

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

Departamento de Producción Vegetal



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

PROYECTO FIN DE CARRERA



**APLICACIÓN DE ESENCIAS DE CANELA Y CLAVO
COMO ALTERNATIVA A LOS FUNGICIDAS DE
SÍNTESIS EN EL CONTROL DE LAS PODREDUMBRES
DE LIMÓN**

Titulación: Ingeniería Agrónoma
Especialidad: Industrias Agrarias
Alumna: Raquel González Martínez
Director: Juan Antonio Martínez López

Cartagena, septiembre 2013

RESUMEN

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

Investigando sobre esta línea, el presente trabajo expone el efecto de los extractos naturales de aceites esenciales de clavo y canela sobre el crecimiento de los hongos *P. digitatum* y *P. italicum* y sobre las podredumbres provocadas por estos hongos en frutos de limón. Los ensayos se realizaron *in vitro*, midiendo el crecimiento de los distintos aislados sobre diferentes dosis de los extractos de aceites, e *in vivo*, sobre frutos de limón inoculados con los patógenos y tratados con la dosis más baja que inhibió el crecimiento de los aislados de los hongos *in vitro*, con la dosis comercial del fungicida imazalil y con una mezcla de imazalil y aceites esenciales. Los dos extractos de aceites esenciales controlaron totalmente el crecimiento de los hongos a la dosis de 500 $\mu\text{L/L}$, mientras que 200 $\mu\text{L/L}$ redujo el crecimiento e inhibió la esporulación de los dos hongos. Los tratamientos con clavo y canela tuvieron efectos similares al imazalil en el control de las podredumbres de los frutos de limón, mientras que el tratamiento a base del uso combinado de una reducción del 75% de la dosis comercial de imazalil, junto con unas dosis muy bajas de aceites de clavo y canela (200 $\mu\text{L/L}$) arrojó el mejor resultado, con una reducción de las podredumbres en general superior al 10% respecto

al tratamiento comercial con imazalil y, lo que fue importante, la esporulación del hongo se vio altamente reducida, por lo que se evitaría, de esta manera, la contaminación de cámara ocasionada por frutos podridos dispersos.

Agradecimientos

Quiero agradecer de corazón a todas aquellas personas que han contribuido de una forma u otra a la realización de este proyecto fin de carrera:

Agradecer a mi director de proyecto, Juan Antonio Martínez, por su enorme ayuda, comprensión y apoyo durante todo este tiempo.

También quiero expresar mi gratitud a la empresa G's España (Murcia) por el suministro del material vegetal y de otros materiales adicionales necesarios para la ejecución de las experiencias. Y a la Prof.^a Dina Cifuentes Romo, le agradezco la preparación y puesta a punto del material genético de los aislados para su identificación posterior.

A mi compañera de laboratorio y amiga Marina por los ratos compartidos y la ayuda ofrecida.

A mis compañeras de clase, que han pasado a ser amigas en el transcurso de estos años, Ana, María, M^a Ángeles, entre otros/as, que en algún momento u otro siempre me han aportado algo en estos años de carrera.

A Oscar, por haberme ayudado con paciencia en los momentos más difíciles, por apoyarme en mis decisiones y darme siempre ánimos para seguir adelante, por estar siempre a mi lado, gracias.

A toda mi familia, en especial mis padres y hermana, por confiar siempre en mí, ayudarme en todo lo posible y darme ánimos todos estos años.

A todos vosotros, ¡¡¡Gracias!!!

Índice

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. OBJETIVOS Y ANTECEDENTES.....	1
CAPÍTULO 2. ASPECTOS COMERCIALES Y AGRONÓMICOS DEL LIMÓN	
2.1. Clasificación botánica	7
2.2. Variedades comerciales	8
2.2.1. Verna	8
2.2.2. Fino	9
2.2.3. Eureka.....	10
2.2.4. Lisbon.....	11
2.3. El sector en España	12
2.3.1. Superficie de cultivo y producción.....	12
2.3.2. Exportación.....	15
2.4. Importancia económica del sector cítrico para la Región de Murcia.....	16
CAPÍTULO 3. ALMACENAMIENTO DEL LIMÓN Y SUS PROBLEMAS	
3.1. Condiciones óptimas de conservación	19
3.2. Deterioro de los frutos durante la conservación y comercialización.....	23
3.2.1. Pérdida natural de calidad.....	23
3.2.2. Alteraciones fisiológicas.....	24
3.2.3. Podredumbres.....	30
CAPÍTULO 4. LAS PODREDUMBRES VERDE Y AZUL DE LOS FRUTOS CÍTRICOS	
4.1. Descripción y agentes causales.....	33
4.2. Variabilidad genética y fenotípica de los diferentes aislados de <i>Penicillium digitatum</i> y de <i>P. italicum</i>	36
4.3. Importancia comercial de las podredumbres	41

4.4. Control de las podredumbres.....	41
4.4.1. Métodos de prevención.....	42
4.4.1.1. Cultivo.....	43
4.4.1.2. Manipulación.....	44
4.4.1.3. Postcosecha.....	45
4.4.2. Aplicación de procedimientos físicos, químicos y microbianos para reducir las podredumbres.....	47
4.4.2.1. Métodos físicos.....	47
4.4.2.2. Fungicidas de síntesis.....	51
4.4.2.3. Substancias naturales de acción fungicida.....	54
4.4.2.4. Control biológico.....	56
4.4.2.5. Potenciación de las defensas naturales de los frutos.....	57

CAPÍTULO 5. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD FUNGISTÁTICA DEL GEL DE *Aloe vera* Y DE LOS EXTRACTOS DE ACEITES ESENCIALES DE CILANTRO, COMINO, CLAVO Y CANELA SOBRE EL DESARROLLO *in vitro* DE DISTINTOS AISLADOS DE *P. digitatum* Y *P. italicum*.

5.1. Introducción.....	59
5.2. Materiales y métodos	63
5.2.1. Material experimental y tratamientos	63
5.2.2. Unidad de observación y número de repeticiones	66
5.2.3. Definición, tipo y clasificación de las variables	67
5.2.4. Establecimiento de las hipótesis	69
5.2.5. Análisis estadístico	70
5.2.6. Protocolo de las mediciones	71
5.3. Resultados y discusión	73

5.4. Conclusiones	81
 CAPÍTULO 6. EFECTO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CLAVO Y CANELA SOBRE EL DESARROLLO <i>in vitro</i> DE DISTINTOS AISLADOS DE <i>P. digitatum</i> Y <i>P. italicum</i>	
6.1. Introducción.....	83
6.2. Materiales y métodos	85
6.2.1. Material experimental y tratamientos.....	85
6.2.2. Unidad de observación y número de repeticiones	87
6.2.3. Definición, tipo y clasificación de las variables	88
6.2.4. Establecimiento de las hipótesis	91
6.2.5. Análisis estadístico	92
6.2.6. Protocolo de las mediciones	93
6.3. Resultados y discusión	96
6.4. Conclusiones	121
 CAPÍTULO 7. EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LA APLICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE CLAVO Y CANELA EN EL CONTROL DE LAS PODREDUMBRES VERDE Y AZUL DE LIMÓN	
7.1. Introducción.....	123
7.2. Materiales y métodos	125
7.2.1. Material experimental y tratamientos	125
7.2.2. Unidad de observación y número de repeticiones	126
7.2.3. Definición, tipo y clasificación de las variables	127
7.2.4. Establecimiento de las hipótesis	128
7.2.5. Análisis estadístico	128
7.2.6. Protocolo de las mediciones	128
7.3. Resultados y discusión	130
7.4. Conclusiones	136
 8. CONCLUSIONES	 138
9. BIBLIOGRAFÍA.....	139

Capítulo 1.

Objetivos y antecedentes

Las pérdidas económicas ocasionadas por las enfermedades de postcosecha constituyen uno de los principales problemas de nuestro sector cítrico. Las enfermedades fúngicas son la fuente más importante de daños en el fruto y de pérdidas después de la recolección (Davies y Albrigo, 1994).

Las pérdidas por podredumbres totales de los cítricos son muy variables, dependiendo ampliamente de la zona productora, condiciones de campo y de almacenamiento (Martínez, 2007). Diversos estudios indican que estas pérdidas representan entre un 5 y 8% del total de la fruta manipulada durante toda la campaña de comercialización (Viñas *et al.*, 2005), alcanzando valores incluso superiores al 12% en años de climatología anormal (Perucho y Tuset, 2001). Las podredumbres ocasionadas por *Penicillium* son las principales causas de pérdidas de los frutos cítricos durante su comercialización en condiciones mediterráneas (Tuset, 1987; Viñas *et al.*, 2005), éstas alcanzan del 60 al 80% del total de los agrios (Tuset, 1987); siendo la podredumbre verde, sin ningún género de dudas, la principal de nuestros agrios a lo largo de toda la campaña de comercialización. Sin embargo, en los limones, la podredumbre verde presenta una incidencia mucho más baja que en naranjas o mandarinas (Tuset, 1987). La podredumbre verde suele tener una elevada incidencia a principio y mitad de la campaña de comercialización, mientras que la azul suele ser importante al final de la misma. Las lluvias tempranas seguidas o no de tiempo seco y caluroso son factores climáticos muy a tener en cuenta porque favorecen la podredumbre azul, mientras que la podredumbre verde se ve acrecentada por lluvias más tardías seguidas de ambiente húmedo y fresco.

Diversas especies de hongos están presentes en los frutos cítricos y causan podridos parasitarios, que en muchas ocasiones pueden llegar a ser muy severos. La gran mayoría de los podridos parasitarios que se producen desde que los frutos cítricos son recolectados hasta que llegan al consumidor son debidos a los patógenos *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, causantes de las podredumbres verde y azul respectivamente (Eckert y Brown, 1986, Tuset, 1987). En el caso del moho azul, la propagación del deterioro se produce por el contacto de unas piezas con otras, causando serios problemas en almacenamiento a largo plazo (Barmore y Brown, 1982). El moho verde requiere heridas abiertas para que se produzcan daños (Davies y Albrigo, 1994), por tanto, es incapaz de infectar a otros frutos adyacentes a menos que éstos estén previamente dañados (Barmore y Brown, 1982).

La solución más eficaz empleada hasta ahora contra esta acción parasitaria consiste en el empleo de fungicidas basados en compuestos de síntesis química, compuestos que han permitido controlar el desarrollo de podredumbres en cítricos y, debido a ello, extender su vida comercial, haciendo posible su venta en mercados tan alejados como Estados Unidos o Japón. Sin embargo, la aplicación masiva y continuada de productos de síntesis ha provocado la aparición de dos problemas fundamentales a los que nos enfrentamos desde hace relativamente pocos años: la aparición de resistencias y los problemas relacionados con los residuos en los seres vivos y en la contaminación del medio ambiente (Martínez, 2007).

Por un lado, la aparición de cepas resistentes entre los microorganismos patógenos obliga al empleo de dosis superiores o de sustancias de mayor poder letal. Además, la eficacia de estos tratamientos depende del modo de aplicación, ya que los productos fungicidas, al aplicarse conjuntamente con ceras, necesitan ser suministrados a dosis superiores para conseguir una efectividad similar a la observada cuando se aplican en ducha, siendo su aplicación mediante baño la que ofrece los mejores resultados.

Los hongos más afectados por estas resistencias que se generan con el uso continuado de este tipo de compuestos fungicidas son los del género *Penicillium* y los fungicidas implicados son los derivados del benzimidazol. Estos fungicidas, que son la base de la defensa antifúngica durante la comercialización, especialmente el tiabendazol y el benomilo, se extendieron en los almacenes de confección en la década de los 70. Muy pronto, al año y medio del inicio de su uso, Harding, en 1972, encontró resistencias al tiabendazol en California. A partir de entonces, y de forma continuada, las resistencias de estos hongos a los benzimidazoles ha sido indicada en EE.UU. (Smoot y Brown, 1974), Israel (Gutter, 1973), España (Tuset *et al.*, 1981), etc. También la resistencia cruzada entre los fungicidas del grupo, especialmente para el tiabendazol y el benomilo, ha sido confirmada y en algunos casos aún sin el empleo de uno de ellos (Smoot y Brown, 1974) y, lo que es más peligroso, la resistencia múltiple entre fungicidas de diferentes grupos.

En los años 80, un nuevo fungicida del grupo de los imidazoles, el imazalil, comienza a emplearse con éxito en los almacenes pues controlaba los aislados de los *Penicillium* resistentes a los benzimidazoles. No obstante, al comienzo de los años 90 se

detectaron resistencias en estos hongos al nuevo fungicida, lo que condicionó al imazalil a ser aplicado en la post-recolección de los cítricos con precauciones.

La proliferación de estas cepas resistentes está siendo un gran problema en zonas productoras de cítricos como Israel, California, Florida, Sudáfrica, etc. y cada vez más en España, que en los últimos años ha visto como el porcentaje de cepas de *P. digitatum* resistentes al imazalil se situaba en torno al 30% (Bus *et al.*, 1991).

El otro problema al que nos enfrentamos es la contaminación del medio ambiente. Los fungicidas de síntesis permanecen largo tiempo sin ser degradados, en consecuencia, el medio ambiente sufre un mayor grado de contaminación a cargo de estos compuestos, o de sus derivados. Por otra parte, existe un creciente rechazo a consumir productos con compuestos químicos de síntesis añadidos, ya que éstos son potencialmente tóxicos para el ser humano (Klein y Lurie, 1991), y pueden causar carcinogénesis, teratogénesis, alta toxicidad y otros efectos en humanos y contaminaciones en el medio ambiente (Meepagala *et al.*, 2002).

Por tanto, el crecimiento de la conciencia del impacto de carácter perjudicial que las sustancias químicas sintéticas producen sobre el medio ambiente y la salud humana, está impulsando a la búsqueda de nuevas alternativas para la producción y almacenamiento de productos hortofrutícolas como el manejo integrado de plagas y enfermedades, la agricultura ecológica, la aplicación de métodos físicos no contaminantes para preservar la calidad de los productos hortofrutícolas recolectados, la utilización de sustancias alternativas a los fungicidas de síntesis de nula o muy baja toxicidad o el fortalecimiento de los sistemas físicos o químicos naturales de defensa contra las enfermedades, todos ellos con menos efectos negativos que la utilización de fungicidas tradicionales.

Los movimientos legislativos de los gobiernos se dirigen hacia una compleja restricción del uso de fungicidas e insecticidas convencionales de los cuales los agricultores han dependido durante décadas. En enero de 2009, el Parlamento Europeo acordó el texto de una nueva regulación para todas aquellas sustancias relacionadas con la protección de los cultivos, que reemplazaban a las directivas 79/117/UE y 91/414/UE. La nueva regulación 1107/2009/UE y el listado de sustancias y usos autorizados (EC540-2011) es más exigente en relación a riesgos para la salud y medio ambiente y pone unos requisitos bastante rigurosos para la introducción de nuevos

sanitarios en el mercado. Es por ello, por lo que es necesario volcarse en la investigación con métodos alternativos o complementarios que permitan reducir o incluso eliminar la mayor parte de los productos de síntesis. La aplicación de fungicidas de síntesis al control de las podredumbres en poscosecha no escapa a las nuevas y exigentes regulaciones. En este sentido, se ha investigado nuevos sistemas de control de las podredumbres en poscosecha basados en procedimientos físicos, medidas de prevención en campo y almacén, métodos biológicos y métodos químicos basados en sustancias naturales o inocuas con el fin de reducir la presencia de residuos en los frutos, la liberación de residuos al medio ambiente, la proliferación de aislados patógenos resistentes y ampliar el abanico de comercialización de los productos en los sistemas de Producción Integrada, Residuo Cero o Producción Ecológica (Palou, 2007).

Los tratamientos físicos, consistentes en un almacenamiento de los frutos a altas temperaturas y alta humedad ambiental durante períodos de tiempo variable, no se están utilizando en cítricos por el elevado coste que supone calentar grandes cantidades de fruta varios días. En Israel se ha patentado un sistema llamado “hot water brushing” (HWB) consistente en un cepillado de los frutos en la línea de confección unos 20 s simultáneo a la aplicación en ducha de agua caliente a 62 °C (Palou, 2007).

La irradiación a dosis bajas ($2-8 \text{ kJ m}^{-2}$) de luz ultravioleta lejana o de baja longitud de onda (UV-C, entre 100 y 280 nm) sobre los cítricos ya recolectados puede inducir resistencias en la piel del fruto contra enfermedades de poscosecha. Distintas compañías están desarrollando prototipos para la integración de forma práctica y económica de sistemas de aplicación de luz UV-C en las líneas de confección de cítricos (Palou, 2007).

Como sistemas físicos complementarios a otros tratamientos antifúngicos de poscosecha pueden citarse la propia conservación frigorífica (a 3-5 °C para naranjas y mandarinas) y la conservación frigorífica en atmósferas controladas convencionales (5-10% O₂ + 0,5% CO₂), atmósferas con monóxido de carbono, atmosferas de baja presión o hipobáricas y atmósferas ozonizadas. El almacenamiento en estas condiciones no ejerce por sí mismo una actividad fungicida pero si una acción fungistática de inhibición o retraso del crecimiento de los patógenos. No obstante, la utilización de estas atmósferas no se ha generalizado porque las ventajas que proporcionan no compensan los elevados costos de instalación y mantenimiento (Palou, 2007).

En cuanto a los productos químicos alternativos a los fungicidas de síntesis tradicionales deben ser sustancias, naturales o de síntesis, con efectos residuales sobre el medio ambiente y toxicológicos sobre las personas y animales conocidos y muy bajos. Por este motivo la mayoría de los candidatos que se ensayan son sustancias presentes de forma natural en plantas, animales o microorganismos. Este es el caso de distintos extractos de plantas superiores, como los glucosinolatos, producidos por especies de la familia de las crucíferas, o los extractos de *Aloe vera* o de especies de los géneros *Allium* y *Capsicum*. Los aceites esenciales de un número importante de especies vegetales (por ejemplo de los géneros *Citrus*, *Thymus*, *Origanum*, *Salvia*, *Mentha*, *Rosmarinus*, *Pinus* o *Eucalyptus*) han sido evaluados por su capacidad fungitóxica y algunos de los compuestos responsables de esta capacidad han sido identificados. Entre ellos destacan el carvacrol, el p-anisaldehído, la L-carvona, el eugenol o la D-limonina (Palou, 2007).

Los aditivos alimentarios y las sustancias catalogadas como “Generally Recognized as Safe” (GRAS), son compuestos permitidos sin restricciones por las distintas legislaciones para muchas y variadas aplicaciones en el campo agroalimentario. Entre más de 40 aditivos que se ensayaron en el Centre UdL-IRTA de Lleida como soluciones acuosas para el control de *P. digitatum* en cítricos, los mejores resultados se obtuvieron con el sorbato potásico y el benzoato sódico (Palou, 2007).

Aunque a nivel experimental se han encontrado y patentado en laboratorios de todo el mundo numerosas levaduras, bacterias y también hongos filamentosos con capacidad antagonica contra las podredumbres verde y azul de los cítricos, únicamente son tres los microorganismos que se han comercializado hasta el momento: las levaduras *Candida oleophila* y *Cryptococcus albidus* y la bacteria *Pseudomonas syringae* (Palou, 2007).

Además, una estrategia alternativa al uso de los fungicidas tradicionales en la batalla contra los patógenos podría ser la alteración de los mecanismos de defensa naturales de las plantas. A este respecto, existen algunos estudios que tratan de averiguar el papel de los compuestos fenólicos presentes en los cítricos como fitoalexinas.

Dentro de estas alternativas, los compuestos de origen natural provenientes de las plantas (aceites esenciales y/o extractos de plantas) constituyen una expectativa de

futuro por poseer más ventajas que los compuestos químicos sintéticos en cuanto a complejidad y diversidad (Martínez y Hernández, 2007). Además poseen propiedades interesantes como son la baja o nula toxicidad, biodegradabilidad en mayor o menor grado, libres de residuos y, lo más importante, poseen propiedades fungo-tóxicas, por lo que estos productos naturales tienen el potencial de ser seguros fungicidas que replacen a los sintéticos (Stroh *et al.*, 1998). De esta forma, el esfuerzo está siendo actualmente dirigido al descubrimiento de moléculas más activas y medioambientalmente más seguras.

Las sustancias naturales a emplear deben de ser biodegradables, productos no tóxicos y de baja persistencia, que desaparecen después de cumplir su función sin llegar a la cadena alimenticia del hombre. Los monoterpenos presentes en aceites esenciales son compuestos que resultan menos perjudiciales que los fungicidas químicos desde el punto de vista ambiental.

Esto crea una oportunidad significativa de mercado para productos alternativos. Los fungicidas naturales basados en los aceites esenciales de plantas y extractos de plantas (bioplaguicidas) podrían representar una alternativa viable para la protección de los cultivos (Okeke, 1994). Quizás el aspecto más atractivo del uso de los aceites esenciales y sus constituyentes para protección de cultivos reside en su baja toxicidad para el ser humano.

En el presente estudio, se trata de seleccionar y estudiar el efecto de ciertas sustancias naturales alternativas a base fundamentalmente de aceites esenciales que ya se conocen que poseen acción fungicida y que no son dañinos para la salud ni para el medio ambiente y confrontar los resultados obtenidos con la eficacia de fungicidas comerciales comúnmente utilizados en postcosecha de cítricos.

Por tanto, en este trabajo se pretende valorar la capacidad de control de diversos extractos naturales como el gel de *Aloe vera* y los aceites esenciales de plantas de comino, clavo, canela y cilantro sobre los principales hongos causantes de podredumbres en la comercialización de los cítricos (*P. digitatum* y *P. italicum*) y su efectividad en una aplicación postcosecha a frutos de limón para el control de las podredumbres verde y azul respectivamente.

Capítulo 2.

Aspectos comerciales y agronómicos del
limón

2.1. Clasificación botánica

Dentro de la clasificación botánica, los cítricos pertenecen al orden Geraniales y a la familia *Rutaceae*. Las especies incluidas en las *Rutaceae* tiene generalmente cuatro importantes características: (i) presencia de glándulas oleíferas; (ii) ovario elevado sobre un disco floral; (iii) presencia de tricomas pelúcidos en las hojas; y (iv) fruto con placentación axilar (Davies y Albrigo, 1994).

El género *Citrus*, al que pertenece el limón, consta de 16 especies de árboles de tamaño moderado a grande, de hoja perenne. La forma de los árboles es muy variable. En las axilas de las hojas de árboles jóvenes aparecen numerosas espinas, aunque son menos prominentes en árboles maduros. Las hojas son unifoliadas con bordes de formas variadas. Las flores nacen individualmente o agrupadas en las axilas de las hojas, pudiendo ser perfectas o estaminadas. El fruto consta de un único ovario de 8-15 carpelos fusionados (gajos) rodeados por una cáscara coriácea. La forma del fruto varía de esferoide (naranjas) a oblato (mandarinas) y prolato (limones y limas). La cáscara contiene numerosas glándulas oleíferas. Las semillas son de forma ovoide a redondeadas, con uno a muchos embriones. El color de los cotiledones puede ser muy variable. Se acepta generalmente que el limón es un híbrido emparentado con el cidro (Davies y Albrigo, 1994).

El árbol de limonero es de tamaño pequeño a grande, abierto y con ramas provistas de abundantes espinas, siendo los brotes de color morado. Las hojas presentan el ápice agudo y los márgenes festoneados. Se observan abundantes flores hermafroditas y/o estaminadas por aborto más o menos completo del pistilo. Los pétalos tienen color amoratado en su cara externa. El limonero no tiene un período definido de floración, pudiendo decirse que si las condiciones climatológicas le son favorables, florece durante todo el año, y, por tanto la maduración del fruto se escalona de forma análoga. El ovario tiene forma de barril, está situado sobre un disco prominente y terminado en un estilo grueso caduco. Los frutos son ovalados con un mamelón típico en la zona apical. La piel algo gruesa de color amarillo. Las semillas son poliembriónicas (www.infoagro.com).

La clasificación botánica completa se detalla en el siguiente párrafo:

- Orden: Geraniales
- Familia: *Rutaceae*
- Género: *Citrus*
- Especie: *Citrus limon* (L.) Burm

2.2. Variedades comerciales

Los criterios de selección de la variedad se basan en el contenido de zumo, su calidad, albedo y presencia de semillas. Entre las variedades destacan: Verna (70% de la producción española; recolección en febrero-julio), Fino (20% de la producción española; se recolecta de octubre a febrero), Eureka y Lisbon.

2.2.1. Verna

El cultivar más extendido en España es Verna. Los árboles de Verna producen una cosecha importante (febrero-agosto) y una segunda cosecha menor (agosto-octubre) en el hemisferio norte (Davies y Albrigo, 1994) que da lugar a frutos denominados “redrojos” (Agustí, 2000). Es una variedad española de origen desconocido, aunque pudo obtenerse en Murcia a partir de la variedad italiana “Monachello”.

El árbol es vigoroso con pocas y pequeñas espinas. Si se injerta sobre naranjo amargo presenta un sobrecrecimiento en la zona del injerto de la variedad respecto al patrón, que con el desarrollo del árbol formará el "miriñaque", que dificulta la circulación de savia y acorta la vida productiva del mismo (www.infoagro.com).

Al ser la floración más prolongada y numerosa que la variedad Fino y al tener más flores estaminadas, la hace más propensa a los ataques del lepidóptero *Prays citri*.

Los frutos son de forma oval. Su tamaño y calidad son variables en función de las condiciones de cultivo. Presentan un elevado contenido en zumo, de acidez inferior a la de otras variedades, los frutos son muy resistentes durante la manipulación y transporte (Agustí, 2000). El peso es de unos 130 gramos, con pocas semillas, corteza gruesa, lo que favorece el transporte y la manipulación. La piel del limón maduro es de color amarillo pálido, de menor intensidad que en la variedad Fino, alcanzando la

coloración de uno a dos meses después que éste, teniendo los frutos del interior del árbol un color blanco-amarillento. Al permanecer los frutos maduros en el árbol durante el verano, puede sufrir más el ataque de la mosca de la fruta (*Ceratitis capitata*). Si el verano es caluroso el fruto suele reverdecerse (www.infoagro.com).

La recolección es de febrero a junio. Una de sus principales ventajas es que fructifica en verano, cuando los limones escasean en los mercados europeos. Aunque tiene dos floraciones, la segunda cosecha es de menor calidad y escaso aprovechamiento comercial. Tiene tendencia natural a la reflorescencia, especialmente si durante el cultivo se producen desequilibrios hídricos o bien el árbol tiene pocos frutos de la cosecha principal (www.infoagro.com).

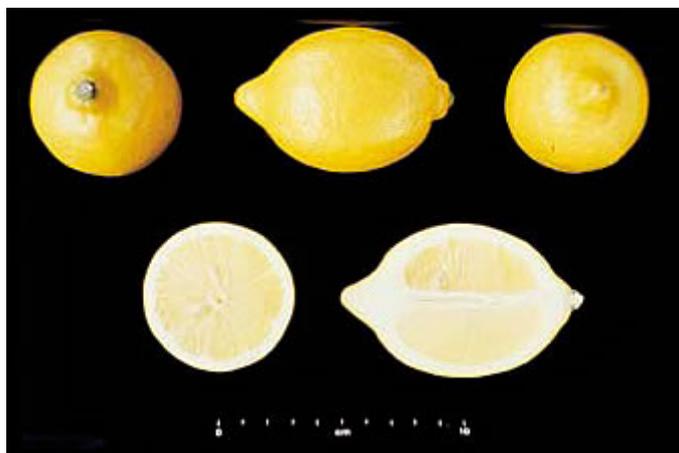


Figura 2.1. Verna (Fuente: www.infoagro.com)

2.2.2. Fino

También se le conoce con los nombres de Mesero, Blanco y Primofiori. Es una variedad española, probablemente procede de la germinación de una semilla de limón común de la Vega del Río Segura (Agustí, 2000).

El árbol es muy vigoroso y de tamaño muy grande con tendencia a la emisión de brotes con espinas.

Los frutos son de tamaño mediano, de unos 110 gramos. La forma es variable, pueden ser esféricos u ovalados. Carecen de cuello en la base, mamelón corto y

puntiagudo. Tienen más semillas, piel más fina y mayor contenido en zumo que la variedad Verna.

La recolección es en primavera y segunda temporada (octubre-febrero). Es una variedad muy cultivada en España, Italia, Argentina y Uruguay. Además, es más precoz que la anterior por lo que debe cultivarse en zonas cálidas, sin riesgo de heladas.

Tiene una gran calidad para consumo en fresco y para la industria. Su característica más importante es la precocidad ya que su permanencia en el árbol, aunque su resistencia al manipulado es menor que en la variedad Verna (www.infoagro.com).

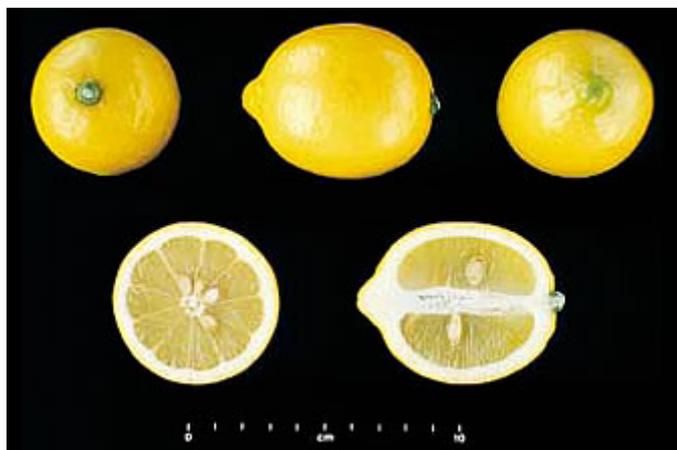


Figura 2.2. Fino (Fuente: www.infoagro.com)

2.2.3. Eureka

Es una variedad obtenida en California en 1858. Probablemente procede de la germinación de una semilla de limón Lunarío.

El árbol es de tamaño y vigor medio, con pocas y pequeñas espinas y sus frutos los frutos son de buen tamaño de unos 120 gramos de peso. Tienen forma elíptica u oblonga. Generalmente presentan un pequeño cuello en la base y un mamelón apical delgado. Estos frutos tienen pocas o ninguna semilla, con una corteza de espesor medio y con tendencia a presentar estrías. El zumo es muy ácido y la pulpa de color verde-amarillento.

Esta variedad tiene una rápida entrada en producción. Es muy cultivada en California, Australia, Sudáfrica, Argentina e Israel. Además, puede producir dos cosechas, la primera y más importante, se recolecta en el mismo periodo que la variedad Fino o un poco antes. Se trata de una variedad muy productiva, con tendencia a fructificar en los extremos de las ramas. Es sensible al frío y al ácaro de las maravillas (www.infoagro.com).

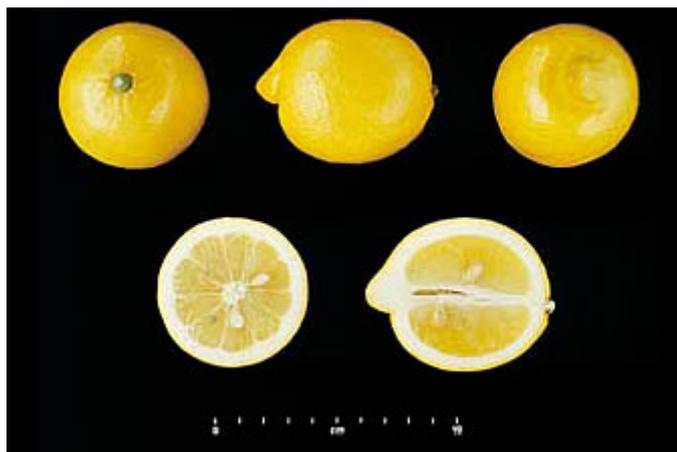


Figura 2.3. Eureka (Fuente: www.infoagro.com)

2.2.4. Lisbon

La variedad Lisbon es de origen australiano y es cultivada en grandes áreas del desierto de Arizona, en EE.UU. (www.fruitveg.com).

El árbol es vigoroso con marcada tendencia a la verticalidad, espinoso, con follaje verde claro y productivo. El fruto es de tamaño medio, elíptico u oblongo, la zona peduncular con un ligero cuello y la zona estilar más apuntada que el Eureka. El contenido en semillas es variable, pero mayor que el del Eureka. La recolección se realiza durante el invierno hasta el comienzo de la primavera.

El denso follaje permite que la fruta no quede tan expuesta. Cuando el árbol es adulto el adelanto en calibre del fruto es menor que en la variedad Fino (www.infoagro.com).

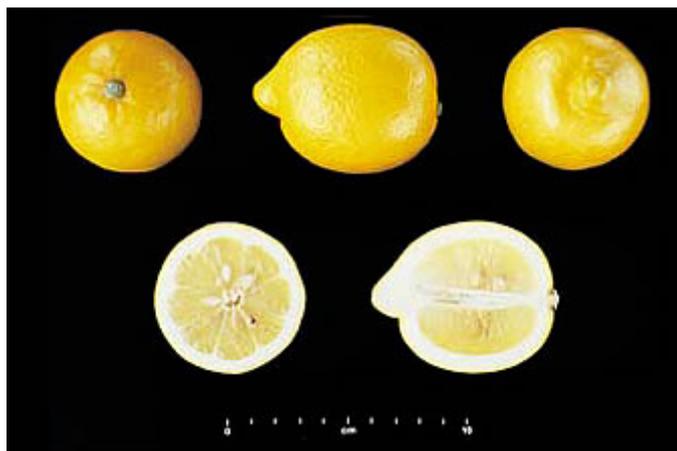


Figura 2.4. Lisbon (Fuente: www.infoagro.com)

2.3. El sector en España

2.3.1. Superficie de cultivo y producción

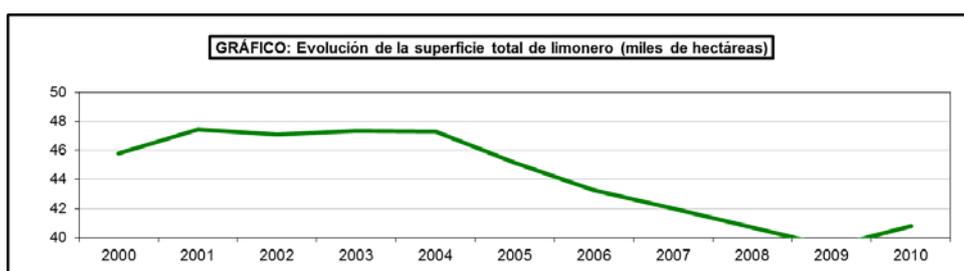


Figura 2.5. Evolución de la superficie total de limonero (miles de hectáreas) en España.

Fuente: www.magrama.gob.es

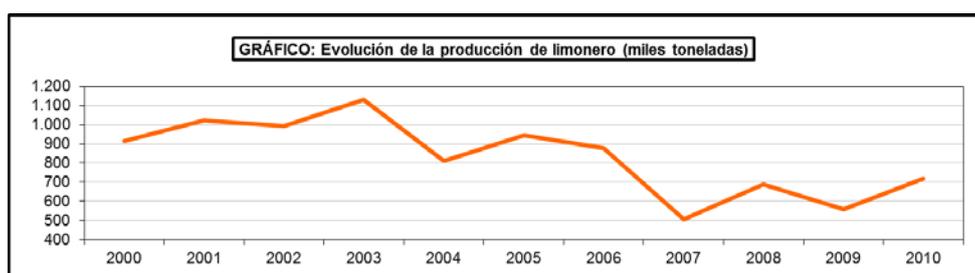


Figura 2.6. Evolución de la producción de limonero (miles de toneladas) en España.

Fuente: www.magrama.gob.es

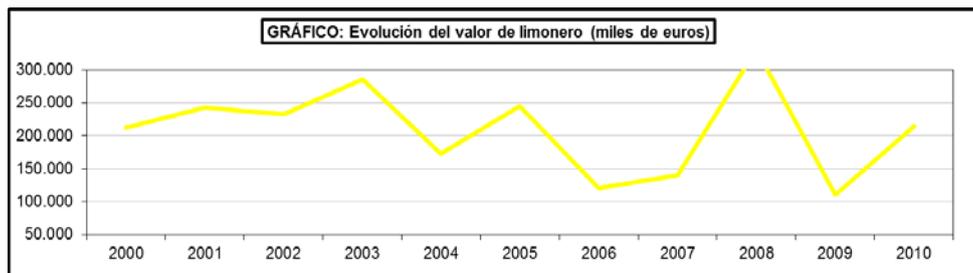


Figura 2.7. Evolución del valor de limonero (miles de euros) en España.

Fuente: www.magrama.gob.es

La evolución histórica de determinados parámetros del cultivo del limón en España, como son la superficie, la producción y el valor de limonero, se ilustra en la Tabla 2.1. y en la Figuras 2.5., 2.6. y 2.7., respectivamente. Según la Tabla 2.1., con su correspondiente gráfico de superficie, se observa un descenso importante de la superficie destinada a la plantación de limonero en España, entre los años 2000 y 2009; presentando una etapa desde 2001 a 2004, en la que la superficie de cultivo se mantuvo prácticamente constante. Sin embargo, en 2010 se vuelve a observar un aumento en la superficie total de limonero en España.

En cuanto a la producción, hay que destacar una disminución de alrededor de 300 mil toneladas entre los años 2000 y 2009, con periodos de altibajos y dos descensos marcados en los años 2004 y 2007. De la misma forma, vuelve a haber un ascenso en la producción de limón en España en 2010.

A pesar de los altibajos sufridos en el cultivo del limón, tanto al número de hectáreas destinadas a la producción del cultivo del limón como a las toneladas producidas, las cifras que presentan el 2010 son esperanzadoras y contribuyen a revitalizar el sector agrícola cítrico.

Años	Superficie en plantación regular		Árboles diseminados (miles de árboles)	Rendimiento de la superficie en producción (qm/ha)	Producción (miles de toneladas)	Precio medio percibido por los agricultores (euros/100kg)	Valor (miles de euros)
	Total (miles de hectáreas)	En producción (miles de hectáreas)					
2000	45,8	44,0	221	208	915,0	23,16	211.942
2001	47,5	45,1	215	227	1.024,1	23,67	242.406
2002	47,1	44,9	194	221	993,7	23,39	232.434
2003	47,4	45,8	198	247	1.129,6	25,24	285.110
2004	47,3	45,7	195	177	810,3	21,29	172.505
2005	45,2	42,8	178	221	944,8	25,89	244.618
2006	43,2	41,7	185	210	877,1	13,81	121.132
2007	42,0	40,2	178	126	506,7	27,67	140.204
2008	40,7	39,0	172	176	687,9	48,09	330.828
2009	39,4	37,6	174	148	558,2	19,87	110.910
2010	40,8	38,7	173	186	717,9	29,90	214.654

Tabla 2.1. Serie histórica de superficie, árboles diseminados, rendimiento, producción, precio, valor del cultivo del limón en España. Fuente: www.magrama.gob.es

Las estimaciones de producción de cítricos, cosecha 2011/2012 (Tabla 2.2.), indicaban un aumento en limón (+14,2%) y descensos en naranja dulce (-12,6%) y pomelo (-1,5%). La producción de mandarina, globalmente, desciende (-3,7%) debido a la disminución en mandarina satsuma (-10,1%) y mandarina clementina (-5,3%) y al aumento de producción de híbridos de mandarina (+2,8%).

Cultivos (ooo. t)	Mes	Def. 2009	Prov. 2010	Avance 2011	2011 (2010=100)
Limón	2	558,2	630,1	719,7	114,2
Pomelo	2	40,3	48,5	47,8	98,5
Naranja	2	2.669,4	3.026,5	2.645,0	87,4
Satsuma	12	161,7	166,9	150,1	89,9
Clementina	1	1.330,6	1.492,6	1.4313,6	94,7
Híbridos	1	507,9	537,1	552,2	102,8
Mandarina total		2.000,1	2.196,6	2.115,9	96,3

Tabla 2.2. Estimaciones de producción de cítricos, cosecha 2011/2012.

Fuente: www.magrama.gob.es

2.3.2. Exportación

La exportación de limones originarios de España durante la campaña 2008/2009 tuvo como principal destino Alemania, con 88 mil toneladas aproximadamente (Tabla 3). Seguido de éste, se encuentra muy cerca Francia, con 72 mil. En tercera, cuarta y quinta posición se encuentra Polonia, Italia y Reino Unido, con 51, 48 y 42.5 mil toneladas respectivamente.

Si nos fijamos en los datos totales de limones destinados a exportación y producidos dentro de nuestro país (Tabla 2.3.), vemos que el 90,3% se destinaron a países de la Unión Europea, mientras que únicamente el 9,7% pasaron estas fronteras y se destinó dicha producción a terceros países.

Mundo y países	Importaciones	Exportaciones
MUNDO	32.117	423.332
PAÍSES DE EUROPA		
Unión Europea	2.531	382.371
Alemania	198	87.984
Austria	-	7.435
Bélgica	-	8.264
Bulgaria	-	879
Chipre	-	-
Dinamarca	72	3.448
Eslovaquia	-	2.662
Eslovenia	-	1.947
Estonia	-	721
Finlandia	-	1.267
Francia	210	71.787
Grecia	4	1.606
Holanda	1.113	18.687
Hungría	-	4.845
Irlanda	29	1.755
Italia	41	47.706
Letonia	-	1.114
Lituania	44	2.146
Luxemburgo	-	169
Malta	-	24
Polonia	477	51.085
Portugal	298	6.686
Reino Unido	34	42.528
República Checa	1	9.143
Rumania	-	660
Suecia	10	7.823
Países con Solicitud de Adhesión		
Antigua Republica de Macedonia	-	312
Croacia	-	3.666
Turquía	181	-
OTROS PAÍSES DEL MUNDO		
Argentina	27.886	67
Australia	-	-
Brasil	8	191
Canadá	-	88
Estados Unidos	-	2.375
Islandia	-	-
Japón	-	-
Noruega	-	1.284
Nueva Zelanda	-	-
Suiza	-	6.599

Tabla 2.3. Comercio exterior de limón de España, 2009 (toneladas). *Fuente: Estadísticas de Comercio Exterior de España. Agencia Estatal de Administración Tributaria.*

2.4. Importancia económica del sector cítrico para la Región de Murcia

En la Tabla 2.4 se muestra un resumen de la producción de limones en las distintas Comunidades Autónomas de nuestro país y se puede apreciar que la Región de Murcia está a la cabeza, con muchísima ventaja sobre las demás, tanto en superficie de suelo destinado al cultivo del limón como a producción de este cítrico.

Provincias y Comunidades Autónomas	Superficie en plantación regular (hectareas)		Árboles diseminados (número)	Rendimiento		Producción (toneladas)		
	Total	En producción		De la superficie en producción (kg/ha)	De los árboles diseminados (kg/árbol)	En palntación regular	Árboles diseminados	Producción Total
A Coruña	136	136	59.184	6.000	75	816	4.439	5.255
Lugo	4	4	1.363	6.000	75	24	102	126
Ourense	1	1	4.371	6.000	75	6	328	334
Pontevedra	72	72	18.733	6.000	75	432	1.405	1.837
GALICIA	213	213	83.651	6.000	75	1.278	6.274	7.552
P. DE ASTURIAS	-	-	16.000	-	4	-	64	64
CANTABRIA	24	24	3.380	7.200	45	173	152	325
Vizcaya	1	1	510	-	-	2	15	17
PAÍS VASCO	1	1	510	-	-	2	15	17
Barcelona	1	1	3.113	49.700	100	50	311	361
Tarragona	6	6	2.381	43.110	98	259	233	492
CATALUÑA	7	7	5.494	44.051	99	309	544	853
BALEARES	185	93	9.615	8.989	5	836	48	884
Alicante	10.111	9.119	-	19.077	-	173.966	-	173.966
Castellón	41	39	-	45.538	-	1.776	-	1.776
Valencia	42	42	-	25.857	-	1.086	-	1.086
C. VALENCIANA	10.194	9.200	-	19.220	-	176.828	-	176.828
R. DE MURCIA	23.768	22.832	-	17.621	-	402.316	-	402.316
Almería	1.331	1.298	-	25.596	-	33.223	-	33.223
Cádiz	17	17	-	20.000	-	340	-	340
Córdoba	13	12	3.750	23.667	-	284	-	284
Granada	95	94	-	20.213	-	1.900	-	1.900
Huelva	12	12	25	16.500	75	200	-	200
Jaén	-	-	510	-	-	-	-	-
Málaga	4.657	4.609	-	19.406	-	89.444	-	89.444
Sevilla	63	63	-	10.500	-	662	-	662
ANDALUCÍA	6.188	6.105	4.285	20.647	-	126.053	-	126.053
Las Palmas	165	165	23.200	13.000	10	2.145	232	2.377
S.C. de Tenerife	56	53	26.740	9.499	5	504	133	637
CANARIAS	221	218	49.940	12.149	7	2.649	365	3.014
ESPAÑA	40.801	38.693	172.875	18.361	43	710.445	7.461	717.906

Tabla 2.4. Análisis provincial de superficie, árboles diseminados, rendimiento y producción de limón, 2010. Fuente: www.magrama.gob.es

Por variedades (Tabla 2.5), podemos observar también la superioridad de nuestra Región con respecto a las demás, siendo la producción de limón Fino muy superior a la de Verna. Únicamente hay que destacar que la producción en toneladas de limón Verna en la Comunidad Valenciana es superior a la Región de Murcia.

Provincias y Comunidades Autónomas	Verna			Mesero			Otros limones		
	Superficie plantación regular (hectáreas)	Árboles diseminados (número)	Producción (toneladas)	Superficie plantación regular (hectáreas)	Árboles diseminados (número)	Producción (toneladas)	Superficie plantación regular (hectáreas)	Árboles diseminados (número)	Producción (toneladas)
A Coruña	-	-	-	-	-	-	136	59.184	5.255
Lugo	-	-	-	-	-	-	4	1.363	126
Ourense	-	-	-	-	-	-	1	4.371	334
Pontevedra	-	-	-	-	-	-	72	18.733	1.837
GALICIA	-	-	-	-	-	-	213	83.651	7.552
P. DE ASTURIAS	-	-	-	-	-	-	-	16.000	64
CANTABRIA	-	-	-	24	3.380	325	-	-	-
Vizcaya	-	-	-	-	-	-	1	510	17
PAÍS VASCO	-	-	-	-	-	-	1	510	17
Barcelona	-	-	-	-	-	-	1	3.113	361
Tarragona	1	688	98	-	-	-	5	1.693	394
CATALUÑA	1	688	98	-	-	-	6	4.806	755
BALEARES	111	3.743	595	18	2.407	81	56	3.465	208
Alicante	4.149	-	64.352	5.962	-	109.614	-	-	-
Castellón	6	-	275	35	-	1.501	-	-	-
Valencia	19	-	594	23	-	492	-	-	-
C. VALENCIANA	4.174	-	65.221	6.020	-	111.607	-	-	-
R. DE MURCIA	5.021	-	60.563	18.747	-	341.753	-	-	-
Almería	700	-	13.006	586	-	18.989	45	-	1.228
Cádiz	-	-	-	-	-	-	17	-	340
Córdoba	-	-	-	-	-	-	13	3.750	284
Granada	-	-	-	-	-	-	95	-	1.900
Huelva	5	25	83	2	-	34	5	-	83
Jaén	-	-	-	-	-	-	-	510	-
Málaga	2.841	-	50.036	1.677	-	38.157	139	-	1.251
Sevilla	-	-	-	-	-	-	63	-	662
ANDALUCÍA	3.546	25	63.125	2.265	-	57.180	377	4.260	5.748
Las Palmas	7	5.324	144	13	11.320	282	145	6.556	1.951
S.C. de Tenerife	26	12.085	310	5	5.365	76	25	9.290	251
CANARIAS	33	17.409	454	18	16.685	358	170	15.846	2.202
ESPAÑA	12.886	21.865	190.056	27.092	22.472	511.304	823	128.538	16.546

Tabla 2.5. Análisis provincial de la superficie, árboles diseminados y producción según variedades, 2010. Fuente: www.magrama.gob.es

Capítulo 3.

Almacenamiento del limón y sus problemas

3.1. Condiciones óptimas de conservación

Es un hecho conocido que la solución idónea para preservar la calidad global (organoléptica, comercial, microbiológica y nutritiva) de los cítricos españoles y satisfacer las crecientes exigencias de los mercados internacionales consiste en mejorar los tratamientos post-recolección (Artés, 1994, 1995, 1999a,b).

La actividad vital de los cítricos recolectados se manifiesta a través de la respiración y de la transpiración. Por la transpiración se produce una pérdida de agua, que se repone por la savia cuando el fruto está unido a la planta, pero que en postcosecha se traduce en pérdida de peso, marchitamiento, arrugas y senescencia del fruto, con notable pérdida de calidad visual (Artés, 2000).

El metabolismo normal de los cítricos conduce también a la biosíntesis de pequeñas cantidades de etileno (C_2H_4), considerado como la hormona de la maduración y que desempeña un papel primordial en el progreso de la maduración y la senescencia (Artés, 2000). En los cítricos provoca un aumento de la actividad respiratoria y su desverdización. (Artés, 2000b).

Los principales factores ambientales que controlan estos procesos metabólicos son la temperatura (al aumentar, estimula la tasa respiratoria), la transpiración y la emisión de C_2H_4 , la humedad relativa del ambiente (cuanto mayor sea la diferencia entre la tensión de vapor del agua en los tejidos del fruto o de la atmósfera en los espacios intercelulares y en el exterior, mayor será la transpiración), la composición de la atmósfera que rodea al fruto y las características del fruto (las epidermis provistas de ceras dificultan el intercambio de gases, la transpiración y las pérdidas de peso). Gestionándolos adecuadamente, según la particular susceptibilidad de cada especie y variedad a dichos factores, así como a otros que también intervienen (fundamentalmente los estados de madurez y sanitario), es posible limitar las alteraciones más comunes en su supervivencia: las fisiológicas, producidas por desequilibrios del metabolismo (marchitamiento, ablandamiento, pardeamientos, envejecimiento,...), las microbiológicas, producidas básicamente por mohos y, en menor medida, por bacterias, y los daños mecánicos. (Artés, 2000b).

La refrigeración o mantenimiento de los cítricos a temperaturas superiores al punto de congelación, es el método idóneo para conservarlos vivos, reducir las pérdidas cualitativas y cuantitativas, retrasar la maduración y senescencia, prolongar el período de oferta en condiciones organolépticas idóneas para el consumo y regular el aprovisionamiento de la industria transformadora (Artés, 1987 y 1997).

El limón es sensible a los daños por frío. De hecho, debe ser almacenado a una temperatura superior a 13°C para evitar daños comunes como son el picado o “pitting” y membranosis o pardeamiento interno de las membranas carpelares. Por ello, la temperatura óptima de conservación siempre es superior a 13°C con el fin de evitar estos daños.

Además de la refrigeración a temperatura constante o convencional, existen varias técnicas profilácticas innovadoras en la postcosecha de los cítricos basadas en la modificación previa, o durante la conservación frigorífica, del régimen térmico o gaseoso (temperatura, humedad relativa, concentraciones de O₂, CO₂, C₂H₄ y otros gases) al que se someten algunos órganos vegetales. En su aplicación a los productos hortofrutícolas se distinguen los pretratamientos térmicos y gaseosos, las variaciones moduladas del régimen de conservación, las combinaciones de pretratamientos con régimen estable o variable de conservación y algunas combinaciones de regímenes variables durante la refrigeración (Marcellin y Ulrich, 1983; Artés, 1995a).

Un cierto retraso en la aplicación de la refrigeración convencional (lo que denominamos acondicionamiento térmico) favorece una mejor calidad comercial de los frutos cítricos, frente a los frutos testigo (Hatton y Cubbedge, 1982; Miller *et al.*, 1990). También se ha obtenido mejor calidad en los cítricos refrigerados aplicando temperaturas moderadamente elevadas antes de refrigerar (precalentamiento o curado) (Artés, 2000), aminorándose los daños por frío y los ataques fúngicos en naranjas, mandarinas, limones y pomelos (Artés, 1995a; Artés *et al.*, 1998; Ben Yehoshua *et al.*, 1987; Di Martino y Lanza, 1998). Ambos tipos de pretratamientos térmicos se han mostrado particularmente eficaces cuando han sido aplicados a frutos envueltos individualmente con películas plásticas, al reducir la deshidratación y controlar los intercambios gaseosos, incluso sin modificar la composición gaseosa de la atmósfera

que rodea a los frutos (Ben Yehoshua *et al.*, 1987; Martínez-Jávega *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1990; Del Río *et al.*, 1992).

Otra técnica para controlar los ataques fúngicos y los daños por frío consiste en someter los frutos a “calentamientos intermitentes” (Artés, 2000). Los calentamientos intermitentes consisten en someter los frutos a una breve interrupción del almacenamiento frigorífico con elevaciones intermitentes de la temperatura, de periodicidad, duración e intensidad variables, según el producto. El factor primordial para el éxito de la aplicación de calentamiento intermitente, es que la primera elevación de la temperatura se produzca durante la inducción de la alteración, antes de que se manifiesten los daños (periodo de latencia). Si se realiza anticipadamente resulta ineficaz y si se realiza tardíamente acelera la aparición de la alteración. (Artés, 1995b; Marcellin, 1992). Los calentamientos intermitentes permiten conservar los frutos a temperaturas inferiores al umbral de daños por frío, lo que permite aprovechar mejor los efectos beneficiosos de la refrigeración en el mantenimiento de la calidad. Los daños por frío no aparecen porque la refrigeración es interrumpida por períodos cortos de temperaturas no refrigeradas.

Las técnicas de las atmósferas controladas y modificadas consisten en la conservación de productos vegetales bajo refrigeración y atmósferas cuya composición está empobrecida en O₂ y enriquecida en CO₂ y en vapor de agua respecto del aire (Artés, 2000). Cuando la composición gaseosa se logra a gran escala, mediante la impermeabilización de las cámaras frigoríficas y el empleo de generadores externos con equipos que ajustan permanentemente las concentraciones de O₂ y de CO₂, la técnica se denomina atmósfera controlada. Cuando se logra a pequeña escala, integrando el empleo de envases de polímeros plásticos con una permeabilidad selectiva y adecuada a los gases permanentes del aire y el intercambio de gases originado por la actividad respiratoria de los frutos bajo refrigeración, se denomina atmósfera modificada. En este caso, la composición de la atmósfera dependerá esencialmente de un equilibrio dinámico establecido entre la actividad metabólica del producto hortofrutícola y la permeabilidad a los gases del polímero utilizado. (Artés, 2000a).

La modificación de la atmósfera frena la respiración de los órganos vegetales frescos en conservación. La reducción del O₂ inhibe la maduración y disminuye la

posibilidad de reacción entre el sustrato respiratorio y el O₂ con lo que se reduce el deterioro. Por su parte, el aumento de la concentración de CO₂ inhibe la biosíntesis de C₂H₄, lo que provoca un retraso en la maduración, y también reduce el deterioro. Además inhibe reacciones fisiológicas importantes como la degradación de clorofilas, desarrollo de antocianos, biosíntesis de carotenos, actividades enzimáticas responsables del ablandamiento (pectinesterasa y poligaracturonasa), la pérdida de acidez y las pérdidas de las vitaminas A y C. La atmósfera requerida debe generarse rápidamente con las concentraciones óptimas de O₂ y CO₂, sin extender los límites de tolerancia a bajos niveles de O₂ y elevados de CO₂, que aumentan los riesgos de desórdenes fisiológicos y otros efectos desfavorables para los órganos vegetales. (Artés, 2000a).

Tabla 3.1. Parámetros biológicos del limón. Fuente: <http://postharvest.ucdavis.edu>

Contenido en agua (%)	90-95
Intensidad respiratoria a 10°C [mg CO ₂ /(kg·h)]	5-6
Clasificación de la intensidad respiratoria	Baja
Tasa producción etileno a 20 °C [μL C ₂ H ₄ /(kg·h)]	< 0,1
Clasificación de la tasa de producción de etileno	Muy baja
Sensibilidad a daños por etileno	No
Sensibilidad a daños por frío	De moderado a severo
Susceptibilidad a daños por congelación	Ninguno
Límite mínimo de O ₂ (%)	5-10
Límite máximo de CO ₂ (%)	0-10

Las atmósferas controladas con el 5-10% O₂ y 0-10% CO₂ pueden retrasar la senescencia y la pérdida del color verde en limones. No pueden emplearse concentraciones fungistáticas de CO₂ (10-15%) porque pueden inducir malos sabores debido a la acumulación de compuestos volátiles fermentativos, especialmente si las concentraciones de O₂ están por debajo del 5% (Arpaia y Kader, 2000).

Estos métodos de conservación tratan de aumentar la calidad global de los productos, reducir los costes productivos y financieros, reducir el elevado costo medioambiental de la actual intensificación de los cultivos, incrementar los rendimientos económicos para los productores y comercializadores y mantener la

vanguardia tecnológica de España en este subsector económico (Artés 1995a,b,c, 1997 y 1999 a,b).

3.2. Deterioro de los frutos durante la conservación y comercialización

3.2.1. Pérdida natural de calidad

La mayoría de los productos frescos contienen en el momento de la cosecha, del 65 al 95 % de agua. Dentro de las plantas en crecimiento existe un flujo continuo de agua. Esta se absorbe del suelo por las raíces, sube por los tallos y se desprende por las partes aéreas, sobre todo por las hojas, como vapor de agua. Los productos frescos siguen teniendo agua después de la cosecha, pero, a diferencia de las plantas en crecimiento, ya no pueden reponer el agua a partir de la tierra, y tienen que recurrir al contenido de agua que tuvieron en el momento de la recolección. Esta pérdida de agua de los productos frescos después de la cosecha constituye un grave problema, que da lugar a mermas y a pérdidas de peso. Cuando el producto recolectado pierde de un 5 a un 10 % de su peso original, empieza a secarse, sufre marchitamiento y pronto resulta inutilizable. Para prolongar la vida útil del producto, el nivel de pérdida de agua debe ser lo más bajo posible (Reina *et al.*, 1995).

Como se ha explicado en el apartado anterior, la aplicación del frío es la técnica principal a la hora de conservar cítricos. Esta aplicación de bajas temperaturas debe basarse siempre en temperaturas por encima del punto crítico de daños por frío para poder mantener las cualidades nutritivas, organolépticas, y carencia de alteraciones fisiológicas debido al frío en los frutos.

La conservación de los cítricos en cámaras frigoríficas permite organizar su comercialización hasta el momento oportuno de salida al mercado. Pero a la hora de conservar frutos cítricos hay que tener en cuenta que una de las principales limitaciones con que nos encontramos son las posibles pérdidas de peso por deshidratación. Es conocido que el ablandamiento de los cítricos se produce como consecuencia de la deshidratación, a diferencia de lo que sucede en la mayoría de frutas y hortalizas en las que se debe a la degradación enzimática de sustancias pécticas de la pared celular. En

consecuencia, las técnicas que reducen las pérdidas de agua de la corteza, contribuyen a evitar el ablandamiento.

Para minimizar en lo posible este problema, Artés (1999b), recomienda el empleo de recubrimientos en los frutos cítricos. Por ello, el encerado de los cítricos y el empleo de envolturas individuales, complementarias a la refrigeración, se han mostrado muy eficaces para reducir el ablandamiento (Artés, 1995a; Cuquerella y Navarro, 1997). También se debe mantener una humedad relativa de la cámara frigorífica siempre superior al 85%, al ser posible del 90-95% (Arpaia y Kader, 2000), ya que valores inferiores pueden producirse pérdida de frescura, de peso y ablandamientos con deformaciones posteriores. Por último, la alta humedad relativa aumenta la cicatrización de heridas causadas por *Penicillium* sp., *Alternaria* sp. y *Botrytis cinerea* (Tuset, 1989), pero por el contrario, facilita el desarrollo de las podredumbres.

Los síntomas de marchitamiento de los frutos cítricos se reflejan fundamentalmente en la pérdida de brillo del flavedo, arrugamiento, pardeamiento externo y ablandamiento.

3.2.2. Alteraciones fisiológicas

Aunque Agustí (2000), sostuvo que, internamente, los frutos pueden ver afectada su calidad con menor contenido de jugo o alteraciones en la relación azúcar/acidez y, externamente, se pueden obtener frutos deformes. Pero también puede haber alteraciones que provoquen desórdenes o cambios fisiológicos del fruto (son las denominadas alteraciones fisiológicas).

Estas alteraciones comprenden un concepto muy amplio de desequilibrios, tanto de origen climático como provocados por el cultivo y la manipulación postcosecha. Las bajas y altas temperaturas, el viento, la humedad muy elevada, los desequilibrios provocados por déficits hídricos, alteraciones nutricionales y las condiciones de conservación, son causa de las alteraciones fisiológicas.

Su estudio y la puesta a punto de técnicas para su control se justifican por la importancia que tiene la calidad y la reducción de pérdidas durante el proceso de

comercialización. Esto resulta de gran complejidad, ya que su interacción y la influencia del cultivo dificultan su identificación y verdadero origen.

Entre las alteraciones fisiológicas de los agrios cabe destacar las siguientes (Agustí, 2000):

- Rajado del fruto o “*splitting*” (Fig. 3.1.). Es un desorden fisiológico que consiste en el agrietamiento de la corteza. Se inicia, generalmente, en la zona estilar y supera, en ocasiones, la zona ecuatorial, pudiendo alcanzar toda la altura del fruto. Sin embargo, algunas veces es posible encontrar una evolución distinta, ya que la alteración se inicia por cualquier punto en el que la resistencia de la corteza se vea disminuida. Las causas que originan este desorden no son bien conocidas. En general, alteraciones climáticas, desórdenes nutricionales, déficits hídricos estacionales y otros factores, se han señalado como posibles agentes causantes del rajado. Sea cual sea la causa original, parece que un crecimiento diferencial entre la pulpa y corteza puede explicar el fenómeno. Si durante la fase de expansión de la pulpa la corteza no reinicia su crecimiento, la presión que aquella ejerce sobre ésta provoca su rotura.

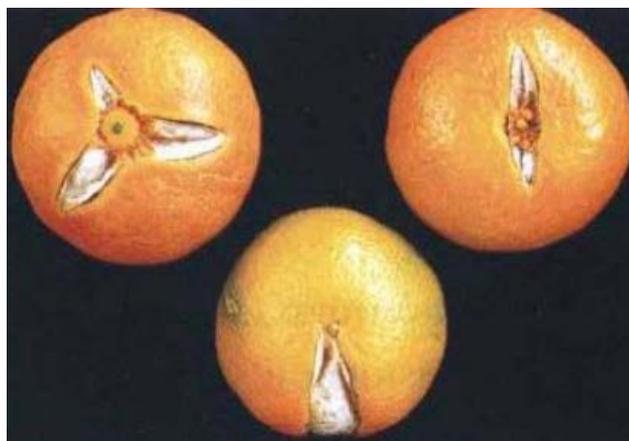


Fig. 3.1. Rajado del fruto o “*splitting*” en mandarina “Nova”. Fuente: Instituto Agroforestal Mediterráneo (Universidad Politécnica de Valencia).

- Picado de la corteza o “*peel pitting*” (Fig 3.2.). Se da en algunos frutos, que durante su permanencia en el árbol tras el cambio de color, y/o durante su almacenamiento en cámara, desarrollan en la superficie de su corteza unas manchas de color marrón más o menos amplias. El factor casual del picado no es

conocido, aunque las bajas temperaturas podrían estar involucradas en su desarrollo. La presencia de vientos fuertes y fríos, así como variaciones de la humedad relativa ambiente, se han relacionado también con su aparición. Finalmente, el estado de maduración de los frutos, su posición en el árbol y la sensibilidad de algunas variedades se han considerado factores determinantes. La pérdida de agua de la corteza se ha asociado con esta alteración fisiológica en algunas variedades de limón (Villafranca).



Fig. 3.2. Picado de la corteza o “*peel pitting*” en pomelo “Marsh”. *Fuente:* Instituto Agroforestal Mediterráneo (Universidad Politécnica de Valencia).

- Clareta o “*creasing*” (Fig. 3.3.). Es una alteración de la corteza que se caracteriza por la presencia de pequeñas grietas y roturas en sus zonas más blandas (albedo) que se corresponden con áreas de depresión del tejido epidérmico (flavedo); las zonas no agrietadas crecen con normalidad, pero a modo de bultos sobresaliendo de la corteza. Todo ello deprecia comercialmente al fruto y lo hace muy frágil al manipularlo. Actualmente se admite que la clareta se origina en las primeras fases de desarrollo del fruto como consecuencia de la rotura enzimática de las paredes de las células del albedo. Este está constituido por gran cantidad de espacios aéreos unidos por ramificaciones celulares que aseguran su continuidad, pero que son fáciles de romper. Cuando se rompen, el tejido se daña y las células se separan, apareciendo grietas que impiden la conexión entre ellas.



Fig. 3.3. Clareta o “creasing” en mandarina “Fortune”. *Fuente:* Instituto Agroforestal Mediterráneo (Universidad Politécnica de Valencia).

- Bufado del fruto. Es una alteración fisiológica caracterizada por la separación de la corteza y la pulpa. El fruto afectado es muy sensible al manipularlo y se agrieta con cierta facilidad, lo que da lugar a problemas de podrido, con las consiguientes pérdidas económicas. El origen del bufado es la aparición de grandes espacios intercelulares en las capas más profundas del albedo después de que el fruto supera la fase de división celular. El desarrollo de estos espacios da lugar, cuando el fruto madura, a roturas celulares y a un albedo agrietado y poco resistente.



Fig. 3.4. Bufado del fruto en mandarina “Satsuma”. *Fuente:* Instituto Agroforestal Mediterráneo (Universidad Politécnica de Valencia).

- Granulación, o secado del fruto (Fig. 3.5.) Esta alteración afecta a algunas variedades cuando se mantiene el fruto en el árbol tras su maduración. Esta alteración la presentan sobretodo las naranjas, que se inicia en el árbol y puede incrementarse rápidamente tras la recolección. La separación de las células en los sacos de zumo permite la penetración del aire que confiere a estos un aspecto

blanquecino volviéndolos al mismo tiempo, duros y firmes como consecuencia del espesamiento y endurecimiento de sus paredes. La consecuencia es una pérdida de rendimiento en zumo, pero esta pérdida no se debe a la desecación de las vesículas sino a la gelificación del zumo en su interior. El origen se ha relacionado con un incremento de la respiración de los frutos, y se ha sugerido que la energía producida es utilizada en el engrosamiento y modificación de las paredes celulares.



Fig. 3.5. Bufado del fruto en naranja dulce “Lane Late”. *Fuente:* Instituto Agroforestal Mediterráneo (Universidad Politécnica de Valencia).

- Oleocelosis (Fig. 3.6.). Es una alteración producida por la liberación de aceites esenciales tras la rotura de sus glándulas situadas en el flavedo. Estos aceites son tóxicos para las células epidérmicas que se colapsan, llenándose su lumen por un gran cloroplasto que contiene grandes cantidades de clorofila, responsable de las manchas verdes que aparecen en las zonas afectadas después de que el fruto cambie de color. En general, la oleocelosis es consecuencia de alteraciones de las condiciones climáticas durante el período inmediatamente anterior al cambio de color del fruto. El rocío, humedades relativas elevadas, temperaturas altas, alteraciones del estado nutricional, ataques de insectos, etc., son algunas de las causas a las que se atribuye esta alteración. Golpes, rozaduras, etc., derivados de un manejo poco cuidadoso del fruto durante su recolección y manipulado en el almacén, también se han señalado como causantes de la misma. Cambios bruscos de la temperatura de almacenamiento provoca un desarrollo rápido de la alteración durante la postrecolección.



Fig. 3.6. Oleocellosis en mandarina. *Fuente:* Instituto Agroforestal Mediterráneo (Universidad Politécnica de Valencia).

- Colapso de la corteza o “Ring breakdown” (Fig. 3.7.). Se muestra como una depresión del tejido epidérmico y subepidérmico dejando sobresalir las glándulas de aceites esenciales que, aunque no se rompen, van tomando una coloración marrón oscuro, cuya superficie se seca y deprime. Se ha señalado como causas de esta alteración, la acción mecánica del viento y la alternancia de periodos lluviosos seguidos por otros de vientos secos. Cambios bruscos de humedad durante el almacenamiento incrementan notablemente el porcentaje de frutos afectados. La temperatura en este caso no parece tener influencia.



Fig. 3.7. Colapso de la corteza o “Rind breakdown” en naranja dulce “Navelate”.
Fuente: Instituto Agroforestal Mediterráneo (Universidad Politécnica de Valencia).

- Daños por el frío (provocados por temperaturas superiores al punto de congelación). Los síntomas incluyen picado (“pitting”), membranosis y adustiosis (“red blotch”). La severidad de los daños depende de la variedad, zona de producción, época de recolección, estado de madurez en el momento de la recolección y condiciones de tiempo y temperatura en que se lleva a cabo la

manipulación y las operaciones postcosecha. Los daños por el frío moderados y severos generalmente vienen seguidos de podredumbres (Arpaia y Kader, 2000). Los factores que tienen mayor influencia en la gravedad de los daños por el frío dependen del producto, pero generalmente son la intensidad y duración del tratamiento frigorífico aplicado y el estado de desarrollo del fruto (Artés, 2000).

3.2.3. Podredumbres

Los hongos constituyen los principales patógenos de los frutos cítricos durante su conservación y comercialización. Las pérdidas ocasionadas por estos agentes bióticos son variables, si bien se encuentran en un aumento generalizado y constante (Tuset, 1999). Las principales podredumbres en limones son las siguientes (Tuset, 1987):

- Podredumbre verde (Fig. 3.8.): causada por el hongo *Penicillium digitatum* que penetra en la corteza de los frutos a través de heridas. Los síntomas empiezan en una zona húmeda en la epidermis del fruto seguido por el crecimiento de un micelio incoloro y, a continuación, se produce la esporulación de color verde. *P. digitatum* es, sin ningún tipo de dudas, el principal hongo causante de la podredumbre de los agrios en nuestro país a lo largo de toda la campaña de comercialización.



Fig. 3.8. Podredumbre verde en limón. *Fuente:* Creación propia.

- Podredumbre azul (Fig. 3.9.): causada por *Penicillium italicum* que puede penetrar en la piel sin que haya heridas y puede propagarse a los limones adyacentes (contaminación cruzada). Los síntomas son parecidos a los de la podredumbre verde, pero en este caso las esporas son de color azul en masa y

por su apariencia constituyen pequeñas masas polvorientas de color azulado. *P. italicum* es, después del “moho verde”, el micromiceto más importante de nuestros frutos cítricos. En frigoconservación, la actividad parasitaria de *P. italicum* alcanza el primer puesto.



Fig. 3.9. Podredumbre azul en limón. Fuente: <http://www.tecnicoagricola.es>.

- Podredumbre negra o verde oscura: causada por *Alternaria citri* o por *A. alternata* (Fig 3.10.). El hongo infecta las flores y suele permanecer en estado latente hasta después del desarrollo de los frutos, por lo que se trata de una podredumbre interna que exteriormente puede pasar desapercibida. Sin embargo, a veces, cuando los frutos se encuentran almacenados se puede producir una decoloración de la piel que cambia a marrón, variable entre el claro y el oscuro. También puede producir podredumbre en los limones a través de las discontinuidades en los pedúnculos o de los extremos apicales (zona estilar) e incluso a partir de heridas. Los tratamientos en precosecha con ácido giberélico o en postcosecha con 2,4-D retrasan la senescencia de los pedúnculos y la consecuente podredumbre por *Alternaria* (Arpaia y Kader ,2000).



Fig. 3.10. Podredumbre negra en mandarina. Fuente: <http://www.tecnicoagricola.es>.

- Podredumbre gris (Fig. 3.11.): está causada por *Botrytis cinerea*, conocido como moho gris. Produce en el fruto de todas nuestras especies y variedades de agrios una podredumbre blanda con exudado de líquido que no le hace perder la forma, adquiriendo la piel una coloración que va del marrón claro al oscuro. Si las condiciones de humedad del ambiente son elevadas y la temperatura permanece templada (más de 12 °C), rápidamente las partes del fruto atacadas por el hongo, se recubren de una mohosidad gris ceniza muy pulverulenta formada por la parte esporógena del mismo. Normalmente, la contaminación primaria y mayor de *B. cinerea* proviene del campo. Luego, en el almacén frigorífico a partir del fruto infectado y especialmente por contacto, la podredumbre avanza. Eliminando con prontitud estos grupos de frutos afectados se disminuye su evolución en el almacén.



Fig. 3.11. Podredumbre gris en naranja. Fuente: <http://www.tecnicoagricola.es>.

- Podredumbre amarga (Fig. 3.12.): los frutos afectados por *Geotrichum candidum* presentan durante la comercialización una podredumbre amarga o ácida de consistencia blanda, que se transforma rápidamente en acuosa y con un fuerte olor pútrido. La infección del hongo tiene lugar cuando los frutos cítricos se encuentran en avanzado período de maduración. En el frigorífico y en partidas con frutos mal seleccionados después de permanecer éstos un mes a 4-6 °C, se han contabilizado porcentajes de podridos superiores al 8%.

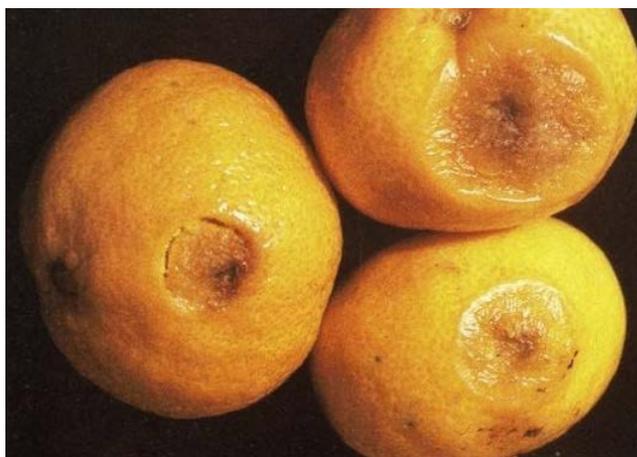


Fig. 3.12. Podredumbre amarga en mandarina. Fuente: <http://www.tecnicoagricola.es>.

- Podredumbre por Rhizopus ocasionada por *Rhizopus stolonifer* (Fig. 3.13.): Es una podredumbre blanda, con pérdida de líquidos, la corteza adquiere una coloración marrón. A temperaturas superiores a 10 °C, los frutos son recubiertos con abundante micelio de color blanquecino, que origina unas largas hifas terminadas en unos puntitos negros, que son las esporas. En los cajones, sacos y contenedores, esta podredumbre se presenta siempre como “nido”, es decir, que a partir de uno o varios frutos infectados, los frutos adyacentes resultan afectados por contacto debido a la contaminación cruzada. La presencia de *R. stolonifer* en un saco, cajón o contenedor, indica con claridad que ha existido un mal manejo de los frutos en las operaciones previas y destinadas al acondicionamiento de los mismos.



Fig. 3.13. Podredumbre por *Rhizopus* en mandarinas. *Fuente:*

<http://www.tecnicoagricola.es>.

- Podredumbre marrón o “aguado” (Fig. 3.14.): los frutos afectados por *Phytophthora citrophthora* comienzan a perder el color verde o naranja a los pocos días de la penetración en los tejidos epidérmicos, apareciendo zonas redondeadas de diversos tamaños de color gris oscuro que rápidamente cambian a un marrón bien definido. La podredumbre que se origina es consistente, nunca blanda. En el almacén esta enfermedad no tiene un desarrollo preocupante.

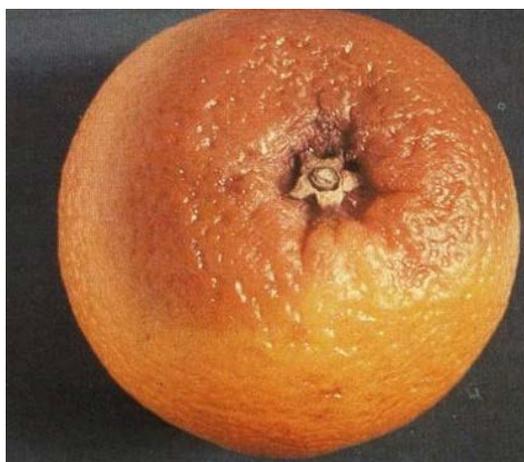


Fig. 3.14. Podredumbre marrón o “aguado” en mandarina. *Fuente:*

<http://www.tecnicoagricola.es>.

- Podredumbre verde grisácea (Fig. 3.15.): *Cladosporium herbarum* es un hongo que puede crecer a temperaturas próximas a los 0 °C. Por ello, su desarrollo en cámara frigorífica no es frenado por las bajas temperaturas, solamente la calidad de la corteza de los frutos agrios es la barrera que impide el crecimiento de este

micromiceto. Debido a esto es conveniente efectuar una buena selección de los frutos antes de su introducción en la cámara frigorífica. La contaminación por contacto no es importante en esta podredumbre. Es una podredumbre seca, firme y flexible, que afecta principalmente a las zonas peduncular y estilar. Las zonas atacadas por el hongo, se oscurecen rápidamente y hay un crecimiento miceliar de color verde grisáceo. Afecta únicamente a la corteza del fruto, produciendo unas depresiones más o menos acentuadas a nivel de flavedo.



Fig. 3.15. *Cladosporium herbarum* . Fuente: <http://www.tecnicoagricola.es>.

- Podredumbre por Fusarium (*Fusarium oxysporum* y *F. solani*) (Fig. 3.16.): estos hongos son comunes micromicetos “habitantes del suelo”, donde permanecen en estado saprofitario, y poseen un parasitismo reducido y poco activo. Para su instauración y posterior incidencia en la planta, necesitan siempre la presencia de tejido vegetal poco turgente. En este caso, su actividad patógena puede alcanzar niveles que pueden llegar a ser preocupantes, necesitándose entonces una lucha específica. La actividad de *Fusarium* durante la conservación y comercialización de nuestros agrios es muy reducida. Si afecta a la corteza de los frutos origina una podredumbre seca, flexible y de color marrón. En ambiente húmedo produce un micelio blanco o blanco-grisáceo. Si afecta a zonas internas del fruto, produce una podredumbre blanda con desarrollo miceliar de coloración rosada o amarillenta.



Fig. 3.16. Podredumbre por *Fusarium* . Fuente: <http://www.tecnicoagricola.es>.

- Podredumbre rosa: causada por *Trichothecium roseum* (Fig. 3.17.). Este hongo puede producir dos tipos de podredumbres, una superficial que se observa en frutos almacenados en frigorífico más de 30 días y otra interna, por penetración del hongo a través de la zona peduncular o estilar. La podredumbre superficial, en ambientes húmedos y zonas deprimidas del flavedo, aparece un ligero moho blanquecino, que poco a poco adquiere una tonalidad rosa. El tejido afectado adquiere un color marrón claro, de consistencia blanda y con olor a tejido fermentado. El hongo también produce una podredumbre interna blanda, de sabor amargo y da a los tejidos un color oscuro, si sale al exterior la piel afectada adquiere un color marrón claro. La utilización de temperaturas por debajo de los 10 °C, detienen el desarrollo de este hongo, pero no muere ni pierde su capacidad de crecimiento. *T. roseum* causa pérdidas poco importantes a nuestros agrios, y al no desarrollarse a temperaturas por debajo de los 10 °C, no supone un peligro durante el almacenamiento frigorífico de la mayoría de las especies cítricas.



Fig. 3.17. Podredumbre rosa causada por *Trichothecium roseum*. Fuente: <http://www.tecnicoagricola.es>.

- Podredumbre por Trichoderma ocasionada por *Trichoderma viride* (Fig. 3.18.): *T. viride* causa pérdidas poco importantes a nuestros agrios. Crece bien por encima de los 5 °C y, por ello, su desarrollo en el frigorífico en el mejor de los casos únicamente es frenado o ralentizado. Una vez fuera de la cámara, a los 4 o 5 días en las bolsas y cajas de naranjas y limones, se pueden contabilizar sin gran dificultad algunos frutos con la podredumbre por Trichoderma, cubierta por un polvillo verde amarillento.



Fig. 3.18. Podredumbre rosa causada por *Trichoderma viride*. Fuente: <http://www.tecnicoagricola.es>.

- Podredumbre algodonosa (Fig. 3.19.): *Sclerotinia sclerotiorum* es un hongo poco activo en nuestros agrios. Normalmente el podrido que provoca es de tipo “nido”, con lo que en los cajones, contenedores o mallas, durante el período de

conservación de la fruta, se pueden ver cubiertos varios frutos por una masa algodonosa de micelio de esta especie. La presencia de las moscas de la fermentación ácida (*Drosophila melanogaster*) es frecuente. Aunque todos los frutos cítricos son afectados por este hongo, es en los limones donde se pueden apreciar los mayores daños, produciéndose la mayor parte de la contaminación de este hongo durante la fase de campo.

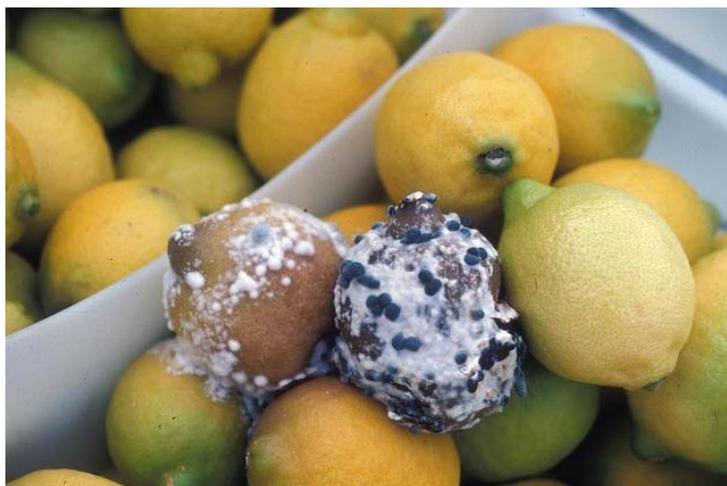


Fig. 3.19. Podredumbre algodonosa causada por *Sclerotinia sclerotiorum* en limones.

Fuente: <http://www.forestryimages.org>.

- Antracnosis (Fig. 3.20.): es ocasionada por la especie *Colletotrichum gloeosporioides*. La actividad de *C. gloeosporioides* durante la post-recolección de los cítricos da lugar actualmente a un porcentaje de podridos no superior al 6%, aunque estamos asistiendo de manera preocupante a un aumento muy espectacular de la incidencia de este hongo en el grupo de las mandarinas, especialmente en aquellas partidas que son almacenadas en cámara frigorífica en períodos de tiempo superiores a los 40-50 días y también en las que han sido desverdizadas. En nuestras condiciones, la actividad de *C. gloeosporioides* durante la post-recolección es, mayoritariamente, un problema de mala calidad de la corteza. Puede localizarse en cualquier zona del fruto, pero es más frecuente en la zona estilar y peduncular. Favorecen el desarrollo, todos aquellos factores, que afectan a la calidad de la corteza del fruto, como escasa profundidad del suelo y baja calidad del mismo, problemas nutritivos, problemas de riego (agua con exceso de sal), etc. Es un podrido firme y flexible, que

produce en la corteza un color marrón, llegando a ser oscuro o negro. El hongo ataca los tejidos del fruto descomponiéndolos y produciendo un fuerte olor a moho. Las esporas se encuentran debajo de la cutícula del fruto y se ven como puntos negros y en condiciones de elevada humedad, salen al exterior formando unas masas blanco-amarillentas.



Fig. 3.20. Antracnosis en limón. Fuente: <http://www.tecnicoagricola.es>.

- Podredumbre por *Phomopsis* (Fig. 3.21.): *P. citri* puede afectar a todos los agrios, pero su incidencia es mayor en pomelos, naranjas y limones. Este hongo desarrolla, durante la post-recolección, una podredumbre que se centra casi siempre alrededor del punto de inserción del pedúnculo, aunque también pueden verse afectadas otras áreas. En estos frutos, y como contaminantes secundarios, es fácil comprobar el desarrollo de *Penicillium*, que en la mayoría de las ocasiones oscurecen la acción de *Phomopsis*. En la actualidad, la incidencia de *Phomopsis* en el podrido de nuestros agrios es prácticamente insignificante, dependiendo principalmente de las condiciones climáticas.



Fig. 3.21. Podredumbre por Phomopsis en limón. Fuente: <http://www.tecnicoagricola.es>.

- Podredumbre negra por Diplodia (Fig. 3.22.): *D. mutila* es un hongo celomiceto muy poco activo como patógeno de nuestros frutos agrios. Su incidencia en postcosecha es mínima, y únicamente se detecta en frutos recogidos después de permanecer maduros durante bastante tiempo en el árbol. La baja humedad del ambiente de los huertos de cítricos españoles determina una muy baja incidencia de este hongo. Aparece alrededor del pedúnculo una decoloración a la que sigue un ablandamiento de la zona y una tonalidad marrón.



Fig. 3.22. Podredumbre negra por Diplodia en mandarina. Fuente: <http://www.tecnicoagricola.es>.

Capítulo 4.

*Las podredumbres verde y azul de los frutos
cítricos*

4.1. Descripción y agentes causales

La gran mayoría de los podridos parasitarios producidos en cítricos durante la globalidad del proceso de comercialización son debidos a *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc., y a *Penicillium italicum* Wehmer, causantes respectivamente de las podredumbres verde y azul de los cítricos. A nivel mundial, las podredumbres verde y azul también son las enfermedades más importantes en postcosecha de cítricos, especialmente en aquellas áreas geográficas con veranos poco lluviosos.

La podredumbre verde en los frutos cítricos, denominada en la literatura científica internacional “Green rot”, es de consistencia blanda en el fruto, que le hace perder con rapidez su forma, adquiriendo éste al final un aspecto de masa disforme. Al comienzo de la infección el área afectada por este hongo muestra un color más oscuro del normal y los tejidos pierden su consistencia firme, haciéndose más blandos (Tuset, 1987). En la superficie de la lesión se desarrolla una tenue vegetación fungosa con aspecto de fieltro, al principio de color blanco (micelio) pero rápidamente cambia a una coloración que varía del verde-amarillo al verde oliváceo, formada por las estructuras esporígenas. Los conidios (esporas) son secos y fácilmente separables de sus estructuras portadoras en forma de pequeñas nubes polvorientas (Tuset, 1987). En una misma cadena de conidios se observan entre ellos marcadas diferencias en la forma y en las dimensiones (Figura 4.1.).

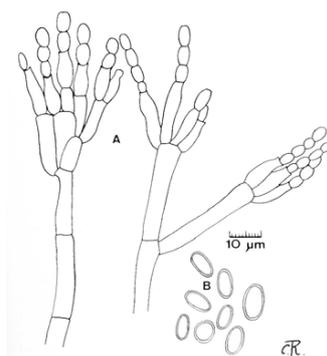


Figura 4.1. *Penicillium digitatum* Saccardo. A) Dibujos de los penicilos (fiálidas o conidióforos). B) Dibujos de conidios maduros (Fuente: Ramírez, 1982).

Desde el punto de vista epidemiológico, *P. digitatum* es un típico parásito de herida. Perdura en estado saprofitario sobre todo tipo de matriz vegetal, entrando en actividad cuando el fruto cítrico se encuentra en período avanzado de maduración o

completamente maduro, es decir, cuando el fruto se encuentra con sus defensas mermadas.

En la comercialización citrícola, la contaminación por este hongo tiene lugar en los siguientes puntos:

- a) En el campo, estando el fruto maduro todavía en el árbol o en las operaciones de recolección y transporte.
- b) En el almacén acondicionador o conservador de la fruta.
- c) Durante el período de distribución y venta en los mercados.

Normalmente predomina el estado del enunciado a), es decir, durante la permanencia del fruto maduro en el huerto (Tuset, 1987). Sin embargo, si los frutos permanecen tiempo en cámara, es probable encontrar proliferaciones más o menos abundantes debido a la dispersión por el ambiente de los conidios a partir de los frutos afectados.

La fuente principal de contaminación son los conidios, pero también el micelio puede jugar un papel interesante cuando los frutos están en contacto (contaminación cruzada). Caso éste de frecuencia considerable durante el periodo de comercialización. (Tuset, 1987).

Una vez en los frutos, si estos se encuentran maduros y presentan heridas o roturas de la cutícula y la humedad del aire es apropiada (más del 80%), los conidios de *P. digitatum* entran en actividad, germinan y el tubo germinativo en crecimiento, penetra con rapidez en el interior de los tejidos de la corteza (albedo), produciéndose la infección y al poco tiempo la podredumbre (Tuset, 1987).

Durante la conservación frigorífica, *P. digitatum* es menos activo que *P. italicum*, predominando éste claramente en los frutos que sufren este proceso térmico. La razón de ello se debe a que *P. digitatum* disminuye el desarrollo en condiciones de bajas temperaturas (especialmente la esporulación), lo que no sucede en *P. italicum* (Tuset, 1987).

Penicillium italicum denominado también como "moho azul", conocido en la literatura anglosajona como "blue mold" (Figura 4.2.), determina una podredumbre blanda en los frutos cítricos, cubriendo la parte externa de la zona del fruto afectada de

una coloración azulada, variable entre el verde-azulado y el verde-grisáceo, debida a la formación de una capa de conidios (esporas) secos, fácilmente separables y que, por su abundancia, constituyen pequeñas masas polvorientas.

Al mismo tiempo que se forma en el exterior la parte reproductora asexual del hongo, los tejidos del fruto invadidos por el micelio del patógeno, se desorganizan como consecuencia de la disolución de las pectinas que constituyen las paredes celulares. Se producen pérdidas de líquidos, mostrándose al final éste blando y completamente arrugado. En condiciones de temperatura igual o superior a los 8-10°C, esta podredumbre es rápida y continua, difundiéndose en todas direcciones hasta afectar al fruto completamente. Si ésta tiene lugar en atmósfera húmeda, el fruto se descompone blandamente con importantes exudados acuosos. Si por el contrario el ambiente es seco, el fruto se deshidrata rápidamente quedando al final arrugado y con aspecto coriáceo (Tuset, 1987).

Su morfología está determinada por los elementos constituyentes de la parte esporígena que son menores en tamaño a los de *P. digitatum*. El micelio es blanco. Los conidios son al principio típicamente cilíndricos y en la madurez elípticos o subglobosos, con paredes lisas, claramente hialinos, tomando un color ligeramente azulado cuando están agrupados en masa (Tuset, 1987).

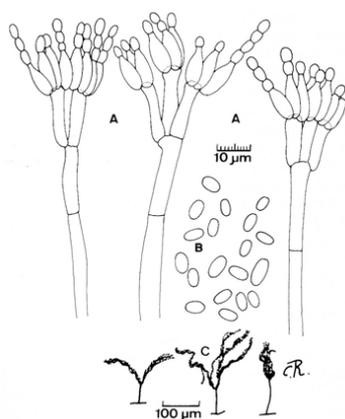


Figura 4.2. *Penicillium italicum* Wehmer. A) Detalles de los penicilos (fiálidas o conidióforos) dibujados. B) Detalles de conidios maduros dibujados (Fuente: Ramírez, 1982).

4.2. Variabilidad genética y fenotípica de los diferentes aislados de *Penicillium digitatum* y de *P. italicum*

Uno de los aspectos más dinámicos e importantes de la biología es que las características de los individuos de una especie no “fijas” en su morfología o fisiología, sino que varían de un individuo a otro. Un hecho real es que se espera que todos los individuos que resulten de un proceso sexual difieran entre sí y de sus progenitores en numerosas características, aún cuando conserven la mayoría de las similitudes con ellos y pertenezcan a la misma especie. Este es el caso de los hongos que resultan de esporas sexuales como oosporas, ascosporas y basidiosporas, Sin embargo, cuando los individuos se reproducen asexualmente, la frecuencia y el grado de variabilidad entre la progenie disminuye ampliamente, pero aún así ciertos individuos de la descendencia mostrarán diferentes características. Este es el caso de la reproducción por medio de conidios, zoosporas, esclerocios y uredosporas. Este es el caso de la reproducción de *P. digitatum* y *P. italicum* en los huertos y en los almacenes sobre frutos podridos. Por todo ello, es un hecho lógico partir de la base de que distintos aislados de estos hongos puedan presentar cierta variabilidad genética y fenotípica que se podría comprobar con la diferente respuesta a ciertos estímulos y sustancias (fenotipo). Es de tener en consideración que, en muchos hongos, algunos procesos parasexuales conducen a la variación. Por otra parte, todos los patógenos de plantas, en particular bacterias, virus, hongos y probablemente micoplasmas, pueden producir variantes en ausencia de algún proceso sexual, por medio de mutaciones y quizás por medio de adaptación citoplásmica (Agrios, 2010).

La mutación y la recombinación son los mecanismos de variabilidad presentes en hongos fitopatógenos y saprófitos. Por medio de la mutación se producen cambios más o menos repentinos en el material genético que es transmitido hereditariamente a la progenie. Las mutaciones ocurren espontáneamente en la naturaleza en todos los organismos vivos, tanto en los que se reproducen sólo por vía sexual o asexual, como en los que se reproducen utilizando ambos mecanismos. Es probable que cada año aparezcan en la naturaleza un gran número de mutantes que difieren de su progenitor en su grado de virulencia y constituye un problema real; por ello, tienen sentido el estudio

patológico de diversos aislados de *Penicillium* obtenidos de especies distintas de frutos cítricos, tal y como se ha hecho en el presente estudio.

Una evidencia de lo comentado es la aparición de aislados resistentes a los fungicidas de síntesis que constituye un problema muy serio en los almacenes españoles.

La taxonomía de microorganismos se ha fundamentado tradicionalmente en el empleo de caracteres morfológicos y de propiedades bioquímicas y fisiológicas. En muchos casos estas características son bastante variables, dentro de la misma especie, produciendo información insuficiente o poco precisa que conduce a la generación de clasificaciones artificiales. La explicación a este fenómeno se ha dado en los párrafos anteriores. De hecho, una de las especies fúngicas más estudiada, *Botrytis cinerea*, presenta tal variabilidad que algunos aislados reconocidos inicialmente como pertenecientes a esta especie, se han separado en nuevas especies aparte, definiendo una nueva especie denominada *B. pelargonium*. Posteriormente se ha comprobado que los aislados de *Botrytis* obtenidos de plantas de hortensia (*Pelargonium x hortorum*) afectadas por este hongo (enfermedad denominada “*Botrytis blight*”) son muy similares genéticamente y responden todos ellos al perfil genético de *B. pelargonium*.

En las últimas décadas, el desarrollo de herramientas de biología molecular ha jugado un papel fundamental en la taxonomía moderna de los hongos y bacterias. Adicionalmente, su empleo ha mejorado el nivel de conocimiento sobre la biología de los microorganismos y sus relaciones filogenéticas con otros organismos, así como también han potenciado su exploración bioprospectiva (Hawksworth *et al.*, 1995; Zuluaga *et al.*, 2011).

Estas técnicas se fundamentan en el análisis de cromosomas, y/o genes de sus productos (proteínas) e incluyen entre otras: electroforesis en campo pulsado, hibridación ADN-ADN, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), análisis de la relación G+C, polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD), polimorfismo de la longitud del ADN amplificado (AFLP), PCR específico, microsatélites, polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP) y secuenciación directa del ADN (Oren y Papke, 2010).

En la taxonomía de microorganismos, las regiones que codifican para el ADN ribosomal (ADNr) han sido las más empleadas para realizar estos estudios, debido a que contienen tanto regiones altamente variables como secuencias muy conservadas, que pueden ser empleadas para realizar análisis a todos los niveles taxonómicos. La región ADNr se encuentra en todos los seres vivos, pues participa directamente en la conformación de los ribosomas, estructuras celulares responsables de la síntesis de proteínas. Debido a esta importante función, se ha planteado que su evolución puede reflejar la misma evolución de los organismos vivos (Oren y Papke, 2010).

A pesar de la gran utilidad que poseen las regiones ribosomales para ser empleadas en análisis filogenéticos, algunas veces se han encontrado incongruencias entre los árboles generados, la biología de los hongos estudiados y las relaciones evolutivas de los taxones definidos. La principal razón de tales problemas radica en la acción no uniforme de fuerzas evolutivas sobre las regiones ADNr de taxones cercanos. Esto se ha solucionado mediante el análisis de regiones adicionales del genoma tales como aquellas que codifican para proteínas como son: RPB1, RPB2, TEF1 α , β -tubulina, y γ -actina.

Las regiones codificadoras de proteínas han sido aplicadas para contestar preguntas taxonómicas a todos los niveles; por ejemplo han sido utilizadas para determinar las relaciones entre eucariotas ancestrales, así como para el estudio de las relaciones evolutivas de diferentes grupos de microorganismos. Una de las principales características de estas regiones y de la cual se deriva su utilidad en estudios filogenéticos, es su organización en regiones codificadoras (exones) interrumpidas por regiones no codificadoras (intrones). Los intrones aparentemente no poseen una función fundamental en las células, de tal manera que están sujetas a un control evolutivo menos riguroso que aquel ejercido sobre los exones; así, dichas regiones presentan un alto nivel de variación en sus secuencias de nucleótidos, lo cual las faculta para su análisis filogenético.

En la actualidad, la base para la detección, identificación y caracterización de bacterias y hongos en agroecosistemas, consiste en la combinación de metodologías morfológicas y bioquímicas tradicionales con técnicas moleculares soportadas en los desarrollos bioinformáticos de los últimos años.

Entre los procedimientos de detección de microorganismos más comúnmente utilizados, se destaca el empleo de medios de cultivo selectivos y semiselectivos. Sin embargo, el grado de sensibilidad de estos procedimientos es variable y frecuentemente bajo, debido a diferencias en la comunidad microbiana del suelo que impiden el crecimiento del microorganismo de interés y al grado de subjetividad generado en la lectura de las colonias del microorganismo por parte de los operarios.

La utilización de plantas indicadoras ha sido otro componente de diagnóstico rutinario de microorganismos, aunque su utilidad es limitada por el bajo nivel de sensibilidad de la prueba. Además, se han diseñado diversas técnicas serológicas que utilizan anticuerpos policlonales y monoclonales en esquemas tipo ELISA o pruebas de flujo lateral para uso en campo.

Aunque las técnicas basadas en PCR tienen un alto potencial como método de detección, su empleo rutinario es limitado por las inconsistencias generadas debido a la inhibición enzimática de las reacciones por parte de compuestos fenólicos y polisacáridos ácidos presentes en las plantas, o por los ácidos húmicos y fúlvicos de los suelos. Existen diferentes alternativas metodológicas para solucionar dichos inconvenientes, destacándose la utilización de la técnica de inmunocaptura que separa eficientemente las células bacterianas de interés del resto de componentes de los extractos mediante el empleo de anticuerpos policlonales.

En la actualidad, se viene incrementando el número de trabajos tendientes a incorporar la metodología de PCR en tiempo real en los programas de detección y cuantificación de inóculo de hongos y bacterias de diferentes sustratos y tejidos.

Una ventaja de los métodos basados en el uso de ácidos nucleicos es la alta precisión que ofrecen para la detección de microorganismos, así como su uso simultáneo para la caracterización genética de las cepas e incluso de su interacción con el hospedero. Estos métodos se dividen básicamente en dos grupos: hibridación con secuencias de ADN/ARN y aquellos que emplean la metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Oren y Papke, 2010). Estos últimos se fundamentan en la amplificación exponencial de una secuencia de ácidos nucleicos que es flanqueada por un par de cebadores, los cuales son usados por una polimerasa termoestable de ADN para la formación de las nuevas cadenas. La técnica consta de múltiples ciclos (usualmente 35 a 40) en los cuales hay desnaturalización de ADN de doble cadena,

anillamiento de los cebadores (oligonucleótidos de 16 a 35 bases), extensión (polimerización) y nuevamente desnaturalización. Esto permite la detección precisa de una región del genoma específica y su posterior secuenciación para caracterizarla con exactitud (Oren y Papke, 2010).

En este estudio se justificaron genéticamente los aislados de *P. digitatum* y *P. italicum*, purificados de limón y mandarina ambos, y se identificaron las especies con PCR. Para ello se procedió obtener el ADN de un subcultivo realizado en medio de cultivo de agar de patata y dextrosa (PDA, Scharlab®, Barcelona) en los laboratorios de patología vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena. Se realizaron cuatro extracciones, dos de *P. digitatum* (uno de mandarina y otro de limón) y otros dos aislados de *P. italicum* de mandarina y de limón. Las muestras preparadas se enviaron al laboratorio SECUGEN S.L. de Madrid donde secuenciaron (los resultados se exponen en la Fig. 4.3 Este análisis se hizo sólo para comprobar la identificación morfológica de los aislados porque no hubieron repeticiones.

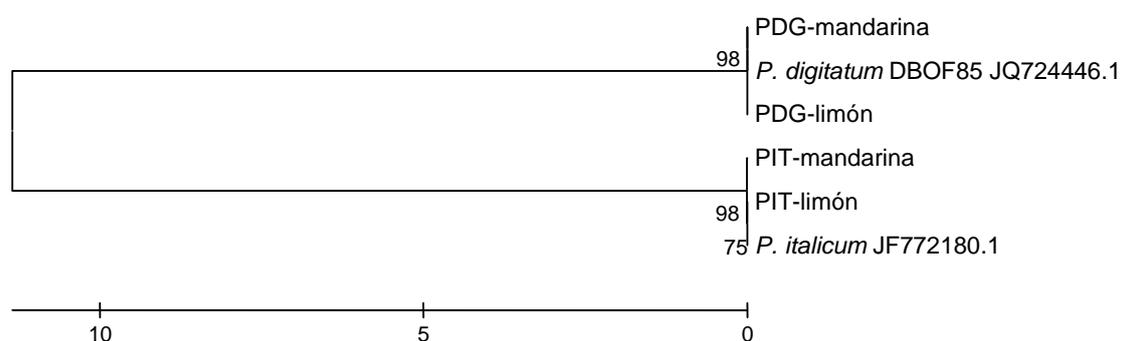


Figura 4.3. Árbol filogenético inferido de la región ITS (espacios de transcripción interna) del ADN ribosomal (ITS1, 5.8S e ITS2) de dos especies de *Penicillium* aislados de mandarina y limón en laboratorio. (Programa: MEGA 4; Método: Neighbour Joining. Modelo: Kimura two-parameter, 2000 bootstrap replicates.

PIT: *Penicillium italicum*, PDG: *Penicillium digitatum*. DBOF85 JQ724446.1 y JF772180.1: Código de acceso en el GenBank database, NCBI, de los hongos homólogos a los aislados de laboratorio.

Como se observa en la Fig. 4.3., encontramos una buena correlación entre la clasificación fenotípica y genética para las especies bien definidas. Sin embargo, inicialmente, los aislados de *P. italicum* se clasificaron dentro de la especie *P. crisogenum*, que está descrita como especie causante de podredumbres en los frutos cítricos en La India. Dado que esta especie no está descrita como agente causal de

podredumbres en los frutos cítricos, se procedió a repetir el análisis que confirmó que por su similitud pertenecían a la especie *P. italicum*.

4.3. Importancia comercial de las podredumbres

Las pérdidas por podredumbres totales de los cítricos son muy variables, dependiendo ampliamente de la zona productora, condiciones de campo y de almacenamiento (Martínez, 2007). Diversos estudios indican que estas pérdidas representan entre un 5 y 8% del total de la fruta manipulada durante toda la campaña de comercialización (Viñas *et al.*, 2005), alcanzando valores incluso superiores al 12% en años de climatología anormal (Perucho y Tuset, 2001).

Las podredumbres ocasionadas por *Penicillium* son las principales causas de pérdidas de los frutos cítricos durante su comercialización en condiciones mediterráneas (Tuset, 1987; Viñas *et al.*, 2005), éstas alcanzan del 60 al 80% del total de los agrios (Tuset, 1987); siendo la podredumbre verde, sin ningún género de dudas, la principal de nuestros agrios a lo largo de toda la campaña de comercialización. Sin embargo, en los limones, la podredumbre verde presenta una incidencia mucho más baja que en naranjas o mandarinas (Tuset, 1987). La podredumbre verde suele tener una elevada incidencia a principio y mitad de la campaña de comercialización, mientras que la azul suele ser importante al final de la misma. Las lluvias tempranas seguidas o no de tiempo seco y caluroso son factores climáticos muy a tener en cuenta porque favorecen la podredumbre azul, mientras que la podredumbre verde se ve acrecentada por lluvias más tardías seguidas de ambiente húmedo y fresco.

4.4. Control de las podredumbres

Para el control de las enfermedades se pueden utilizar bien compuestos letales sobre patógenos (fungicidas y bactericidas) o compuestos que retardan o inhiben su crecimiento (fungistáticos y bacteriostáticos). Por otra parte, los tratamientos se pueden hacer previamente al cosechado o ya en postcosecha como parte de los tratamientos de lavado, confección y conservación.

Para controlar los patógenos de herida, los tratamientos en el campo son generalmente menos efectivos que los tratamientos postcosecha. Sin embargo, los tratamientos precosecha son un buen medio de control cuando se producen daños considerables durante la recogida y los tratamientos postcosecha no se pueden realizar pronto.

El control de los principales patógenos postcosecha de los frutos cítricos se realiza mediante el empleo de fungicidas sintéticos. Aparte de su acción curativa, los tratamientos con estos fungicidas se caracterizan por ser, en general, de persistencia elevada y ejercer en mayor o menor medida una acción preventiva que protege al fruto de futuras infecciones. Aunque su efectividad depende de la dosis y el modo de aplicación, en general es elevada. Este factor, junto a su facilidad de aplicación y su precio razonable han contribuido a perpetuar el uso de estos productos químicos desde su introducción inicial hacia la década de los años 1950. A pesar de sus ventajas, la utilización masiva, continuada y en ocasiones poco controlada de los fungicidas sintéticos ha generado graves problemas como son la aparición de cepas de los patógenos resistentes a los fungicidas, el incremento de la producción de residuos químicos y el aumento de la incidencia de ciertas enfermedades no controladas por estos productos (Palou, 2005).

En este sentido, se ha investigado nuevos sistemas de control de las podredumbres en postcosecha basados en procedimientos físicos, medidas de prevención en campo y almacén, métodos biológicos y métodos químicos basados en sustancias naturales o inocuas con el fin de reducir la presencia de residuos en los frutos, la liberación de residuos al medio ambiente, la proliferación de aislados patógenos resistentes y ampliar el abanico de comercialización de los productos en los sistemas de Producción Integrada, Residuo Cero o Producción Ecológica (Palou, 2007).

4.4.1. Métodos de prevención

La calidad global de la fruta fresca viene predeterminada por muchos factores, tales como el estándar morfológico y comercial de la variedad, su poder nutritivo, valor

dietético, apreciación sensorial, estado fitosanitario, condiciones higiénico-sanitarias, etc. Sin embargo, es necesario seleccionar y aplicar una metodología para mantener, en la medida de lo posible, esa calidad alcanzada en el momento de la cosecha a lo largo de toda la comercialización del producto. Las pérdidas por podredumbres constituyen el mayor problema de la comercialización de los cítricos cuando se almacenan en condiciones adecuadas, por lo que los métodos de prevención y control deben comenzar desde el principio de la producción hasta el consumo.

4.4.1.1. Cultivo

La influencia medioambiental (clima y suelo) sobre el rendimiento y la calidad de la fruta, y más concretamente sobre su comportamiento después de cosechada, está comprobada en muchos casos. La fruta de un mismo cultivo producido bajo climas distintos puede reaccionar de forma diferente ante las temperaturas de la frigoconservación. La distinta composición de los lípidos de la membrana parece marcar la diferencia entre unas y otras.

La mejora varietal puede estar dirigida a conseguir cultivos más resistentes a las patologías y fisiopatías que afectan a la fruta después de cosechada. Los mecanismos de tolerancia y resistencia a estas alteraciones son de origen genético y pueden reforzarse por medio de las técnicas tradicionales de cruzamiento-selección o por las más modernas de la ingeniería genética.

La ingeniería genética podría resultar muy eficaz para mejorar la conservación postcosecha de algunas frutas. En este sentido, cabe citar el ejemplo de la pera William de la que se ha aislado una proteína inhibidora de la actividad del enzima "poligalacturonasa" (PG), dotada de un notable potencial para prevenir las alteraciones infecciosas. El aislamiento y la transferencia a otros cultivos del gen responsable de esta propiedad, conduciría a la mejora por vía genética de la resistencia a infecciones de la fruta durante su almacenaje. De hecho, ya se han conseguido tomates transgénicos sintetizadores de altas dosis de PG que manifiestan resistencia a las infecciones por *Botrytis cinerea* y mantienen su consistencia durante un tiempo extra después de cosechados.

La influencia del tipo de patrón sobre la maduración de la fruta (más o menos precoz) y sobre su contenido en calcio está probada en muchas especies. Ambas variables (precocidad y contenido en calcio) influyen, a su vez, sobre la aptitud de la fruta para conservarse durante su almacenamiento. Experiencias realizadas en la Universidad de Massachussets (EE.UU.) pusieron de manifiesto la influencia del patrón sobre la maduración y conservación postcosecha de manzanas variedad Starkspur Supreme Delicious.

En cuanto a las técnicas de cultivo, el abonado y el aporte consiguiente de elementos minerales a disposición del árbol pueden influir sobre la resistencia o la susceptibilidad de la fruta a determinadas alteraciones después de cosechada. El calcio aumenta la resistencia frente a un buen número de daños, sobre todo de origen fisiológico.

Por otro lado, un exceso de nitrógeno hace a la fruta más susceptible a los ataques por microorganismos y, al mismo tiempo, incrementa el metabolismo respiratorio, anticipando así los fenómenos de senescencia.

Un exceso de riego vuelve las cutículas más susceptibles a una serie de lesiones o microheridas en los frutos que pueden aparecer después de cosechados. Estas alteraciones se convierten con frecuencia en vías de acceso a patógenos que pueden terminar de arruinar la calidad y presencia de la fruta. Cuando el agua de riego moja la base del tronco se facilitan las pudriciones de almacén de origen fúngico (*Phytophthora cactorum*, *Mucor piriformis*, etc.).

4.4.1.2. Manipulación

Las medidas previas a la entrada en cámara de la fruta son todas aquellas que tiendan a evitar heridas y contaminación en la fruta, antes, durante y después de la recolección, lo que se suele denominar como daños mecánicos. En este sentido, deben extremarse las medidas de higiene y limpieza en las operaciones manuales, los útiles, los embalajes y las máquinas de recolección, clasificación y transporte de la fruta. El cuidadoso manejo de la fruta para no producirle lesiones y heridas reviste el mismo interés.

4.4.1.3. Postcosecha

El elevado contenido acuoso de las frutas frescas recién cosechadas las hace altamente vulnerables a los ataques por microorganismos. Sus consecuencias pueden ir desde un deterioro aceptable y una pérdida de valor comercial asumible, hasta perjuicios irreparables que inutilizan el producto para su consumo.

Los daños producidos en la fruta fresca después de cosechada pueden ser de varios tipos:

- a) Enfermedades infecciosas producidas principalmente por hongos de pequeño tamaño (micromicetos).
- b) Fisiopatías.
- c) Procesos naturales de senescencia

Las causas inmediatas o lejanas de que se presenten estos tipos de accidentes tienden hoy a ser vistas bajo una perspectiva global e interrelacionada, donde se estudian desde la influencia del medio (suelo y clima) y de la variedad cultivada, hasta las técnicas de cultivo (labores, abonado, riego, podas...), tratamientos contra plagas y enfermedades, estado de la fruta en el momento de su recogida, forma de llevar a cabo la cosecha, posibles daños físicos por una mala manipulación durante y después de cosechada, el estado y características de las cámaras y los transportes, así como los regímenes de frío a que se someten en esta fase final previa a su puesta en los mercados.

El estudio de las interacciones de estas variables y sus efectos sobre el resultado de la cosecha permiten actuar de forma coordinada, mediante la planificación como un todo del proceso productivo. Este tipo de estrategia acude a los recursos naturales de los que son depositarias las plantas y la naturaleza, y los combina equilibradamente con las tecnologías, reduciendo al mínimo (compatible con el fin económico de la producción) los tratamientos con productos químicos. Se conoce como "estrategia de producción integrada" (PI).

El objetivo último es la mejor calidad y sanidad de los productos y a él se subordinan las estrategias y las acciones en que éstas se materializan. El interés de las

acciones productivas no se detiene en el momento de la cosecha. Por el contrario, se prolonga a la fase de post-recolección, hasta el momento en que la fruta llega al consumidor. Sin duda, el mejor procedimiento para preservar la calidad de las frutas y hortalizas una vez recolectadas consiste en la aplicación del frío con el fin de ralentizar el metabolismo de estos productos frescos que continúan respirando una vez cosechados.

La conservación por frío disminuye la transpiración de la fruta, inhibe la germinación de esporas y el crecimiento de hongos, y retrasa los cambios bioquímicos que conducen a la senescencia. Todo ello contribuye a una reducción de las pérdidas postcosecha y a una mejora de la presentación y la calidad intrínseca de la fruta. La dilatación de los periodos de conservación postcosecha convierte a la frigoconservación en una actividad económica que permite diferir la oferta y concentrarla en los momentos más favorables.

La distribución de las pérdidas durante su conservación en cámara varía según la clase de fruta. La de pepita tiene una conservación normalmente larga, mientras que la de hueso se limita a unas pocas semanas.

Los cítricos, al no ser frutos climatéricos, alcanzan la madurez en el árbol sin que se produzcan cambios importantes en la intensidad respiratoria y la producción de etileno. La causa principal de deterioro fisiológico en estos frutos es el estrés hídrico producido al separarlos del árbol, sin posibilidad de reposición del agua que pierden a partir de ese momento. La transpiración produce desecación, arrugamiento y reblandecimiento del fruto y anticipan el momento de la senescencia. Si las pérdidas de peso son excesivas, se produce un endurecimiento del fruto acompañado generalmente de un pardeamiento del flavedo. Las temperaturas de frigoconservación reducen la intensidad de estos fenómenos. Al retrasar la senescencia se mejora la resistencia fisiológica de los tejidos a los ataques por hongos y frenan la evolución de las podredumbres.

4.4.2. Aplicación de procedimientos físicos, químicos y microbianos para reducir las podredumbres

El control directo contra los hongos de la post-recolección de los cítricos se puede realizar mediante lucha física, química (sustancias con acción fungicida o fungistática) o biológica.

4.4.2.1. Métodos físicos

La lucha física se refiere a la adecuación de tratamientos térmicos u otros tratamientos físicos con el fin de reducir o impedir el desarrollo fúngico.

Dentro de la lucha física destacan los tratamientos por calor (curado y agua caliente), irradiaciones (radiaciones ionizantes y luz ultravioleta) y otros tratamientos físicos complementarios a la conservación frigorífica, como son las atmósferas controladas (convencionales, hipobáricas y ozonizadas) y las atmósferas modificadas.

El curado o tratamiento con aire caliente, es un procedimiento por el cual la fruta llegada del campo se almacena a altas temperaturas ($>30^{\circ}\text{C}$) y alta humedad ambiental ($>90\%$) durante periodos de tiempo variable (1-3 días). Un curado de 65- 72 horas a $33\text{-}37^{\circ}\text{C}$ reduce significativamente la incidencia de la podredumbre verde en naranjas, mandarinas, pomelos y limones (Stange y Eckert, 1994; Artés, 1995a; Tuset *et al.*, 1996; Lanza, 1997; Plaza *et al.*, 2003; Ballester *et al.*, 2004 y Kinay *et al.*, 2005). No obstante, estos tratamientos resultan poco efectivos contra la podredumbre azul cuando los frutos se almacenan posteriormente en frío (Plaza *et al.*, 2003). A pesar de sus efectos beneficiosos, el curado de los cítricos no se está utilizando a nivel comercial de forma generalizada por el elevado coste que supone calentar grandes cantidades de fruta durante varios días, y en casos de aplicación defectuosa, pueden producirse efectos adversos en la calidad de la fruta tratada como pueden ser pérdidas de peso o fitotoxicidades debidas a un exceso de calor (Palou, 2005).

Con los tratamientos con agua caliente pueden alcanzarse, en algunos casos, los efectos beneficiosos del curado con una tecnología mucho más simple, práctica y barata. Baños de poca duración (2-3 minutos) en agua caliente ($45\text{-}55^{\circ}\text{C}$) son efectivos contra

las podredumbres verde y azul (Barkai-Golan y Apelbaum, 1991; Tuset *et al.*, 1996 y Palou *et al.*, 2001b, 2002). Los principales factores limitantes son la poca persistencia del tratamiento y el estrecho margen existente entre las temperaturas efectivas y las que causan daños irreversibles por calor en la piel de los frutos.

Los efectos tanto del curado como del agua caliente sobre *P. digitatum* y *P. italicum* pueden ser directos o indirectos. Entre los primeros, los más destacables son la inhibición de la germinación o del crecimiento del tubo germinativo del conidio y los daños sobre las hifas fúngicas en crecimiento (Barkai-Golan y Phillips, 1991; Schirra *et al.*, 2000). Los efectos indirectos se refieren a la inducción en el huésped de resistencia a la infección. El calor puede contribuir a mantener o alargar la actividad antifúngica de compuestos constituyentes de la piel de los cítricos como el citral o proteínas como la quitinasa o la β -1,3-glucanasa (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992; 1995; Pavoncello *et al.*, 2001). También puede inducir la biosíntesis, en heridas superficiales inoculadas con el patógeno, de compuestos no constituyentes con actividad antifúngica llamados en general fitoalexinas (Palou, 2005). Por otro lado, también puede catalizar la biosíntesis en heridas de la piel de ligninas y materiales análogos que actúan como una barrera física a la penetración de las hifas del hongo (Brown *et al.*, 1978; Ben-Yehoshua *et al.*, 1989; Lanza, 1997). Además, el curado, pero especialmente el agua caliente, puede llegar a fundir las ceras epicuticulares del flavedo y taponar así microheridas y vías de entrada de los patógenos (D'hallevin y Schirra, 2001).

Por otro lado, dentro de las irradiaciones, los primeros tratamientos realizados con radiaciones ionizantes que se evaluaron para el control de *Penicillium* spp. en la postcosecha de cítricos fueron los rayos γ y posteriormente los electrones acelerados o rayos β (Barkai-Golan y Kahan, 1966; Maxie *et al.*, 1969; Barkai-Golan y Padova, 1981). Se observó que en comparación con otros patógenos de postcosecha de cítricos como *Alternaria citri* o *Diplodia natalensis*, *P. digitatum* y en mayor medida *P. italicum* eran bastante sensibles a la radiación γ . Con una dosis de 1,0 kGy se inactivaron el 98% y el 99,5% de las esporas respectivamente.

Una conclusión general de estos primeros estudios tanto en rayos γ como β , fue que la dosis mínima necesaria para un control efectivo de las podredumbres (1,0- 1,5 kGy) podían resultar fitotóxicas, produciéndose daños externos y manchas en la corteza

de los frutos. Por ello, se probaron dosis inferiores (0,25-0,50 kGy) en combinación con otros tratamientos como el calor o las envolturas plásticas (Barkai- Golan *et al.*, 1969; Lezhneva *et al.*, 1973; Barkai-Golan y Padova, 1981). Aunque algunos resultados fueron satisfactorios, el uso de esta tecnología no se generalizó como método de control de enfermedades porque las instalaciones especiales que se requieren, caras y poco prácticas, no se justifican con los beneficios obtenidos (Palou, 2005).

La luz ultravioleta (UV), es altamente energética y puede ser fácilmente absorbida por los organismos vivos. Este principio se ha utilizado para intentar inactivar los conidios de *P. digitatum* y *P. italicum*, pero se observó que los pigmentos presentes en ambos tipos de esporas las protegían de la acción de la luz UV (Asthana y Tuveson, 1992). Distintos estudios indican que la irradiación a dosis bajas (2-8 kJ/m²) de luz UV lejana o de baja longitud de onda (UV-C, entre 100 y 280 nm) puede reducir la incidencia de la podredumbre verde en distintas especies de cítricos, aunque la efectividad y la posibilidad de que se produzcan fitotoxicidades depende de la dosis, el tipo de fruto y su estado de madurez (Chalutz *et al.*, 1992; Droby *et al.*, 1993; Kinay *et al.*, 2005). En este sentido, la luz UV-C es una hormetina porque es nociva a altas dosis pero a dosis subletales estimula una respuesta beneficiosa que consiste en la inducción en la piel del fruto de resistencia a la infección (Palou, 2005).

Otros sistemas físicos complementarios a la conservación frigorífica es la utilización de las atmósferas controladas convencionales, hipobáricas y ozonizadas. El almacenamiento en estas condiciones no ejerce por sí mismo una actividad fungicida, pero sí una acción fungistática de inhibición o retraso del crecimiento de los patógenos. Por otro lado, el frío ralentiza la actividad metabólica del fruto y retrasa su entrada en senescencia, ayudando así a mantener la resistencia natural del fruto a la infección.

A pesar de los sistemas físicos descritos brevemente con anterioridad, que deben ser utilizados junto con la refrigeración frigorífica, el almacenamiento exclusivo a baja temperatura, alta humedad y ventilación adecuada es el sistema universal adoptado a nivel comercial siempre que se pretende retrasar considerablemente la llegada de los frutos cítricos a los mercados. Las condiciones recomendadas son muy variables, pero en general pueden situarse en 90-95% de humedad relativa y 3-5°C para las naranjas (Kader y Arpaia, 2002). Las temperaturas inferiores a los 3°C y superiores al punto de

congelación, pueden provocar daños por frío. Los limones, sin embargo, presentan una susceptibilidad al frío mucho mayor que las naranjas, por lo que deben ser conservados a una temperatura superior a unos 13°C, dependiendo de la variedad, para evitar los daños ocasionados por la temperatura (Artés, 1987). A temperaturas bajas, el desarrollo de *Penicillium* spp. en el fruto se ve ralentizado pero no inhibido totalmente. Se trata de un efecto transitorio que solamente dura el tiempo que dura la exposición a las bajas temperaturas y que es superior para *P. digitatum* que para *P. italicum*. Mientras que a temperaturas ambientales *P. digitatum* crece más rápidamente que *P. italicum*, a temperaturas inferiores a 10°C ocurre lo contrario. La temperatura óptima de crecimiento es de 24°C para ambos patógenos (Whiteside *et al.*, 1993).

La conservación frigorífica de los cítricos en atmósfera controlada convencional (5-10% O₂ + 0-5% CO₂ para naranjas) no se ha generalizado porque las ventajas que proporciona respecto al alargamiento de la vida fisiológica del fruto no compensan los elevados costos de instalación y mantenimiento. El enriquecimiento de atmósferas controladas con monóxido de carbono (CO) al 5-10% tiene un efecto fungistático importante pero, al tratarse de un gas tóxico e inflamable, su uso requiere la implementación de medidas de seguridad caras que lo hacen inviable económicamente (Kader y Arpaia, 2002).

Las atmósferas controladas hipobáricas o de baja presión (75-175 mmHg) no ofrecen ventajas sustanciales respecto a las atmósferas controladas convencionales (Spalding y Reeder, 1976). Esta es una tecnología especialmente adecuada para alargar la vida útil de productos hortofrutícolas cortados en fresco, pero presenta el inconveniente principal del coste elevadísimo que supone su utilización y uso.

Otra técnica positiva para el control de las podredumbres y que no genera un coste adicional excesivo es la conservación frigorífica en atmósferas ozonizadas. Esta técnica presenta en la actualidad un gran interés en el sector citrícola español, ya que se puede generar una atmósfera ozonificada con la instalación de pequeños generadores de ozono que se acoplan fácilmente a las paredes de las cámaras frigoríficas. Sin embargo, se ha demostrado (que el ozono (O₃) gaseoso es incapaz de controlar infecciones de *P. digitatum* y *P. italicum* establecidas en la piel del fruto y, por tanto, en ningún caso puede considerarse un sustituto de los fungicidas aplicados en dréncher o en la línea de

confección Palou *et al.*, 2001a). Aunque se trata de un gas con un evidente poder fungicida debido a su elevada capacidad oxidante, únicamente actúa por contacto y, a concentraciones no fitotóxicas, este contacto no se produce cuando las estructuras fúngicas se desarrollan en el interior de la piel (Palou, 2005). No obstante, la ozonización continua o intermitente del ambiente de las cámaras inhibe de forma importante el crecimiento aéreo del micelio y la esporulación en cítricos conservados en frío, pudiéndose así reducir la carga de inóculo fúngico presente en los almacenes y también evitar la proliferación de cepas de *Penicillium* spp. resistentes a los fungicidas. Sin embargo, este efecto es solamente transitorio y los patógenos reanudan su crecimiento aéreo y esporulan cuando el ozono deja de estar presente en el ambiente (Harding, 1968; Palou *et al.*, 2001a).

4.4.2.2. Fungicidas de síntesis

Los primeros fungicidas que se utilizaron en los frutos cítricos, tras su recolección, datan de la década de 1950. Estos estaban limitados al bórax, carbonato sódico y ortofenilfenato sódico (SOPP). De estos, actualmente sólo se utiliza el SOPP, ya que presenta actividad casi exclusivamente sobre parásitos de heridas (*Penicillium* spp.), pero es ligeramente tóxico, y obliga a lavar los frutos tras su aplicación. En la siguiente década es, con la llegada del 2-aminobutano (2-AB) y, sobre todo, de los derivados del bencimidazol, cuando se inicia el avance en la aplicación de estas sustancias.

El 2-AB es un fungicida de gran especificidad sobre *Penicillium*. No impide la esporulación, no es fitotóxico y tiene una baja toxicidad sobre animales de sangre caliente. Se utilizaba antes de la desverdización y de la conservación frigorífica de los frutos cítricos (Agustí, 2000).

Dentro de los bencimidazoles, fungicidas sistémicos, el tiabendazol (TBZ) y el benomilo pueden penetrar a través de la cutícula y epidermis. Además, se han mostrado altamente eficaces sobre los hongos de herida, presentan gran actividad antiesporulante frente a *Penicillium* spp., y son muy poco tóxicos. A la vista de ello, no es extraño que su empleo se haya extendido por todos los países productores de cítricos para consumo en fresco y se hayan convertido en productos, prácticamente, insustituibles. A pesar de

ello, estos productos no controlan *Alternaria*, *Geotrichum* y *Phytophthora* (Agustí, 2000).

Los bencimidazoles son inhibidores de la multiplicación fúngica, actuando sobre la mitosis (Hutson y Miyamoto, 1998) y sobre el movimiento celular en la hifa fúngica (Tuset, 1987). Esta acción produce la desorganización de la estructura de la hifa y, de este modo, se paraliza el crecimiento de la misma (Tuset, 1987). Las concentraciones bajas de estos fungicidas inhiben la elongación del micelio y las altas actúan sobre la germinación de esporas (Barberá, 1989).

Los mejores resultados con estos productos se han obtenido cuando se aplican como suspensiones de agua. Su formulación en ceras y resinas determina problemas de resistencia a *Penicillium* spp.

En el grupo del imidazol, el imazalil es activo frente a *Penicillium* spp. y ligeramente eficaz contra *Alternaria* spp., *Botrytis* spp. y *Geotrichum* spp. Los imidazoles y triazoles pertenecen al grupo de fungicidas denominados “inhibidores de la biosíntesis del ergosterol”, un esteroide que está presente en las células de muchos hongos. Su acción tóxica la realizan en diversas etapas de la biosíntesis de este compuesto, lo que hace que los hongos tengan dificultades para desarrollar resistencias (Tuset, 1987). Dentro de este grupo, los triazoles pertenecen a los denominados retardadores del desarrollo del crecimiento vegetal, inhibiendo la síntesis de ácido giberélico en los meristemas subapicales, impidiendo de este modo el crecimiento a nivel de tallos y ramas de las plantas y potenciando el poder sumidero de otras partes de la planta (Hutson y Miyamoto, 1998).

El procloraz es muy similar al imazalil, aunque posee una menor penetración en la corteza, lo que le confiere una cierta actividad subcortical y, por ello, una fuerte acción antiesporulante. Es más activo que el imazalil frente a *Alternaria* spp. y *Geotrichum* spp., pero presenta una respuesta errática en el control de las infecciones profundas de *Penicillium* spp. En ambos casos, sus formulaciones como suspensiones en agua son las más eficaces (Agustí, 2000).

Del grupo de las diguanadinas, la guazatina es eficaz en el control de las infecciones incipientes de *Penicillium digitatum* y de *Geotrichum candidum*, pero es poco eficaz frente a *Penicillium italicum* y prácticamente nulo en el control de *Alternaria* spp. y *Collectotrichum* spp. De él, solo son eficaces las suspensiones en agua (Tuset, 1987).

El modo de acción de muchos tipos de fungicidas no es todavía muy bien conocido, pero parecen actuar en lugares muy específicos de las células fúngicas. Esta característica puede estar íntimamente relacionada con el desarrollo de resistencias por parte de los patógenos, lo que a menudo es un serio problema para los nuevos fungicidas específicos (Hutson y Miyamoto, 1998).

Las resistencias a los fungicidas en los tratamientos postcosecha de nuestros agrios es, desde hace varios años, una manifestación preocupante, debido a que las podredumbres se combaten con la aplicación masiva y continuada de productos tradicionales de síntesis, lo que ha generado la aparición, proliferación y dispersión de biotopos resistentes en las poblaciones de los patógenos de *Penicillium* (Wilson *et al.*, 1997; Viñas *et al.*, 2005). Los fungicidas de síntesis autorizados en la postcosecha de los cítricos que son utilizados corrientemente son: procloraz, miclobutanil, 2-fenilfenol, acetato de guazatina, imazalil, metiltiofanato, fosetil-al, pirimetanil, tiabendazol y las combinaciones autorizadas de algunos de ellos que pueden ser consultadas en el registro de productos fitosanitarios del Ministerio de Agricultura (<http://www.magrama.gob.es/>).

De entre ellos, los fungicidas más afectados por la aparición de resistencias son los derivados del benzimidazol (tiabendazol y benomilo) (Perucho y Tuset, 2002). El imazalil, fungicida derivado de los imidazoles de uso frecuente, tampoco escapa a este problema, de tal modo que, 10 años después de ser puesto en el mercado, ya se detectaron resistencias importantes (Martínez, 2007). También se ha constatado la presencia de numerosos aislados resistentes de *P. digitatum* y *P. italicum* expuestos continuamente a ortofenilfenol (2-fenilfenol). La proliferación de cepas resistentes al imazalil y al tiabendazol está siendo un problema cada vez más frecuente en España. En los últimos años, el porcentaje de aislados de *P. digitatum* resistentes al imazalil es del 30% (Bus *et al.*, 1991; citados por Viñas *et al.*, 2005). También se ha puesto de

manifiesto la presencia de aislados de las dos especies de *Penicillium* resistentes al tiabendazol en Cataluña (Palou *et al.*, 2001).

4.4.2.3. Substancias naturales de acción fungicida

Los aceites esenciales son un grupo de sustancias naturales que se están probando en experimentos científicos planeados desde la década de 1940 y están ofreciendo resultados prometedores para que puedan ser utilizados en el futuro en el marco de una Producción Integrada de cítricos. Estos aceites son compuestos, de tipo lipofílico, altamente volátiles y con fuertes propiedades aromáticas que son sintetizados y almacenados en determinados compartimentos y estructuras celulares. Presentan un importante papel en la protección de las plantas, ya que tienen propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas e insecticidas (Hernández, 2011).

En la actualidad se conoce la actividad antimicrobiana de muchos de estos aceites y se utilizan al menos en el industria alimentaria como inhibidores de microbiota bacteriana acompañante (Calvo y Shiva, 2003), pero son escasos los trabajos que estudian su mecanismo de acción y se desconoce este mecanismo en gran parte. Kurita *et al.* (1981) escanearon 40 compuestos de aceites esenciales contra siete especies de hongos y Singh *et al.* (1980) contra veintidós especies de hongos, incluyendo patógenos de plantas, llegando a poner de manifiesto una gran selectividad entre tipo de aceite y especie atacada. La actividad antifúngica de los aceites esenciales ha sido atribuida a fenoles monoterpénicos, especialmente el timol, carvacrol y eugenol (Isman, 2000); también al D-limoneno, cineol, α -pineno, β -pineno, β -mirceno y alcanfor (Barkai-Golan, 2001), o adicionalmente a p-anisaldehído y L-carvona. Sin embargo, existe cierta especificidad entre ellos, L-carvona es efectiva contra *B. cinerea*, pero no contra *Penicillium* sp. (Palou *et al.*, 2001). Los extractos de aceites de tomillo (Cayuela y García, 2007; Martínez, 2007) y enebro (Martínez, 2007) también han mostrado su eficacia para controlar las especies de *Penicillium* patógenas de los agrios.

Aunque, por lo argumentado anteriormente, no es un tema actual que los aceites esenciales sean reconocidos como portadores de compuestos fungitóxicos, no se han utilizado todavía como tratamientos fungicidas en postcosecha principalmente por carencia de estudios científicos sobre el tema, pero también porque la industria

encuentra más fácil patentar y proteger nuevos compuestos sintéticos que productos naturales de las plantas (Wilson *et al.*, 1997). Sin embargo, se está utilizando un formulado a base de aceites esenciales de romero como un fungicida de amplio espectro en cultivos y el aceite de clavo se usa comercialmente como herbicida, inhibidor de la brotación de la patata y fungicida (Hall y Fernández, 2004). Los aceites de tomillo rojo (*Thymus zygis* L.) son utilizados en España como fungicidas y repelente natural con acción preventiva y curativa en agricultura ecológica (De Liñán, 2006).

Los aceites esenciales de clavo y canela presentan una elevada actividad microbiana contra mohos, levaduras y bacterias patógenas como *Bacillus anthracis* (Davidson, 1997). Otras especies bacterianas afectadas son: *Escherichia coli*, *Enterobacter faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, entre otras muchas especies (Hernández, 2011). Estos aceites, especialmente el de clavo, presentan actividad antifúngica contra las especies de *Penicillium* aisladas del aire (Pinheiro *et al.*, 2011). El aceite de clavo es eficaz contra especies de *Alternaria*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Septoria* y *Penicillium digitatum*, mientras que los aceites de canela son efectivos contra *Fusarium moniliforme* (Hall y Fernández, 2004) y varias especies de *Penicillium* (Davidson, 1997; Yigit *et al.*, 2000). Estos aceites poseen también actividad antifúngica contra *Aspergillus* sp. (Llewellyn *et al.*, 1981; Kim *et al.*, 1995). El aceite de clavo inhibe el desarrollo de *Aspergillus niger* (Hernández, 2011) y se consideran compatibles con las frutas y sus derivados (Kim *et al.*, 1995). El aceite esencial mayoritario del clavo es eugenol, derivado fenólico con propiedades medicinales, antimicrobianas y antifúngicas. El aceite de clavo contiene este compuesto entre aproximadamente 50 y 98% de la composición total de aceites esenciales. El eugenol está presente en otras plantas también, pero no a tan elevada proporción. El aceite esencial de canela contiene un 8% de eugenol y es rico en cinamaldehído (Davidson, 1997; Martínez, 2012). Su actividad antifúngica es debida a la acción sobre la membrana celular, provocando la desestabilización de la misma e induciendo a la muerte celular (Hernández, 2011). Otros aceites con acción antifúngica que contiene el aceite de clavo es el β -cariofileno, α -humuleno y acetato de eugenol, mientras que el de canela es rico en cinamaldehído. Entre otros, también se han identificado los siguientes compuestos antifúngicos presentes en los aceites de clavo y canela: timol, alcanfor, limoneno, carvacrol (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

Otros compuestos de interés que no están relacionados directamente con los aceites esenciales y que son componentes naturales del flavedo de los frutos cítricos, ya sean preformados o inducidos (fitoalexinas), también presentan actividad antifúngica. Entre ellos destacan algunos terpenos como el citral y cumarinas como la limetina, la escoparona o la escopoletina. La actividad de todos estos compuestos naturales disminuye sensiblemente a medida que el fruto envejece. Algunos se han conseguido sintetizar artificialmente e incluso utilizar como tratamientos fungicidas, aunque aún no a escala comercial. Ciertos compuestos aromáticos volátiles que se producen durante la maduración de algunos frutos, como el aceacetaldehído hexanal o el benzaldehído, también presentan actividad antifúngica (Palou, 2007).

4.4.2.4. Control biológico

El control, con el empleo de agentes microbianos antagonistas (bacterias y hongos) es una prometedora alternativa al uso de los fungicidas. Aún en sus comienzos y, especialmente, en los cítricos su uso está muy poco extendido. Este tipo de control pretende reducir el inóculo fúngico depositado en la corteza de los frutos mediante la actividad biológica (por competencia, producción de antibióticos o lisis enzimática) desarrollada por el agente antagonista en las inmediaciones del hongo patógeno. Los animadores de este tipo de lucha la consideran ventajosa respecto a otros sistemas porque, según ellos, los antagonistas son (Tuset, 1999):

- Más seguros (en el sentido de fiabilidad) al no acumularse en los alimentos,
- Más persistentes que los fungicidas,
- Más suaves en la rotura del balance ecológico, al no incidir en los enemigos naturales.
- Comparables en eficiencia con los fungicidas.

De hecho, con resultados atractivos en el control, especialmente de *Penicillium* spp., diferentes especies bacterianas de los géneros *Pseudomonas* (*P. cepacia*, *P. fluorescens*, *P. syringae*) y *Bacillus* (*B. subtilis*) y de las levaduras *Pichia guilliermondii* y *Candida oleophila* (Aspire), entre otras, han sido empleadas en pequeños ensayos semi-comerciales y también, como *C. oleophila*, en almacenes en plena campaña.

Es conveniente saber que un microorganismo que va a ser empleado como antagonista en postcosecha, debe tener como mínimo las siguientes características (Tuset, 1999):

- Ser genéticamente estable.
- Efectivo a bajas concentraciones y contra un amplio número de patógenos.
- No ser él, ni sus posibles metabolitos, perjudiciales para el hombre.
- Compatible con los procesos comerciales (encerado, espumado, etc.)
- No patógenos de los frutos.

Esto que debe ser siempre respetado, conlleva obstáculos biológicos y económicos importantes. Es imprescindible conocer muy bien los mecanismos que utiliza el agente antagonista, los metabolitos originados, y su capacidad patógena (tanto para los animales de sangre caliente como para los vegetales), su estabilidad genética durante mucho tiempo (años) y lo que creemos es más interesante, su eficacia sobre los diferentes patógenos que aquejan a los cítricos durante su comercialización. Pues no podemos olvidar que un antagonista es como un “fungicida animado” con el “peligro” de ser transformado por el ambiente ecológico. Si se cumple lo indicado el mercado potencial de los antagonistas es considerable, pero hoy todavía se necesitan programas de investigación y desarrollo cualificados y de larga duración para lograr agentes con suficiente garantía para ser empleados en la post-recolección de los agrios. El consumidor aún no está preparado para la idea de que en la superficie del fruto que va degustar existe una capa más o menos tupida compuesta por un microorganismo vivo que teóricamente la está protegiendo de otros. No obstante el futuro, con toda la investigación por delante, decidirá.

4.4.2.5. Potenciación de las defensas naturales de los frutos

En general, las plantas se defienden de los patógenos por la combinación de dos tipos de defensa: una defensa estructural, que actúa como barrera física e inhibe la entrada y proliferación del patógeno, y una defensa bioquímica, que produce sustancias

que son directamente tóxicas para el patógeno o crean condiciones para inhibir su crecimiento.

La actuación conjunta de los mecanismos de respuesta de las plantas a patógenos requiere de una precisa regulación mediada por la presencia de diferentes moléculas señalizadoras vegetales. El ácido jasmónico y el ácido abscísico son compuestos reguladores de las plantas que participan en numerosas respuestas de defensa.

El ácido salicílico (SA) (ácido 2-hidroxibenzoico) es una hormona que tiene un papel importante en la activación de respuestas de la planta frente al ataque de patógenos (Dempsey *et al.*, 1999). Los mecanismos por los cuales el SA actúa en las plantas son variados y pueden suponer alteraciones en la síntesis y actividad de algunas enzimas, aumento en la expresión de genes de defensa, potenciación de varias respuestas de defensa y/o generación de radicales libres. Mediante el empleo de plantas mutantes ha sido posible el aislamiento de genes implicados en las rutas de defensa mediadas por SA (Dempsey *et al.*, 1999).

Distintas plantas y animales pueden producir péptidos antimicrobianos como parte de sus mecanismos naturales de defensa. Algunas de estas proteínas como el hexapéptido PAF19, sintetizado en el IATA de Valencia, o las proteínas quitinasa y β -1,3-glucanasa, biosintetizadas por el fruto como respuesta a un tratamiento estresante han mostrado capacidad inhibidora de la podredumbre verde de los cítricos. La proteína Harpin (Messenger[®]), aislada a partir de la bacteria patógena *Erwinia amylovora*, se ha ensayado como sustancia inductora de resistencia a patógenos postcosecha. El ácido jasmónico y el metil-jasmonato, conocidos conjuntamente como jasmonatos, son reguladores naturales del crecimiento con capacidad inhibidora de la podredumbre verde de los cítricos. El quitosano, un polímero de la β -1,4-glucosamina que se obtiene por deacetilación de la quitina del exoesqueleto de los artrópodos y que también es un componente estructural de la pared celular de algunos hongos, y su derivado el glicolquitosano, también presentan actividad antifúngica contra distintos patógenos de postcosecha (Palou, 2007).

CAPÍTULO 5.

Estudio de la capacidad fungistática del gel de Aloe vera y de los extractos de aceites esenciales de cilantro, comino, clavo y canela sobre el desarrollo in vitro de distintos aislados de P. digitatum y P. italicum

5.1. Introducción

En los capítulos anteriores, se ha puesto de manifiesto la importancia que tienen los hongos *Penicillium digitatum* y *P. italicum* en la infección y colonización de los frutos cítricos y las considerables pérdidas que producen en el sector citrícola español. También se argumentó que estos patógenos son de herida, es decir, no pueden provocar infección a través de la superficie intacta del flavedo.

Cualquier accidente climático o alteración fisiológica que cause daños en la superficie del fruto contribuye a aumentar su susceptibilidad a las podredumbres verde y azul durante la post-recolección. En nuestros cítricos, el aumento experimentado desde hace una decena de años por las diferentes dermatosis o manchas de los frutos durante su periodo de madurez, de origen variable, los predispone a los hongos, especialmente a *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Botrytis cinerea*. Estos micromicetos se instalan en las zonas de la corteza alteradas donde encuentran las condiciones más favorables para las etapas de la germinación de los conidios y de la infección. El podrido de los frutos, por consiguiente, está prácticamente asegurado especialmente en los meses de marzo y abril.

Tradicionalmente, se están utilizando en los almacenes citrícolas españoles diversos tipos de fungicidas que ya se han comentado en los apartados anteriores. Sin embargo, como propuesta general, y posiblemente la más importante en la producción integrada, el control de las plagas y enfermedades se debe conducir al menor uso de los medios químicos (productos antiparasitarios) potenciando los métodos culturales, biológicos, biotécnicos y físicos. La producción integrada pretende que la actividad agrícola tiene que ser siempre respetuosa con el medio ambiente, sin menoscabo de su rentabilidad.

Ahora bien, como la tendencia es firme hacia este modelo de producción agrícola y ésta debe permitir una rentabilidad con la obtención de un producto de calidad, el control de los patógenos fúngicos más activos en post-recolección debe de ser priorizado y además con resultados positivos. Para ello es necesario realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* con los principales patógenos que actúan en postcosecha empleando

nuevas sustancias naturales, como son los aceites esenciales, que nos permitan mejorar toda la parte del control, reduciendo los residuos y disminuyendo el posible impacto ambiental.

Los aceites esenciales son un grupo de sustancias naturales que se están probando en experimentos científicos planeados desde la década de 1940 y están ofreciendo resultados prometedores para que puedan ser utilizados en el futuro en el marco de una Producción Integrada de cítricos. Estos aceites son compuestos, de tipo lipofílico, altamente volátiles y con fuertes propiedades aromáticas que son sintetizados y almacenados en determinados compartimentos y estructuras celulares. Presentan un importante papel en la protección de las plantas, ya que tienen propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas e insecticidas (Hernández, 2011).

Muchas especias y hierbas exhiben actividad antimicrobiana; entre las usadas en alimentos se encuentran por ejemplo el apio, cilantro, laurel, almendra, albahaca, café, angélica, puerro, rábano picante, hierbabuena, tomillo, etc. El primer reporte del uso de las especias como conservadores se remonta a unos 1.550 años a.c., cuando los antiguos egipcios las empleaban para conservar alimentos y embalsamar a los muertos (Davidson, 2001). Ciertas especias inhiben el crecimiento de microorganismos, como canela, clavo y mostaza con gran poder conservante. O también pimienta, laurel, cilantro, comino, orégano, romero, salvia y tomillo, que tienen actividad intermedia. La función conservadora se debe a los aceites esenciales, en cuya composición poseen compuestos tipo eugenol o aldehído cinámico con poder antimicrobiano. También presentan actividad antimicrobiana las oleorresinas de estas especias. La aplicación de aceites esenciales provenientes de orégano, cilantro (*Coriandrum sativum* L.) y tomillo, entre otros, se ha estudiado para controlar en tomate a los hongos incidentes en postcosecha, *R. stolonifer*, *B. cinerea*, *Alternaria arborescens* Simmons y *Geotrichum candidum* Link. Los resultados han sido variables, en función del hongo y del tipo de extracto evaluado.

En el caso del aceite esencial de comino, se observó que *E. coli* y *S. typhimurium* tuvieron valores de 750 mg/L de concentración mínima inhibitoria. Se ha

atribuido la actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino al alto nivel de cuminaldehído, así como a otros compuestos minoritarios presentes como β -pineno, limoneno y α -pineno.

Los aceites esenciales de clavo y canela presentan una elevada actividad microbiana contra mohos, levaduras y bacterias patógenas como *Bacillus anthracis* (Davidson, 1997). Estos aceites, especialmente el de clavo, presentan actividad antifúngica contra las especies de *Penicillium* aisladas del aire (Pinheiro *et al.*, 2011). El aceite de clavo es eficaz contra especies de *Alternaria*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Septoria* y *Penicillium digitatum*, mientras que los aceites de canela son efectivos contra *Fusarium moniliforme* (Hall y Fernández, 2004) y varias especies de *Penicillium* (Davidson, 1997; Yigit *et al.*, 2000). Estos aceites poseen también actividad antifúngica contra *Aspergillus* sp. (Llewellyn *et al.*, 1981; Kim *et al.*, 1995).

Un nuevo extracto con potentes propiedades antifúngicas es el extracto obtenido a partir de *Aloe vera* L., que se ha encontrado que tiene actividad antifúngica contra cuatro patógenos de postcosecha comunes: *Penicillium digitatum*, *P. expansum*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* (Barkai-Golan, 2001). Otros estudios con extractos de *Aloe vera* L. también resultaron positivos al inhibir la germinación de esporas de *B. cinerea* en 95% y el crecimiento micelial en 68%.

En general los plaguicidas de origen vegetal son biodegradados a productos no tóxicos y de baja persistencia, por lo tanto no presentan efectos negativos para el medio ambiente y desaparecen después de cumplir su función sin llegar a la cadena alimenticia del hombre, además estas sustancias suelen ser activas con lo que es muy recomendable su uso como agentes de control de enfermedades (Sung-Eun y *et al.*, 2001).

En definitiva, el objetivo fundamental de este estudio ha sido evaluar la capacidad fungistática del gel de *Aloe vera* y de los extractos de aceites esenciales de cilantro, comino, clavo y canela sobre el desarrollo *in vitro* de distintos aislados de *P. digitatum* y *P. italicum* con el fin de chequear el efecto de las sustancias antifúngicas presentes en estos preparados en un primer experimento de escrutinio y de poner de

manifiesto la posible variabilidad de la respuesta de los diferentes aislados dentro de la misma especie a estas sustancias. De este modo, las sustancias que, después de este estudio, presenten mayor poder fungistático o fungicida serán seleccionadas para un estudio más profundo en el siguiente apartado (Cap. 6).

Tabla 5.1. Lista de plantas usadas como saborizantes que poseen actividad antimicrobiana.

Fuente: López-Malo (1995).

Ajedrea (Savoir)
Ajo(Garlic)
Albahaca(Basil)
Anís (Anise)
Azafrán (Saffron)
Canela (Cinnamon)
Cardamomo(Cardamos)
Cebollinos (Chives)
Cilantro (coriander)
Calvo (Clove)
Comino(Cumin)
Curcuma(Turmeric)
Eneldo(Dill)
Estragon (Tarragon)
Hinojo(Fennel)
Jengibre(Ginger)
Laurel (Bay)
Macis (Mace)
Mejorana(Marjoram)
Menta (Mint)
Mostaza (Mustad)
Nuez moscada (Nutmeg)
Perejil(Parsley)
Perifollo (Chervill)
Pimienta (Pepper)
Pimienta de cayena (Red pepper)
Pimienta de Jamaica (Alispice)
Pimentón (Páprika)
Romero (Rosemary)
Salvia (Sage)
Semilla de apio (Clery seed)
Te limón (Lemosngrass)
Tomillo (Thyme)
Vainilla (Vanilla)

La tabla 5.1 muestra una lista de plantas utilizadas como saborizantes y que también poseen actividad antimicrobiana.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Material experimental y tratamientos

Previo a la realización de las experiencias *in vitro* del presente capítulo, se capturaron dos aislados de *P. digitatum*, uno obtenido de un fruto de limón (*Citrus limon* (L.) Burm. var. Fino), el cual presentaba una podredumbre verde, y otro de un fruto de mandarina (*Citrus deliciosa* Ten.) con el mismo tipo de podredumbre. Se procedió del mismo modo con dos aislados de *P. italicum*. Las muestras se recogieron en la cooperativa El Limonar de Santomera, a partir de los frutos de destrío del día 25 de Octubre de 2011. Esos frutos de destrío provenían de unos huertos de limoneros y de mandarinos de localización próxima a la cooperativa, es decir, en los campos de Santomera (Murcia). Se recogieron varias muestras de cada tipo de fruto y podredumbre y se transportaron el mismo día en coche particular hasta el laboratorio de patología vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena. El aislamiento se realizó inmediatamente a partir de un único fruto de cada una de las podredumbres en una cabina de flujo laminar, utilizando para ello un medio de cultivo sintético de agar de patata y dextrosa (PDA. Scharlab®. Barcelona). Las placas se incubaron a 26°C hasta el desarrollo completo de los hongos. Posteriormente se procedió a purificar los aislados de *P. digitatum* y *P. italicum* eliminando de forma aséptica una pequeña porción cuadrada (aproximadamente de 2x2 mm) justo del margen de la colonia del micelio desarrollado y colocándolo sobre otra placa que contenía PDA.

Posteriormente se hizo un cultivo de conidios de cada uno de los cuatro aislados tocando con un asa de cultivo la masa conidiógena de cada uno de ellos y haciendo diluciones sucesivas en agua destilada esterilizada con tween 80 (0,01%) hasta la 10⁻⁶. Se hicieron siembras en PDA (0,2 mL de la dilución sobre una placa conteniendo PDA solidificado y extensión posterior con el asa de siembra de punta redonda para dispersar el inóculo sobre el medio, es el denominado método de la extensión de aislamiento de microorganismos). De este modo se obtuvieron colonias aisladas obtenidas a partir de un conidio (cultivo monospórico). Por medio de este procedimiento se pudo comprobar la presencia de colonias de *P. italicum* en los aislados de *P. digitatum* y viceversa. Esto

pone de manifiesto lo que se ha sugerido en la bibliografía en varias ocasiones, que en la naturaleza las dos especies conviven juntas y predomina una sobre otra, dependiendo de las condiciones y otros factores desconocidos.

La purificación completa de los aislados se logró a partir de los cultivos monospóricos tras siembra de una pequeña porción de micelio de una colonia seleccionada por el color en otra placa conteniendo PDA. De esta manera se obtuvieron los cultivos origen a partir de los cuales se hicieron las siembras para cada uno de los experimentos realizados con los extractos de aceites esenciales.

Los aislados y las podredumbres fueron identificados de acuerdo con Tuset (1987) y por medio de la PCR descrita en el capítulo anterior. Los aislados sobre PDA se conservaron en frigorífico doméstico para su conservación y uso posterior (cultivos originales). En las Figuras 5.1. y 5.2. se muestran fotografías de frutos de limón y mandarina obtenidos de El Limonar de Santomera y del aspecto de estos hongos creciendo en placas de Petri, respectivamente. Antes de proceder a su uso para las pruebas realizadas en el presente trabajo se realizaron subcultivos con idéntica forma de proceder.



Figura 5.1. (a) Fruto de limón afectado por podredumbre verde y (b) Fruto de mandarina afectado por podredumbre azul.

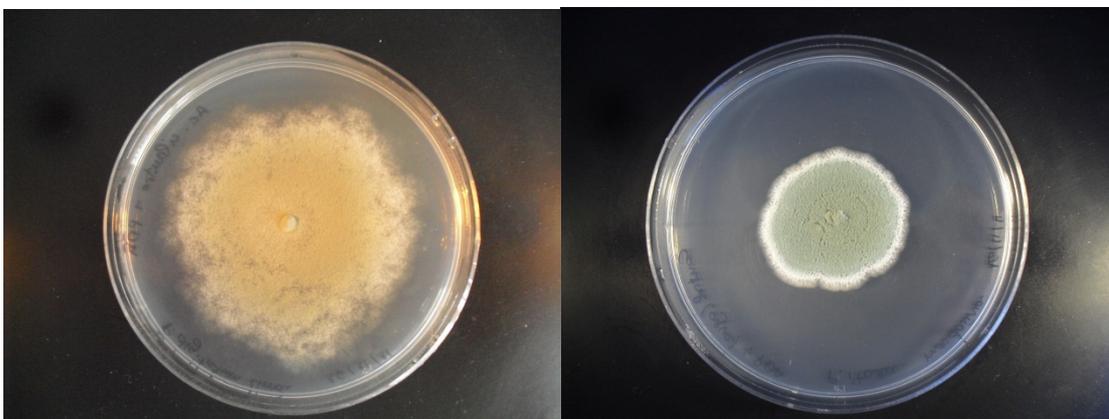


Figura 5.2. (a) Aislado de *Penicillium digitatum* y (b) Aislado de *Penicillium italicum*.

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

- Testigo (T1). Contiene 19 mL de medio de cultivo PDA en la placa de Petri con 1 mL de agua destilada esterilizada.
- Aloe vera (T2). 19 mL de medio de cultivo PDA en una placa de Petri más 1 mL de gel de *Aloe vera* (Activaloe[®], Alborote, Granada) a una concentración de 500 $\mu\text{L/L}$ (equivalente a 500 μL de gel en 1 L de medio de cultivo). La dosis correspondiente es de 10 $\mu\text{L/placa Petri}$.
- Cilantro (T3). 19 mL de medio de cultivo PDA en una placa de Petri más 1 mL de extracto de aceites esenciales de cilantro (Mondeconatur[®], Barcelona) a una concentración de 500 $\mu\text{L/L}$ (equivalente a 500 μL de extracto de aceites esenciales de cilantro en 1 L de medio de cultivo). La dosis correspondiente es de 10 $\mu\text{L/placa Petri}$.
- Comino (T4). 19 mL de medio de cultivo PDA en una placa de Petri más 1 mL de extracto de aceites esenciales de comino (Esencial'arôms[®]), a una concentración de 500 $\mu\text{L/L}$ (equivalente a 500 μL de extracto de aceites esenciales de comino en 1 L de medio de cultivo). La dosis correspondiente es de 10 $\mu\text{L/placa Petri}$.

- Clavo (T4). 19 mL de medio de cultivo PDA en una placa de Petri más 1 mL de extracto de aceites esenciales de clavo (Herbarom[®]), a una concentración de 500 μ L/L (equivalente a 500 μ L de extracto de aceites esenciales de clavo en 1 L de medio de cultivo). La dosis correspondiente es de 10 μ L/placa Petri.
- Canela (T4). 19 mL de medio de cultivo PDA en una placa de Petri más 1 mL de extracto de aceites esenciales de canela (Herbarom[®]), a una concentración de 500 μ L/L (equivalente a 500 μ L de extracto de aceites esenciales de canela en 1 L de medio de cultivo). La dosis correspondiente es de 10 μ L/placa Petri.

La concentración de 500 μ L/L (dosis correspondiente de 10 μ L/placa Petri) se escogió para evaluar el efecto de los extractos de aceites esenciales y de gel de *Aloe vera* porque, de acuerdo con la bibliografía, es habitualmente utilizada para este tipo de compuestos cuando se estudian sus efectos antimicrobianos y antimicóticos.

5.2.2. Unidad de observación y número de repeticiones

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

La experiencia comenzó el día 25 de octubre de 2011, y se extendió hasta el día 23 de noviembre de 2011, cuando la colonia transferida del hongo estaba próxima del borde de la placa de crecimiento. Para cada tratamiento se utilizó una única dosis y el tratamiento testigo tuvo ausencia de cualquier sustancia inhibidora. En el tratamiento con gel de *Aloe vera* y extractos de aceites esenciales de cilantro, comino, clavo y canela la concentración empleada fue 500 μ L/L (dosis correspondiente de 10 μ L/placa Petri).

Para el tratamiento testigo se utilizaron 12 placas de Petri, 3 placas fueron para *P. digitatum* aislado de limón, otras 3 para *P. digitatum* aislado de mandarina, y lo mismo para *P. italicum* (3 para el aislado de limón y 3 para el aislado de mandarina). Para los tratamientos con *Aloe vera* y extractos de aceites esenciales de cilantro, comino, clavo y canela se utilizaron en total 60 placas de Petri: 15 para cada uno de los cuatro aislados. De estas 15 placas por hongo, se diferenciaron cinco grupos de 3 placas

Petri cada uno, para cada tratamiento. Es decir, se utilizaron 3 repeticiones por tratamiento y dosis que tuvieron valor de réplica. La unidad de observación o unidad experimental en este caso correspondía a una placa Petri, es decir, el lugar o recinto donde crece cada colonia individual de cada aislado bajo los efectos de los tratamientos. Cada una de ellas es independiente, pero las variables relacionadas con el crecimiento y tasa de crecimiento se miden sobre las mismas unidades de observación en función del tiempo.

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

5.2.3. Definición, tipo y clasificación de las variables

Las variables consideradas para valorar el efecto del gel de *Aloe vera* y los extractos de aceites esenciales sobre cada uno de los aislados se definen a continuación:

Área de crecimiento de la colonia (cm²). Representa el área de la colonia desarrollada medida a intervalos diarios sobre la misma colonia (medidas repetidas). Esta medida se realiza generalmente como el diámetro de la colonia, pero consideramos que el diámetro de una colonia no caracteriza totalmente el crecimiento en los casos en los que la colonia no tiene un hábito de crecimiento totalmente circular. Si bien, *P. digitatum* crece casi como un círculo perfecto, *P. italicum* presenta figuras irregulares en su crecimiento, probablemente porque mientras la colonia está creciendo se dispersan conidios formados que germinan y los nuevos micelios se unen al micelio principal. En algunos casos no es fácil distinguir este proceso. La medición del área de la colonia se realizó, previa calibración con el diámetro de la placa Petri, con fotografía digital de ésta y posterior análisis en el software Image Tool for Windows, versión 3.0 (Texas,

EE.UU.). Esta variable es de tipo cuantitativa continua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

Tasa de crecimiento (cm²/día). Es el grado (velocidad) de crecimiento del hongo medido en su fase lineal de crecimiento cuando se desarrolla en un medio de cultivo sólido. La fase lineal de crecimiento es la fase en la que el hongo crece a pleno rendimiento una vez ha pasado la fase exponencial que suele durar solamente unas pocas horas y antes de entrar en la fase estacionaria donde la velocidad de crecimiento disminuye.

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

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

donde,

μ : Tasa de crecimiento (cm²/día),

$A_{(t+1)}$: Área de la colonia un día determinado (cm²),

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

t + 1 : Un día determinado (días) y,

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

En el presente trabajo, se ha calculado la tasa de crecimiento aplicando la ecuación anterior, generalmente entre los días 2 y 7, cuando de acuerdo con los gráficos obtenidos no había duda de que el hongo se encontraba en la fase lineal de crecimiento.

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

Duración de la fase lineal (días). Esta variable representa los días transcurridos entre el final de la fase exponencial (generalmente la fase de latencia, ya que la 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, detectando la zona lineal visualmente en el gráfico. Es una variable de tipo cuantitativa discontinua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

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

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

donde,

$A_{control}$: Área media de la colonia del tratamiento testigo (cm²),

A : Área media de la colonia del tratamiento con una concentración determinada de aceite esencial de canela o clavo (cm²).

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

5.2.4. Establecimiento de las hipótesis

Una hipótesis es una idea basada en un conjunto de conocimientos plausibles acerca de un problema o pregunta, por su naturaleza se trata de una conjetura o idea acerca de la posible relación entre dos o más fenómenos observables o variables. Una hipótesis estadística es una presunción acerca de parámetros de una población y el test estadístico de la hipótesis es la utilización de datos procedentes de una muestra para

asumir o rechazar una presunción acerca de la población. Las hipótesis definen las características del plan de trabajo a desarrollar y el tipo de test estadístico que ha de ser utilizado para su aceptación o rechazo.

En el primer punto del presente capítulo se ha estudiado y puesto de manifiesto que ciertos extractos de aceites esenciales y el gel de *Aloe vera* pueden influir en el crecimiento y desarrollo de ciertos hongos. Los experimentos que se van a desarrollar a continuación están planeados para poner de manifiesto ese posible efecto y poder medirlo sobre dos aislados de *P. digitatum* y otros dos de *P. italicum* aislados de diferentes frutos de especies cítricas distintas. Con esto último se pretende poner de manifiesto si la respuesta depende del aislado.

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

1. Los aceites esenciales de cilantro, comino, clavo y canela, y el gel de *Aloe vera* ejercen influencia sobre el crecimiento *in vitro* de los hongos *P. digitatum* y *P. italicum*.
2. Los aislados de hongos patógenos obtenidos de distintas especies de frutos cítricos (mandarina y limón), responden de manera distintas a los microbianos utilizados.

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

5.2.5. Análisis estadístico

Dado que las hipótesis que se quieren contrastar, definen las características del plan de trabajo que se quiere trazar, hay que tener en cuenta que una de las hipótesis planteadas incluye el efecto del aislado sobre la respuesta que tienen las sustancias

retardadoras sobre su crecimiento. Evidentemente sólo partimos de dos aislados distintos por hongo para cada una de las dos especies fúngicas estudiadas; si bien, son bastantes significativos porque se obtuvieron de diferentes especies de frutos (limón y mandarina), hecho que puede aumentar la posible variabilidad entre los aislados. Esto significa que el alcance de las conclusiones no va a ser crucial a la hora de caracterizar a la población de aislados de *Penicillium* de los cítricos. Es por ello, por lo que se ha optado a realizar un análisis básico de los datos utilizando para ellos los estadísticos de la media aritmética como medida de centralización y la desviación estándar como medida de la dispersión. La utilización del ANOVA o análisis de la varianza se ha evitado fundamentalmente porque el tamaño de la muestra no es elevado ($n=3$) y la falta del concepto réplica como tal que permitiría poner de manifiesto diferencias significativas cuando no las hay. El error se minimiza también, dado que las medidas de las áreas se tomaron de las mismas colonias en función del tiempo, es decir, es un caso de diseño de medidas repetidas. En este caso se requeriría otro tipo de análisis ANOVA, el denominado ANOVA de medidas repetidas.

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

5.2.6. Protocolo de las mediciones

Primeramente se preparó el medio de cultivo de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Después de su esterilización en autoclave, se dejó reposar en un baño termostático a 48°C. Las placas de Petri se rotularon y dispusieron para agregar 1 mL de la emulsión a valorar convenientemente diluida en agua destilada esterilizada con tween 80 (0,01%) para aumentar la dispersión de los aceites lipofílicos en el medio de cultivo, que es hidrofílico. Al tratamiento testigo se agregó 1 mL de agua destilada esterilizada para que presentara la misma cantidad de medio de cultivo que presentaban las placas con sustancias a tratar. Una vez que cada placa tenía 1 mL del compuesto correspondiente, 10 μ L de extracto de aceites o de gel de *Aloe vera*, se procedió a rellenar las placas con 19 mL de medio de cultivo a 48°C. Las placas se movieron

cuidadosamente en cruz y en giros alternos para homogenizar la emulsión con el medio de cultivo en toda la placa. Los extractos de aceites esenciales y el gel de *Aloe vera* no se esterilizaron para evitar la desnaturalización de compuestos decisivos. Previamente comprobamos que no crecían bacterias ni hongos a partir de los extractos, probablemente porque ya venían esterilizados de fábrica o que se inactivaron todas las células de microorganismos presentes por la alta concentración de compuestos antimicrobianos presentes en los extractos puros.

Las placas se dejaron reposar no menos de 15 horas dentro de la cabina de flujo para proceder a la inoculación del hongo anteriormente purificado y aislado. Para ello se partió de cultivos de los diferentes aislados realizados a partir de los aislados iniciales de los frutos o de las placas origen que se conservaban en el frigorífico. Entonces se depositó una pequeña porción de cultivo del hongo cortada asépticamente del borde de la colonia crecida de cinco días a 26°C con un bisturí en el centro de la placa nueva (subcultivo). Todo este procedimiento se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar, para asegurar la máxima asepsia en el trabajo, y después se depositaron las placas en la incubadora a 26°C durante los días necesarios hasta que el tratamiento testigo creció cerca del borde de la placa. Las placas se sacaban de la incubadora por pocos minutos para apuntar las observaciones y medir el tamaño de la colonia (proceso rápido porque se hizo con un montaje fotográfico). Para llevar a cabo la toma de medidas, se midió el tamaño de cada colonia, los días dos y siete del experimento, tomando fotos para luego medir el área con el programa informático Image Tool 3.0.

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

5.3. Resultados y discusión

En la Figura 5.3. se aprecia el crecimiento de *Penicillium digitatum* aislado de la podredumbre de limón en placas tratadas con 500 µL/L de gel de *Aloe vera*, y los extractos de aceites esenciales de cilantro, comino, clavo y canela (500 µL/L).

El mayor grado de crecimiento se obtuvo con las placas tratadas con el extracto de cilantro, incluso éste fue superior a las tratadas con la solución testigo (agua destilada). Como se observa, el período de latencia o de adaptación del hongo fue de sólo dos días para la mayoría de los tratamientos. Sin embargo, en las placas tratadas con los extractos de clavo y canela no se observó crecimiento durante los días que duró el experimento; incluso estas placas se almacenaron por un tiempo prolongado y en ningún caso el hongo llegó a crecer. Esto indica que, a una dosis de 500 µL/L de estos aceites esenciales, el crecimiento de *P. digitatum* queda totalmente inhibido. Esto puede ser debido a que los aceites esenciales de clavo y canela presentan una elevada actividad antimicrobiana contra mohos, levaduras y bacterias patógenas como *Bacillus anthracis* (Davidson, 1997). Estos aceites, especialmente el de clavo, presentan actividad antifúngica contra las especies de *Penicillium* aisladas del aire (Pinheiro *et al.*, 2011). Los aceites de canela también son efectivos contra varias especies de *Penicillium* (Davidson, 1997; Yigit *et al.*, 2000).

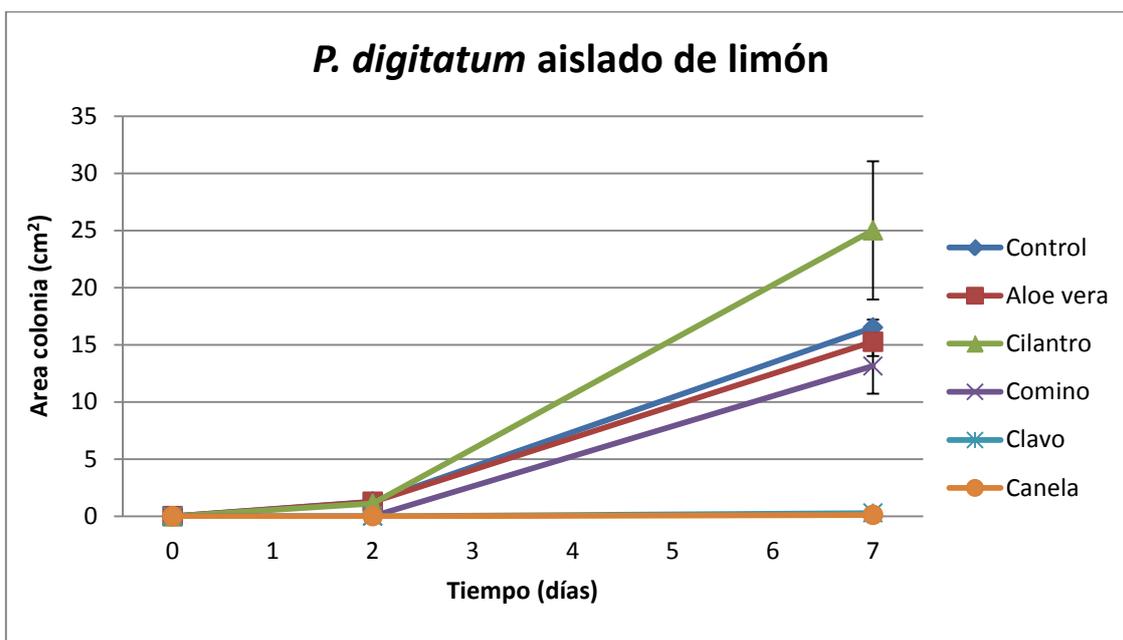


Figura 5.3. Efecto de 500 $\mu\text{L/L}$ de gel de *Aloe vera* y de aceites esenciales de cilantro, comino, clavo y canela sobre el crecimiento de *P. digitatum* aislado de limón. Las barras verticales son la desviación estándar.

En la Tabla 5.2 se muestra la tasa de crecimiento del hongo para cada tratamiento que, como tal tasa, indica la velocidad de crecimiento del hongo durante su fase de crecimiento lineal. También incluye la duración de la fase lineal de crecimiento, expresada en días, y la inhibición del crecimiento en relación al tratamiento testigo, expresada en porcentaje. Esta última sólo se calculó para aquellos tratamientos en los que se observó inhibición o reducción del crecimiento de *P. digitatum*.

Tabla 5.2. Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de *P. digitatum* aislado de limón para los diferentes tratamientos utilizados a base de 500 $\mu\text{L/L}$ de gel de *Aloe vera* y extractos de distintos aceites esenciales.

TRATAMIENTO	TASA DE CRECIMIENTO ($\text{cm}^2/\text{día}$)	DURACIÓN FASE LINEAL (días)	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)
CONTROL	3,04±0,08	5±0	
ALOE VERA	2,80±0,22	5±0	8
CILANTRO	4,78±1,16	5±0	
COMINO	2,63±0,48	5±0	20
CLAVO	0,06±0,02	5±0	98
CANELA	0,02±0,03	5±0	99

Los resultados plasmados en la Tabla 5.2 revelan, como se ha comentado anteriormente, que el aceite esencial de cilantro no inhibió el crecimiento de *P. digitatum*, sino que lo estimuló, puesto que tuvo una tasa de crecimiento superior a la solución testigo (4,78 cm²/día frente a 3,04 cm²/día, respectivamente). La explicación a este efecto puede deberse a que los extractos de aceites esenciales de cilantro pueden contener ciertas sustancias favorecedoras del crecimiento que enmascaran el escaso efecto inhibitorio de las sustancias antimicrobianas que poseen. Los efectos del gel de *Aloe vera* sobre el desarrollo de *P. digitatum*, *P. expansum*, *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*.

Además, podemos observar que con el gel de *Aloe vera* el hongo tuvo un crecimiento similar al testigo sin tratamiento alguno (sólo un 8% de inhibición – Tabla 5.2.). En el caso de extracto de comino, la inhibición del crecimiento fue del 20%, es decir, superior a los ejercidos por los aceites anteriores.

Los tratamientos que mejores resultados arrojaron fueron los realizados con extractos de clavo y canela, con una inhibición casi total del crecimiento de *P. digitatum*, 98 y 99%, respectivamente. La concentración de 500 µL/L de estos aceites no solo afectó al crecimiento, sino también a la germinación de conidios puesto que, además de no desarrollar el color verde en la placa, característico de *P. digitatum*, tras observar las muestras al microscopio solo aparecieron hifas sin la existencia de conidios. Estas hifas, como se observa en la Figura 5.4., fueron distintas a las observadas con el resto de aceites y gel de *Aloe vera*, ya que presentaron unos ensanchamientos en forma de clamidosporas, lo que evidencia el poder antimicrobiano de los aceites esenciales de clavo y canela. La actividad antifúngica de los aceites esenciales ha sido atribuida a fenoles monoterpénicos, especialmente el timol, carvacrol y eugenol (Isman, 2000). La actividad antifúngica del aceite de clavo se debe fundamentalmente al eugenol. Esta sustancia ejerce su acción sobre la membrana celular del hongo, provocando la desestabilización de la misma e induciendo la muerte celular (Hernández, 2011). El aceite de clavo contiene este compuesto entre aproximadamente 50 y 98% de la composición total de aceites esenciales. El eugenol está presente en otras plantas también, pero no a tan elevada proporción. El aceite esencial de canela contiene un 8% de eugenol y es rico en cinamaldehído (Davidson, 1997; Martínez, 2012).



Figura 5.4. (a) Hifas con clamidosporas de *P. digitatum* aislado de limón para los tratamientos utilizados a base de 500 $\mu\text{L/L}$ de extractos de aceites esenciales de clavo y canela **(b)** Hifas y conidios de *P. digitatum* aislado de limón (solución testigo).

En la Figura 5.5. se aprecia el crecimiento de *Penicillium digitatum* aislado de la podredumbre de mandarina en placas tratadas con 500 $\mu\text{L/L}$ de gel de *Aloe vera*, y los extractos de aceites esenciales de cilantro, comino, clavo y canela (500 $\mu\text{L/L}$).

De la misma forma que en el caso anterior con *P. digitatum* aislado de limón, el mayor grado de crecimiento de *P. digitatum* aislado de podredumbre de mandarina se obtuvo con el uso de 500 $\mu\text{L/L}$ del extracto de aceites esenciales de cilantro, también superior a las tratadas con la solución testigo (agua destilada). Además, el período de latencia o de adaptación del hongo fue de sólo dos días para la mayoría de los tratamientos. Sin embargo, las placas tratadas con los extractos de clavo y canela no se observó crecimiento durante los días que duró el experimento ni por un tiempo superior. Esto vuelve a indicar que a una dosis de 500 $\mu\text{L/L}$ de estos aceites esenciales el crecimiento de *P. digitatum* se inhibe totalmente, independientemente de donde haya sido aislado el hongo, lo que indica también una gran similitud entre los dos aislados. Esta similitud de resultados entre hongos de la misma especie pero aislados de diferentes frutos puede deberse a la existencia de selectividad entre tipo de aceite y especie de hongo. Esto fue demostrado por Kurita *et al.* (1981) que escanearon 40 compuestos de aceites esenciales contra 7 especies de hongos y Singh *et al.* (1980) contra 22 especies de hongos, incluyendo patógenos de plantas, llegando a poner de manifiesto una gran selectividad entre tipo de aceite y especie atacada.

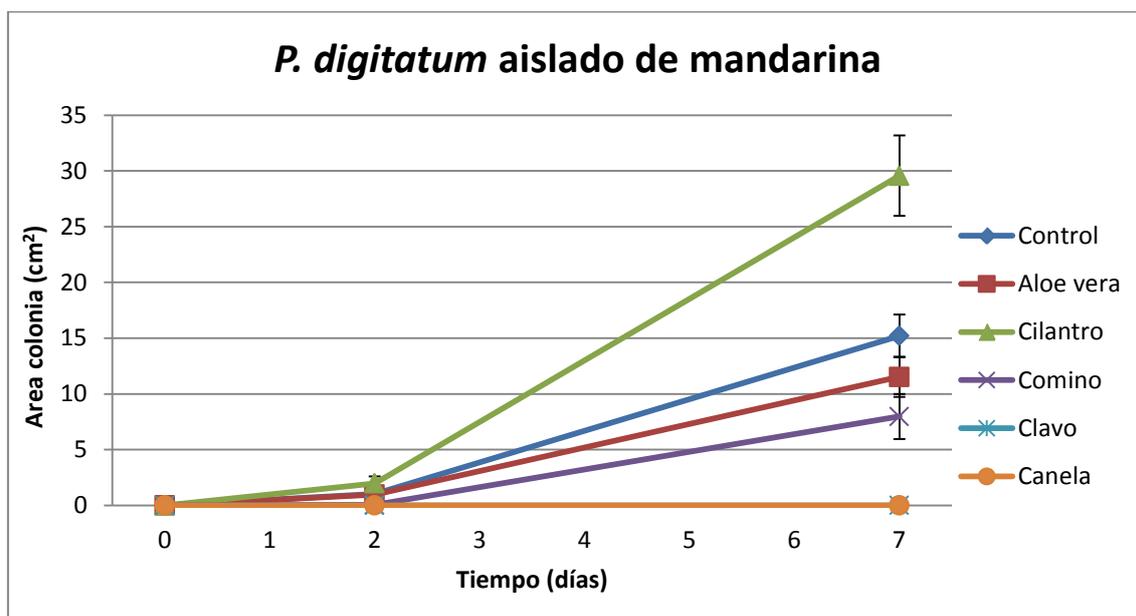


Figura 5.5. Efecto de 500 $\mu\text{L/L}$ de gel de *Aloe vera* y de aceites esenciales de cilantro, comino, clavo y canela sobre el crecimiento de *P. digitatum* aislado de mandarina. Las barras verticales son la desviación estándar.

Tabla 5.3. Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de *P. digitatum* aislado de mandarina para los diferentes tratamientos utilizados a base de 500 $\mu\text{L/L}$ de gel de *Aloe vera* y extractos de distintos aceites esenciales.

TRATAMIENTO	TASA DE CRECIMIENTO ($\text{cm}^2/\text{día}$)	DURACIÓN FASE LINEAL (días)	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)
CONTROL	2,84 \pm 0,34	5 \pm 0	
ALOE VERA	2,11 \pm 0,34	5 \pm 0	24
CILANTRO	5,52 \pm 0,61	5 \pm 0	
COMINO	1,58 \pm 0,38	5 \pm 0	48
CLAVO	0,00 \pm 0,00	5 \pm 0	100
CANELA	0,00 \pm 0,00	5 \pm 0	100

La Tabla 5.3. indica que *P. digitatum* tuvo una tasa de crecimiento superior si es tratado con extracto de aceite de cilantro, prácticamente el doble que el control (5,52 frente a 2,84 $\text{cm}^2/\text{día}$, respectivamente). Sin embargo, para el resto de tratamientos, la inhibición del crecimiento fue algo mayor que en el caso de este mismo hongo aislado de limón. Pero, en general, los resultados fueron los mismos puesto que el orden de mejor a peor tratamiento antifúngico es el mismo en los dos aislados: canela = clavo > comino > *Aloe vera* > cilantro. Esto indica que *P. digitatum* aislado de mandarina ha

sido más sensible al efecto de los aceites, pero en la misma proporción que el aislado de limón, es decir, el aceite que más afectó al aislado del limón afectó del mismo modo al de mandarina, pero más intensamente. Esto es, dentro de lo que cabe, normal porque son aislados distintos. Sin embargo, no se trataría, en este caso, de variabilidad porque no son respuestas distintas. En la Figura 5.5. se aprecia el crecimiento de *Penicillium italicum* aislado de la podredumbre de limón en placas tratadas con 500 µL/L de gel de *Aloe vera*, y los extractos de aceites esenciales de cilantro, comino, clavo y canela (500 µL/L).

En la Figura 5.6. se aprecia el crecimiento de *Penicillium italicum* aislado de la podredumbre de limón en placas tratadas con 500 µL/L de gel de *Aloe vera*, y los extractos de aceites esenciales de cilantro, comino, clavo y canela (500 µL/L).

El mayor grado de crecimiento, en este caso, se obtuvo con las placas tratadas con el gel de *Aloe vera*, incluso superior a las tratadas con la solución testigo (agua destilada). Los efectos del gel de *Aloe vera* sobre el desarrollo de *P. digitatum*, *P. expansum*, *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*. Estos autores obtuvieron un efecto estimulante en la supervivencia de las esporas de *Botrytis cinerea* cuando aumentaron la concentración de dicho gel. Este hecho pudo haber sido el resultado de compuestos nutricionales presentes en el extracto de Aloe que estimulan el crecimiento microbiano, lo que enmascara las propiedades inhibitorias (Levin *et al.*, 1988).

El período de latencia o de adaptación del hongo fue de sólo dos días tratado con cilantro y comino, y de incluso menos, aproximadamente un día, para la solución testigo y el gel de *Aloe vera*. Sin embargo, las placas tratadas con los extractos de clavo y canela no se observó crecimiento durante los días que duró el experimento. Esto indica que a una concentración de 500 µL/L (dosis de 10 µL/placa) de estos aceites esenciales, el crecimiento de *P. italicum* se inhibe totalmente. Estos resultados ya fueron obtenidos por Davidson (1997), donde los extractos del aceite esencial de clavo inhibieron la iniciación del crecimiento durante más de 21 días a 25 ° C de las especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. De acuerdo con este autor, el aceite esencial de canela fue el siguiente más eficaz, inhibiendo tres especies de *Penicillium* durante más de 21 días.

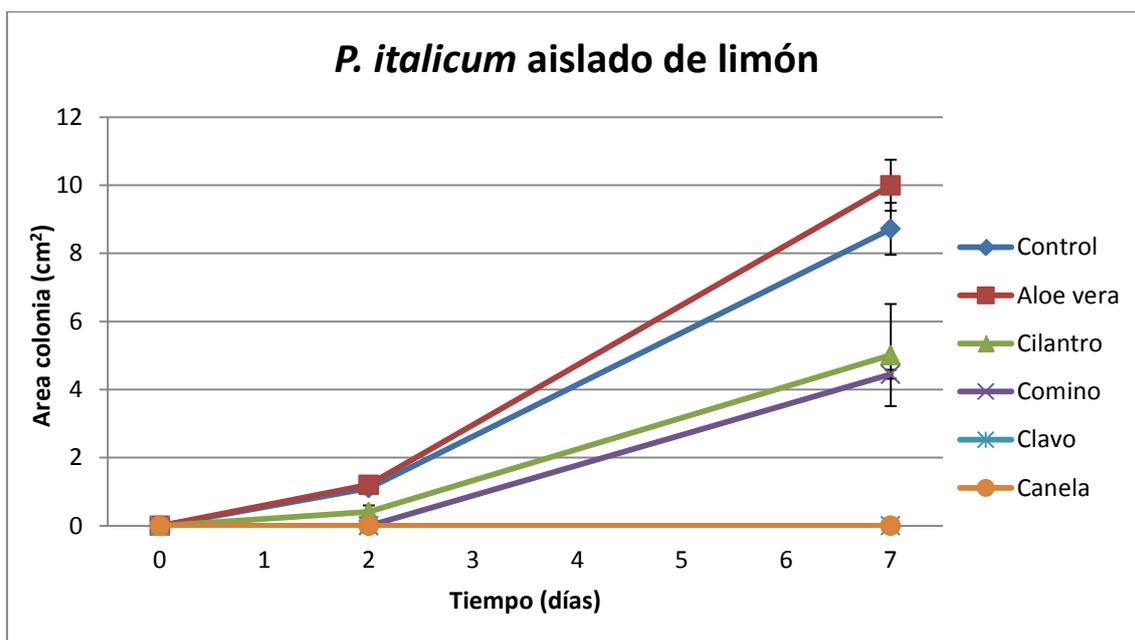


Figura 5.6. Efecto de 500 $\mu\text{L/L}$ de gel de *Aloe vera* y de aceites esenciales de cilantro, comino, clavo y canela sobre el crecimiento de *P. italicum* aislado de limón. Las barras verticales son la desviación estándar.

Según la Tabla 5.4., la tasa crecimiento de *P. italicum* en la solución testigo y tratado con *Aloe vera* fue similar, algo superior con éste último. En el caso de los tratamientos con extractos de aceites de cilantro y comino la inhibición del crecimiento de este hongo fue de aproximadamente el 50%, mientras que para los aceites de clavo y canela la inhibición fue total, del 100%.

Tabla 5.4. Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de *P. italicum* aislado de limón para los diferentes tratamientos utilizados a base de 500 $\mu\text{L/L}$ de gel de *Aloe vera* y extractos de distintos aceites esenciales.

TRATAMIENTO	TASA DE CRECIMIENTO ($\text{cm}^2/\text{día}$)	DURACIÓN FASE LINEAL (días)	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)
CONTROL	1,52±0,13	5±0	
ALOE VERA	1,76±0,13	5±0	
CILANTRO	0,92±0,26	5±0	43
COMINO	0,89±0,03	5±0	49
CLAVO	0,00±0,00	5±0	100
CANELA	0,00±0,00	5±0	100

En la Figura 5.7., se aprecia el crecimiento de *Penicillium italicum* aislado de la podredumbre de mandarina en placas tratadas con 500 $\mu\text{L/L}$ de gel de *Aloe vera*, y los extractos de aceites esenciales de cilantro, comino, clavo y canela (500 $\mu\text{L/L}$).

Al igual que en el caso anterior con *P. italicum* aislado de limón, el mayor grado de crecimiento de este hongo aislado de mandarina se obtuvo con las placas tratadas con el gel de *Aloe vera*, también superior a las tratadas con la solución testigo (agua destilada). Sin embargo, el período de latencia o de adaptación del hongo fue inferior a dos días para la mayoría de los tratamientos. Solo en las placas tratadas con los extractos de clavo y canela no se observó crecimiento durante los días que duró el experimento. Esto vuelve a indicar que a una concentración de 500 $\mu\text{L/L}$ (dosis de 10 $\mu\text{L/placa}$) de estos aceites esenciales, el crecimiento de *P. italicum* se inhibe totalmente, independientemente del tipo de aislado ensayado.

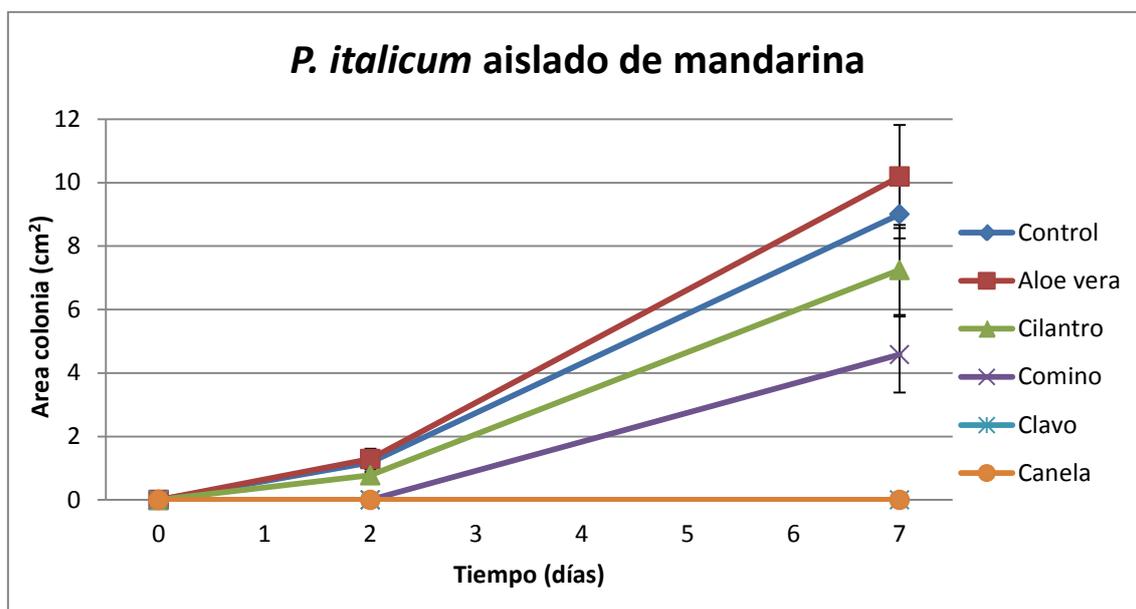


Figura 5.7. Efecto de 500 $\mu\text{L/L}$ de gel de *Aloe vera* y de aceites esenciales de cilantro, comino, clavo y canela sobre el crecimiento de *P. italicum* aislado de mandarina. Las barras verticales son la desviación estándar.

Según la Tabla 5.5., la tasa crecimiento de *P. italicum* en la solución testigo y tratado con *Aloe vera* fue similar, algo superior con éste último. Sin embargo, a diferencia que en el caso anterior aislado de limón, la tasa de crecimiento de *P. italicum*

aislado de mandarina fue superior en el tratamiento con extracto de cilantro, mostrando una inhibición de tan solo el 20% de su crecimiento con respecto a la solución testigo. Para el tratamiento con extracto de comino la inhibición del crecimiento de este hongo fue de aproximadamente el 50%, mientras que para los aceites de clavo y canela la inhibición también fue total, del 100%.

Tabla 5.5. Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de *P. italicum* aislado de mandarina para los diferentes tratamientos utilizados a base de 500 µL/L de gel de *Aloe vera* y extractos de distintos aceites esenciales.

TRATAMIENTO	TASA DE CRECIMIENTO (cm ² /día)	DURACIÓN FASE LINEAL (días)	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)
CONTROL	1,56±0,23	5±0	
ALOE VERA	1,78±0,26	5±0	
CILANTRO	1,29±0,26	5±0	20
COMINO	0,92±0,24	5±0	49
CLAVO	0,00±0,00	5±0	100
CANELA	0,00±0,00	5±0	100

5.4. Conclusiones

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

- En el caso de *Penicillium digitatum*, los tratamientos realizados con esencia de comino y gel de *Aloe vera* no ejercieron apenas efecto antifúngico, tanto para el aislado de limón como para el de mandarina, permitiendo la adaptación al medio del hongo y creciendo aproximadamente de igual manera que la solución testigo, sin tratamiento alguno. El efecto de la esencia de comino a la concentración de 500 µL/L sobre *Penicillium digitatum* fue algo mayor que el gel de *Aloe vera*, notándose la diferencia sobre todo en el aislado de mandarina, donde con la esencia de comino se inhibió un 48%, mientras que con el gel tan solo un 24% del crecimiento, es decir, la mitad.
- En cuanto a la esencia de cilantro, la misma dosis produjo un efecto contrario al deseado, es decir, no inhibió el crecimiento de *Penicillium digitatum*. sino que lo estimuló. La explicación a este efecto puede deberse a que los extractos de

aceites esenciales pueden contener ciertas sustancias favorecedoras del crecimiento que enmascaran el escaso efecto inhibitor de las sustancias antimicrobianas que poseen sobre los aislados ensayados en este estudio.

- Los tratamientos realizados con extractos de clavo y canela a la concentración de 500 $\mu\text{L/L}$ (dosis de 10 $\mu\text{L/placa}$) inhibieron totalmente el crecimiento de *Penicillium digitatum*.
- En el caso de *Penicillium italicum*, los tratamientos realizados con extractos de cilantro y comino si tuvieron efecto antifúngico, tanto aislado de limón como de mandarina, teniendo una tasa de crecimiento de aproximadamente la mitad que la solución testigo. El efecto de la esencia de comino a la concentración de 500 $\mu\text{L/L}$ (dosis de 10 $\mu\text{L/placa}$) sobre *Penicillium italicum* fue algo mayor que con esencia de cilantro, notándose la diferencia sobre todo en el aislado de mandarina, donde con la esencia de comino se redujo un 49% el crecimiento, mientras que con esencia de cilantro tan solo lo disminuyó un 20%.
- En cuanto al gel de *Aloe vera* a la misma dosis no produjo un efecto inhibitor del crecimiento de *Penicillium italicum*, sino que este hongo creció de manera similar a cuando no llevó ningún tratamiento antifúngico, incluso superior, es decir, que estimuló el crecimiento.
- Los tratamientos realizados con extractos de clavo y canela a la concentración de 500 $\mu\text{L/L}$ (dosis de 10 $\mu\text{L/placa}$), tuvieron efectos frente a *Penicillium italicum* iguales a los producidos en *Penicillium digitatum*, es decir, inhibieron totalmente el crecimiento de *P. italicum*.
- Las diferencias en los resultados obtenidos sobre el efecto de los aceites esenciales utilizados en el crecimiento de *P. digitatum* y *P. italicum* puede deberse a la existencia de selectividad entre tipo de aceite y especie de hongo.

CAPÍTULO 6.

Efecto de los aceites esenciales de clavo y canela sobre el desarrollo in vitro de distintos aislados de P. digitatum y P. italicum

6.1. Introducción

En la experiencia del capítulo anterior (Cap. 5) se puso de manifiesto la escasa capacidad fungistática del gel de *Aloe vera* y de los extractos de aceites esenciales de cilantro y comino sobre el desarrollo *in vitro* de distintos aislados de *P. digitatum* y *P. italicum*. Sin embargo, con este primer experimento de escrutinio, se demostró un gran efecto de las sustancias antifúngicas presentes en los aceites esenciales de clavo y canela sobre el crecimiento de dichos hongos en estudio. De este modo, estos aceites, que presentaron mayor poder fungistático y fungicida, fueron seleccionados para un estudio más profundo en el presente capítulo.

Como objetivo general de este estudio, y ya comentado anteriormente, se pretende conducir hacia una producción integrada, con un control de las plagas y enfermedades basado en un menor uso de los medios químicos (productos antiparasitarios) potenciando los métodos culturales, biológicos, biotécnicos y físicos.

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

Por ello, se pretende la búsqueda de sustancias inocuas o de muy reducida toxicidad, como son los aceites esenciales, que resulten ser una alternativa válida al uso de fungicidas sintéticos utilizados para el control de las podredumbres postcosecha. En general los plaguicidas de origen vegetal son biodegradables a productos no tóxicos y de baja persistencia, por lo tanto no presentan efectos negativos para el medio ambiente y desaparecen después de cumplir su función sin llegar a la cadena alimenticia del hombre. Además estas sustancias suelen ser activas contra un número limitado de

especies diana específicas, con lo que es muy recomendable su uso como agentes de control de enfermedades (Sung-Eun y *et al.*, 2001).

Los aceites esenciales de clavo y canela, protagonistas de este estudio, presentan una elevada actividad microbiana contra mohos, levaduras y bacterias patógenas como *Bacillus anthracis* (Davidson, 1997). Otras especies bacterianas afectadas son: *Escherichia coli*, *Enterobacter faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, entre otras muchas especies (Hernández, 2011). Estos aceites, especialmente el de clavo, presentan actividad antifúngica contra las especies de *Penicillium* aisladas del aire (Pinheiro *et al.*, 2011). El aceite de clavo es eficaz contra especies de *Alternaria*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Septoria* y *Penicillium digitatum*, mientras que los aceites de canela son efectivos contra *Fusarium moniliforme* (Hall y Fernández, 2004) y varias especies de *Penicillium* (Davidson, 1997; Yigit *et al.*, 2000). Estos aceites poseen también actividad antifúngica contra *Aspergillus* sp. (Llewellyn *et al.*, 1981; Kim *et al.*, 1995). El aceite de clavo inhibe el desarrollo de *Aspergillus niger* (Hernández, 2011) y se consideran compatibles con las frutas y sus derivados (Kim *et al.*, 1995).

El aceite esencial mayoritario del clavo es eugenol, derivado fenólico con propiedades medicinales, antimicrobianas y antifúngicas. El aceite de clavo contiene este compuesto entre aproximadamente 50 y 98% de la composición total de aceites esenciales. El eugenol está presente en otras plantas también, pero no a tan elevada proporción. El aceite esencial de canela contiene un 8% de eugenol y es rico en cinamaldehído (Davidson, 1997; Martínez, 2012). Su actividad antifúngica es debida a la acción sobre la membrana celular, provocando la desestabilización de la misma e induciendo a la muerte celular (Hernández, 2011). Otros aceites con acción antifúngica que contiene el aceite de clavo son el β -cariofileno, α -humuleno y acetato de eugenol, mientras que el de canela es rico en cinamaldehído. Entre otros, también se han identificado los siguientes compuestos antifúngicos presentes en los aceites de clavo y canela: timol, alcanfor, limoneno, carvacrol (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

En definitiva, el objetivo fundamental de este estudio fue valorar el efecto de diferentes concentraciones de los extractos puros de los aceites esenciales de clavo y

canela sobre el crecimiento *in vitro* de *P. digitatum* y *P. italicum*, principales hongos causantes de podredumbres en la comercialización de los cítricos.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Material experimental y tratamientos

Se valoró la eficacia de extractos puros de aceites esenciales ecológicos de clavo (*Syzygium aromaticum* L. sinónimo de *Eugenia caryophyllata* Thunb.) y canela (*Cinnamomum zeylanicum* J. Presl) Herbarom[®], Galdana Innovacions, Manlleu, España (Figura 6.1.) sobre el crecimiento *in vitro* de *P. digitatum* y *P. italicum*. La composición principal de estos aceites, de acuerdo con el fabricante, son eugenol y acetato de eugenilo para el aceite de canela y eugenol y β -cariofileno para el de clavo.



Figura 6.1. Aceites esenciales ecológicos de clavo (*Syzygium aromaticum* L. sinónimo de *Eugenia caryophyllata* Thunb.) y canela (*Cinnamomum zeylanicum* J. Presl) Herbarom[®], Galdana Innovacions, Manlleu, España

Los aislados de *P. digitatum* y *P. italicum* se obtuvieron, como se ha comentado en el capítulo 5, en el mes de octubre de 2011 de frutos de limón y de mandarina recogidos de la cooperativa El Limonar de Santomera afectados de podredumbre verde y azul. La sintomatología de las podredumbres coincidía con la descrita por Tuset (1987) y Snowdon (1990) y se corroboraron las dos especies de hongos por medio de la PCR descrita en el capítulo 4. Los hongos se aislaron en medio de cultivo sintético agar de patata y dextrosa (PDA) (Scharlab[®], Barcelona) y se purificaron posteriormente sobre el mismo medio de cultivo. A continuación, se realizaron cultivos monospóricos (Figura 6.2.) realizando diluciones sucesivas de una suspensión de conidios obtenida a partir de cada uno de los aislados purificados. Con este procedimiento conseguimos separar las dos especies de *Penicillium* que, hemos constatado, suelen crecer juntas

sobre los frutos colonizados por una de las dos podredumbres. La purificación completa de los aislados se logró a partir de los cultivos monospóricos tras siembra de una pequeña porción de micelio de una colonia seleccionada por el color en otra placa conteniendo PDA. De esta manera se obtuvieron los cultivos origen a partir de los cuales se hicieron las siembras para cada uno de los experimentos realizados con los extractos de aceites esenciales.



Figura 6.2. Cultivo monospórico de *Penicillium italicum*.

Con el fin de valorar el efecto de los aceites seleccionados sobre el crecimiento del hongo creciendo en condiciones idóneas, se realizaron los ensayos *in vitro*. Se seleccionaron las siguientes concentraciones reducidas de aceites, ya que la efectividad comercial reside no solo en su eficacia sino también en que esta efectividad sea patente a concentraciones muy bajas: 1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L/L}$. Se realizaron los siguientes tratamientos para la prueba *in vitro*:

- Testigo (T1). Contiene 19 mL de medio de cultivo PDA en la placa de Petri con 1 mL de agua destilada esterilizada.
- Clavo (T2). 19 mL de medio de cultivo PDA en una placa de Petri más 1 mL de extracto de aceites esenciales de clavo (Herbarom[®]), a las concentraciones de 1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L/L}$ (equivalente a 1,6; 8, 40, 200 y 1.000 μL de extracto de aceites esenciales de clavo en 1 L de medio de cultivo). La dosis correspondiente es de 0,032; 0,16; 0,8; 4 y 20 $\mu\text{L/placa Petri}$, respectivamente.

- Canela (T3). 19 mL de medio de cultivo PDA en una placa de Petri más 1 mL de extracto de aceites esenciales de canela (Herbarom[®]), a las concentraciones de 1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L}/\text{L}$ (equivalente a 1,6; 8, 40, 200 y 1.000 μL de extracto de aceites esenciales de canela en 1 L de medio de cultivo). La dosis correspondiente es de 0,032; 0,16; 0,8; 4 y 20 $\mu\text{L}/\text{placa}$ Petri, respectivamente.

Estas concentraciones se escogieron para evaluar el efecto de los extractos de aceites esenciales de clavo y canela porque, de acuerdo con la bibliografía, constituyen el rango habitualmente utilizado para este tipo de compuestos cuando se estudian sus efectos antimicrobianos y antimicóticos.

6.2.2. Unidad de observación y número de repeticiones

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

La experiencia comenzó el día 12 de diciembre de 2011, y se extendió hasta el día 30 de abril de 2012. Para cada tratamiento se utilizaron diferentes dosis y el tratamiento testigo tuvo ausencia de cualquier sustancia inhibidora. En el tratamiento con extractos de aceites esenciales de clavo y canela las concentraciones empleadas fueron de 1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L}/\text{L}$ (dosis correspondiente de 0,032; 0,16; 0,8; 4 y 20 $\mu\text{L}/\text{placa}$ Petri, respectivamente).

Para el tratamiento testigo se utilizaron 32 placas de Petri, 8 placas fueron para *P. digitatum* aislado de limón, otras 8 para *P. digitatum* aislado de mandarina, y lo mismo para *P. italicum* (8 para el aislado de limón y 8 para el aislado de mandarina). De la misma forma, para los tratamientos con extractos de aceites esenciales de clavo y canela se utilizaron 32 placas de Petri por cada una de las dosis empleadas, utilizando 8 placas por cada uno de los aislados, lo cual se corresponde a 4 placas por aceite esencial para cada uno de los cuatro aislados. Es decir, se utilizaron 4 repeticiones por tratamiento y dosis que tuvieron valor de réplica. La unidad de observación correspondía a una placa Petri. Cada una de ellas es independiente, pero las variables relacionadas con el crecimiento y tasa de crecimiento se miden sobre las mismas unidades de observación en función del tiempo.

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

6.2.3. Definición, tipo y clasificación de las variables

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

Área de crecimiento de la colonia (cm²). Representa el área de la colonia desarrollada medida a intervalos diarios sobre la misma colonia (medidas repetidas). Esta medida se realiza generalmente como el diámetro de la colonia, pero consideramos que el diámetro de una colonia no caracteriza totalmente el crecimiento en los casos en los que la colonia no tiene un hábito de crecimiento totalmente circular. Si bien, *P. digitatum* crece casi como un círculo perfecto, *P. italicum* presenta figuras irregulares en su crecimiento, probablemente porque mientras la colonia está creciendo se dispersan conidios formados que germinan y los nuevos micelios se unen al micelio principal. En algunos casos no es fácil distinguir este proceso. La medición del área de la colonia se realizó, previa calibración con el diámetro de la placa Petri, con fotografía digital de ésta y posterior análisis en el software Image Tool for Windows, versión 3.0 (Texas, EE.UU.). Esta variable es de tipo cuantitativa continua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

Tasa de crecimiento (cm²/día). Es el grado (velocidad) de crecimiento del hongo medido en su fase lineal de crecimiento cuando se desarrolla en un medio de cultivo sólido. La fase lineal de crecimiento es la fase en la que el hongo crece a pleno rendimiento una vez ha pasado la fase exponencial que suele durar solamente unas pocas horas y antes de entrar en la fase estacionaria donde la velocidad de crecimiento disminuye.

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

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

donde,

μ : Tasa de crecimiento (cm²/día),

$A_{(t+1)}$: Área de la colonia un día determinado (cm²),

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

t + 1 : Un día determinado (días) y,

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

En el presente trabajo, se ha calculado la tasa de crecimiento aplicando la ecuación anterior, generalmente entre los días 6 y 7, para *P. digitatum*, y 10 y 13, en el caso de *P. italicum*, cuando, de acuerdo con los gráficos obtenidos, no había duda de que el hongo se encontraba en la fase lineal de crecimiento. Esta variable es cuantitativa continua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

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

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

$$\text{Inhibición del crecimiento (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A}{A_{\text{control}}} \times 100$$

donde,

A_{control} : Área media de la colonia del tratamiento testigo (cm^2),

A : Área media de la colonia del tratamiento con una concentración determinada de aceite esencial de canela o clavo (cm^2).

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

Conidiogénesis (conidios/ cm^2). Determina el número de conidios por unidad de superficie. Por tanto mide la cantidad de conidios producidos. Se trata de una variable de tipo cuantitativa discontinua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

Para el cálculo de los conidios por cm^2 se utilizó la siguiente ecuación que se desarrollará en el subapartado del protocolo de las mediciones:

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

donde,

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

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

0,0025 : volumen de la unidad mínima de recuento (mm^3),

A micelio : Área de micelio (cm^2).

Tamaño de los conidios (μm). Es la longitud máxima de los conidios. Se mide con el ocular micrométrico del microscopio y dependiendo del aumento objetivo utilizado se transforman las medidas a μm . Se trata de una variable de tipo cuantitativa

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

Masa de micelio (mg). Mide el peso del micelio total del micelio que ha crecido en la placa de Petri. Tanto el micelio sumergido, que se encuentra por debajo del medio de cultivo y nutre a todo el hongo, como del micelio aéreo que se encuentra por encima del medio de cultivo y que porta la parte reproductiva del hongo formada por los conidióforos y los conidios. En este experimento solamente se ha pesado el micelio aéreo que, por otro lado, constituye la mayor parte del micelio de este hongo creciendo en medio de cultivo. Se trata de una variable de tipo cuantitativa continua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

6.2.4. Establecimiento de las hipótesis

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

En el anterior capítulo se ha estudiado y puesto de manifiesto que los extractos de aceites esenciales de clavo y canela pueden influir en el crecimiento y desarrollo de *P. digitatum* y *P. italicum*. Los experimentos que se van a desarrollar a continuación están planeados para poner de manifiesto ese efecto y averiguar cual es la mínima dosis de estos aceites con efecto fungicida sobre dos aislados de *P. digitatum* y otros dos de *P. italicum* aislados de diferentes frutos de especies cítricas distintas. Con esto último se pretende poner de manifiesto si la respuesta depende del aislado.

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

1. Los aceites esenciales de clavo y canela ejercen influencia sobre el crecimiento *in vitro* de los hongos *P. digitatum* y *P. italicum*.
2. Los aceites esenciales de clavo y canela ejercen influencia sobre la conidiogénesis de los hongos *P. digitatum* y *P. italicum*.
3. Los aceites esenciales de clavo y canela ejercen influencia sobre el tamaño de los conidios de los hongos *P. digitatum* y *P. italicum*.
4. Los aceites esenciales de clavo y canela ejercen influencia sobre la masa de micelio de los hongos *P. digitatum* y *P. italicum*.
5. Los aceites esenciales de clavo y canela ejercen influencia sobre la germinación de los hongos *P. digitatum* y *P. italicum*.
6. Los aislados de hongos patógenos obtenidos de distintas especies de frutos cítricos (mandarina y limón), responden de manera distintas a los microbianos utilizados.

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

6.2.5. Análisis estadístico

Dado que las hipótesis que se quieren contrastar, definen las características del plan de trabajo que se quiere trazar, hay que tener en cuenta que una de las hipótesis planteadas incluye el efecto del aislado sobre la respuesta que tienen las sustancias retardadoras sobre su crecimiento. Evidentemente sólo partimos de dos aislados distintos por hongo para cada una de las dos especies fúngicas estudiadas; si bien, son bastantes significativos porque se obtuvieron de diferentes especies de frutos (limón y mandarina), hecho que puede aumentar la posible variabilidad entre los aislados. Esto significa que el alcance de las conclusiones no va a ser crucial a la hora de caracterizar a la población de aislados de *Penicillium* de los cítricos. Es por ello, por lo que se ha optado a realizar un análisis básico de los datos utilizando para ellos los estadísticos de la media aritmética como medida de centralización y la desviación estándar como

medida de la dispersión. La utilización del ANOVA o análisis de la varianza se ha evitado fundamentalmente porque el tamaño de la muestra no es elevado (como máximo $n=4$) y la falta del concepto réplica como tal que permitiría poner de manifiesto diferencias significativas cuando no las hay. El error se minimiza también, dado que las medidas de las áreas se tomaron de las mismas colonias en función del tiempo, es decir, es un caso de diseño de medidas repetidas. En este caso se requeriría otro tipo de análisis ANOVA, el denominado ANOVA de medidas repetidas.

Atendiendo al diseño del protocolo y la hipótesis a considerar, podemos definir que el experimento consta de las siguientes variables independientes controladas o factores: aislado (4 niveles) y extracto de aceite (2 niveles).

6.2.6. Protocolo de las mediciones

Primeramente se preparó el medio de cultivo de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Después de su esterilización en autoclave, se dejó reposar en un baño termostático a 48°C hasta que alcanzó esta temperatura. Las placas de Petri se rotularon y dispusieron para agregar 1mL de la emulsión a valorar convenientemente diluida en agua destilada esterilizada con tween 80 (0,01%) para aumentar la dispersión de los aceites lipofílicos en el medio de cultivo, que es hidrofílico. Al tratamiento testigo se agregó 1 mL de agua destilada esterilizada para que tuviera la misma cantidad de medio de cultivo que presentaban las placas con sustancias a tratar. Una vez que cada placa tenía 1 mL del compuesto correspondiente, a las dosis de 0,032; 0,16; 0,8; 4 y 20 μ L de extracto de aceites de clavo y canela, se procedió a rellenar las placas con 19 mL de medio de cultivo a 48°C. Las placas se movieron cuidadosamente en cruz y en giros alternos para homogenizar la emulsión con el medio de cultivo en toda la placa. Los extractos de aceites esenciales no se esterilizaron para evitar la desnaturalización de compuestos decisivos. Previamente comprobamos que no crecían bacterias ni hongos a partir de los extractos, probablemente porque ya venían esterilizados de fábrica o que se inactivaron todas las células de microorganismos presentes por la alta concentración de compuestos antimicrobianos presentes en los extractos puros.

Las placas se dejaron reposar no menos de 15 horas dentro de la cabina de flujo para proceder a la inoculación del hongo anteriormente purificado y aislado. Para ello se

partió de cultivos de los diferentes aislados realizados a partir de los aislados iniciales de los frutos o de las placas origen que se conservaban en el frigorífico. Entonces se depositó una pequeña porción de cultivo del hongo cortada asépticamente del borde de la colonia crecida de cinco días a 26°C con un bisturí en el centro de la placa nueva (subcultivo). Todo este procedimiento se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar, para asegurar la máxima asepsia en el trabajo, y después se depositaron las placas en la incubadora a 26°C durante los días necesarios hasta que el tratamiento testigo creció cerca del borde de la placa. Las placas se sacaban de la incubadora diariamente por pocos minutos para apuntar las observaciones y medir el tamaño de la colonia (proceso rápido porque se hizo con un montaje fotográfico). Para llevar a cabo la toma de medidas, se midió el tamaño de cada colonia, cada uno de los días que duró el experimento, tomando fotos para luego medir el área con el programa informático Image Tool 3.0.

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

Posteriormente, una vez que ya no hubo variaciones en el área de las colonias de *P. digitatum* y *P. italicum* para cada tratamiento, es decir, cuando llegó a su límite de crecimiento, se procedió a realizar las pruebas restantes para observar la influencia de estos tratamientos sobre la conidiogénesis, el tamaño de los conidios, la masa de micelio y la germinación de los hongos en estudio. Para ello, cada una de las muestras, de 4 placas por dosis de aceite, se dividieron en 2 placas para cada una de las pruebas. Dos placas fueron congeladas para la medida de la masa de micelio; y las otras dos se destinaron para la medida de la cantidad de conidios producidos (conidiogénesis) y del tamaño de éstos, realizado con un micrométrico ocular acoplado a un microscopio de contraste de fases para un recuento más fácil y eficaz.

Para analizar la influencia de estos tratamientos sobre la masa de micelio de *P. digitatum* y *P. italicum*, se procedió a extraer el micelio superficial de cada placa, con ayuda de una espátula, introduciéndolo en tubos de ensayo. Posteriormente, fueron introducidos en una estufa a 78°C para la eliminación total del agua durante no menos de 24 horas. Por último, se procedió a pesar los micelios secos con una balanza de precisión.

En el caso de averiguar el efecto que las diferentes dosis de los aceites esenciales de clavo y canela ejercían sobre la conidiogénesis de los aislados de *Penicillium*, el procedimiento realizado para contabilizar los conidios que crecieron por cm^2 se muestra en las siguientes imágenes, Figura 6.3.

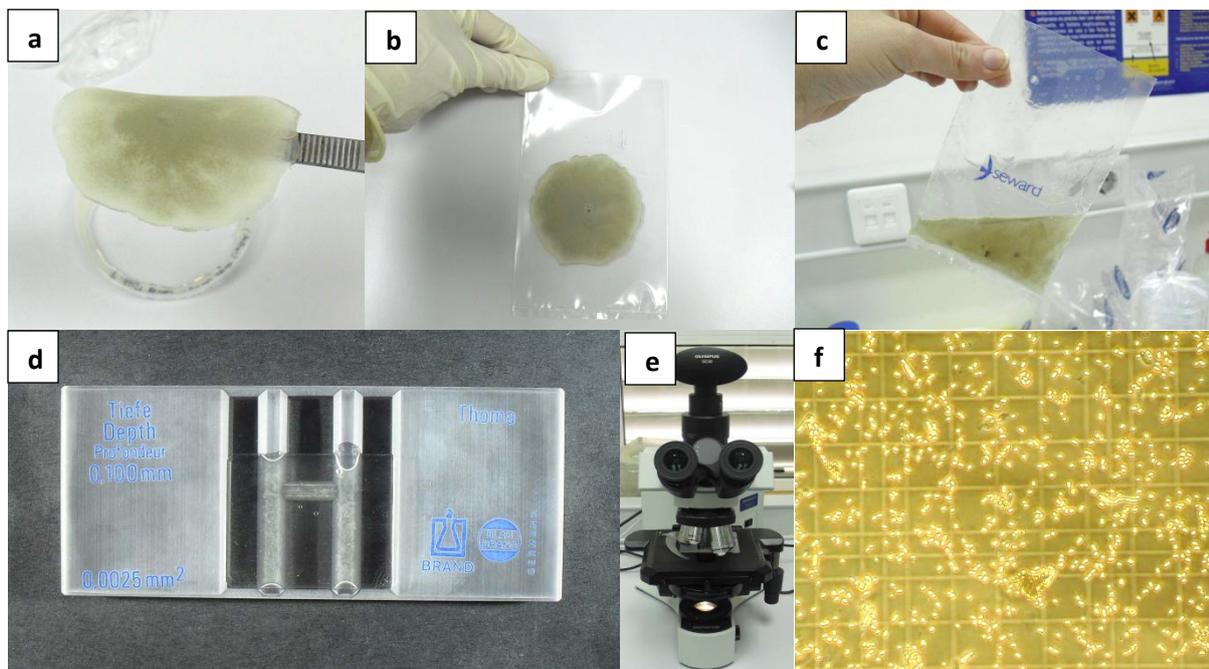


Figura 6.3. (a) Extracción del micelio del hongo de la placa. (b) Introducción del micelio en bolsa de Stomacher. (c) Adición de agua destilada y triturado en Stomacher. (d) Cámara de Thoma. (e) Microscopio de contraste de fases. (f) Fotografía de conidios de *Penicillium* sp. bajo el microscopio de contraste de fases con el fin de hacer el recuento de los conidios con la cuadrícula.

Para el cálculo de los conidios por cm^2 se utilizó la siguiente ecuación que ya se ha descrito en el subapartado de descripción de variables:

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

donde,

V. agua : volumen de agua (mL),

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

0,0025 : volumen de la unidad mínima de recuento (mm³),

A micelio : Área de micelio (cm²).

Para la representación de los gráficos de influencia de las diferentes dosis de aceites esenciales sobre la masa de micelio, la conidiogénesis, el tamaño de los conidios y la germinación de *P. digitatum* y *P. italicum* se tomó el valor medio por dosis de las dos réplicas y se representó la desviación estándar de la medición por medio de una barra vertical pasando por el valor medio.

6.3. Resultados y discusión

Efecto de diferentes concentraciones de los aceites esenciales de canela y clavo sobre el crecimiento de *P. digitatum* y *P. italicum*.

En las Figuras 6.4. y 6.5., se aprecia el crecimiento de *Penicillium digitatum* aislado de limón en placas tratadas con solución testigo (agua destilada) y las tratadas con el extracto de aceite esencial de canela (Figura 6.4.) y clavo (Figura 6.5.) con las concentraciones utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 µL/L).

Las concentraciones de los aceites esenciales de canela y clavo comprendidas entre 1,6 y 40 µL/L (dosis de 0,032 y 0,8 µL/placa, respectivamente) favorecieron ligeramente y, de manera proporcional a la dosis aplicada, el crecimiento de *P. digitatum*. La aplicación de 200 µL/L (dosis de 4 µL/placa) de aceite de canela redujo considerablemente el crecimiento de *P. digitatum* hasta aproximadamente el 45% del área del control (0 µL de aceite) al término del décimo día de incubación y un 51% del control con la aplicación de clavo al mismo hongo.

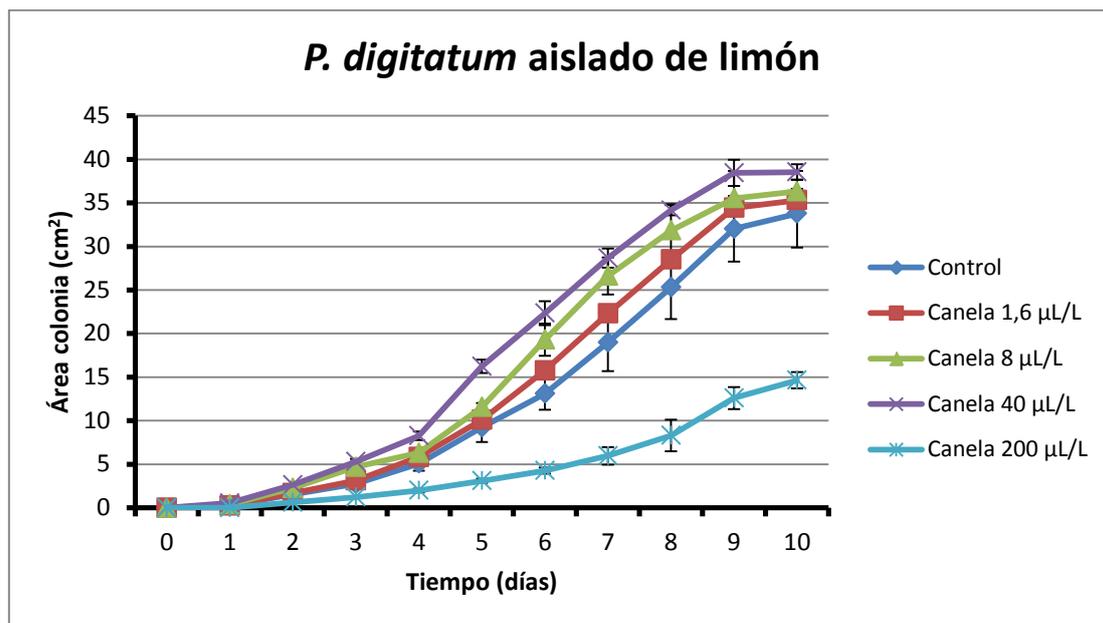


Figura 6.4. Efecto de diferentes concentraciones de aceite esencial de canela sobre el crecimiento de *P. digitatum* aislado de limón. Las barras verticales son la desviación estándar.

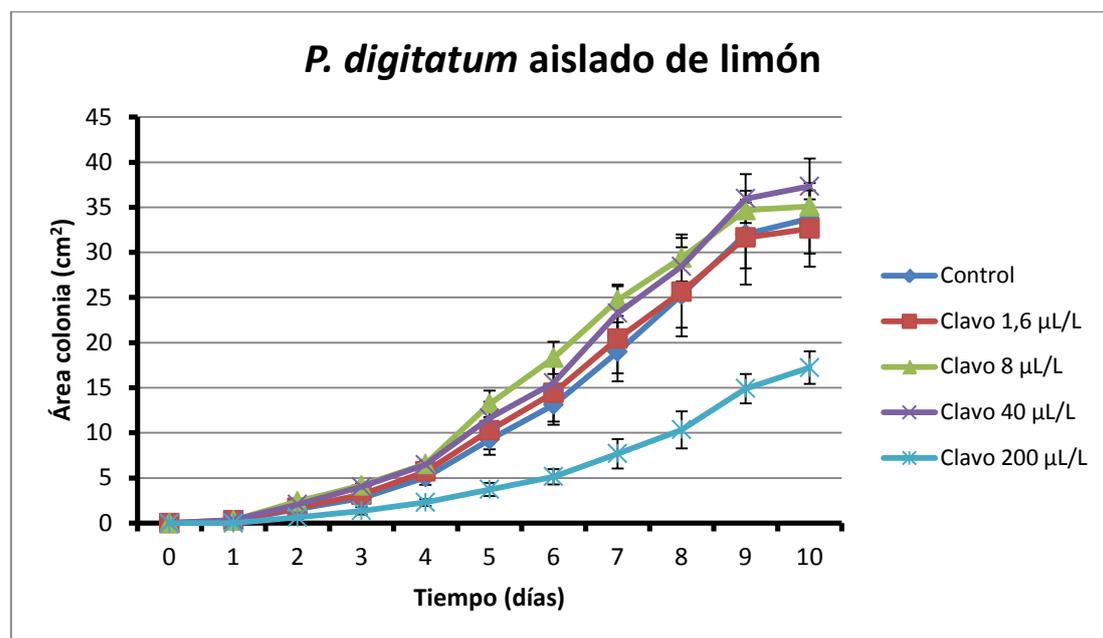


Figura 6.5. Efecto de diferentes concentraciones de aceite esencial de clavo sobre el crecimiento de *P. digitatum* aislado de limón. Las barras verticales son la desviación estándar.

En la Tabla 6.1. se muestra la tasa de crecimiento del hongo para cada tratamiento que, como tal tasa, indica la velocidad de crecimiento del hongo durante su fase de crecimiento lineal. También incluye la duración de la fase lineal de crecimiento, expresada en días, y la inhibición del crecimiento en relación al tratamiento testigo,

expresada en porcentaje. Esta última sólo se calculó para aquellos tratamientos en lo que se observó inhibición o reducción del crecimiento de *P. digitatum*.

Tabla 6.1. Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de *P. digitatum* aislado de limón para los diferentes tratamientos utilizados a base de 1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L/L}$ de los extractos de aceites esenciales de canela y clavo.

Tratamiento	Tasa de crecimiento ($\text{cm}^2/\text{día}$)	Duración fase lineal (días)	Inhibición del crecimiento (%)
Control	5,9 \pm 1,5	3,3 \pm 0,5	
Canela 1,6	6,5 \pm 0,6	3,8 \pm 0,5	
Canela 8	7,7 \pm 1,5	2,5 \pm 0,6	
Canela 40	6,1 \pm 0,6	3,0 \pm 0,8	
Canela 200	4,3 \pm 1,3	1,5 \pm 1,0	67
Clavo 1,6	6,0 \pm 0,3	3,8 \pm 1,0	
Clavo 8	6,4 \pm 0,4	3,5 \pm 0,6	
Clavo 40	7,7 \pm 1,0	3,0 \pm 0,0	
Clavo 200	4,6 \pm 1,1	1,5 \pm 0,6	59

Esta Tabla revela que, como se ha comentado anteriormente, los tratamientos que mejores resultados arrojan son los realizados con extractos de canela y clavo a la concentración de 200 $\mu\text{L/L}$, con una inhibición del crecimiento de *P. digitatum* de 67 y 59%, respectivamente.

En las siguientes Figuras se muestra el crecimiento de *Penicillium digitatum* aislado de mandarina en placas tratadas con solución testigo (agua destilada) y las tratadas con el extracto de aceite esencial de canela (Figura 6.6.) y clavo (Figura 6.7.) con las dosis utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L/L}$).

De manera similar al caso anterior con *P. digitatum* aislado de limón, en el aislado de mandarina, las concentraciones de los aceites esenciales de clavo y canela comprendidas entre 8 y 40 $\mu\text{L/L}$ (dosis de 0,16 y 0,8 $\mu\text{L/placa}$) favorecieron ligeramente y, de manera proporcional a la dosis aplicada, el crecimiento de *P. digitatum*. Con una concentración de 1,6 $\mu\text{L/L}$ (dosis de 0,032 $\mu\text{L/placa}$) el crecimiento del hongo fue prácticamente igual al que experimentó sin tratamiento alguno. La aplicación de 200 $\mu\text{L/L}$ (dosis de 4 $\mu\text{L/placa}$) de aceite de canela y clavo redujo el crecimiento de *P. digitatum* con una inhibición del crecimiento de 35 y 51%, respectivamente (Tabla 6.2.).

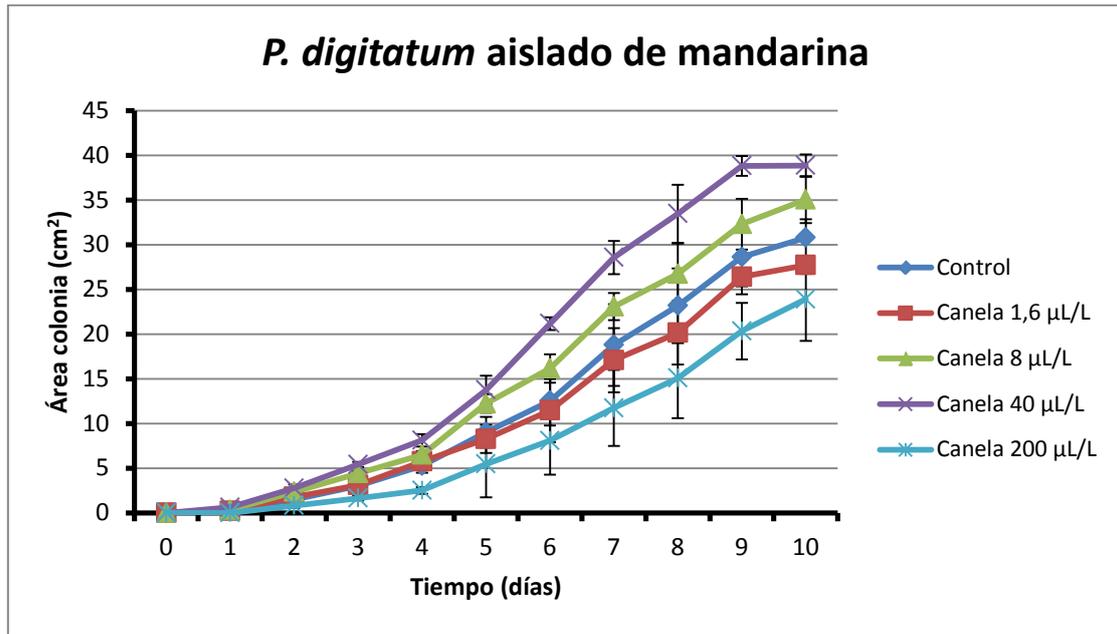


Figura 6.6. Efecto de diferentes concentraciones de aceite esencial de canela sobre el crecimiento de *P. digitatum* aislado de mandarina. Las barras verticales son la desviación estándar.

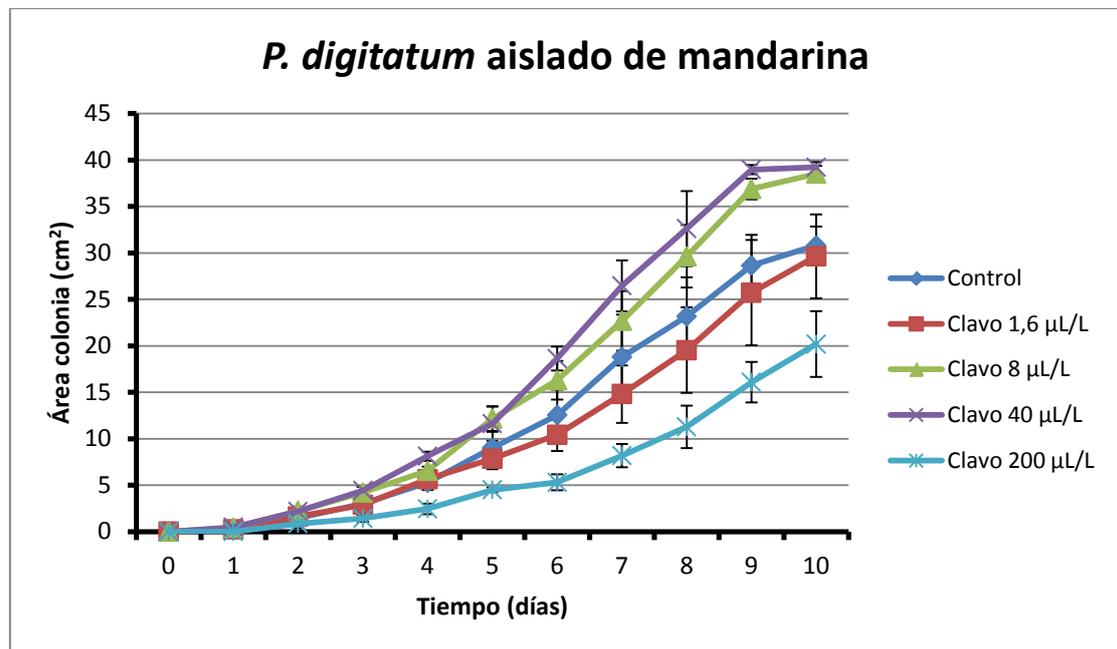


Figura 6.7. Efecto de diferentes concentraciones de aceite esencial de clavo sobre el crecimiento de *P. digitatum* aislado de mandarina. Las barras verticales son la desviación estándar.

Tabla 6.2. Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de *P. digitatum* aislado de mandarina para los diferentes tratamientos utilizados a base de 1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L/L}$ de los extractos de aceites esenciales de canela y clavo.

Tratamiento	Tasa de crecimiento ($\text{cm}^2/\text{día}$)	Duración fase lineal (días)	Inhibición del crecimiento (%)
Control	$6,3 \pm 2,2$	$3,5 \pm 1,3$	
Canela 1,6	$5,6 \pm 0,9$	$3,0 \pm 0,0$	
Canela 8	$6,9 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,8$	
Canela 40	$7,4 \pm 1,3$	$3,5 \pm 0,6$	
Canela 200	$3,3 \pm 0,6$	$2,8 \pm 1,3$	35
Clavo 1,6	$6,2 \pm 2,7$	$2,8 \pm 1,3$	
Clavo 8	$7,0 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,6$	
Clavo 40	$7,8 \pm 1,5$	$3,0 \pm 1,4$	
Clavo 200	$4,8 \pm 0,3$	$2,3 \pm 1,0$	51

Se ha comprobado, para los dos aislados de *P. digitatum*, que las concentraciones inferiores a 40 $\mu\text{L/L}$ de los aceites esenciales de canela y clavo demostraron un efecto opuesto al esperado, es decir, estimularon el crecimiento hifal durante la fase lineal que tiene lugar cuando el hongo presenta la mayor tasa de crecimiento. La explicación a este efecto puede deberse a que los extractos de aceites esenciales pueden contener ciertas sustancias favorecedoras del crecimiento que enmascara el escaso efecto inhibitor del aceite esencial a dosis muy bajas. Un efecto similar fue observado por Saks y Barkai-Golan (1995), estudiando los efectos del gel de *Aloe vera* sobre el desarrollo de *P. digitatum*, *P. expansum*, *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*.

En el caso de *P. italicum*, la Figura 6.8. muestra el crecimiento de este hongo aislado de limón en placas tratadas con solución testigo (agua destilada) y las tratadas con el extracto de aceite esencial de canela (Figura 6.8.) y clavo (Figura 6.9.) con las concentraciones utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L/L}$).

En *P. italicum* el efecto de las dosis de aceite fue ligeramente diferente. De este modo, las concentraciones inferiores a 8 $\mu\text{L/L}$ (dosis de 0,16 $\mu\text{L/placa}$) presentaron valores de crecimiento similares al control, mientras que la de 40 $\mu\text{L/L}$ (dosis de 0,8 $\mu\text{L/placa}$) presentó un ligero efecto retardador del crecimiento observado desde el sexto día de incubación, especialmente con el aceite de clavo. La concentración de 200 $\mu\text{L/L}$ (dosis de 4 $\mu\text{L/placa}$) se mostró más efectiva para *P. italicum* que para *P. digitatum*,

alcanzando una inhibición de aproximadamente 17% del área del control al décimo día de incubación para el primer hongo (valores muy similares para los dos aceites esenciales). La concentración de 1.000 $\mu\text{L/L}$ (dosis de 20 $\mu\text{L/}$ placa) inhibió completamente el desarrollo de los dos hongos. Estas diferencias pueden deberse a la selectividad que existe entre aceite esencial y especie de hongo contra el que ejerce acción fungicida. Parece ser que los aceites esenciales de clavo y canela tienen un mayor efecto inhibiendo el crecimiento de *P. italicum* que sobre *P. digitatum*. Esta selectividad entre tipo de aceite y especie atacada fue puesta de manifiesto por Kurita *et al.* (1981) escaneando 40 compuestos de aceites esenciales contra 7 especies de hongos y Singh *et al.* (1980) contra 22 especies de hongos, incluyendo patógenos de plantas. La actividad antifúngica de los aceites esenciales ha sido atribuida a fenoles monoterpénicos, especialmente el timol, carvacrol y eugenol (Isman, 2000); también al D-limoneno, cineol, α -pineno, β -pineno, β -mirceno y alcanfor (Barkai-Golan, 2001), o adicionalmente a p-anisaldehído y L-carvona. Sin embargo, existe cierta especificidad entre ellos, L-carvona es efectiva contra *B. cinerea*, pero no contra *Penicillium* sp. (Palou *et al.*, 2001). Los extractos de aceites de tomillo (Cayuela y García, 2007; Martínez, 2007) y enebro (Martínez, 2007) también han mostrado su eficacia para controlar las especies de *Penicillium* patógenas de los agrios.

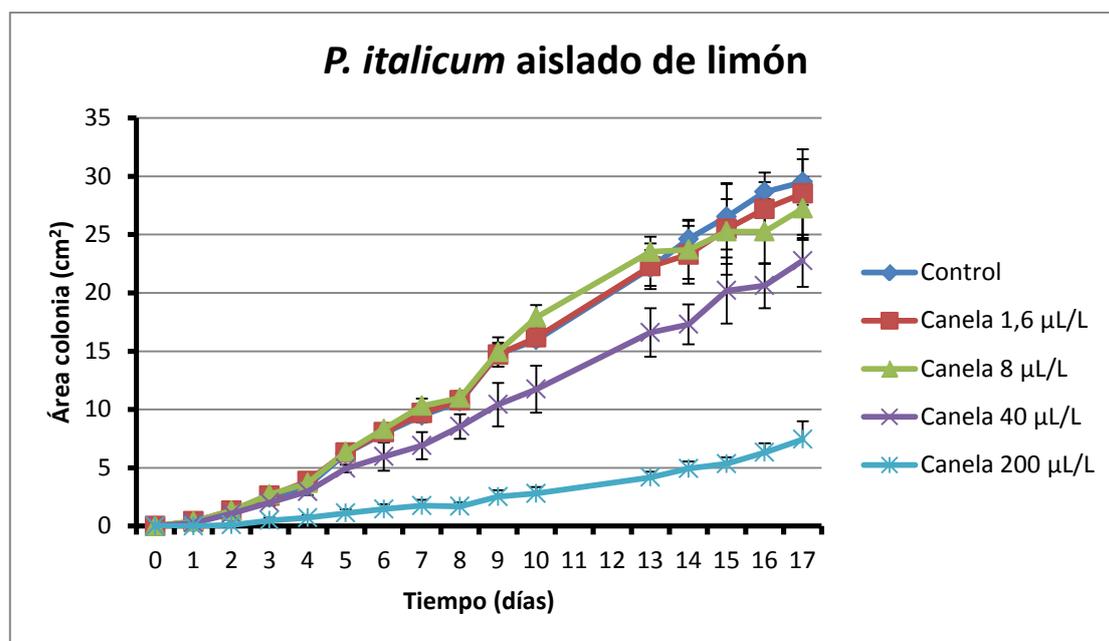


Figura 6.8. Efecto de diferentes concentraciones de aceite esencial de canela sobre el crecimiento de *P. italicum* aislado de limón. Las barras verticales son la desviación estándar.

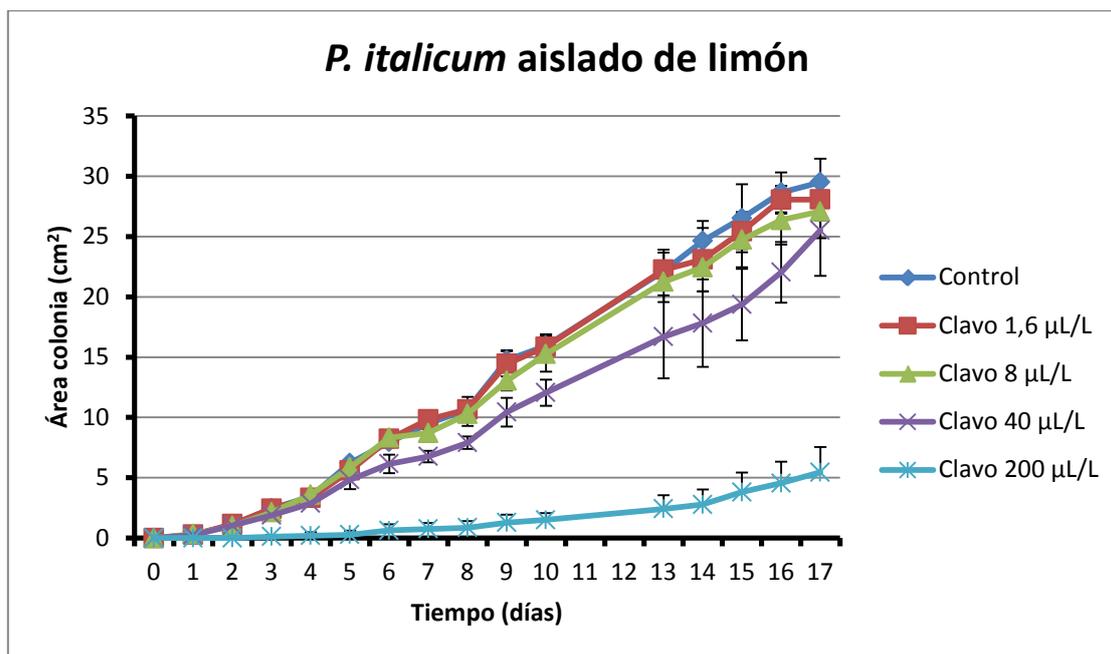


Figura 6.9. Efecto de diferentes concentraciones de aceite esencial de clavo sobre el crecimiento de *P. italicum* aislado de limón. Las barras verticales son la desviación estándar.

También se puso de manifiesto que el desarrollo de *P. italicum* fue más lento y que, incluso con una duración del experimento 7 días superior, el área máxima de las colonias estuvo en torno a 30 cm² a los 17 días, mientras que en el caso de *P. digitatum* llegó a niveles de 40 cm² en 10 días. *P. italicum* presentó una tasa de crecimiento más reducida que *P. digitatum*, y es conocido que la podredumbre azul es sólo más importante que la verde a temperaturas de refrigeración (Tuset, 1987).

Según la Tabla 6.3., la tasa crecimiento de *P. italicum*, tanto para canela como para clavo a la concentración de 200 µL/L, fue inferior a uno con una inhibición del crecimiento de aproximadamente el 90%.

En la Figura 6.10. se muestra el crecimiento de *Penicillium italicum* aislado de mandarina en placas tratadas con solución testigo y las tratadas con el extracto de aceite esencial de canela (Figura 6.10.) y clavo (Figura 6.11.) con las concentraciones utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 µL/L).

De la misma forma, las concentraciones inferiores a 8 µL/L (dosis de 0,16 µL/placa) presentaron valores de crecimiento similares al control, mientras que la de 40

$\mu\text{L/L}$ (dosis de $0,8 \mu\text{L/placa}$) presentó un ligero efecto retardador del crecimiento observado desde el sexto día de incubación, aunque algo menor que en el caso de *P. italicum* aislado de limón. La concentración de $200 \mu\text{L/L}$ se volvió a mostrar efectiva alcanzando una inhibición del crecimiento del 90 % (Tabla 6.4.). La concentración de $1.000 \mu\text{L/L}$ inhibió completamente el desarrollo de los dos hongos.

Tabla 6.3. Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de *P. italicum* aislado de limón para los diferentes tratamientos utilizados a base de 1,6; 8, 40, 200 y $1.000 \mu\text{L/L}$ de los extractos de aceites esenciales de canela y clavo.

Tratamiento	Tasa de crecimiento ($\text{cm}^2/\text{día}$)	Duración fase lineal (días)	Inhibición del crecimiento (%)
Control	$2,1 \pm 0,4$	$9,3 \pm 0,5$	
Canela 1,6	$1,6 \pm 0,1$	$9,5 \pm 2,4$	
Canela 8	$1,9 \pm 0,2$	$8,3 \pm 1,5$	
Canela 40	$1,6 \pm 0,1$	$7,5 \pm 1,0$	
Canela 200	$0,5 \pm 0,0$	$5,0 \pm 2,4$	81
Clavo 1,6	$2,1 \pm 0,4$	$9,3 \pm 0,5$	
Clavo 8	$2,0 \pm 0,1$	$8,0 \pm 2,2$	
Clavo 40	$1,5 \pm 0,9$	$7,8 \pm 2,2$	
Clavo 200	$0,9 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,5$	89

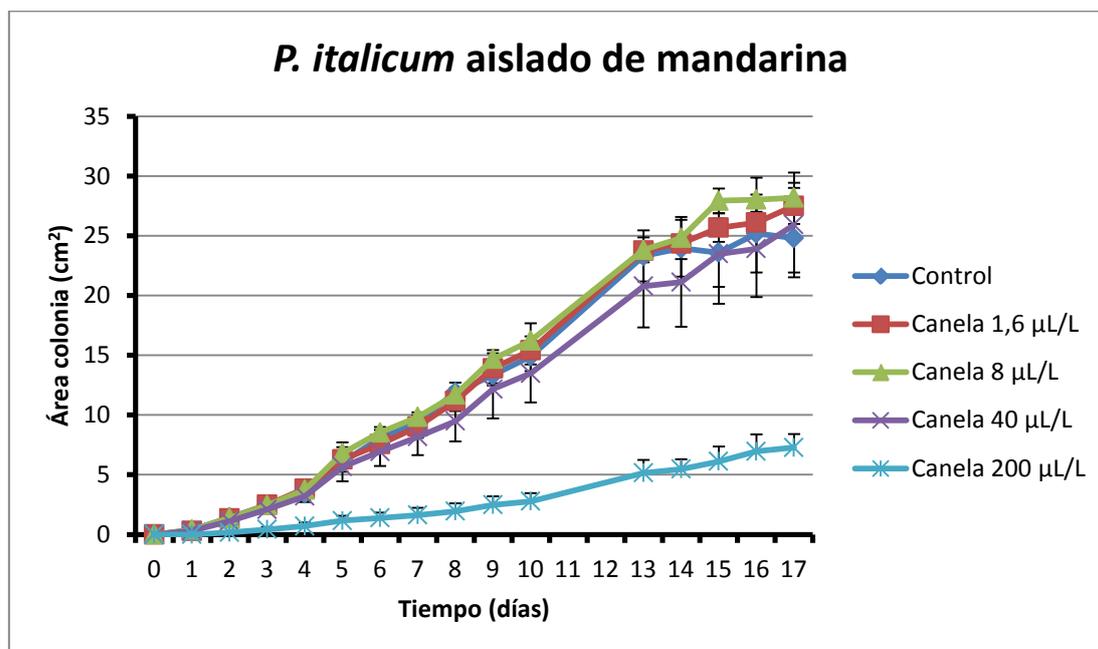


Figura 6.10. Efecto de diferentes concentraciones de aceite esencial de canela sobre el crecimiento de *P. italicum* aislado de mandarina. Las barras verticales son la desviación estándar.

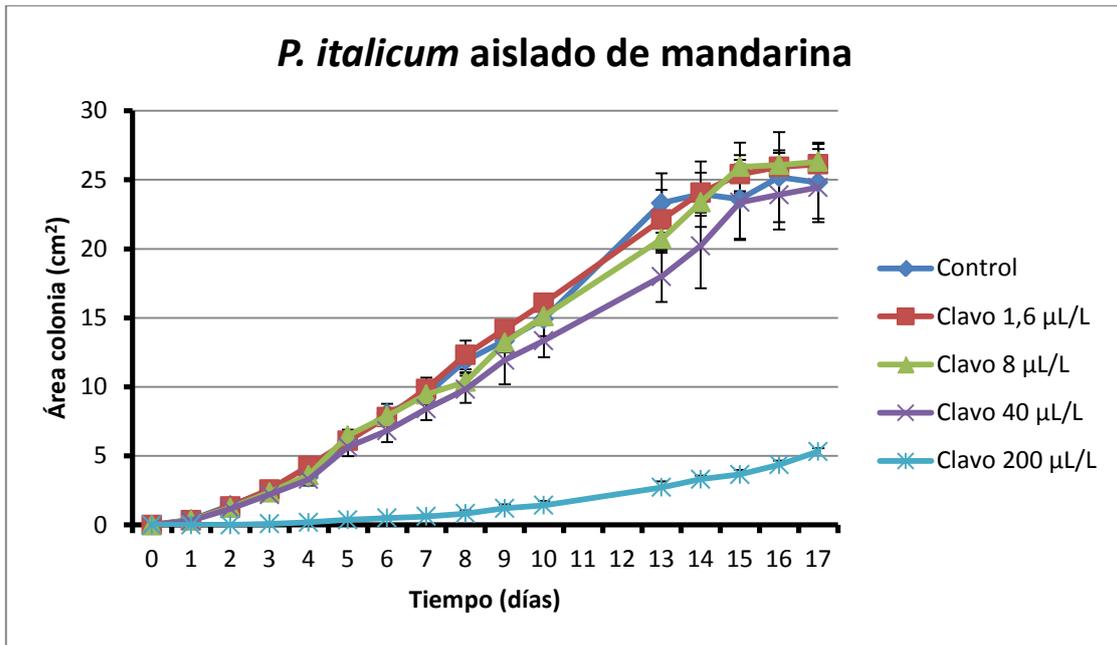


Figura 6.11. Efecto de diferentes concentraciones de aceite esencial de clavo sobre el crecimiento de *P. italicum* aislado de mandarina. Las barras verticales son la desviación estándar.

Tabla 6.4. Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de *P. italicum* aislado de mandarina para los diferentes tratamientos utilizados a base de 1,6; 8, 40, 200 y 1.000 µL/L de los extractos de aceites esenciales de canela y clavo.

Tratamiento	Tasa de crecimiento (cm ² /día)	Duración fase lineal (días)	Inhibición del crecimiento (%)
Control	2,8 ± 0,4	8,8 ± 0,5	
Canela 1,6	2,4 ± 0,4	8,5 ± 0,6	
Canela 8	2,5 ± 0,2	8,3 ± 0,5	
Canela 40	2,4 ± 0,4	7,5 ± 1,7	
Canela 200	0,8 ± 0,1	4,0 ± 1,4	81
Clavo 1,6	2,0 ± 0,5	9,3 ± 1,7	
Clavo 8	1,9 ± 0,2	8,3 ± 1,5	
Clavo 40	1,6 ± 0,3	9,8 ± 0,5	
Clavo 200	0,4 ± 0,0	6,3 ± 1,5	90

Efecto de los extractos de aceites esenciales de canela y clavo sobre la conidiogénesis de *P. digitatum* y *P. italicum*.

En las Figuras 6.12. y 6.13., se muestra el efecto que presentaron las diferentes concentraciones de aceites esenciales de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L/L}$) sobre la conidiogénesis de *Penicillium digitatum* aislado de limón (Figura 6.12.) y *Penicillium digitatum* aislado de mandarina (Figura 6.13.).

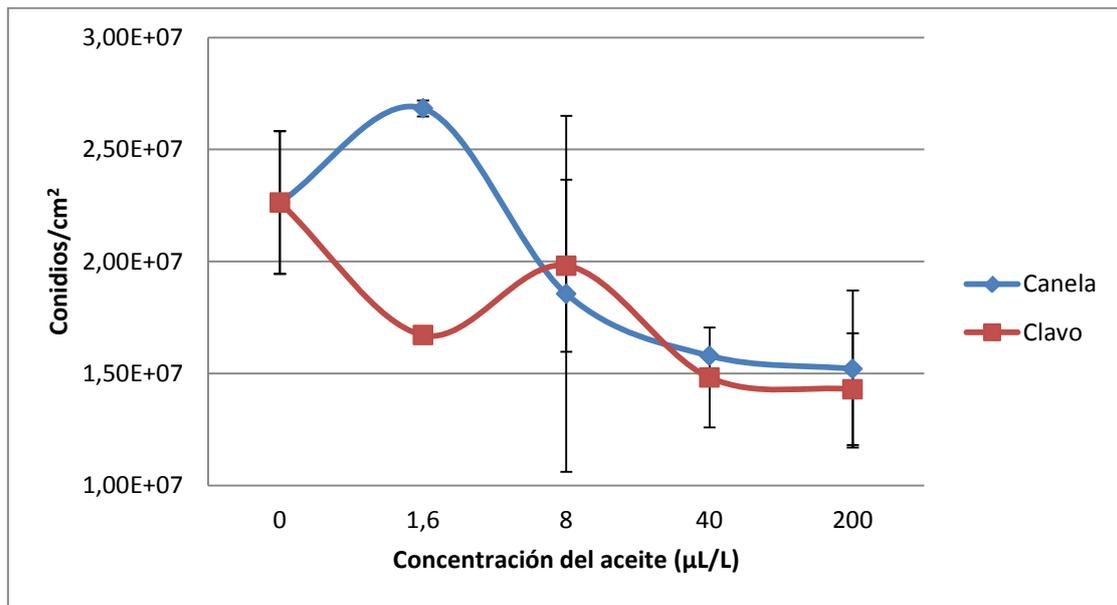


Figura 6.12. Efecto de las diferentes concentraciones de aceite esencial de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L/L}$) sobre la conidiogénesis (conidios/ cm^2) de *P. digitatum* aislado de limón. Las barras verticales son la desviación estándar.

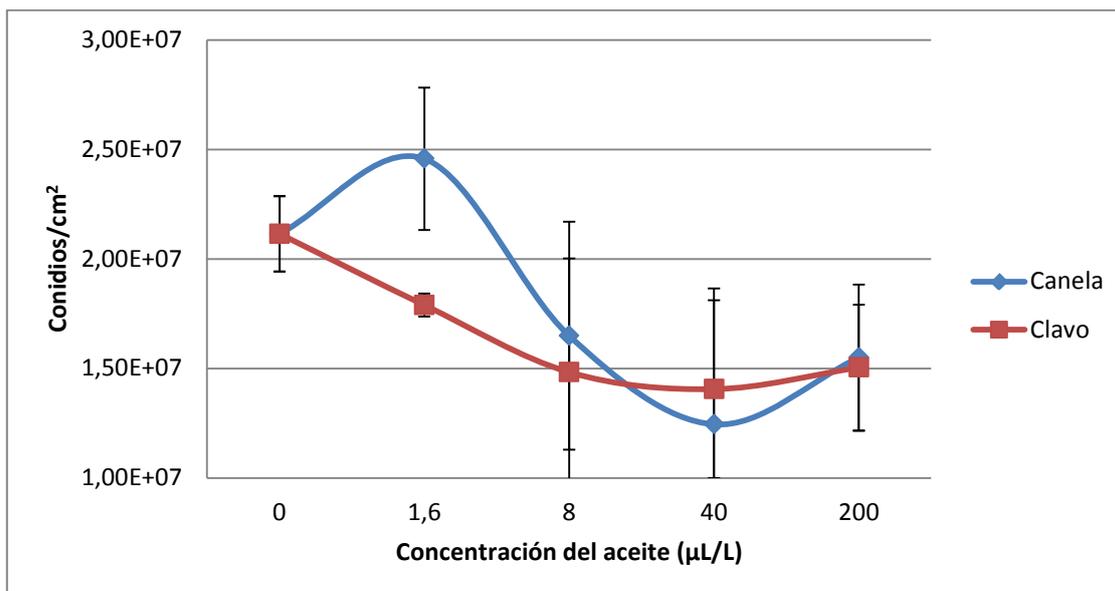


Figura 6.13. Efecto de las diferentes concentraciones de aceite esencial de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 µL/L) sobre la conidiogénesis (conidios/cm²) de *P. digitatum* aislado de mandarina. Las barras verticales son la desviación estándar.

Si analizamos ambas figuras, podemos observar que hubo una tendencia descendente en la cantidad de conidios que crecieron por cm² en ambos aislados de *Penicillium digitatum* conforme se aumentó la concentración de los aceites esenciales utilizados.

Sin embargo, hay que destacar que en el caso del aceite esencial de canela, a la concentración de 1,6 µL/L (dosis de 0,032 µL/placa), se observó un estímulo en la conidiogénesis de *P. digitatum*, tanto aislado de limón como de mandarina. De esta manera, el crecimiento de conidios por cm² de *P. digitatum* con el tratamiento de 1,6 µL/L de extracto de canela fue de aproximadamente $5 \cdot 10^6$ conidios/cm² superior respecto a la solución testigo (agua destilada). Este efecto estimulante en el crecimiento de conidios, a esa misma concentración de extracto (1,6 µL/L), fue diferente en el caso de las placas tratadas con aceite esencial de clavo, notándose incluso en *P. digitatum* aislado de limón una inhibición en el crecimiento de conidios, superior a la observada con el tratamiento de 8 µL/L de extracto de clavo.

En las Figuras 6.14. y 6.15. se muestra el efecto que presentaron las diferentes concentraciones de aceites esenciales de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y

1.000 $\mu\text{L/L}$) sobre la conidiogénesis de *Penicillium italicum* aislado de limón (Figura 6.14.) y *Penicillium italicum* aislado de mandarina (Figura 6.15.).

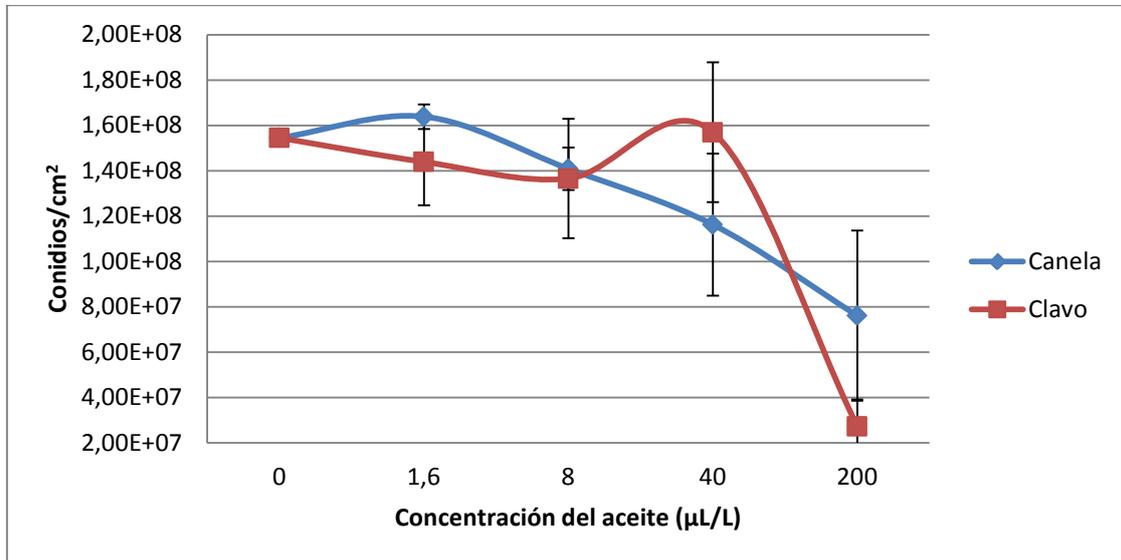


Figura 6.14. Efecto de las diferentes concentraciones de aceite esencial de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L/L}$) sobre la conidiogénesis (conidios/ cm^2) de *P. italicum* aislado de limón. Las barras verticales son la desviación estándar.

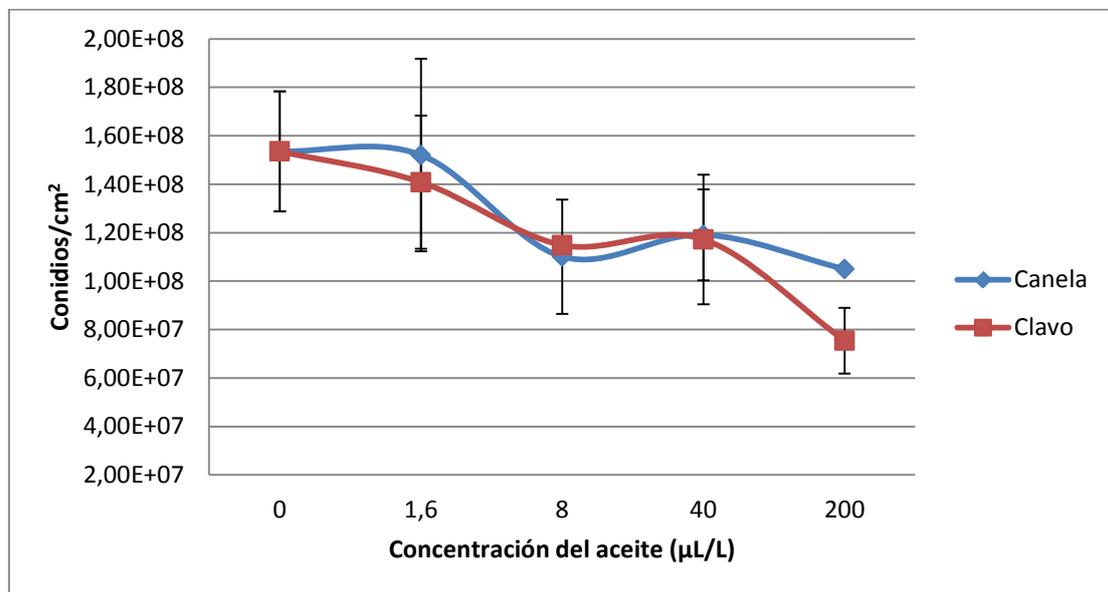


Figura 6.15. Efecto de las diferentes concentraciones de aceite esencial de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L/L}$) sobre la conidiogénesis (conidios/ cm^2) de *P. italicum* aislado de mandarina. Las barras verticales son la desviación estándar.

En el caso de *P. italicum*, también se observó un descenso en el número de conidios que crecieron por unidad de superficie cuando se aumentó la dosis de los aceites esenciales de clavo y canela. Esta disminución fue más acentuada que en el caso anterior de *P. digitatum*, habiendo una diferencia de aproximadamente $1 \cdot 10^8$ conidios/cm² entre los resultados observados con la solución testigo y el tratamiento con la mayor concentración utilizada para ambos aceites esenciales, 200 µL/L.

Este efecto inhibitorio de la formación de conidios fue puesto de manifiesto por Nishiyama *et al.* (1998), comprobando que la conidiogénesis de cuatro especies de hongos filamentosos, como son *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *Penicillium expansum* y *Rhizopus*, fue suprimida por el contacto gaseoso con aceites de limón, lavanda y tomillo. Este efecto antiesporulante de los aceites esenciales pareció estar correlacionado con su actividad inhibitoria de la respiración, en vez de con su actividad inhibitoria del crecimiento.

Además, se observó que la cantidad de conidios que crecen por cm² es muy superior en *P. italicum*, del orden de 10^8 , respecto a los crecidos en *P. digitatum*, del orden de 10^7 . Esto puede ser debido, como se verá más adelante, a la diferencia de tamaño de los conidios entre ambas especies. Los conidios de *P. italicum* presentaron aproximadamente la mitad de tamaño (µm) que los conidios de *P. digitatum*, pudiendo así crecer en mayor cantidad por unidad de superficie.

Efecto de los extractos de aceites esenciales de canela y clavo sobre el tamaño de los conidios de *P. digitatum* y *P. italicum*.

En las Figuras 6.16. y 6.17. se muestra el efecto que presentaron las diferentes concentraciones de aceites esenciales de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 µL/L) sobre el tamaño de los conidios de *Penicillium digitatum* aislado de limón (Figura 6.16.) y *Penicillium digitatum* aislado de mandarina (Figura 6.17.).

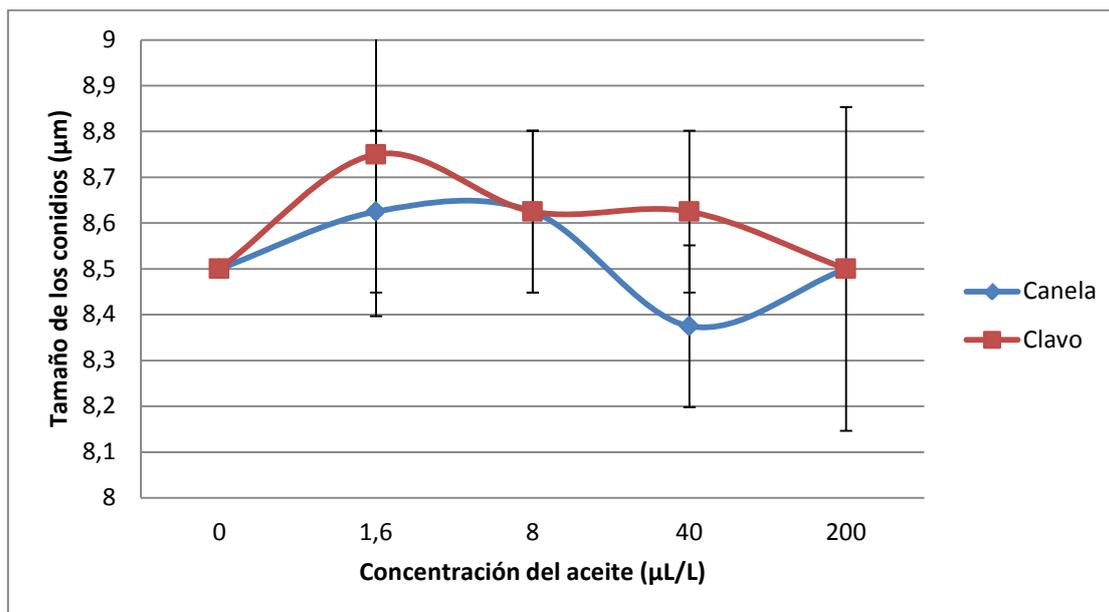


Figura 6.16. Efecto de las diferentes concentraciones de aceite esencial de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 µL/L) sobre el tamaño de los conidios (µm) de *P. digitatum* aislado de limón. Las barras verticales son la desviación estándar.

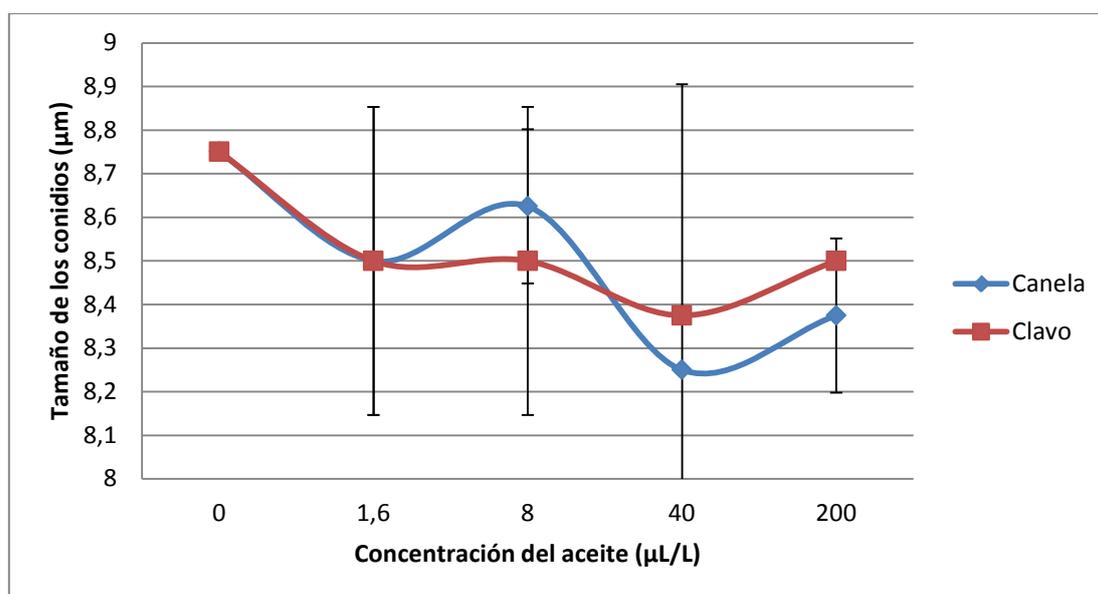


Figura 6.17. Efecto de las diferentes concentraciones de aceite esencial de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 µL/L) sobre el tamaño de los conidios (µm) de *P. digitatum* aislado de mandarina. Las barras verticales son la desviación estándar.

No se observó un efecto claro de los aceites esenciales de clavo y canela sobre el tamaño de los conidios de *P. digitatum* aislado de limón y mandarina. Éstos, presentaron en su mayoría una forma elíptica y un tamaño variable, con una longitud

que varió entre 8 y 9 μm . Estas dimensiones son conformes a las que expusieron Frisvad y Filtenborg (1995), según los cuales, los conidios de *P. digitatum* son de forma cilíndrica y elíptica, de color verde olivo y con un tamaño de 3,5-8 x 3,0-4,0 μm .

En las Figuras 6.18. y 6.19. se muestra el efecto que presentaron las diferentes concentraciones de aceites esenciales de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L/L}$) sobre el tamaño de los conidios de *Penicillium italicum* aislado de limón (Figura 6.18.) y *Penicillium italicum* aislado de mandarina (Figura 6.19.).

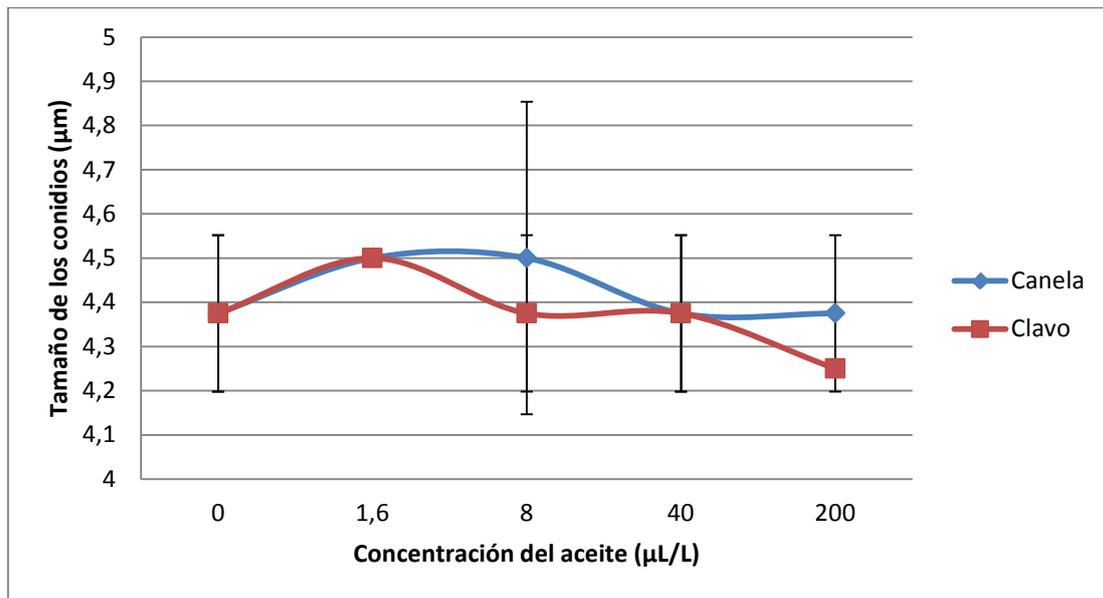


Figura 6.18. Efecto de las diferentes concentraciones de aceite esencial de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L/L}$) sobre el tamaño de los conidios (μm) de *P. italicum* aislado de limón. Las barras verticales son la desviación estándar.

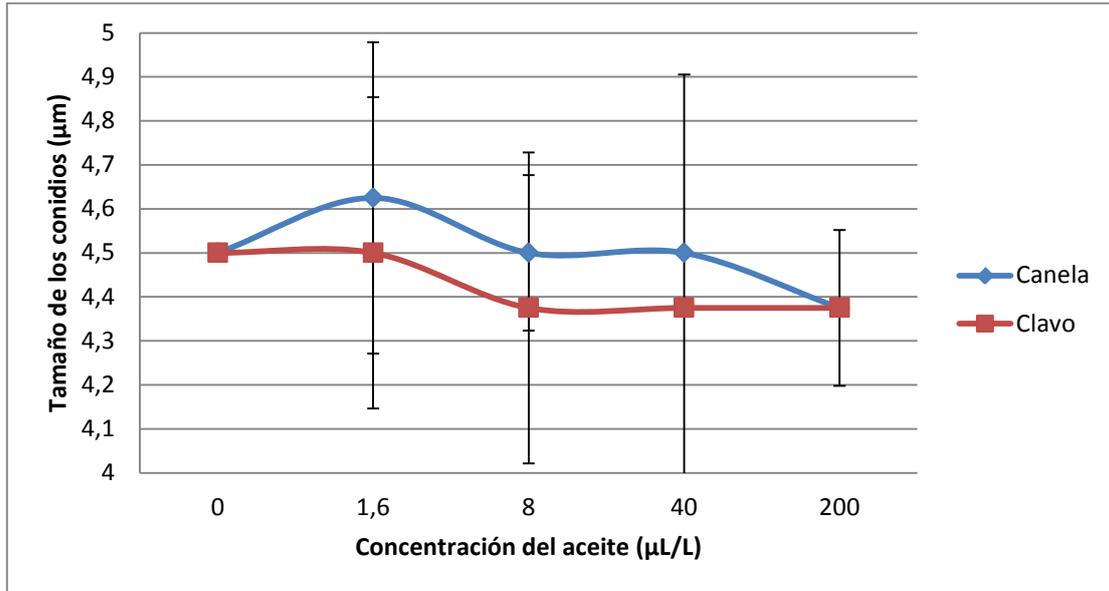


Figura 6.19. Efecto de las diferentes concentraciones de aceite esencial de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 µL/L) sobre el tamaño de los conidios (µm) de *P. italicum* aislado de mandarina. Las barras verticales son la desviación estándar.

En el caso de *P. italicum*, tampoco se observó ningún cambio en cuanto a tamaño y forma en los conidios por efecto de los tratamientos con diferentes dosis de los aceites esenciales utilizados. Estas figuras muestran que el tamaño de los conidios para ambos aislados de *P. italicum*, de limón y de mandarina, presentó una tendencia más o menos lineal, que osciló entre 4,3 y 4,6 µm de longitud, aproximadamente.

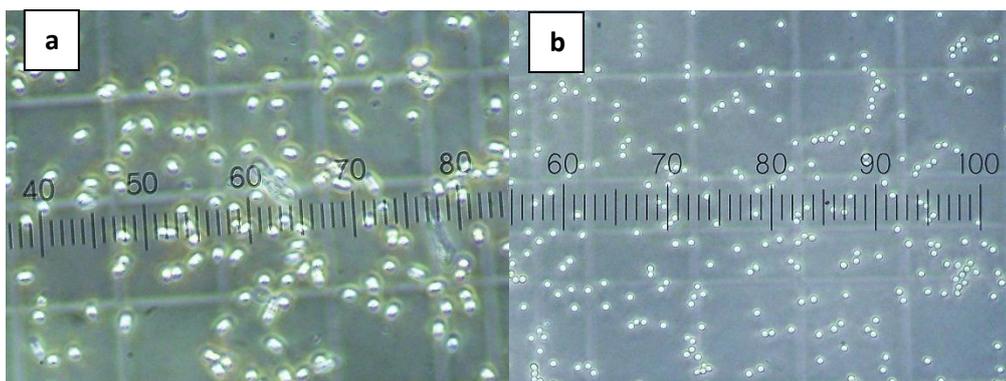


Fig. 6.20. (a) Conidios de *P. digitatum* observados con microscopio de contraste de fases. (b) Conidios de *P. italicum* observados con microscopio de contraste de fases.

Se contrastó, por tanto, y como se observa en la Fig. 6.20, la diferencia de tamaños y formas entre los conidios de ambas especies de *Penicillium*, *digitatum* y *P.*

italicum. Así pues, mientras que los conidios de *P. digitatum* presentaron una forma predominantemente elíptica y una longitud que osciló entre 8,2 y 8,8 μm , los de *P. italicum*, por su parte, se mostraron cilíndricos y con un tamaño que varió entre 4,3 y 4,6 μm de longitud, es decir, aproximadamente la mitad que *P. digitatum*. Estas diferencias de morfología entre ambas especies de *Penicillium* fue puesta de manifiesto por Tuset (1987). Los conidios de *P. digitatum* son lisos, de color verde oscuro en masa, variables en la forma (predominan los elípticos aunque es frecuente la presencia de cilíndricos y subglobosos) y con dimensiones comprendidas entre 3,5-12 x 3-8 μm (media 5,8-7,6 x 4,1-6,2). Sin embargo, los elementos constituyentes de la parte esporígena de *P. italicum* son menores en tamaño que los de *P. digitatum*. Los conidios son al principio típicamente cilíndricos y en la madurez elípticos o subglobosos, con medidas comprendidas entre 4-10 x 2,5-7 (media 4-6 x 2,5-4 μm).

Efecto de los extractos de aceites esenciales de canela y clavo sobre la masa de micelio de *P. digitatum* y *P. italicum*.

En las Figuras 6.21. y 6.22., se muestra el efecto que presentaron las diferentes concentraciones de aceites esenciales de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L/L}$) sobre la masa de micelio de *Penicillium digitatum* aislado de limón (Figura 6.21.) y *Penicillium digitatum* aislado de mandarina (Figura 6.22.).

La masa de micelio aéreo de *P. digitatum* aislado de limón disminuyó con la dosis de aceites esenciales de canela y de clavo. Sin embargo, esta disminución fue más acusada con el uso del aceite esencial de canela. La dosis de 8 $\mu\text{L/L}$ arrojó la mínima masa de micelio. Aunque los valores medios de masa aumentaron con las dosis de 40 y 200 $\mu\text{L/L}$, consideramos que no son contradictorios puesto que el error aumentó considerablemente a estas concentraciones (Fig. 6.21). Sin duda se tendría que haber aumentado el tamaño de la muestra.

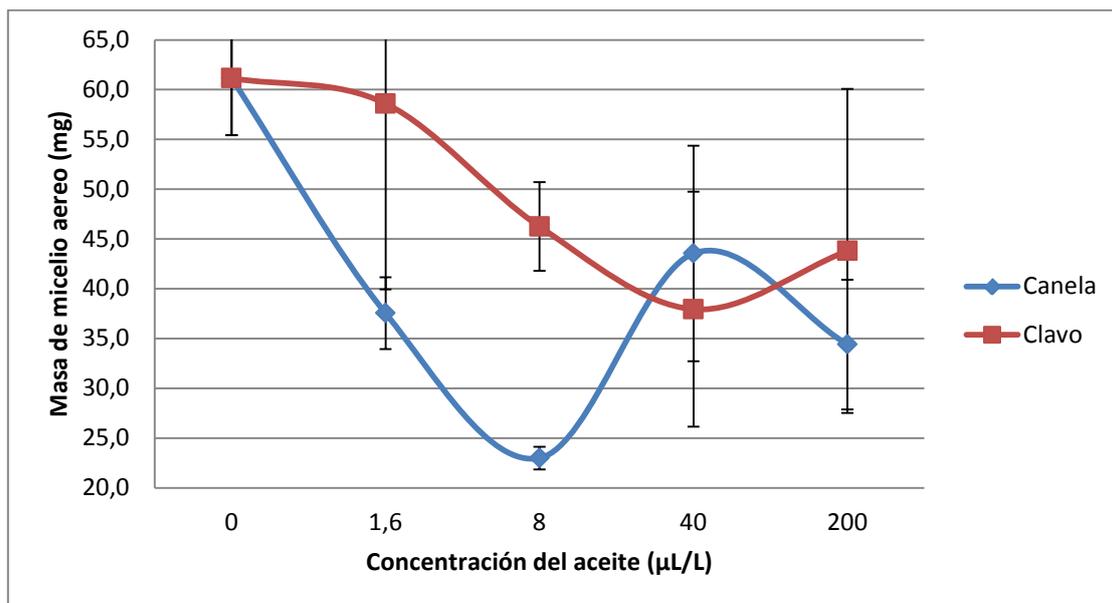


Figura 6.21. Efecto de las diferentes concentraciones de aceite esencial de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 µL/L) sobre la masa de micelio aéreo (mg) de *P. digitatum* aislado de limón. Las barras verticales son la desviación estándar.

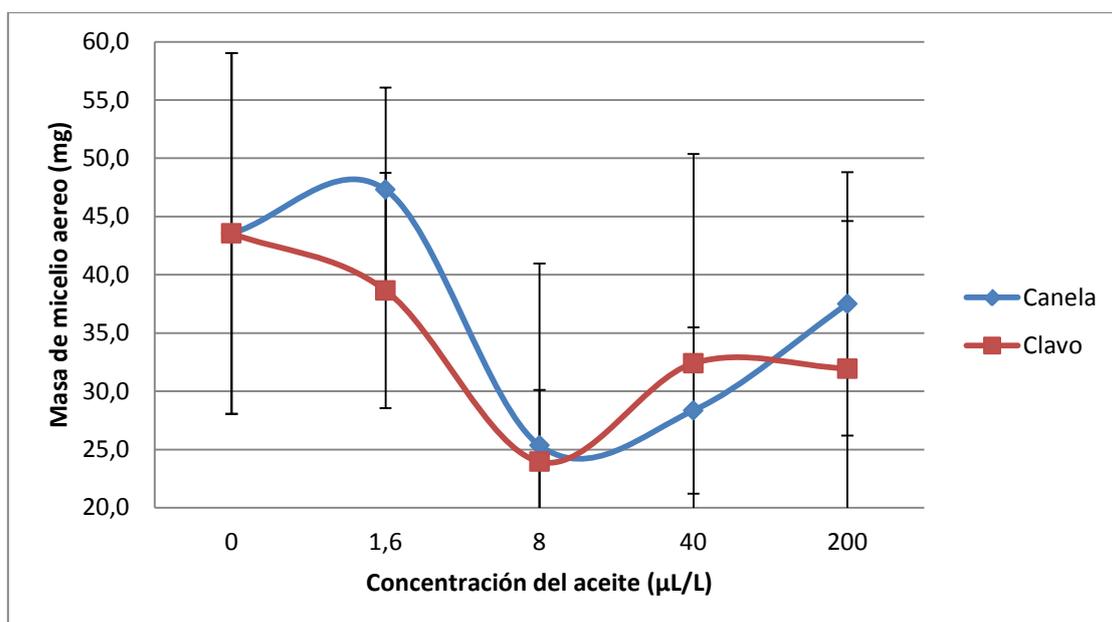


Figura 6.22. Efecto de las diferentes concentraciones de aceite esencial de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 µL/L) sobre la masa de micelio aéreo (mg) de *P. digitatum* aislado de mandarina. Las barras verticales son la desviación estándar.

Para *P. digitatum* aislado de mandarina (Fig. 6.22), la masa de micelio siguió una tónica similar a la de *P. digitatum* aislado de limón. Sin embargo, la dosis de 1,6 µL/L no tuvo efecto alguno sobre el descenso de micelio y este descenso fue menos

acusado en todas sus dosis de aceites de canela y clavo que el descenso obtenido para *P. digitatum* aislado de limón.

En las Figuras 6.23. y 6.24. se muestra el efecto que presentaron las diferentes concentraciones de aceites esenciales de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L/L}$) sobre la masa de micelio de *Penicillium italicum* aislado de limón (Figura 6.23.) y *Penicillium italicum* aislado de mandarina (Figura 6.24.).

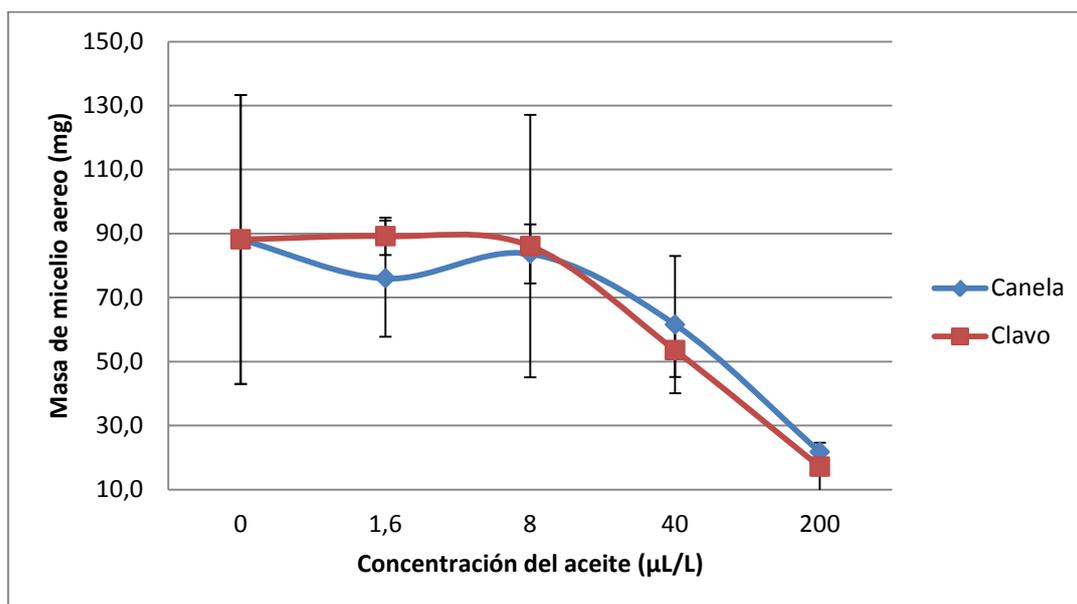


Figura 6.23. Efecto de las diferentes concentraciones de aceite esencial de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 $\mu\text{L/L}$) sobre la masa de micelio aéreo (mg) de *P. italicum* aislado de limón. Las barras verticales son la desviación estándar.

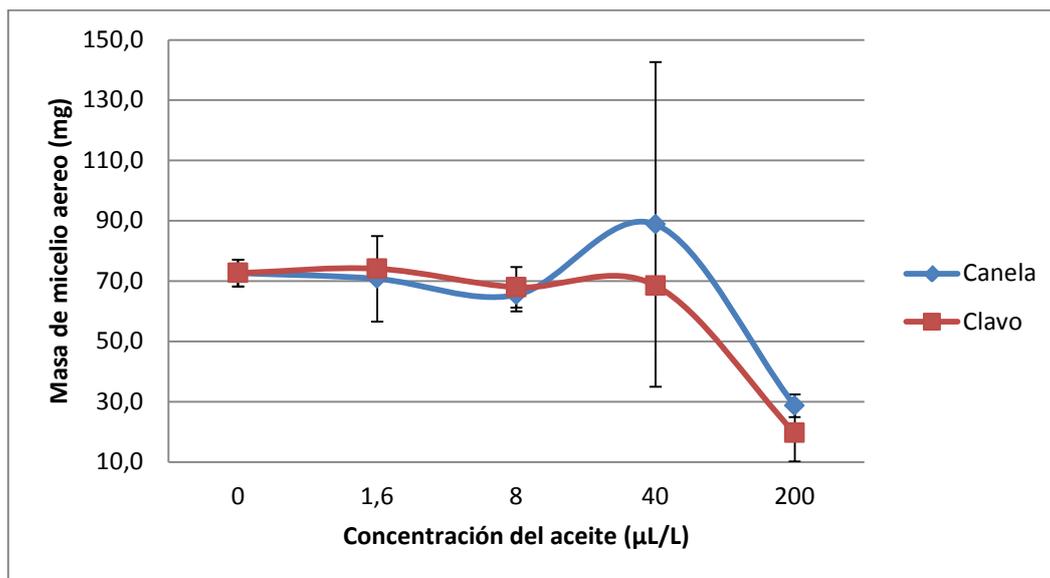


Figura 6.24. Efecto de las diferentes concentraciones de aceite esencial de canela y clavo utilizadas (1,6; 8, 40, 200 y 1.000 µL/L) sobre la masa de micelio aéreo (mg) de *P. italicum* aislado de mandarina. Las barras verticales son la desviación estándar.

Para ambos aislados, tanto de limón como de mandarina, se observó que la masa de micelio de *P. italicum* siguió prácticamente la misma tendencia con los diferentes tratamientos utilizados de los aceites de clavo y canela, al principio se mantuvo lineal a las concentraciones de 1,6 y 8 µL/L de ambos aceites, es decir, se obtuvo la misma masa de micelio medida en miligramos que en el caso de la solución testigo (agua destilada). En el caso de *P. italicum* aislado de limón, la masa de micelio presentó una disminución a partir de 8 µL/L de aceites, manteniendo esa tendencia descendente hasta la mayor concentración utilizada, 200 µL/L. Esto indica que las concentraciones de 40 y 200 µL/L de los aceites esenciales de canela y clavo redujeron considerablemente el crecimiento en masa del micelio de *P. italicum* aislado de limón, de manera proporcional a la dosis aplicada de aceite. Por otro lado, en el aislado de mandarina, la masa de micelio del hongo se mantuvo constante con la concentración de 40 µL/L de aceite de clavo, aumentando incluso alrededor de 20 miligramos en el caso del aceite de canela. Sin embargo, con la concentración de 200 µL/L de ambos aceites si se observó una reducción importante, de aproximadamente 50 miligramos, en el crecimiento en masa de *P. italicum* aislado de mandarina.

Otra diferencia entre ambos aislados fue que en el aislado de limón se observó mayor crecimiento en la masa de micelio de *P. italicum*, con una diferencia de

aproximadamente 20 miligramos respecto a este hongo aislado de mandarina, para la solución testigo y las concentraciones de 1,6 y 8 $\mu\text{L/L}$ de los aceites esenciales de canela y clavo. Sin embargo, con la concentración de 200 $\mu\text{L/L}$ de aceite de canela y clavo se obtuvo la misma masa de micelio del hongo (30 mg) para el aislado de limón y para el aislado de mandarina. Esto indica que ambos aceites tuvieron un mayor efecto sobre *P. italicum* aislado de limón, donde se presentó una mayor inhibición del crecimiento de la masa de su micelio.

Esta acción inhibidora en el crecimiento de la masa de micelio de hongos fitopatógenos fue reportada por Bernal Alcocer *et al*, (2005) evaluando la actividad fungicida de metabolitos secundarios como los alcaloides, presentes en cerca del 20% de todas las especies de plantas. Estudiando el efecto de los alcaloides presentes en distintas especies de *Lupinus* observaron que el peso seco promedio del micelio de *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria solani* y *Rhizoctonia solani*, en todas las concentraciones del extracto, fue menor al peso seco que se registró en el testigo (0 ppm), observándose una tendencia a incrementarse significativamente la inhibición del crecimiento micelial de 30 a 94% conforme aumentaron las concentraciones de extracto, pero sin diferencias significativas entre las concentraciones más altas (10.000 y 20.000 ppm). Sin embargo, a concentraciones más bajas se observó un mayor incremento en el peso seco del micelio con respecto al testigo (0 ppm).

Efecto de los extractos de aceites esenciales de canela y clavo sobre la germinación de conidios de *P. digitatum* y *P. italicum*.

En las Figuras 6.25. y 6.26., se muestra el efecto que presentaron los aceites esenciales de canela y clavo utilizados a una concentración de 500 $\mu\text{L/L}$ (dosis de 10 $\mu\text{L/placa}$) sobre la germinación de *Penicillium digitatum* aislado de limón (Figura 6.25.) y *Penicillium digitatum* aislado de mandarina (Figura 6.26.).

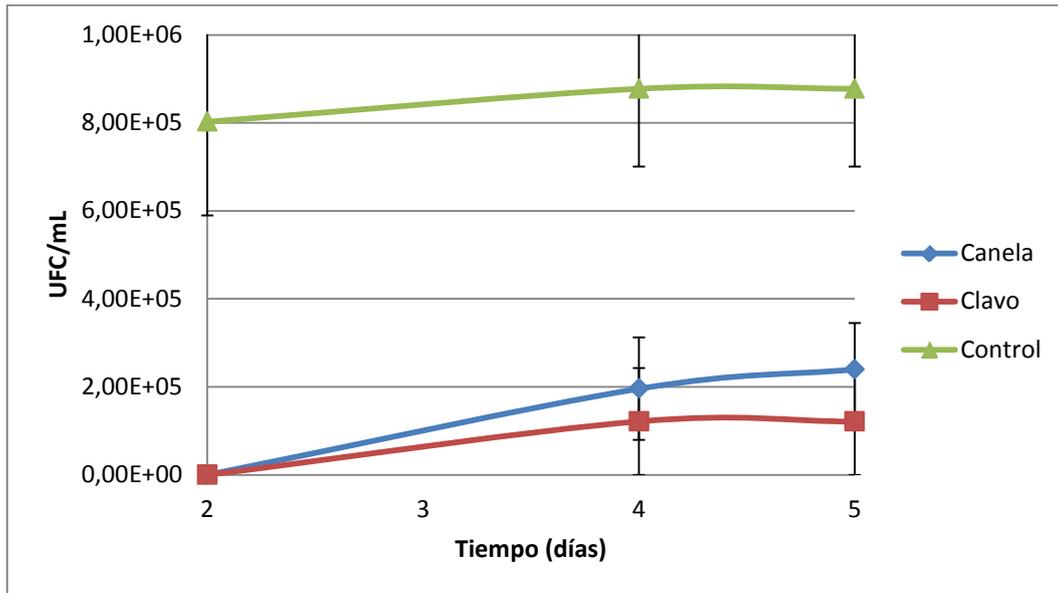


Figura 6.25. Efecto de 500 µL/L de aceite esencial de canela y clavo sobre la germinación de *P. digitatum* aislado de limón. Las barras verticales son la desviación estándar.

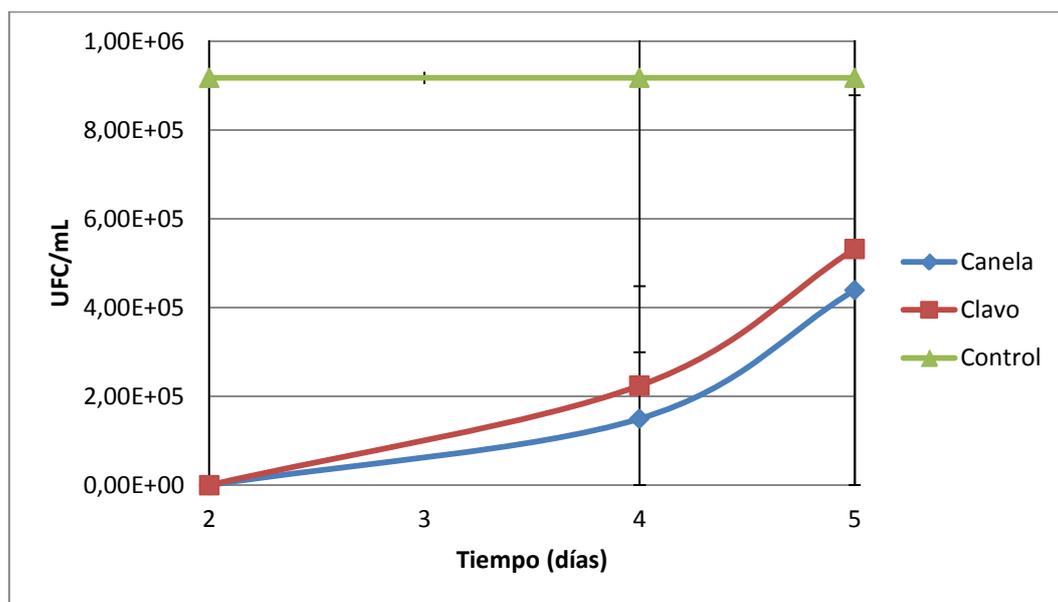


Figura 6.26. Efecto de 500 µL/L de aceite esencial de canela y clavo sobre la germinación de *P. digitatum* aislado de mandarina. Las barras verticales son la desviación estándar.

Se observó que para una concentración de 500 µL/L de los aceites esenciales de canela y clavo se produjo una gran inhibición en la germinación de los conidios de *P. digitatum*. Este efecto sobre la germinación del hongo fue más acentuado sobre *P. digitatum* aislado de limón en el quinto día de incubación. Así, mientras que en *P. digitatum* aislado de limón se obtuvo un recuento en torno a $2 \cdot 10^5$ UFC/mL para ambos

aceites, en *P. digitatum* aislado de mandarina el recuento fue mayor, de aproximadamente $5 \cdot 10^5$ UFC/mL.

En las Figuras 6.27. y 6.28., se muestra el efecto que presentaron los aceites esenciales de canela y clavo utilizados a una concentración de 500 μ L/L (dosis de 10 μ L/placa) sobre la germinación de *Penicillium italicum* aislado de limón (Figura 6.27.) y *Penicillium italicum* aislado de mandarina (Figura 6.28.).

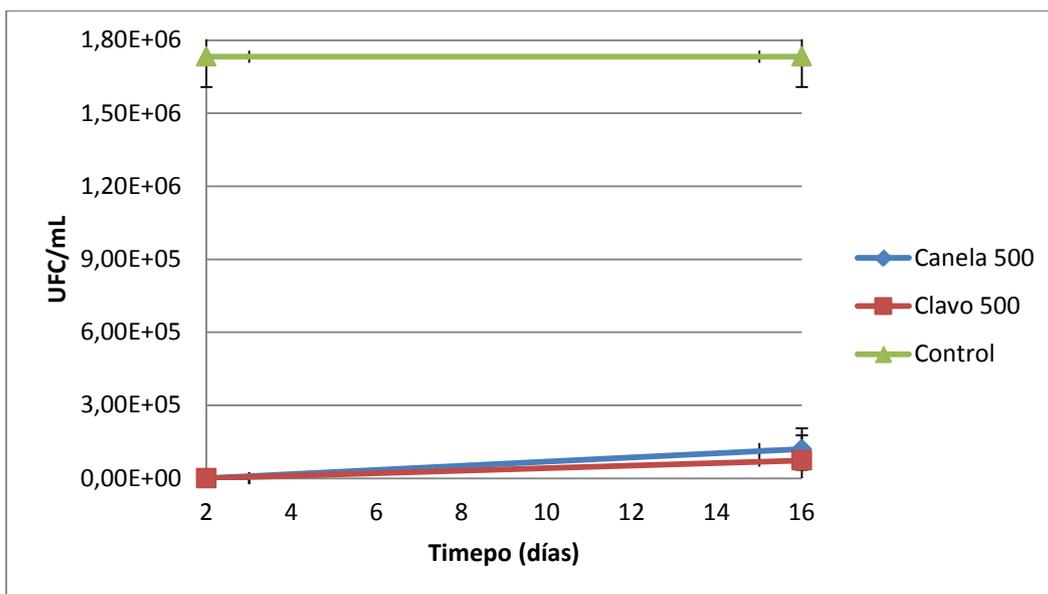


Figura 6.27. Efecto de 500 μ L/L de aceite esencial de canela y clavo sobre la germinación de *P. italicum* aislado de limón. Las barras verticales son la desviación estándar.

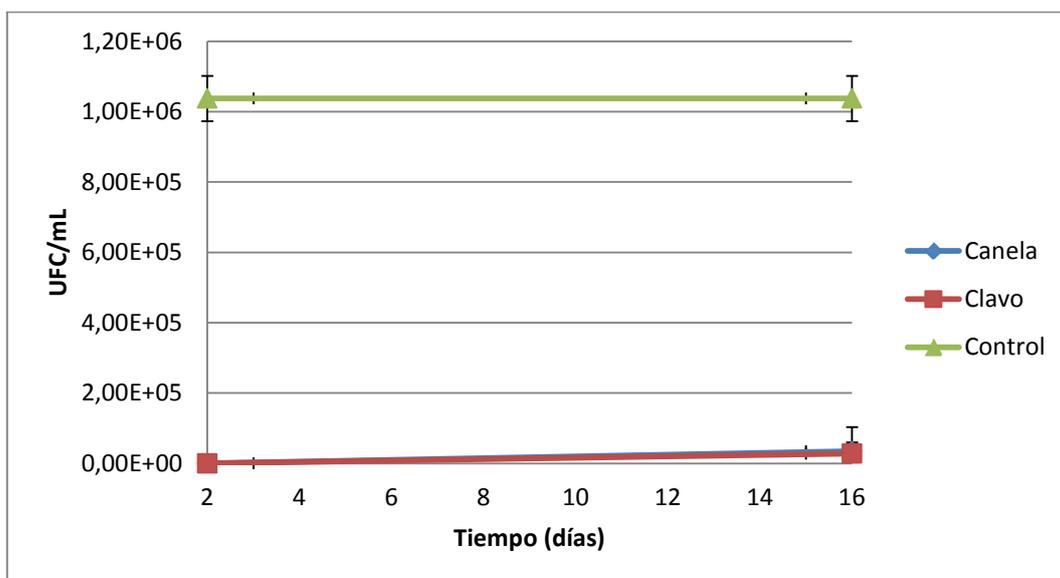


Figura 6.28. Efecto de 500 μ L/L de aceite esencial de canela y clavo sobre la germinación de *P. italicum* aislado de mandarina. Las barras verticales son la desviación estándar.

En el caso de *P. italicum*, estos aceites esenciales mostraron un efecto totalmente inhibitorio en la germinación del hongo. Solamente, a partir del día 16 de experimento se observó un pequeño crecimiento de unidades formadoras de colonias en las placas tratadas con los aceites de clavo y canela, siendo $1,20 \times 10^5$ UFC/mL en la placa tratada con 500 $\mu\text{L/L}$ de canela y $7,30 \times 10^4$ UFC/mL en la placa tratada con 500 $\mu\text{L/L}$ de clavo para *P. italicum* aislado de limón, mientras que en el caso del aislado de mandarina el crecimiento fue algo menor, $3,45 \times 10^4$ y $2,78 \times 10^4$ UFC/mL en las placas tratadas con canela y clavo, respectivamente.

Kurt *et al.* (2006), estudiando el efecto fungicida de diferentes aceites esenciales de orégano, tomillo, lavanda y romero encontraron que el aceite de orégano a una concentración de 12,8 mg/mL inhibía el crecimiento de *B. cinerea* completamente. Los aceites esenciales de lavanda y romero eran inhibidores a concentraciones relativamente altas (25,6 mg/mL). También observaron que la germinación de las esporas, como en el caso de este estudio, fue inhibida por los aceites esenciales probados.

Debido a la completa inhibición de la germinación de *P. italicum*, se probó con una concentración menor de ambos aceites esenciales, siendo ésta 200 $\mu\text{L/L}$. En las siguientes figuras se muestra el efecto que presentaron los aceites esenciales de canela y clavo utilizados a una concentración de 200 $\mu\text{L/L}$ (dosis de 4 $\mu\text{L/placa}$) sobre la germinación de *Penicillium italicum* aislado de limón (Figura 6.29.) y *Penicillium italicum* aislado de mandarina (Figura 6.30.).

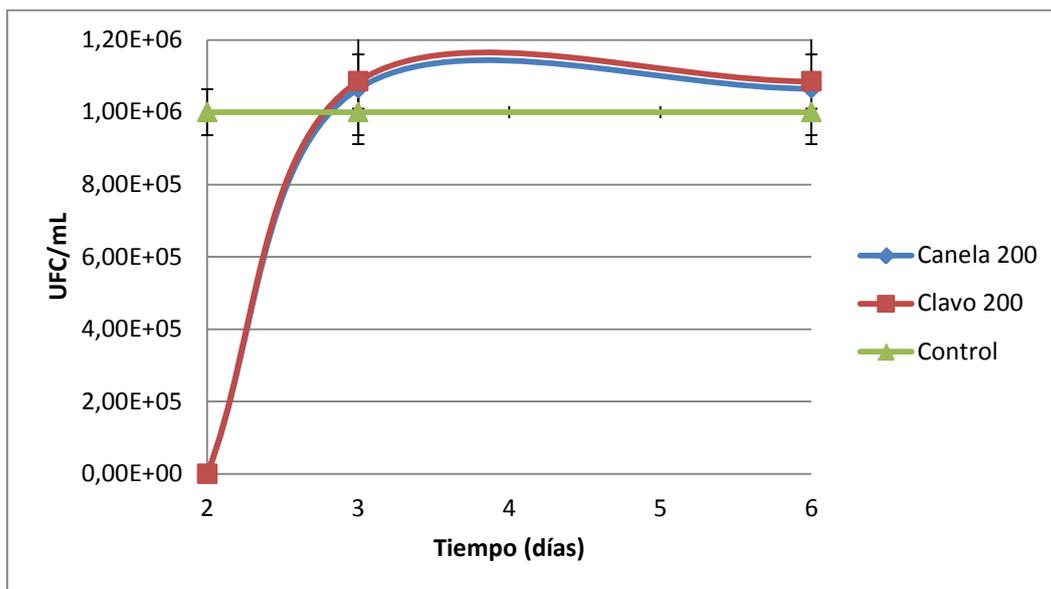


Figura 6.29. Efecto de 200 µL/L de aceite esencial de canela y clavo sobre la germinación de *P. italicum* aislado de limón. Las barras verticales son la desviación estándar.

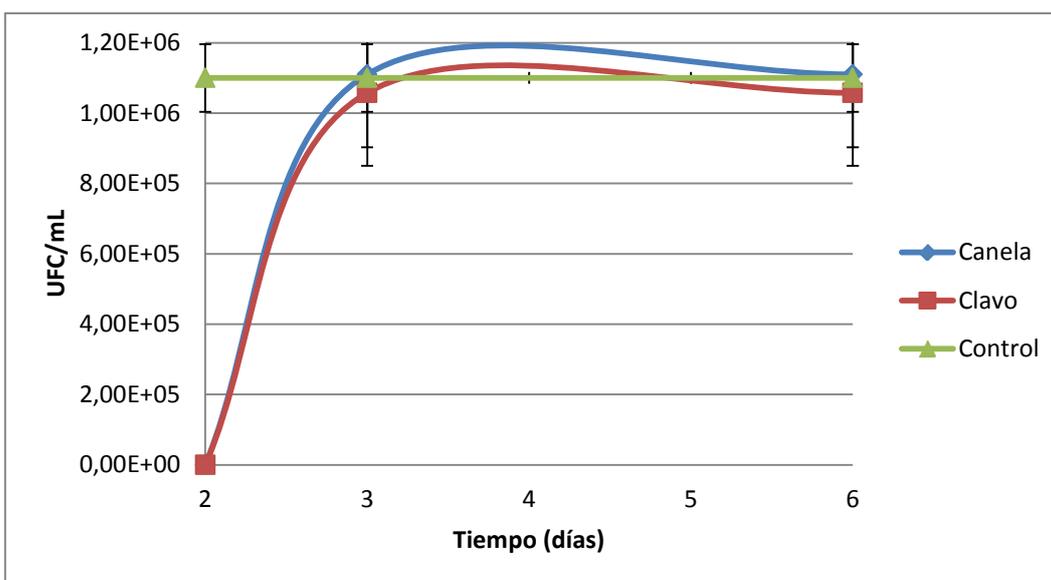


Figura 6.30. Efecto de 200 µL/L de aceite esencial de canela y clavo sobre la germinación de *P. italicum* aislado de mandarina. Las barras verticales son la desviación estándar.

Con esta concentración reducida de 200 µL/L de ambos aceites se observó una inhibición completa de la germinación de *P. italicum* al cabo de dos días de incubación. Sin embargo, a partir del tercer día de experimento se produjo una germinación igual o incluso superior, en el caso del aislado de limón, a la producida con el control (agua destilada).

6.4. Conclusiones

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

- Las concentraciones de los aceites esenciales de clavo y canela comprendidas entre 1,6 y 40 $\mu\text{L/L}$ favorecieron ligeramente y, de manera proporcional a la dosis aplicada, el crecimiento de *P. digitatum*. Sin embargo, en *P. italicum*, las concentraciones inferiores a 8 $\mu\text{L/L}$ presentaron valores de crecimiento similares al control, mientras que la de 40 $\mu\text{L/L}$ presentó un ligero efecto retardador del crecimiento observado desde el sexto día de incubación, especialmente con el aceite de clavo. La aplicación de 200 $\mu\text{L/L}$ de aceite de canela redujo considerablemente el crecimiento de *P. digitatum* hasta aproximadamente el 45% del área del control y un 51% del control con la aplicación de clavo al mismo hongo.
- La concentración de 200 $\mu\text{L/L}$ se mostró más efectiva para *P. italicum* que para *P. digitatum*, alcanzando una inhibición de aproximadamente 17% del área del control al décimo día de incubación para el primer hongo (valores muy similares para los dos aceites esenciales). Esta dosis también inhibió la conidiogénesis del hongo (producción de conidios), por lo que el aspecto de las colonias sobre el medio de cultivo era de color blanco, como mínimo hasta el sexto día, dependiendo de la especie de hongo y del aceite utilizado. La concentración de 1000 $\mu\text{L/L}$ inhibió completamente el desarrollo de los dos hongos.
- La conidiogénesis de *P. digitatum* se vio afectada con las diferentes dosis de aceites de canela y clavo utilizados. Se observó una tendencia descendente en la cantidad de conidios que crecieron por cm^2 en ambos aislados de *Penicillium digitatum* conforme se aumentó la concentración de los aceites esenciales utilizados. Sin embargo, en el caso del aceite esencial de canela, a la concentración de 1,6 $\mu\text{L/L}$ (dosis de 0,032 $\mu\text{L/placa}$), se observó un estímulo en la conidiogénesis de *P. digitatum*, tanto aislado de limón como de mandarina. En el caso de *P. italicum* la inhibición del crecimiento de conidios fue más acentuada que en *P. digitatum*.

- No se observó ningún cambio en cuanto a tamaño y forma en los conidios de ambas especies en estudio por efecto de los tratamientos con diferentes dosis de los aceites esenciales utilizados. Sin embargo se puso de manifiesto la diferencia de tamaños y formas entre los conidios de ambas especies de *Penicillium digitatum* e *italicum*. Así pues, mientras que los conidios de *P. digitatum* presentaron una forma predominantemente elíptica y una longitud que osciló entre 8,2 y 8,8 μm , los de *P. italicum*, por su parte, se mostraron cilíndricos y con un tamaño que varió entre 4,3 y 4,6 μm de longitud, es decir, aproximadamente la mitad que *P. digitatum*.
- Las concentraciones de 40 y 200 $\mu\text{L/L}$ de los aceites esenciales de canela y clavo redujeron considerablemente el crecimiento en masa del micelio de *P. italicum* aislado de limón, de manera proporcional a la dosis aplicada de aceite, mientras que en el aislado de mandarina solo fue efectiva la mayor concentración de 200 $\mu\text{L/L}$ de ambos aceites.
- Para una concentración de 500 $\mu\text{L/L}$ de los aceites esenciales de canela y clavo se produjo una gran inhibición en la germinación de los conidios de *P. digitatum*. En el caso de *P. italicum*, estos aceites esenciales mostraron un efecto totalmente inhibitorio en la germinación del hongo. Solamente, a partir del día 16 de experimento se observó un pequeño crecimiento de unidades formadoras de colonias en las placas tratadas con los aceites de clavo y canela. Sin embargo, con una concentración reducida de 200 $\mu\text{L/L}$ de ambos aceites se produjo, a partir del tercer día de experimento, una germinación igual o incluso superior de *P. italicum* a la producida con el control (agua destilada).

CAPÍTULO 7.

*Evaluación de la efectividad de la aplicación de aceites
esenciales de clavo y canela en el control de las
podredumbres verde y azul de limón*

7.1. Introducción

El ensayo basado en el estudio del efecto de un producto sobre el crecimiento del hongo es de fácil aplicación cuando el hongo crece bien sobre medios de cultivo y se basa en la confrontación del hongo con concentraciones crecientes de diversas sustancias con potencial efecto fungicida añadidas al medio de cultivo, de manera que la medida del crecimiento del micelio (cuerpo vegetativo del hongo) nos permite estimar el efecto del producto. De este modo, los ensayos *in vitro* consistieron en poner en contacto directo diversas sustancias, con potencial efecto fungicida, con el hongo en condiciones óptimas de crecimiento en relación a nutrientes y temperatura con el fin de ver cómo afectaban estas sustancias a su crecimiento. La evaluación de la eficacia de los productos con potenciales propiedades antifúngicas durante el almacenamiento de los productos hortofrutícolas, tiene muchas más interferencias y resulta más complejo; por lo que una primera evaluación *in vitro* siempre nos dirige hacia los productos que podrían ser más eficaces en el control de la podredumbres. Por tanto, un producto que es eficaz *in vitro* no necesariamente lo será durante el almacenamiento del producto hortofrutícola que se aplica, pues influyen numerosos factores como la degradabilidad y persistencia de la sustancia testada, resistencia del fruto, etc. Por ello se deduce fácilmente que si un producto no es útil *in vitro* difícilmente lo será *in vivo*.

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

En esta tercera y última fase de este estudio se procederá a la inoculación del propágulo del patógeno sobre los frutos de limón tratados con los productos y concentraciones idóneos que optimizamos en los capítulos anteriores. Tras los resultados de este ensayo se podrá comprobar finalmente si la sustancia probada es realmente efectiva o no, comparando dichos resultados con un fungicida comercial, imazalil (0,1 %).

La inoculación de propágulos del patógeno es un sistema muy eficaz e imprescindible para poner de manifiesto la bondad de un tratamiento antifúngico en el

laboratorio. La inoculación de propágulos, de hecho, es una de las etapas fundamentales en los postulados de Koch para confirmar e identificar una determinada patología, aunque la inoculación siempre es un método drástico de hacer presente un posible microorganismo patógeno en presencia de su huésped. Entre las ventajas que presenta están (Vélez, 2006):

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

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

Las defensas contra la infección que se encuentran en los tejidos vegetales son muy variadas. Las principales son las de tipo físico, principalmente la cutícula y epidermis intacta. De este modo sólo los patógenos muy especializados son capaces de penetrar al tejido vegetal intacto, pero éste no es el caso de *Penicillium* sp. Por otro lado se encuentran las defensas de tipo químico que inhiben el desarrollo del hongo. Hay compuestos variados, entre ellos los compuestos fenólicos y los aceites esenciales. También hay otros compuestos que son de síntesis inducida cuando se produce la infección, los principales son las fitoalexinas. Estas defensas se pueden ver comprometidas en postcosecha, especialmente cuando el vegetal se encuentra en estado senescente (Vélez, 2006).

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

7.2. Materiales y métodos

7.2.1. Material experimental y tratamientos

Para la realización de las experiencias del presente capítulo, se aisló y purificó un aislado de *P. digitatum* y otro de *P. italicum* que se obtuvieron en el mes de octubre de 2011 de frutos de limón de un huerto local afectados de podredumbre verde y azul. De hecho, se trataba de usar los mismos aislados usados en los experimentos *in vitro*.

Las pruebas de patogenicidad se realizaron sobre frutos de limón (*Citrus limon* L. Burm.), variedad Fino. Los frutos maduros (índice de madurez de 2,3 °Brix/acidez) se cosecharon en el término de Torre Pacheco (Murcia) a principios de mayo de 2012 y se transportaron el mismo día a la empresa G's España situada en la misma localidad. Pocas horas después, se transportaron a los laboratorios de la Estación Experimental y Agroalimentaria Tomás Ferro de la Universidad Politécnica de Cartagena, localizada en La Palma (Murcia).

La experiencia empezó el día 7 de mayo de 2012, efectuándose las inoculaciones ese mismo día, y se dio por finalizada el 1 de junio. Los frutos inoculados con el hongo permanecieron almacenados en el laboratorio a una temperatura en torno a 20-25°C.

Los tratamientos antifúngicos realizados fueron los siguientes:

- a) 0% esencia de canela, clavo e imazalil (testigo) (pH 6,90; T^a 22°C).

- b) imazalil 50% p/v, dosis 0,1% FRUITGARD-I-50 (testigo fungicida comercial) (pH 6,82; T^a 22°C).
- c) mezcla de imazalil 50% p/v al 0,025% + 200 µL/L aceite esencial de canela + 200 µL/L aceite esencial de clavo (pH 7,02; T^a 22°C).
- d) 500 µL/L de aceite esencial de canela + 0,1 mL/L de tween 80 (pH 7,38; T^a 22°C).
- e) 500 µL/L de aceite esencial de clavo + 0,1 mL/L de tween 80 (pH 7,33; T^a 22°C).

7.2.2. Unidad de observación y número de repeticiones

Para la experiencia de inoculación se tomaron 180 limones seleccionados y libres de defectos. Los limones fueron separados en 5 grupos de 36 frutos cada uno. Estos frutos fueron introducidos en cajas de cartón de 6 frutos cada una para su inoculación, obteniéndose un total de 30 cajas de cartón. Cada tratamiento contaba con 6 cajas (3 cajas con frutos inoculados con *P. digitatum* y 3 cajas con frutos inoculados con *P. italicum*). En definitiva, 90 frutos fueron inoculados con *P. digitatum* y otros 90 frutos fueron inoculados con *P. italicum*. Cada caja correspondía a una repetición y cada limón era una unidad experimental que se agrupaban en grupos de 6. Cada repetición recibió el lavado por separado aun perteneciendo a un mismo grupo de tratamiento.

Todos los limones fueron inoculados con una suspensión de conidios de hongo en agua destilada esterilizada y no se mezclaron en una misma caja limones inoculados con hongos distintos ni tratados con soluciones diferentes en ningún caso.



Figura 7.1. Limones en cajas en grupos de seis unidades (réplica compuesta de seis unidades experimentales).

7.2.3. Definición, tipo y clasificación de las variables

Las variables consideradas para valorar el efecto de los extractos de aceites esenciales de clavo y canela sobre el control de las podredumbres de limones se definen a continuación:

La principal variable objeto de estudio en esta prueba fue el número de limones afectados de podredumbre verde o azul tras la inoculación de *P. digitatum* y *P. italicum* respectivamente.

En las experiencias de patogeneicidad, además de contabilizar el número de limones afectados de podredumbre, se observó la evolución de las podredumbres, que mide la maduración del hongo en el fruto y el Índice de Desarrollo de la Podredumbre (IDP), que incluye crecimiento y maduración. De este modo, se representó el porcentaje total de frutos afectados de podredumbre y el porcentaje por grado de desarrollo. Para este caso se diferenció entre frutos blandos sin micelio, con micelio blando y con micelio esporulado (se distingue por el color de la masa de conidios).

El Índice de Desarrollo de la Podredumbre (IDP) se obtuvo aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{IDP} = [(P_1 \times 0) + (P_2 \times 1) + (P_3 \times 2) + (P_4 \times 3)] / \text{TF}$$

donde: P_1 es el número de frutos sin podredumbre; P_2 es el número de frutos podridos sin micelio; P_3 es el número de frutos con micelio blanco y P_4 corresponde al número de frutos podridos con micelio coloreado. TF es el total de frutos. Este índice varía entre los valores de 0 y 3, siendo 0 (no hay podredumbre) y 3 (todos los frutos están afectados y con micelio esporulado).

La evolución de las podredumbres es una variable de tipo cuantitativa discontinua de acuerdo con la escala de medidas e independiente de acuerdo con el diseño del protocolo, mientras que el IDP es una variable cuantitativa continua de

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

7.2.4. Establecimiento de las hipótesis

La hipótesis a contrastar fue que los diferentes tratamientos antifúngicos aplicados en este ensayo, influyen en cierto modo en el desarrollo de las podredumbres verde y azul de frutos de limón inoculados con *P. digitatum* y *P. italicum* respectivamente.

7.2.5. Análisis estadístico

No se realizó ningún tratamiento estadístico a los resultados. La incidencia de las podredumbres se anotó contabilizando el número de frutos podridos en el punto de inoculación a intervalos diarios dentro de cada bandeja y el grado de desarrollo de la podredumbre se calculó diferenciando entre frutos blandos sin micelio, con micelio blando y con micelio esporulado. Cuando los frutos se iban pudriendo generalmente se fueron eliminando el mismo día para evitar la contaminación del resto de los frutos de la bandeja, especialmente si el fruto se encontraba muy afectado.

7.2.6. Protocolo de las mediciones

El mismo día de su recepción, los frutos fueron seleccionados libres de alteraciones y defectos y se lavaron bajo el grifo de agua potable de abastecimiento. Posteriormente, sin escurrir, se realizaron los lavados en las distintos tratamientos a base de aceites esenciales y fungicidas comerciales durante 3 minutos y 30 segundos, respectivamente, en continua agitación en los siguientes preparados: a) 0% esencia de canela, clavo e imazalil (testigo) (pH 6,90; T^a 22°C), b) imazalil 50% p/v, dosis 0,1% FRUITGARD-I-50 (testigo fungicida comercial) (pH 6,82; T^a 22°C), c) mezcla de imazalil 50% p/v al 0,025% + 200 µL/L aceite esencial de canela + 200 µL/L aceite esencial de clavo (pH 7,02; T^a 22°C), d) 500 µL/L de aceite esencial de canela + 0,1 mL/L de tween 80 (pH 7,38; T^a 22°C), e) 500 µL/L de aceite esencial de clavo + 0,1 mL/L de tween 80 (pH 7,33; T^a 22°C). Los frutos se dejaron secar al aire.

Una vez que los frutos estaban ya secos (menos de 2 horas tras el tratamiento), se inocularon en la zona ecuatorial por la técnica del pinchazo descrita por Andrés-

Yeves *et al.* (1991). La inoculación se realizó efectuando un pequeño pinchazo con una aguja estéril de jeringuilla hipodérmica, no muy profundo, hasta alcanzar el albedo, sobre la superficie del fruto (Figura 7.2.). De este modo se genera sobre el tejido vegetal una vía artificial donde penetraría el propágulo de *Penicillium*. De esta manera podemos reproducir los síntomas de dicho patógeno que necesita de heridas en la corteza del fruto para poder ocasionar podredumbre. Por ello, es también factor importante considerar la densidad del inóculo infeccioso compuesto a base de conidios suspendidos en agua destilada esterilizada que previamente ha sido cuantificado hasta alcanzar una concentración de conidios de *P. digitatum* de $7,8 \times 10^6$ conidios/mL y de *P. italicum* correspondiente a $8,0 \times 10^6$ conidios/mL, ajustadas con una cámara de recuento de tipo Thoma y obtenidos de cultivos jóvenes de cuatro días creciendo a 26°C.



Figura 7.2. Inoculación en la zona ecuatorial por la técnica del pinchazo descrita por Andrés-Yeves *et al.* (1991).

El punto de inoculación fue marcado en un punto próximo con un marcador permanente para identificar la aparición de podredumbre con el hongo inoculado. Se confeccionaron 3 cajas de 6 frutos por tratamiento. Los frutos se almacenaron durante 25 días a una temperatura comprendida entre 20 y 25°C (la mayor parte del tiempo entre 22 y 23°C) y una humedad relativa variable entre 50 y 97%.

Creamos un ambiente húmedo colocando sobre las cajas de cartón una bolsa de polipropileno sin sellarla, para así facilitar el intercambio de gases producidos por la respiración del organismo vegetal y un bote con agua en su interior (Figura 7.3.). De esta manera, se reducen las pérdidas de peso de los frutos y se mantienen turgentes, ya que no debemos pasar por alto que el hongo sólo coloniza el tejido vegetal con un

determinado contenido mínimo de agua libre, y una atmósfera húmeda facilita la colonización del hongo.



Figura 7.3. Bolsa de polipropileno y bote de agua en las cajas de cartón para aumentar la humedad relativa.

Además de la humedad ambiente, también es un factor importante la temperatura. Los frutos se almacenaron a una temperatura favorable para el desarrollo de la enfermedad. La temperatura óptima para el desarrollo y crecimiento de los hongos que causan podredumbres en postcosecha ronda alrededor de los 25 °C, temperatura que no fue difícil de conseguir dentro del laboratorio teniendo en cuenta la fecha en la que tuvo lugar el ensayo. A esta temperatura el deterioro del fruto puede ser importante, por lo que es un factor que no debemos menospreciar. Las temperaturas de refrigeración también son adecuadas pero no aconsejables salvo para desarrollos específicos. A menor temperatura de almacenamiento, más tarde aparecerán los síntomas de podredumbre.

Posteriormente se contabilizó el número de frutos podridos en el punto de inoculación a intervalos diarios dentro de cada bandeja, diferenciando entre frutos blandos sin micelio, con micelio blando y con micelio esporulado (color verde o azul, según se tratase de *P. digitatum* o *P. italicum*, respectivamente).

7.3. Resultados y discusión

Los frutos de limón inoculados con suspensiones infectivas de *P. digitatum* mostraron síntomas de podredumbre verde antes de los tres días de almacenamiento,

pero con incidencia y severidad variable según el tratamiento antifúngico utilizado (Tabla 7.1). Tras los tres primeros días, el porcentaje de frutos con síntomas de podredumbre, pero sin afloración de micelio, estuvo comprendido entre el 30 y el 55%, siendo los mejores tratamientos los de imazalil y el tratamiento mixto a base de una dosis reducida de imazalil, de aceite de clavo y canela.

Tabla 7.1. Evolución de las podredumbres de frutos de limón tratados con distintos antifúngicos e inoculados con conidios de *P. digitatum*, durante su almacenamiento de 18 días a 20–25°C y una humedad relativa de 50-97%.

Tiempo (días)	Tratamiento	% frutos blandos	% frutos micelio blanco	% frutos micelio esporulado	% frutos podridos
3	Control	55	39	0	94
	Imazalil ^z	30	12	0	42
	Mixto ^y	30	0	0	30
	Canela ^x	55	17	0	72
	Clavo ^w	33	30	0	63
6	Control	0	0	94	94
	Imazalil	12	0	55	67
	Mixto	12	39	12	63
	Canela	0	0	78	78
	Clavo	0	0	72	72
11	Control	0	0	94	94
	Imazalil	12	0	61	73
	Mixto	0	12	50	62
	Canela	0	0	78	78
	Clavo	5	0	72	77
15	Control	0	0	94	94
	Imazalil	12	0	61	73
	Mixto	0	12	50	62
	Canela	0	0	78	78
	Clavo	5	0	72	77
18	Control	0	0	94	94
	Imazalil	12	0	61	73
	Mixto	0	12	50	62
	Canela	0	0	78	78
	Clavo	5	0	72	77
25	Control	5	0	95	100
	Imazalil	5	18	72	95
	Mixto	0	0	78	78
	Canela	5	0	84	91
	Clavo	0	0	78	78

Hay que destacar que aunque el fungicida de síntesis imazalil fue aplicado a la dosis recomendada de 0,1% de imazalil 50% [EC] p/v, en baños de 30 segundos, los frutos empezaron a presentar, sólo unos días después, unas manchas de color pardo en el flavedo que atribuimos a un daño ocasionado por el producto quizás por aplicarlo durante un tiempo de contacto excesivo con el fungicida (se recomienda su aplicación en ducha durante 30 segundos). Este fungicida controló el desarrollo de la podredumbre verde. Al término de los tres primeros días, únicamente el tratamiento mixto estaba exento de frutos con micelio, por lo que las únicas podredumbres que presentaba este tratamiento sólo mostraban síntomas de reblandecimiento de los frutos.



Figura 7.4. Manchas de color pardo en el flavedo del fruto, causadas por el fungicida imazalil.

A los seis días existía esporulación (masas de color verde en el micelio debido a la formación de conidios) en todos los tratamientos, siendo el tratamiento mixto el que menos frutos coloreados presentaba (12%), mientras que en control, sin tratamiento antifúngico alguno, el 94% (Tabla 7.1.). Posteriormente, la evolución de las podredumbres se ralentizó y a los 18 días el tratamiento mixto mejoró el de imazalil que presentó un 11% de frutos esporulados más que el mixto. Los tratamientos de canela y clavo arrojaron resultados muy similares y redujeron en un 16% y en un 22% respectivamente las podredumbres esporuladas del control (94%). Al término de los 25 días de tratamiento los tratamientos mixto y de clavo se igualaron en porcentaje de frutos podridos (78%), mientras que el tratamiento con imazalil presentó un 17% más de frutos podridos (95%), superando también al tratamiento con canela (91%). Aunque hay que destacar que el número de frutos esporulados fue un 6% menor en el tratamiento con imazalil respecto al tratamiento mixto.

Los frutos inoculados con *P. italicum* desarrollaron las podredumbres más lentamente. Este hongo presentó una tasa de crecimiento más reducida que *P. digitatum*,

y es conocido que la podredumbre azul es sólo más importante que la verde a temperaturas de refrigeración (Tuset, 1987). De hecho, aunque los frutos se almacenaron en condiciones favorables para el desarrollo de los hongos inoculados, no se detectaron frutos blandos en todos los tratamientos hasta los 6 días (Tabla 7.2.). A los 11 días se empezó a apreciar frutos con micelio blanco excepto en el tratamiento mixto, mientras que la esporulación empezó a ser patente a los 15 días, curiosamente fue superior en el tratamiento con imazalil, con el 12% de los frutos esporulados, mientras que en los otros tratamientos el valor fue también bastante bajo (5%) (Tabla 7.2.). Es de destacar que no hubo ningún fruto esporulado en el tratamiento mixto, lo que indica que este tratamiento no solo tuvo un efecto patente en el control de la podredumbre azul, sino que controló totalmente el desarrollo de la esporulación y, por tanto, la posible dispersión de la podredumbre dentro de un recinto.

Al analizar los datos conjuntamente (incidencia y severidad) a partir del Índice de Desarrollo de la Podredumbre (IDP) (Figura 7.5.), se apreció que todos los tratamientos antifúngicos aplicados redujeron significativamente la podredumbre verde, pero los tratamientos mixto e imazalil arrojaron los mejores resultados, especialmente el primero que, además, no produjo manchas en el flavedo. Respecto al desarrollo de la podredumbre azul, se comprobó que todos los tratamientos retardaron el desarrollo de la podredumbre por igual antes de los 6 días de almacenamiento, pero posteriormente la podredumbre se disparó hasta niveles iguales o incluso superiores al control, este último fue el caso del tratamiento con aceite de canela. Únicamente el tratamiento mixto controló bastante bien el desarrollo de la podredumbre hasta los 15 días de almacenamiento favorable para su desarrollo (Figura 7.5.).

Tabla 7.2. Evolución de las podredumbres de frutos de limón tratados con distintos antifúngicos e inoculados con conidios de *P. italicum*, durante su almacenamiento de 18 días a 20–25°C y una humedad relativa de 50-97%.

Tiempo (días)	Tratamiento	% frutos blandos	% frutos micelio blanco	% frutos micelio esporulado	% frutos podridos
3	Control	0	0	0	0
	Imazalil ^z	0	0	0	0
	Mixto ^y	0	0	0	0
	Canela ^x	0	0	0	0
	Clavo ^w	0	0	0	0
6	Control	30	0	0	30
	Imazalil	12	0	0	12
	Mixto	5	0	0	5
	Canela	12	0	0	12
	Clavo	5	0	0	5
11	Control	24	5	0	29
	Imazalil	17	5	0	22
	Mixto	5	0	0	5
	Canela	30	5	0	35
	Clavo	24	5	0	29
15	Control	24	5	5	34
	Imazalil	12	0	12	24
	Mixto	12	0	0	12
	Canela	47	0	5	52
	Clavo	30	0	5	35
18	Control	33	0	12	45
	Imazalil	17	0	12	29
	Mixto	39	0	0	39
	Canela	39	0	12	51
	Clavo	12	12	12	36
25	Control	22	0	28	50
	Imazalil	5	0	24	29
	Mixto	28	5	6	39
	Canela	11	5	34	50
	Clavo	11	11	22	44

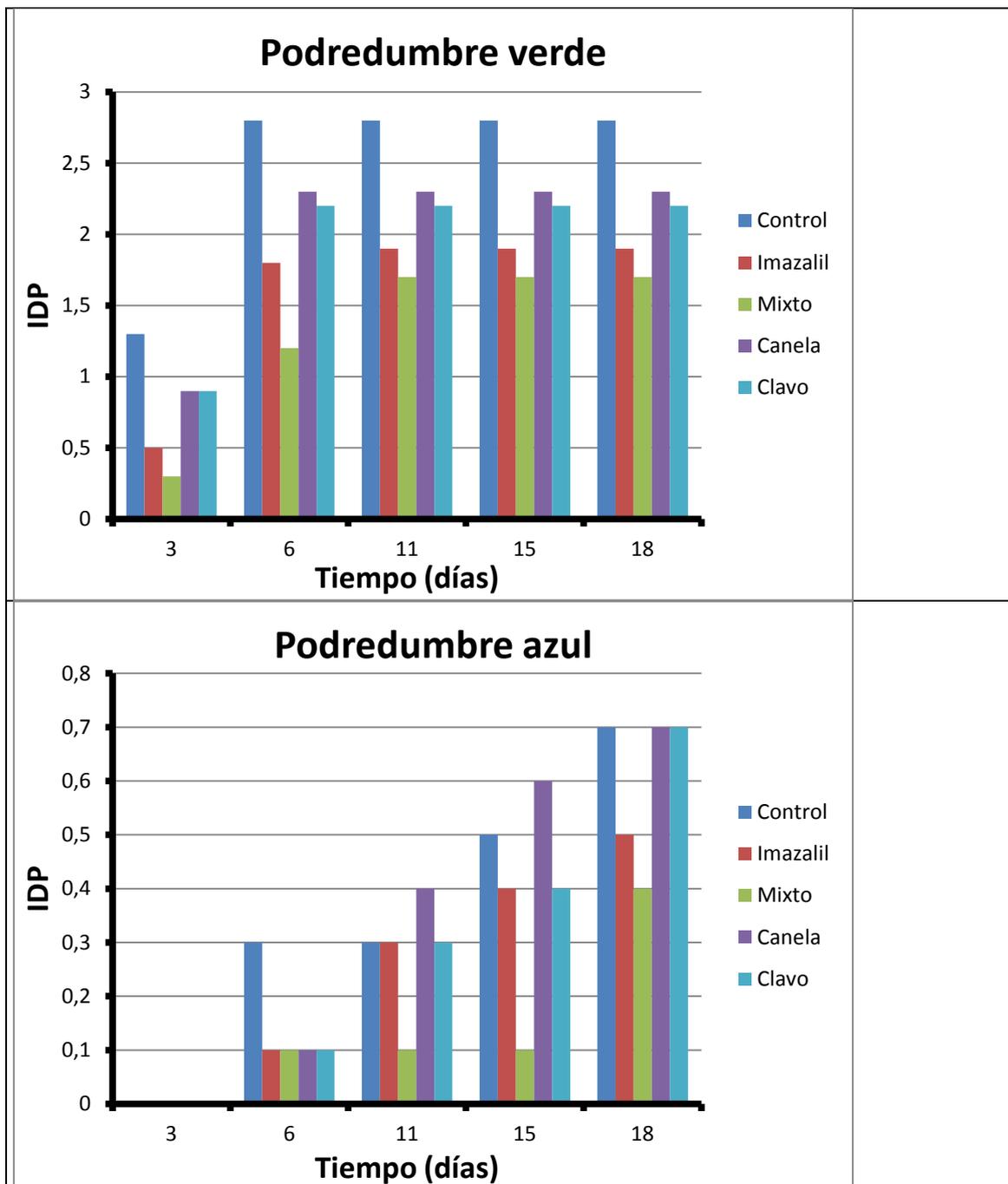


Figura 7.5. Incidencia y severidad de las podredumbres verde y azul, expresada como Índice de Desarrollo de la Podredumbre (IDP), en limones inoculados con conidios de *P. digitatum* y *P. italicum* respectivamente y sometidos a diferentes tratamientos antifúngicos, tras su almacenamiento durante 18 días entre 20 y 25°C y una humedad relativa comprendida entre 50 y 97%. Las dosis de sustancias activas están descritas en la sección de materiales y métodos.

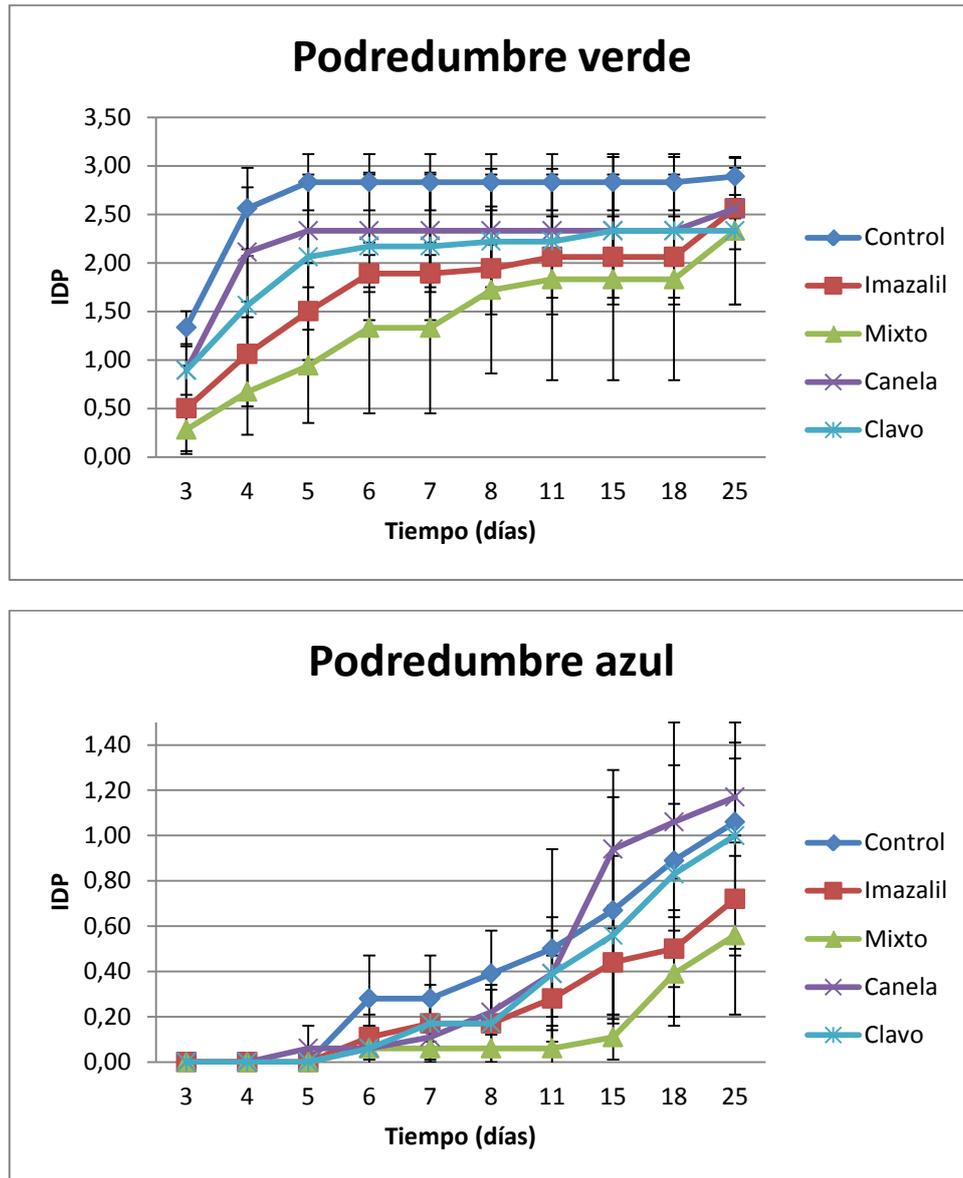


Figura 7.6. Evolución de las podredumbres verde y azul con los valores medios de incidencia y severidad, expresada como Índice de Desarrollo de la Podredumbre (IDP), en limones inoculados con conidios de *P. digitatum* y *P. italicum* respectivamente y sometidos a diferentes tratamientos antifúngicos, tras su almacenamiento durante 25 días entre 20 y 25°C y una humedad relativa comprendida entre 50 y 97%. Las dosis de sustancias activas están descritas en la sección de materiales y métodos. Las barras verticales son la desviación estándar.

7.4. Conclusiones

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

- Con respecto a *P. digitatum*, al término del experimento, el tratamiento mixto mejoró el de imazalil. Los tratamientos de canela y clavo arrojaron resultados

muy similares hasta el último día, cuando se observó un aumento de frutos esporulados en el tratamiento con canela, un 6% superior a los frutos tratados con clavo.

- Los frutos inoculados con *P. italicum* desarrollaron las podredumbres más lentamente. No hubo ningún fruto esporulado en el tratamiento mixto hasta el día 25 al término del experimento (6% de frutos esporulados), lo que indica que este tratamiento no solo tuvo un efecto patente en el control de la podredumbre azul, sino que controló totalmente el desarrollo de la esporulación y, por tanto, la posible dispersión de la podredumbre dentro de un recinto.
- Al analizar los datos conjuntamente (incidencia y severidad) a partir del Índice de Desarrollo de la Podredumbre (IDP) se apreció que todos los tratamientos antifúngicos aplicados redujeron significativamente la podredumbre verde, pero los tratamientos mixto e imazalil arrojaron los mejores resultados, especialmente el primero.
- Respecto al desarrollo de la podredumbre azul, únicamente el tratamiento mixto controló bastante bien el desarrollo de la podredumbre.

8.

Conclusiones

Basándonos en que los extractos o esencias de plantas constituyen una expectativa esperanzadora de futuro debido a su baja toxicidad para el medio ambiente y a sus propiedades antifúngicas y que tras los estudios realizados con la aplicación de aceites esenciales de canela y clavo para el control de las podredumbres verde y azul en limón, concluimos con lo siguiente:

La eficacia de los extractos de aceites esenciales de clavo y canela sobre el desarrollo de las podredumbres verde y azul ha sido similar, pero estos aceites se han mostrado más contundentes en el control de la podredumbre verde. Sin embargo, es necesario continuar la investigación con los extractos de aceites más eficaces o sus mezclas con el fin de optimizar la dosis y la forma de aplicación, junto con la utilización de mojantes adecuados.

No obstante, se debe tener en cuenta que, en algunos casos, la utilización de aceites esenciales en el campo fitosanitario puede resultar complicada en razón de la multiplicidad de perfiles fitoquímicos o polimorfismo químico que presentan, lo que puede influir de manera decisiva en la variabilidad de los resultados. A pesar de todo ello, los aceites de clavo y canela han mejorado su eficacia mezclados con una dosis muy reducida del fungicida sintético imazalil. Este ha sido el único tratamiento de los ensayos en los que se ha podido garantizar un control duradero de las dos podredumbres, mejorando significativamente el tratamiento comercial de imazalil. El uso combinado de aceites esenciales y dosis muy reducidas de fungicidas de síntesis permitiría producir y comercializar en un marco de Producción Integrada y reduciría los residuos de sustancias contaminantes logrando, al mismo tiempo, unos productos más saludables.

9

Bibliografía

Agrios, G.N. 2010. Fitopatología, 2ª ed., Ed. Limusa. 838 pags..

Agustí, M., Alamelá, V. 1991. Aplicación de fitoreguladores en citricultura. Ed. EADOS, S.A. Barcelona. 261 págs.

Agustí, M. 2000. Citricultura. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 217-232.

Arpaia, M.L., Kader, A. 2000. Recomendaciones para preservar la calidad postcosecha de los cítricos. Levante Agrícola. Especial Postcosecha, 352. 239- 243.

Artés, F. 1987. Refrigeración y comercialización hortofrutícola en la Región de Murcia. 2ª Edición. Ed. CEBAS-CSIC. 150 pág.

Artés, F. 1994. Tratamientos térmicos y gaseosos alternativos a los tratamientos químicos postcosecha. Fruticultura Profesional, 66, 36-43.

Artés, F. 1995a. Innovaciones en los tratamientos físicos modulados para preservar la calidad hortofrutícola en la postrecolección. I. Pretratamientos térmicos. Revista Española Ciencia y Tecnología de Alimentos, 35 (1), 45-64.

Artés, F. 1995b. Innovaciones en los tratamientos físicos modulados para preservar la calidad hortofrutícola en la postrecolección. II. Tratamientos térmicos cíclicos. Revista Española Ciencia y Tecnología de Alimentos, 35 (2), 139-149.

Artés, F. 1995c. Innovaciones en los tratamientos físicos modulados para preservar la calidad hortofrutícola en la postrecolección. III. Tratamientos térmicos cíclicos. Revista Española Ciencia y Tecnología de Alimentos, 35 (3), 247-269.

Artés, F. 1997. Innovaciones en la tecnología de limones y pomelos. Phytoma, 90, 141-147.

- Artés, F. 1999a. Innovaciones tecnológicas para mejorar la calidad de la naranja y mandarina en la postrecolección, IV Congreso Citricultura de la Plana. Nules.
- Artés, F. 1999b. Avances en los tratamientos postcosecha para la conservación en fresco de limón y pomelo. Levante Agrícola. Especial Postcosecha, (38), 348, 289-294.
- Artés, F. 2000a. Conservación de los productos vegetales en atmósfera modificada. Aplicación del frío a los alimentos. Editor: M. Lamúa. Editorial Mundi Prensa. Cap. 4, 104-125.
- Artés, F. 2000b. Tratamientos alternativos para preservar mejor la calidad de los cítricos refrigerados. Levante Agrícola. Especial Postcosecha. 352, 229-238.
- Artés, F., Escriche, A. 1988. Maladies physiologiques des agrumes et nouvelles techniques de réfrigération. Revue General du Froid, 47-51.
- Asthana, A., Tuveson, R.W. 1992. Effects of UV and phototoxins on selected fungal pathogens of citrus. It. J. Plant Sci 153, 442-452.
- Ballester, A.R., Lafuente, M.T., González-Candelas, L. 2004. Implicación del metabolismo de fenilpropanoides en la inducción de resistencia en los frutos cítricos frente a la infección por *Penicillium digitatum*. Libro Resúmenes XII Congreso Soc. Esp. Fitopatol. 38.
- Barberá, C. 1989. Pesticidas agrícolas. Ediciones Omega. Barcelona, 603 págs.
- Barkai-Golan, R. 2001. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables and Control. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 418 págs.
- Barkai-Golan, R., Apelbaum, A. 1991. Synergistic effects of heat and sodium ophenyl pénate treatments to inactivate *Penicillium* spores and suppress decay in citrus fruits. Tropical Sci. 31, 229-233.

Barkai-Golan, R., Kahan, R.S. 1966. Effect of gamma radiation on extending the storage life of oranges. Pt Dis. Rep. 50, 874-877.

Barkai-Golan, R., Kahan, R.S., Padova, R. 1969. Synergistic effects of gamma radiation and heat on the development of *Penicillium digitatum* in vitro and in stored citrus fruit. Phytopathology 59, 922-924.

Barkai-Golan, R., Padova, R. 1981. Eradication of *Penicillium* on citrus fruits by electron radiation. Proc. Int. Soc. Citriculture 2, 799-801.

Barkai-Golan, R., Phillips, D.J. 1991. Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. Plant Dis. 75, 1085-1089.

Barmore, C. R. y Brown G. E. 1982. Spread of *Penicillium digitatum* y *P. italicum* during contact between citrus fruits. Phytopathology, 72: 116-120.

Ben Yehoshua, S., Barak, E., Shapiro, B. 1987. Postharvest curing at high temperatures reduces decay of individually sealed lemons and other citrus fruits. Journal American Society Horticultural Science, 112, 658-663.

Ben Yehoshua, S., Kim, J.J., Shapiro, B. 1989. Curing of citrus fruit. Applications and mode of action. Proc. V Controlled Atmosphere Res. Conf. 179-196.

Ben Yehoshua, S., Rodov, V., Fang, D.Q., Kim, J.J., Carmeli, S. 1992. Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. J. Agric. Food Chem. 40, 1217-1221.

Boletín Oficial de la Región de Murcia. 1998. Orden de 24 de junio de la Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua por la que establecen las normas para la producción integrada de cítricos. BORM 150 de 2 de julio de 1998.

- Bono, R., Soler, J., Fernández de Córdoba, L. 1985. Variedades de agrrios cultivados en España. Generalidad Valenciana. Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación. Valencia.
- Brown, G.E., Ismail, M.A., Barmore, C.R. 1978. Lignification of injuries to citrus fruit and susceptibility to green mold- Proc. Fla. State Hort. Soc. 91, 124-126.
- Cayuela, J.A., García, J.M. 2007. Evaluación de productos naturales contra *Penicillium* en cítricos. Levante Agrícola. Especial Postcosecha, 388: 387-391.
- Chalutz, E., Droby, S., Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. 1992. UV-induced resistance to postharvest diseases of citrus fruit. J. Phytochem. Photobiol. 15, 367-374.
- Coscollá, R.; Malagón, J., Fabado, F.J. 2001. La producción integrada en los cítricos valencianos. Comunidad Agraria Valenciana, 18. 23-28.
- Cuquerella, J., Navarro, P. 1997. Medidas objetivas de calidad en frutos cítricos con tratamiento de cuarentena de frío. En: Medición de la calidad en frutos tropicales y subtropicales con tratamientos físicos de cuarentenas. Ed. CYTED. Proy. XI. 10.2. Valencia.
- Cuquerella, J; Martínez-Navarro, J.M. y Jimenez-Cuesta, M. 1983. Frigoconservación de cítricos. Hoja Técnica I.N.I.A. Nº 45. 20.
- Davies, F. S., Albrigo, L. G. 1994. Cítricos. Zaragoza. Ed. Acribia, S.A. 283 págs.
- Del Río, M,A., Cuquerella, J., Ragone, M.L. 1992. Effects of postharvest curing at high temperature on decay and quality of 'Marsh' and 'Navel' oranges. Proceedings International Society Citriculture, 3, 1081-1083.
- De Liñán, C. 2007. EcoVad. Productos e Insumos para Agricultura Ecológica. Ediciones Agrotécnicas, S.A., Madrid, 287 págs.

Dempsey, D.A., Shah, J., Klessing, D.F. 1999. Salicylic acid and disease resistance in plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18: 547-575.

Di Martino, E., Lanza, G. 1998. Curing citrus fruits to control green mold. En COST Workshoop: Non conventional Methods for the Control of Postharvest Disease and Microbiological Spoilage. Bologna. Ed. Bertolini, P.C. Sijmons, M.E. Guerzoni y F. Serra, 249-256.

Diario Oficial de la Generalidad Valenciana, 1997. Resolución del Director General de Investigación, Desarrollo Tecnológico y Sanidad Vegetal por la que se establecen las normas para la producción integrada en cítricos, en el ámbito de la Comunidad Valenciana. DOGV 3066 de 28 de agosto.

Droby, S.; Porat, R. E.; Weiss, B.; Shapiro, B.; Philosoph-Hadas, S., Meir, S. 1999. Suppressing green mold decay in grapefruit with postharvest jasmonate application. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 124 (2). 184-188.

Eckert, J.W., Brown, G.E. 1986. Postharvest citrus diseases and their control. *Fresh Citrus Fruits*. Wardowski, W.F., Nagy, S., Grierson, W. (Eds.). Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York. 315-360.

Gutter, Y. 1973. Benzimidazole resistant strains of citrus fruit pathogens. *Res. Summaries. 1971-73, The Volcani Center, Israel*, 56-57.

Hall, D.J., Fernández, Y.J. 2004. In vitro evaluation of selected essential oils as fungicides against *Penicillium digitatum* Sacc. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 117: 377-379.

Hammer, P.A. 1981. Statistics: A tool for the horticultural scientist. *HortScience*, 16(5): 620-640.

Harding, P.R., Jr. 1968. Effect of ozone on *Penicillium* mold decay and sporulation. *Plant Dis. Rep.* 52, 245-247.

- Hatton, T.T., Cubbedge, R.H. 1982. Conditioning Florida grapefruit to reduce chilling injury during low temperature storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 107: 57-60.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler, D.N. 1995. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 8th ed. Wallingford: CAB International. 616 págs.
- Hernández, M. C. 2011. Evaluación de la esencia de tomillo (*Thymus vulgaris*) y la esencia de enebro (*Juniperus communis*) como alternativa a los fungicidas tradicionales en el control de las podredumbres de naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Trabajo fin de carrera, Escuela Técnico Superior de Ingeniería Agronómica, Cartagena.
- Hutson, D., Miyamoto, J. 1998. *Fungicidal Activity*. Ed. Wiley. 254 págs.
- Isman, M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*. 603-608.
- Kader, A.A., Arpaia, M.L. 2002. Postharvest handling systems: subtropical fruits. *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. 3a ed. Kader, A.A. (Ed.). University of California Agriculture and Natural Resources. Pub. 3311. Oakland, CA, EE UU. 375-383.
- Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2839-2845.
- Kinay, P., Yildiz, F., Sen, F., Yildiz, M., Karacoli, I. 2005. Integration of pre- and postharvest treatments to minimize *Penicillium* decay of satsuma mandarins. *Postharvest Biol. Technol.* 37, 31-36.
- Kurita, N., Miyagi, M., Kurane, R., Takahara, Y. 1981. Antifungal activity of components of essential oils. *Agri. Biol. Chem.*, 45: 945-952.

Lanza, G. 1997. Control del moho verde (*Penicillium digitatum*) mediante curación a alta temperatura. Últimos ensayos en Italia. Phytoma-España 90, 95-98.

Lanza, G.; Aleppo, E., Strano, M.C. 1998. Alternative means to synthetic fungicides on green mold control in citrus fruti. Atti del workshop nazionale 'Postraccolta degli ortoflorofrutticoli', Ascea Marina, Salerno Italy. Italy-Hortus, 5. 61-66.

Llewellyn , G.C., Burkett, M.L., Eade, T. 1981. Potential mould growth aflatoxin production antnicicotic actuvity of selected natural species and herbs. J. Assoc. off Anal. Chem., 64(4): 955-960.

Mañes, V. 1990. Las exigencias de la calidad de los productos agroalimentarios en Europa. SITGES. Publicación Servicio Oficial de Inspección, Vigilancia y Regulación de las Exportaciones (S.O.I.V.R.E.) Valencia. España.

Marcellin, P., Ulrich, R. 1983. Comportement des fruits et légumes conditions modulées et programéess. International Jal Refrigeration, 6, 329-336.

Marcellin, P. 1992. Les maladies physiologiques du froid. Les végétaux et le froid. D, Côme (Ed). Edit. Hermann, 3, 53-105.

Martínez, L. J.; Hernández, G. M. 2007. Utilización de aceites esenciales de enebro y tomillo para controlar el desarrollo de *P. digitatum* y *P. italicum* sobre frutos de naranja. XXI Congreso Nacional de Microbiología. Sevilla.

Martínez J.A., Bañón S. 2007. Differential effects of gibberellic acid on the growth of *Botrytis cinerea* isolated from various ornamental plants. XVI International Plant Protection Congress, Glasgow, Scotland, UK, 15-18 October 2007. Congress Proceedings, volume 2:780-781.

Martínez, J.A. 2012. Natural Fungicides Obtained from Plants, Fungicides for Plant andAnimal Diseases, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), ISBN: 978-953-307-804-

5, InTech, Con acceso en:<http://www.intechopen.com/books/fungicides-for-plant-and-animal-diseases/natural-fungicides-obtained-from-plants>.

Martínez-Jávega, J.M., Rago-ne, M., Cuquerella, J., Navarro, P. 1988. Preamacemamiento a 35°C de frutos cítricos en envoltura plástica individual, una técnica alternativa para el control de podredumbres. Actas III Congreso Soc. Española Ciencias Hortícolas, 2, 417-422.

Maxie, E.C. Sommer, N.F., Eaks, I.L. 1969. Effet of gamma radiation on citrus fruit. Proc. First Int. Citrus Symp. 3, 1375-1387.

Meepagala, K. M., Sturtz, G. y Wedge , D. E. 2002. Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisa dracunculus L., dracunculus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50. 6989-6992.

Miller, W.R., Chun, D., Risse, L.A., Hatton, T.T., Hinsch, R.T. 1990. Conditioning of Florida grapefruit to reduce peel stress during low-temperature storage. *HortScience*, 25, 209-211.

Oekeke, B. 1994. Fungal metabolite extracts active against phytopathogens. *The Science of the Total Environment*. 155. 125-130.

Ortuño, A., Botia, J. M., Fuster, M. D., Porrás, I., García-Lidón A. y Del Río, J. A. 1997. Effect of scoparone (6,7-dimethoxy-coumarin) biosíntesis on the resistente of tangelo Nova, *Citrus paradisi* and *Citrus aurantium* fruits against *Phytophthora parasitica*. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*. 45. 2740- 2743.

Palou, L., Smilanick, J.L., Crisosto, S.H., Mansour, M. 2001a. Effect of gaseous ozone exposure on the development of green and blue molds on cold stored citrus fruit. *Plant Dis*. 85, 632-638.

Palou, L., Smilanick, J.L., Usall, J., Viñas, I. 2001b. Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. *Plant Dis.* 85, 371-376.

Palou, L., Usall, J., Muñoz, J.A. Smilanick, J.L., Viñas, I. 2002. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. *Postharvest Biol. Technol.* 24, 93-96.

Palou, L. 2005. Métodos de control físicos ensayados en postcosecha contra las podredumbres verde y azul de los cítricos. *Levante Agrícola.* 377, 341-350.

Palou, L. 2007. Evaluación de alternativas para el tratamiento antifúngico en poscosecha de cítricos de Producción Integrada. *Horticultura*, Vol. XXV, núm. 3 junio 2007, pág. 82 - pág. 93.

Pavoncello, D., Lurie, S., Droby, S., Porat, R. 2001. A hot treatment induces resistance to *Penicillium digitatum* and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo. *Physiologia Plantarum* 111, 17-22.

Perucho, R., Tuset, J.J. 2001. Hongos causantes del podrido en clementinas y mandarinas en postcosecha. *Levante Agrícola. Especial Postcosecha:* 101-106.

Perucho, R., Tuset, J.J. 2002. Resistencias de los hongos *Penicillium* a los fungicidas empleados en la postcosecha de los frutos cítricos. *Levante Agrícola. Especial Postcosecha:* 252-257.

Pinheiro, P., De Oliveira, R., De Sousa, R., De Oliveira, E. 2011. Antifungal action of *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oil against *Penicillium* spp. from environment air of a dry food industry. *Int. Research J. Micro.*, 2(5): 173-178.

Plaza, P., Usall, J., Torres, R., Lamarca, N., Asensio, A., Viñas, I. 2003. Control of green and blue mould by curing on oranges during ambient and cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 195-198.

- Regnault-Roger, C., Philogéne, B.J.R., Vicent, C. 2004. Biopesticidas de origen vegetal. 1ª Edición en español. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Schirra, M., D'hallewin, G., Ben-Yehoshua, S., Fallik, E. 2000. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. *Postharvest Biol. Technol.* 18, 151-157.
- Singh, A.A., Dikshit, A., Sharma, M.L., Dixit, S.N. 1980. Fungitoxic activity of some essential oils. *Econ. Bot.* 34, 186-190.
- Spalding, D.H., Reeder, W.F. 1976. Low pressure (hypobaric) storage of limes. *J. Amer. Hort. Soc.* 101, 367-370.
- Stange, R.R., Jr, Eckert, J.W. 1994. Influence of postharvest handling and surfactants on control of green mold of lemons by curing. *Phytopathology* 84, 612-616.
- Stroh, J., Wan, M. B. y Moul D. J. 1998. Evaluation of the acute toxicity to juvenile pacific coho salmon and rainbow trout of some plant essential oils, a formulated product and the carrier. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60. 923-930.
- Sung-Eun, L., Byeoung-Soo, P., Moo-Key, K., Won-Sik, C. 2001. Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 20, 523-528.
- Tuset, J.J. 1987. Podredumbres de los frutos cítricos. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Generalitat Valenciana. España. 33-125.
- Tuset, J.J. 1989. Cítricos: Consideraciones para el control de las podredumbres. Departamento de Poscosecha de ANECOOP. S. COOP. II Jornadas de Comercialización y desarrollo de la Empresa Cooperativa Agraria. 117-123.
- Tuset, J.J. 1999. Perspectivas del control de las podredumbres en la postcosecha de cítricos. *Levante Agrícola. Especial Postcosecha*, 348. 272-280.

Tuset, J.J., Hinarejos, C., Mira, J.L., Martínez-Jávega, J.M. 1996. Tratamientos térmicos a los frutos cítricos para el control de las enfermedades de la posrecolección. *Levante Agrícola* 337, 342-347.

Tuset, J.J., Hinarejos, C., Mira, J.L. 2000. Eficacia de los tratamientos postcosecha tolerados en roducción integrada en el control de *Penicillium digitatum* y *Botrytis cinerea*. *Levante Agrícola*. 352, 210-215.

Tuset, J.J., Perucho, R. 2003. Hongos causantes del podrido de nuestras naranjas en las últimas campañas de comercialización. *Levante Agrícola. Especial Postcosecha*, 366. 220-226.

Vélez, M. J. 2006. Evaluación de diversas sustancias como alternativa a los fungicidas tradicionales en el control de podredumbres de limón (*Citrus limon L., Burm.*). Proyecto Fin de Carrera. Universidad Politécnica de Cartagena. Cartagena.

Viñas, I. 1997. Control biológico de las principales enfermedades fúngicas postcosecha. *Phytoma España*.

Viñas , I., Teixidó, N., Abadías, M., Torres, R., Usall, J. 2005. Resistencias a fungicidas en postcosecha de frutos. Situación actual y perspectivas. *Phytoma España*, 173: 29-34.

Whiteside, J.O., Garnsey, S.M., Timmer, L.W. (Eds.). 1993. *Compendium of Citrus Diseases*. 2a ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, EE.UU.

Wilson, C.I., Wisniewski, M.E. 1994. *Biological Control of Postharvest Diseases Theory and Practice* Char, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Appalachian Fruit Research Station, Kearneysville, West Virginia.

Wilson, C.L., Solar, J.M., El Ghaouth, A., Wisniewski, M.E. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 81(2): 204-210.