, bajo condiciones óptimas de crecimiento del fitopatógeno, *P. ulaiense* presenta un menor crecimiento que los organismos control. Los resultados obtenidos de la medición del área de crecimiento, representado como tamaño aumentado de la colonia (cm²) por tiempo (días), muestran un crecimiento progresivo de la colonia, sin observarse cambios bruscos en el tamaño de la misma. En contraposición a lo observado en los organismos control, *P. ulaiense* mantiene una cinética de crecimiento progresiva hasta el 9 día de estudio. De forma similar, *P. ulaiense* produce menor masa de micelio aéreo que los organismos control.

El micelio sumergido producido es similar al de *P. digitatum*, aunque mucho menor que el de *P. italicum*. Estos resultados sitúan a *P. ulaiense* como un fitopatógeno de lento crecimiento y baja producción de micelio aéreo (g). Del mismo modo que *P. digitatum* y *P. italicum*, *P. ulaiense* precisa de una herida en la corteza del fruto para poder acceder al albedo y poder producir enfermedad. Al principio, los esfuerzos del patógeno se centran en crecer internamente generando micelio interno. Los resultados obtenidos podrían indicar un modo de actuación similar al de *P. digitatum* en cuanto a la velocidad de infección en las zonas internas del fruto.

La producción de conidios por cm² es superior en el caso de *P. digitatum* y muy similar entre *P. italicum* y *P. ulaiense*. Este hecho determina que en ausencia de estrés, *P. ulaiense* presenta una elevada producción de conidios en relación al área de crecimiento. Es decir, requiere menor espacio de crecimiento para generar una elevada cantidad de conidios.

5.5. Caracterización de *P. ulaiense* en presencia de fungicidas

P. ulaiense ve afectado su crecimiento y conidiogénesis cuando crece en medio a diferentes dosis de fungicida. El estudio comparativo de la acción sobre los diferentes parámetros estudiados del patógeno, muestran una mejor acción preventiva y curativa en el caso del fungicida TBZ. A nivel preventivo, el fungicida TBZ es capaz de mantener el crecimiento de micelio aéreo y micelio sumergido en valores próximos a 0, cuando éste es suministrado al medio de cultivo por debajo de la dosis comercial. Los valores de conidiogénesis se ven mermados en comparación con el estudio control cuando *P. ulaiense* se ve sometido a la acción del fungicida TBZ. A nivel curativo, *P. ulaiense* muestra valores próximos a 0 en los tres parámetros de estudio mencionados, cuando se suministra una dosis comercial.

P. ulaiense disminuye severamente su crecimiento y desarrollo de estructuras de propagación en presencia del fungicida tiabendazol, cuando este es suministrado en la dosis comercial. El fungicida pirimetanil actúa de forma preventiva contra *P. ulaiense* sin inhibir completamente el crecimiento y producción de conidios del patógeno, incluso a dosis altas de producto.

El fungicida tiabendazol realiza una acción de control tanto a nivel curativo como a nivel preventivo sobre la podredumbre gris ocasionada por *P. ulaiense* en cítricos. A dosis altas de TBZ se obtienen mejores resultados que a la misma dosis de PYR. Los ensayos realizados sitúan a *P. ulaiense* como un fitopatógeno poscosecha de cítricos a tener en cuenta en el control de podredumbres dentro de las centrales citrícolas. Los fungicidas estudiados han mostrado tener efecto sobre los principales parámetros de crecimiento del patógeno.

5.6. Perspectiva del desarrollo completo de la investigación en curso

Las especies empleadas en este estudio se encuentran almacenadas en condiciones óptimas para su conservación en el Departamento de Protección de Cultivos de la UPCT dentro de la colección MAPYS (Microorganismos para la Agricultura, Poscosecha Y Sostenibilidad, asociada a la red de microorganismos españoles REDESMI, gestionada por la Colección Española de Cultivos Tipo de Valencia (CECT). Los resultados obtenidos en este estudio requieren posteriores experiencias que permitan conocer el efecto de la aplicación *in vivo* de fungicidas sobre la podredumbre originada por *P.*

ulaiense. Para ello, se podría inocular el patógeno de forma similar a la mencionada en apartados anteriores y posteriormente, aplicar el fungicida sobre el fruto previamente infectado. La realización de este ensayo podría complementarse estandarizando las condiciones de incubación de los frutos una vez se ha producido la infección y suministrado los diferentes tratamientos. Con este posterior trabajo, obtendríamos un mayor conocimiento del modo de acción de patógeno cuando este es inoculado en frutos sanos y posteriormente, es sometido a un factor limitante del crecimiento/desarrollo y/o germinación como es la aplicación de un estrés químico.

6. CONCLUSIONES

- a) El ensayo *in vitro* en medio de cultivo con PDA y albedo de limón, naranja, mandarina y pomelo ha demostrado que el albedo es un medio óptimo de crecimiento para todos los organismos estudiados.
- b) *P. ulaiense* es capaz de reproducir síntomas de enfermedad en frutos de limonero, naranjo y mandarino. El resto de las especies estudiadas no mostraron signos que demuestren una intención por parte del hongo de colonizar el fruto y causar enfermedad, de modo que no se consideran patógenos de las variedades de cítricos estudiadas.
- c) *P. ulaiense* no causa enfermedad en pomelo cuando el fruto está sano, de modo que no se puede considerar patógeno de esta especie.
- d) *P. ulaiense* muestra un crecimiento lento y progresivo cuando crece en medio de cultivo sin fungicida. En general, todos los parámetros estudiados indican una menor agresividad de la enfermedad.
- e) El control de la podredumbre gris originada por *P. ulaiense* mediante el empleo de tiabendazol permitió observar un retardo en el crecimiento del patógeno en todos los casos de estudio, incluso a dosis bajas del fungicida. En el caso del control de *P. ulaiense* con pirimetanil, el patógeno era capaz de crecer a dosis altas de fungicida. Del mismo modo, la conidiogénesis de *P. ulaiense* se ve mermada en mayor medida cuando es sometido a un medio de cultivo con TBZ.

- f) Los fungicidas estudiados permiten un control de la podredumbre por *P. ulaiense* a nivel preventivo, siendo útiles como fungicidas poscosecha en centrales citrícolas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alamar, S. 2008. Cambios de la expresión génica asociados a la respuesta de los frutos cítricos frente a la infección por hongos del género *Penicillium*. Tesis Doctoral. *Universidad Politécnica de Valencia*, España.
- Aziz, N.H., Mattar, Z. A., Mahrous, S. R. 2006. Contamination of grains by mycotoxin-producing molds and mycotoxins and control by gamma irradiation. *Institute of Biology and Animal Nutrition*, 8.
- Baily, J.D., Tabuc, C., Querin, A., Guerre, P. 2005. Production and Stability of Patulin, Ochratoxin A, Citrinin, and Cyclopiazonic Acid on Dry Cured Ham. *Journal of Food Protection*, 68 (7). 1516-1520.
- Botía J.M., Del Río J.A., Fuster M.D., García-Lidón A., Ortuño A., Porras I. 1996. Flavonoides presentes en los cítricos. Aspectos de su Importancia Industrial. *Fruticultura Profesional*, 80: 50-55.
- Cantu, D., Vicente, A.R., Greve, L.C., Dewey, F.M., Bennett, A.B., Labavitch, J.M., Powell, A.L.T. 2008. The intersection between cell wall disassembly ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 105: 859-864.
- Carrillo, L. 1995. *Penicillium ulaiense* Hsieh, Su & Tzean, a post-harvest pathogen of citrus Fruit in northeastern Argentina. *Review Argent. Microbiology*, 27: 107-1013.
- Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. *Universidad Nacional de Jujuy. Universidad Nacional de Salta*, 4, 1 – 24: 61 – 69.
- Davidse L.C. 1986. Benzimidazole fungicides: Mechanism of action and biological impact. *Annual Review of Phytopathology*, 24: 43-65.
- Delgado, R., Pérez, G. 1997. Caracterización biológica de *Penicillium digitatum*, *P. italicum* y *P. ulaiense* en poscosecha en cítricos. Tesis Doctoral. *Universidad de la República*, Uruguay.
- Eckert, J.W., Eaks, I.L. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. The citrus industry. University of California, *Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland*, pp. 179–259.
- FAO. 2004. Manual Técnico. Manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos.
- FAO. 2016. Citrus Fruit. Fresh and processed statistical bulletin. Rome.

- Frisvad, J.C., Samson, R. A. 2004. Polypjasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* - A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.* 49: 1-174.
- García, J.A. 2017. El sector de los cítricos en España. *Distribución y Consumo*, 3: 36-39.
- García A., Del Río J.A., Porras I., Fuster M.D., Ortuño A. 2003. El Limón y sus Componentes Bioactivos. *Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente de la Región de Murcia*.
- Haro-Mazo, J.F., Guerrero-Beltrán, J.A. 2013. Efectos de la radiación UV-C en frutas y verduras. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7-1: 68-77.
- Holmes, G. J., Eckert, J. W. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Postharvest Pathology and Mycotoxins*, 89:716-721.
- Holmes, G.J., Eckert, J.W., Pitt, I. 1993. New postharvest disease of citrus in California caused by *Penicillium ulaiense*. *Plant Disease*, 77:537.
- Holmes, G.J., Eckert, J.W., Pitt, I. 1994. Revised description of *Penicillium ulaiense* and its role as a pathogen of citrus fruits. *Postharvest Pathology and Mycotoxins*, 84: 719-727.
- Houbraken, J.A., Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2010. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity*, 44: 117-133.
- Izco, J., Barreno E., Brugués, M., Costa, M., Devesa, J.A., Fernández, F., Gallardo, T., Llimona, X., Prada, C., Talavera, S., Valdés, B. 2004. Botánica. *McGraw-Hill Interamericana*. 2ª edición. pp. 239-254 y 274-278.
- Khan, A., Subhani, M.N., Chatta, M.B., Anwar, W., Nawaz, K. 2017. First Report of Whisker Mold of Citrus (*Citrus sinensis*) Caused by *Penicillium ulaiense* in Pakistan. *Plant Disease*, 101(6): 1042 p.
- Kellerman, M., Erasmus, A., Cronjé, P., Fourié, P. 2014. Thiabendazole residue loading in dip, drench and wax coating applications to control green mould and chilling injury on citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 96: 78–87.
- Kinay, P., Mansour, M.F., Mlikota, F., Margosan, D.A., Smilanick, J.L. 2006. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection*, 26: 647-656.
- López, M. 2013. Estudio de los factores de patogenicidad/virulencia de *Penicillium* sobre frutos cítricos. Tesis Doctoral. *Universidad Politécnica de Valencia*, España.

- Lorenzini, M., Simonato, B., Favati, F., Bernardi, P., Sbarbati, A., Zapparoli, G. 2018. Filamentous fungi associated with natural infection of noble rot on withered grapes *P. citrinum*. *International Journal of Food Microbiology*, 272: 83-86.
- Lund, F. 1995. Diagnostic characterization of *Penicillium palitans*, *P. commune* and *P. solitum*. *Letters in Applied Microbiology*, 21: 60-64.
- MoscOSO-Ramirez, P.A., Palou, L. 2015. Evaluación de tratamientos poscosecha con inductores químicos de resistencia para el control de las podredumbres verde y azul de los cítricos. Consultado en: ResearchGate.
- Palou L. 2012. Situación actual del control de las enfermedades de poscosecha en cítricos en España. *Fruticultura*. 23: 24-31.
- Panno, S., Davino, S., Tuttolomondo, P., Iacono, G., Davino, A., Rubio, L., Galipienso, L. 2014. Cítricos ornamentales como vector de enfermedades: riesgo para el comercio internacional. *Actas de Horticultura*, 68: 25-33.
- Pasquel J., Rodríguez-Paéz J.E., Mosquera S.A. 2016. Evaluación de la capacidad antifúngica del ZnO sobre *Penicillium digitatum* considerando su incorporación como revestimiento. *Agronomía Colombiana*, 34: 114-117.
- Petrus, J. 2015. Pathogenicity and host specificity of *Penicillium spp.* on pome and citrus fruit. *Plant Disease*, 99: 21-30.
- Pimenta, S.R., Silva, F. L., Silva, F.M., Morais, P. B., Braga, D.T., Rosa, A.C., Correa, A. 2008. Control biológico de *Penicillium italicum*, *P. digitatum* y *P. expansum* por la levadura *Saccharomycopsis schooenii* en naranjas. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39 (1).
- Pitt, J.I., Spotts, R.A., Holmes, R.J., Cruickshank, R.H. 1991. *Penicillium solitum* revived, and its role as a pathogen of pomaceous fruit. *Phytopathology*, 81: 1108-1112.
- Rouissi, W., Cherif, A., Ligorio, A., Ippolito, A., Sanzani, S.M. 2015. First report of *Penicillium ulaiense* causing whisker mould on stored citrus fruit in Tunisia. *Journal of Plant Pathology*, 97 (2): 391-403
- Salvador, A., Navarro, P., Martínez-Jávega, J.M. 2007. Tecnología poscosecha en cítricos. Trabajo presentado en el XII Simposium Internacional de Citricultura.
- Smilanick, J.L., Mansour, M.F., Mlikota F., Goodwine, W.R. 2006. The effectiveness of pyrimethanil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control citrus green mold after harvest. *Postharvest Biology and Technology*, 42: 75-85.
- Stampella P., Delucchi G., Keller, H., Hurrell, J. 2014. Etnobotánica de *Citrus reticulata* (Rutaceae, Aurantiodeae) naturalizada en Argentina. *Bonplandia*, 23(2): 151-162.

- Sholberg, P.L., Bedford, K., Stokes, S. 2005. Sensitivity of *Penicillium spp.* and *Botrytis cinerea* to pyrimethanil and its control of blue and gray mold of stored apples. *Crop Protection*, 24: 127–134.
- Taiz, L., Zaiger, E. 2006. Fisiología Vegetal. Publicaciones de la Universidad de Jaime I. Castellón de la Plana. 542-543 pp.
- Tashiro, N., Manabe, K., Ide, Y. 2012. First report of whisker mold, a postharvest disease on citrus caused by *Penicillium ulaiense* (in Japan). *J. Gen Plant Pathol*, 70: 140-144.
- Visagie, C.M., Houbraeken, J., Frisva, J.C., Hong, S.B., Klassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi T., Samson, R.A. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78: 343-371.
- Youssef, K., Ahmed, Y., Ligorio, A., D'ongia, A.M., Nigro, F., Ippolito, A. 2010. First report of *Penicillium ulaiense* as a postharvest pathogen of orange fruit in Egypt. *New Disease Reports*, 21:18.

ANEXO I

Listado de Figuras

Tabla 1. Total de frutos empleados en los distintos ensayos realizados en este trabajo. (Pág. 11)

Figura 1. Preparación de medio de cultivo con albedo. A) Número de frutos empleados para cada litro de medio. B) Albedo extraído de cada uno de los frutos. C) Medios de cultivo preparados antes del autoclavado. (Pág. 14)

Figura 2. Frutos de limón, naranja, mandarina y pomelo antes de la inoculación. (Pág.16)

Figura 3. A) Bandeja con pomelos inoculados con *P. ulaiense* en cámara seca. B) Bandeja con pomelos inoculados con *P. ulaiense* en cámara húmeda. (Pág. 19)

Figura 4. Protocolo para obtener medios de cultivo en PDA a diferentes concentraciones de fungicida. A) Preparación de medio de cultivo en PDA. B) Diluciones de los fungicidas empleados. C) Siembra en medio con PDA del día 19/02/18. D) Siembras de *P. ulaiense*, *P. digitatum* y *P. italicum* en PDA. (Pág. 21)

Figura 5. Procedimiento para obtener el micelio aéreo. (Pág. 22)

Tabla 2. Crecimiento de diversas especies de la microbiota penicífica de frutos cítricos en agar albedo obtenido a partir de diversas especies de frutos. (Pág. 26)

Figura 6. Siembras de las especies del género *Penicillium* objeto de estudio. A) *P. digitatum*. B) *P. italicum*. C) *P. ulaiense*. D) *P. solitum*. E) *P. citrinum*. F) *P. adametzoides*. G) *P. brevicompactum*. (Anexo II).

Tabla 3. Crecimiento de diversas especies de la microbiota penicífica de frutos cítricos sobre distintas especies de frutos cítricos. (Pág. 27)

Figura 7. Resultados ensayo *in vivo* de inoculación de *P. ulaiense* a distintas especies de frutos cítricos. A) Crecimiento de *P. ulaiense* en limón. B) Crecimiento de *P. ulaiense* en naranja. C) Crecimiento de *P. ulaiense* en mandarina. D) Pomelo inoculado con *P. ulaiense*, donde se muestra ausencia de capacidad infectiva. (Pág. 28)

Figura 8. Resultados ensayo *in vivo* de la inoculación de *P. solitum* en limón (A), naranja (B), mandarina (C) y pomelo (D). (Anexo II).

Figura 9. Resultados ensayo *in vivo* de la inoculación de *P. citrinum* en limón (A), naranja (B), mandarina (C) y pomelo (D). (Anexo II).

Figura 10. Resultados ensayo *in vivo* de la inoculación de *P. adametzoides* en limón (A), naranja (B), mandarina (C) y pomelo (D). (Anexo II).

Figura 11. Resultados ensayo *in vivo* de la inoculación de *P. brevicompactum* en limón (A), naranja (B), mandarina (C) y pomelo (D). (Anexo II).

Figura 12. Resultados ensayo de viabilidad de la suspensión de conidios empleada para el ensayo *in vivo*. A) *P. ulaiense*. B) *P. solitum*. C) *P. citrinum*. D) *P. adametzoides*. E) *P. brevicompactum*. (Anexo II).

Figura 13. Estudio de patogénesis de *P. ulaiense* en pomelo. A) Resultados cámara húmeda. B) Resultados cámara no húmeda. (Pág. 30)

Figura 14. Re-aislado de *P. ulaiense* en medio con PDA a partir de una podredumbre observada en pomelo. (Anexo II).

Figura 15. Masa de micelio aéreo obtenida tras 9 días de incubación en medio agar PDA, en ausencia de fungicidas y a temperatura óptima de crecimiento. Resultados obtenidos de la comparativa entre los organismos control (*P. digitatum* y *P. italicum*) y el organismo modelo de estudio (*P. ulaiense*). (Pág. 30)

Figura 16. Efecto de los fungicidas TBZ y PYR sobre la masa de Micelio Aéreo de *P. digitatum* (A), *P. italicum* (B) y *P. ulaiense* (C). (Pág. 31)

Figura 17. Masa de micelio sumergido obtenida tras 9 días de incubación en medio agar PDA, en ausencia de fungicidas y a temperatura óptima de crecimiento. Resultados obtenidos de la comparativa entre los organismos control (*P. digitatum* y *P. italicum*) y el organismo modelo de estudio (*P. ulaiense*). (Pág. 32)

Figura 18. Efecto de los fungicidas TBZ y PYR sobre la masa de micelio sumergido de *P. digitatum* (A), *P. italicum* (B) y *P. ulaiense* (C). (Pág. 33)

Figura 19. Resultados obtenidos del estudio de la conidiogénesis de *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. ulaiense* en condiciones normales de crecimiento, en ausencia de fungicidas. (Pág. 34)

Figura 20. Efecto de los fungicidas TBZ (A) y PYR (B) sobre la conidiogénesis (conidios/cm²) de *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. ulaiense*. (Pág. 35)

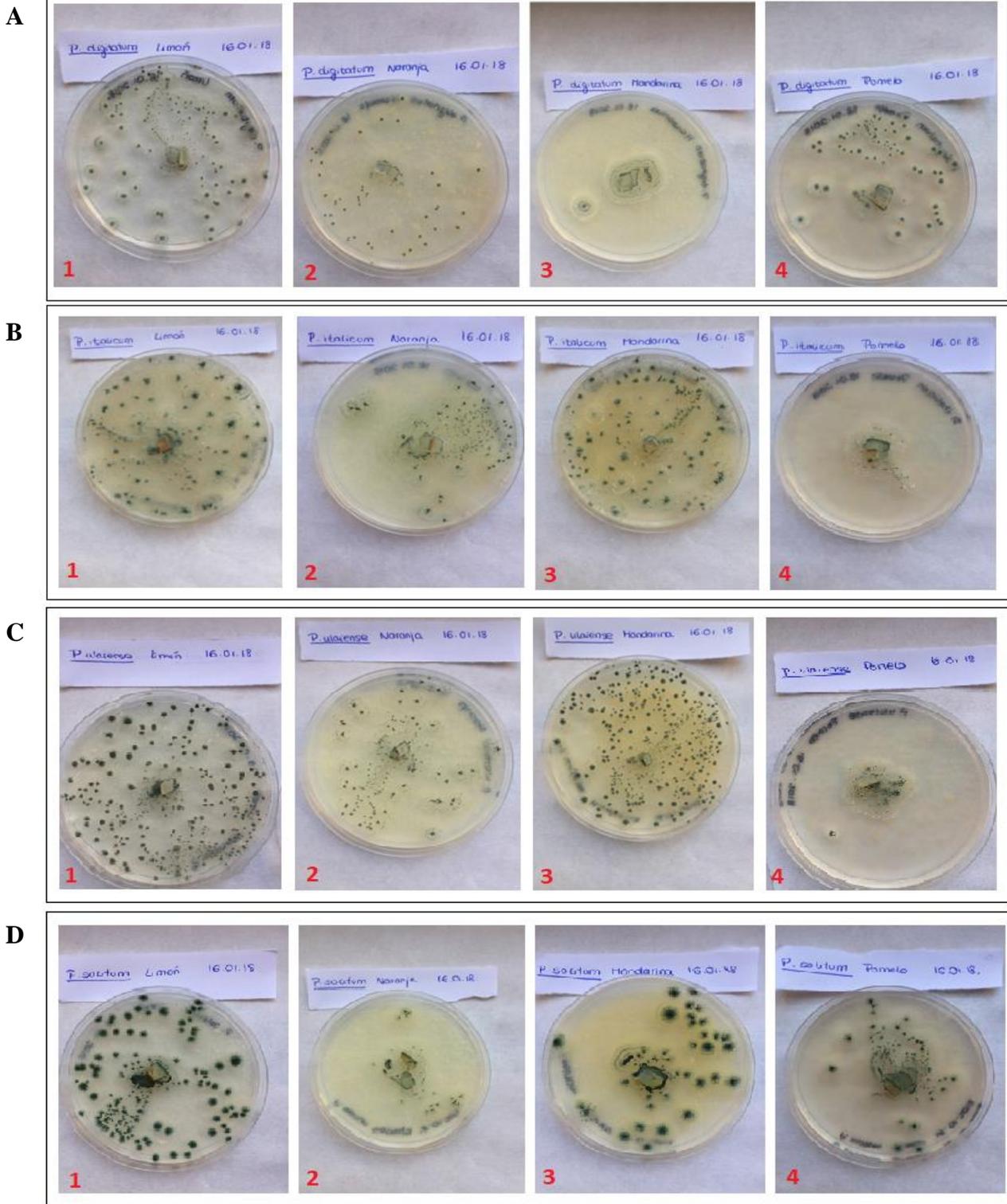
Figura 21. Cinética de crecimiento de tres aislados de *Penicillium* de distintas especies, creciendo sobre PDA en medio de cultivo control sin fungicidas (15-25°C). (Pág. 36)

Figura 22. Cinética de crecimiento de tres aislados de *Penicillium* de distintas especies, creciendo sobre PDA a distintas concentraciones de fungicida TBZ (izquierda) y PYR (derecha), de los tres organismos estudiados (15-25°C). (Pág. 37)

ANEXO II

Figuras

Figura 6. Siembras de las especies del género *Penicillium* objeto de estudio. A) *P. digitatum*. B) *P. italicum*. C) *P. ulaiense*. D) *P. solitum*. E) *P. citrinum*. F) *P. adametzoides*. G) *P. brevicompactum*.



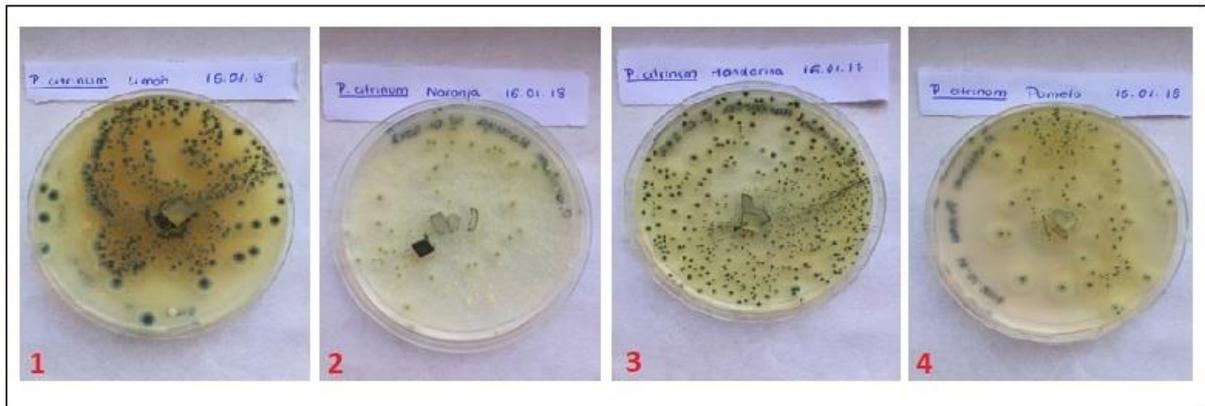
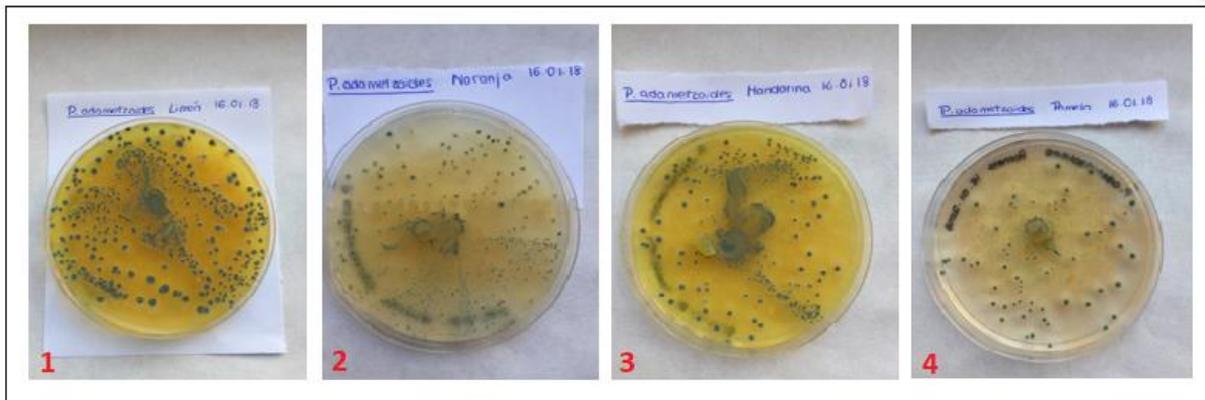
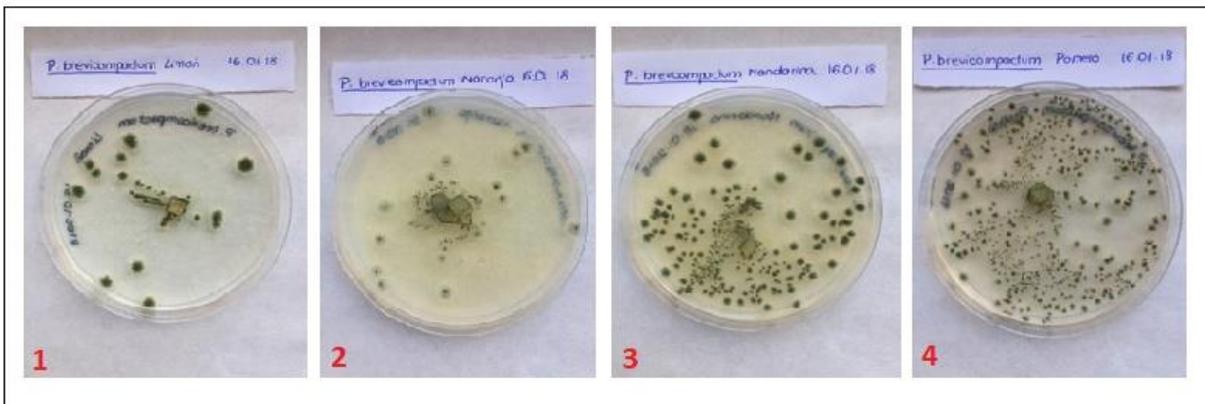
E**F****G**

Figura 8. Resultados ensayo *in vivo* de la inoculación de *P. solitum* en limón (A), naranja (B), mandarina (C) y pomelo (D).

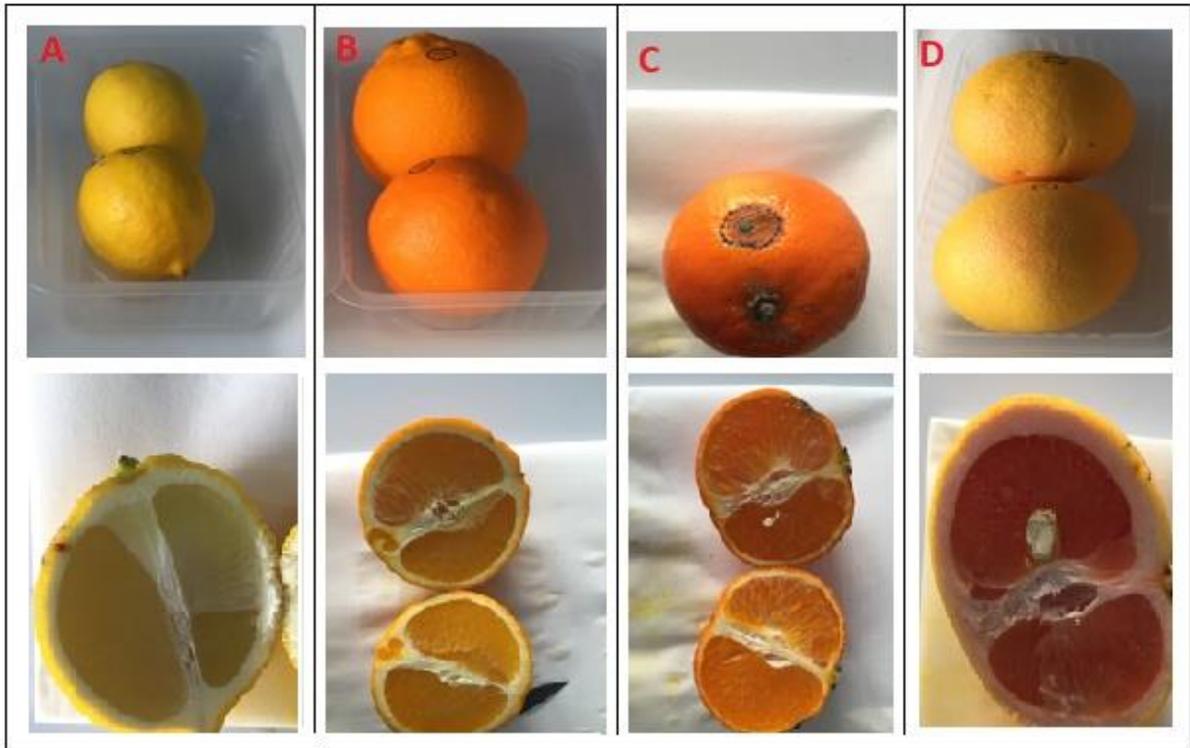


Figura 9. Resultados ensayo *in vivo* de la inoculación de *P. citrinum* en limón (A), naranja (B), mandarina (C) y pomelo (D).

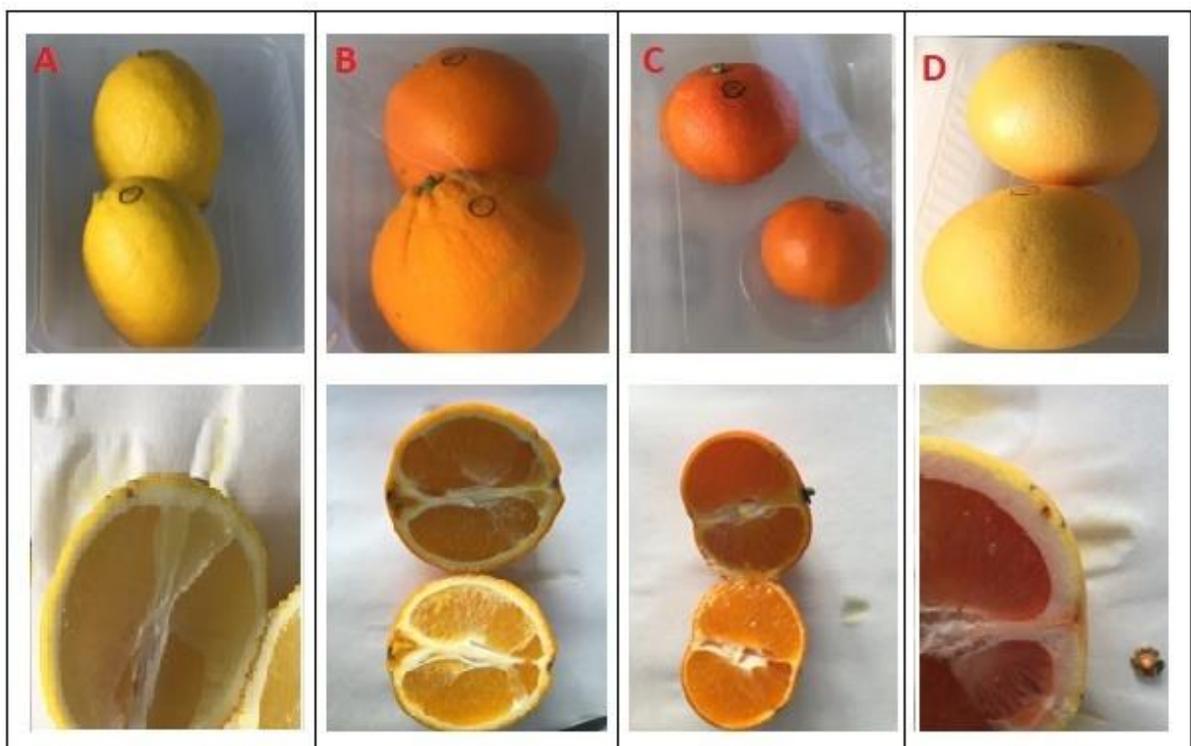


Figura 10. Resultados ensayo *in vivo* de la inoculación de *P. adametzoides* en limón (A), naranja (B), mandarina (C) y pomelo (D).

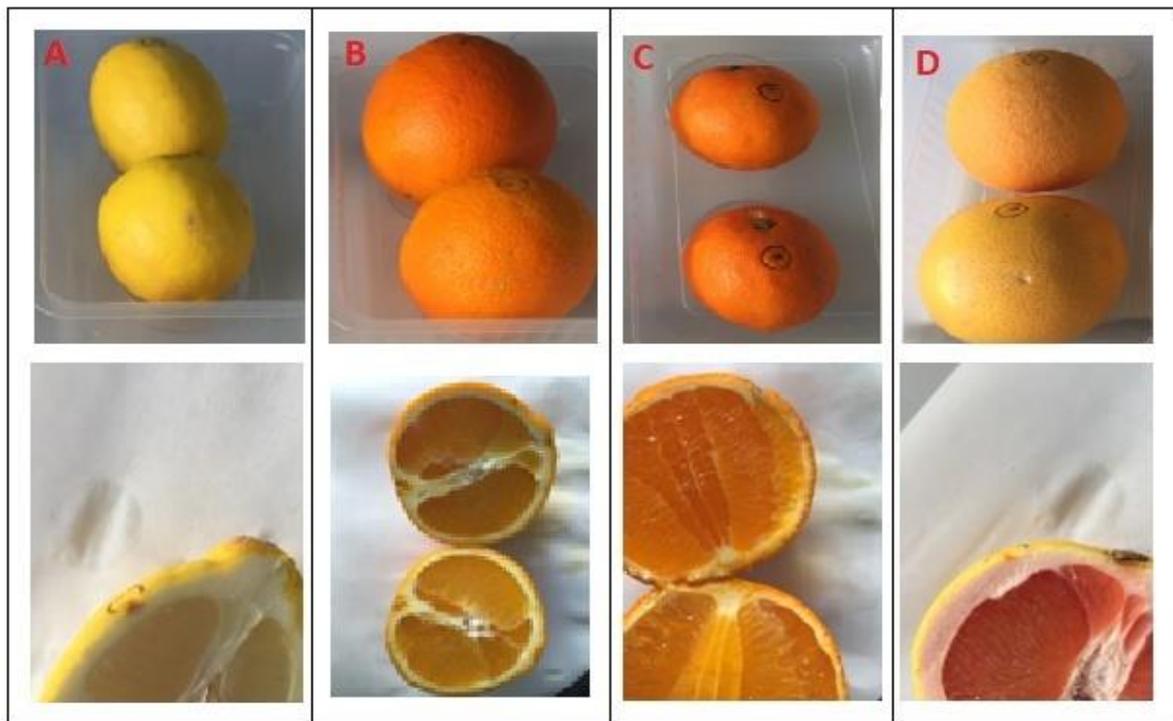


Figura 10. Resultados ensayo *in vivo* de la inoculación de *P. brevicompactum* en limón (A), naranja (B), mandarina (C) y pomelo (D).

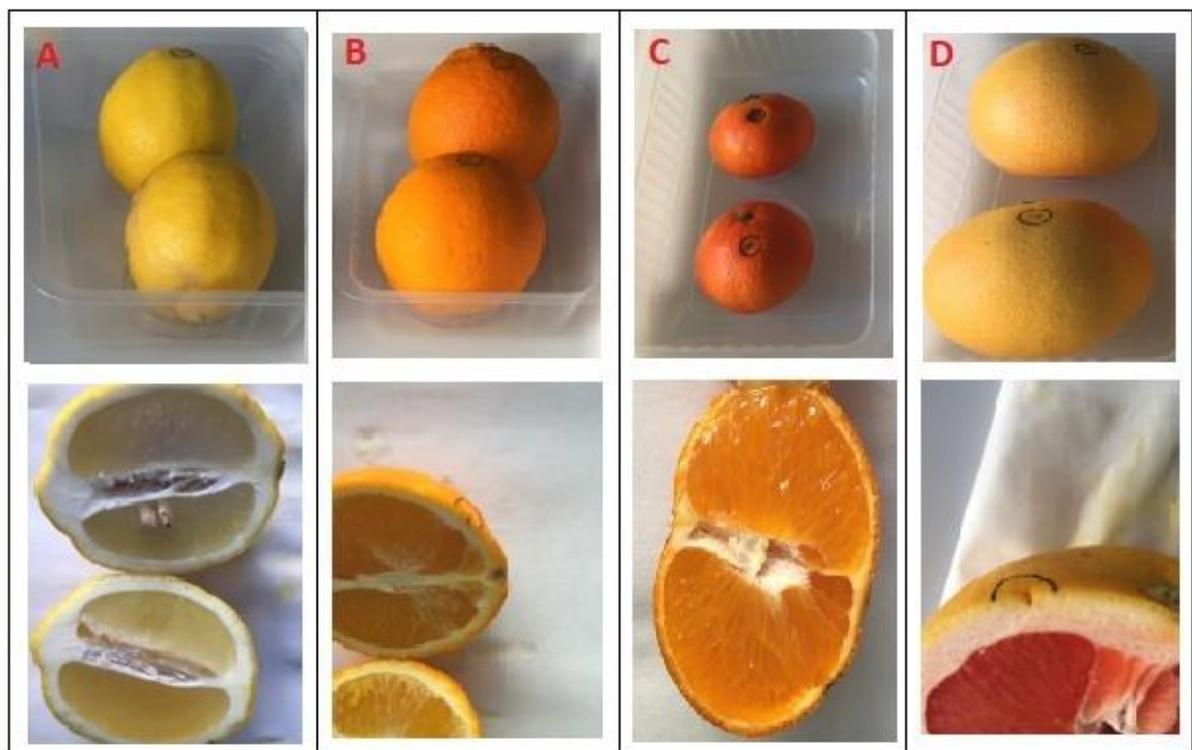


Figura 11. Resultados ensayo de viabilidad de la suspensión de conidios empleada para el ensayo *in vivo*.
A) *P. ulaiense*. B) *P. solitum*. C) *P. citrinum*. D) *P. adametzoides*. E) *P. brevicompactum*.

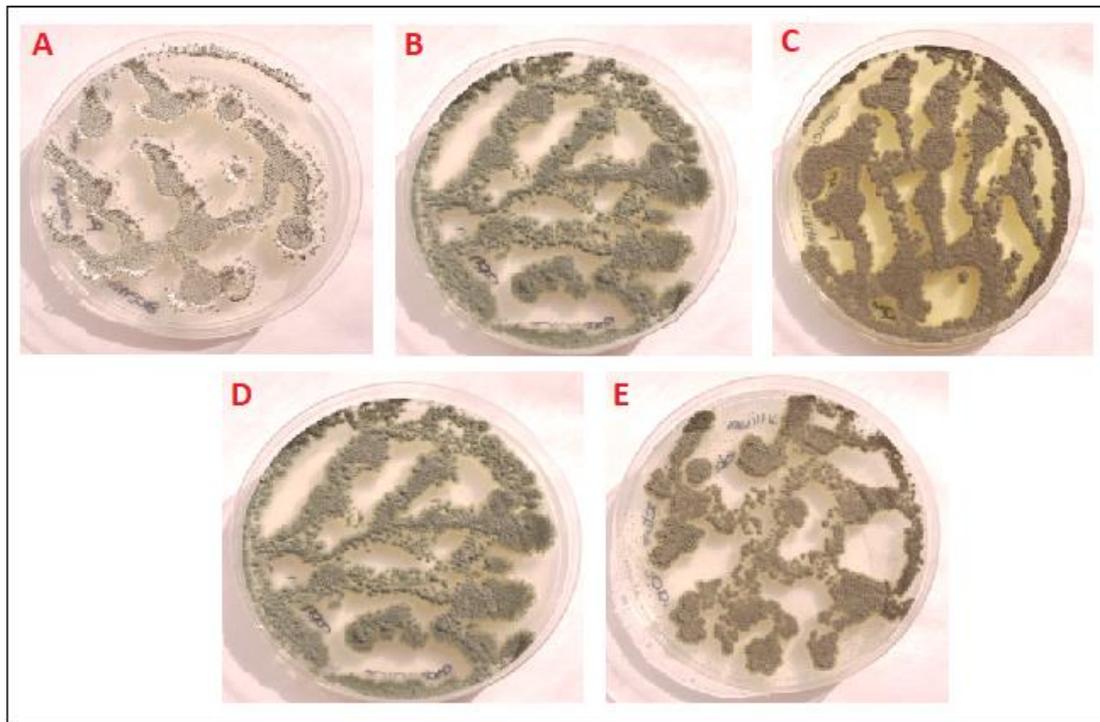


Figura 14. Re-aislado de *P. ulaiense* en medio con PDA a partir de una podredumbre observada en pomelo.

