



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS,

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD FITOPATOLOGIA

**“CONTROL POSTCOSECHA DE *Penicillium digitatum* EN
FRUTOS DE NARANJA”**

GONZALEZ FIERRO PAULINA H.

T E S I S
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

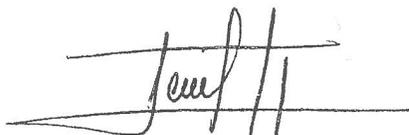
Montecillo, Texcoco, Estado de México. Mayo 2011

La presente tesis es titulada “CONTROL POSTCOSECHA DE *Penicillium digitatum* EN FRUTOS DE NARANJA” y realizada por la alumna: González Fierro Paulina, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGIA**

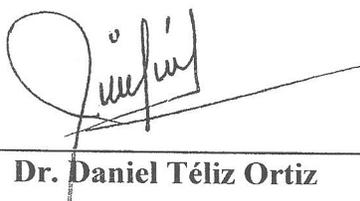
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



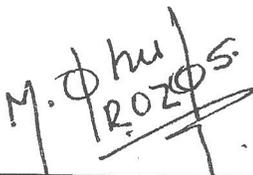
Dr. Daniel Nieto Angel

ASESOR



Dr. Daniel Téliz Ortiz

ASESOR



Dr. Mario Orozco Santos

Montecillo, Texcoco. Edo. De México. Mayo de 2011

CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	1
DEDICATORIA	2
INDICE DE FIGURAS Y CUADROS.....	3
RESUMEN GENERAL	5
GENERAL SUMMARY	7
INTRODUCCION GENERAL	9
OBJETIVOS	11
LITERATURA CITADA	12
CAPITULO I. EFECTO DE NUEVE CONCENTRACIONES DE ESPORAS EN LA GERMINACION Y CRECIMIENTO DE <i>Penicillium digitatum</i> EN FRUTOS DE NARANJA EN POSTCOSECHA	
Resumen.....	13
Summary	14
1.1 Introducción	15
1.2 Materiales y Métodos.....	16
1.3 Resultados	17
1.4 Discusión.....	20
1.5 Conclusiones	21
1.6 Literatura citada	21
CAPITULO II. EFECTO DE TRES TIPOS DE HERIDA EN LA INFECCION Y CRECIMIENTO DE <i>Penicillium digitatum</i> EN FRUTOS DE NARANJA EN POSTCOSECHA	
Resumen	22
Summary	23
2.1 Introducción	24
2.2 Materiales y Métodos	25
2.3 Resultados	26
2.4 Discusión.....	27

2.5 Conclusiones	28
2.6 Literatura citada	28
CAPITULO III. EFECTIVIDAD BIOLOGICA DEL TIABENDAZOL, FLUDIOXONIL, PIRIMETANIL, TR ICON®, EXTRACTO DE NEEM Y TIMOREX GOLD ® PARA EL CONTROL POSTCOSECHA DE <i>Penicillium digitatum</i> EN NARANJA	
Resumen	29
Summary	30
3.1 Introducción.....	31
2.7 Materiales y Métodos.....	32
2.8 Resultados	34
2.9 Discusión.....	38
2.10 Conclusiones	40
2.11 Literatura citada	41

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme el apoyo económico para concluir mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados por brindarme la oportunidad de cumplir una meta profesional más.

Al Dr. Daniel Nieto Ángel por todo su apoyo, comprensión y aportaciones en la dirección de esta tesis.

Al Dr. Daniel Téliz Ortiz por ser un importante asesor en quien se puede tener toda la confianza y por sus sabios consejos.

Al Dr. Mario Orozco Santos por su disposición y apoyo en todo momento.

Al M.C. Francisco Marcelo Lara Viveros y al Ing. Luis Alfonso Aguilar Pérez por todo su apoyo y consejos en la realización de la tesis.

A mi esposo Servando por todo el apoyo y comprensión y sin el cual esto no hubiera sido posible.

A mi familia, quienes siempre han sido un gran apoyo en mi vida: Mis abuelos; Manuel y Lucy, mi madre Delfina y mis tres hermanas; Perla, Olympia y Cristina.

¡Gracias!

A mis dos hijos *Sara Lucia* y *Santiago*, por ser el motor que me da las energías para seguir siempre adelante.

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURAS

CAPITULO I.

Página

Figura 1. Regresión para determinar el porcentaje de incidencia de *P. digitatum* sobre frutos de naranja en postcosecha 18

Figura 2. Curva de crecimiento del micelio de *Penicillium digitatum* a nueve concentraciones de esporas 19

Figura 3. Curva de crecimiento de la esporulación de *Penicillium digitatum* a nueve concentraciones de esporas 19

CAPITULO II.

Página

Figura 1. Porcentajes de incidencia de *P. digitatum* para los tres diferentes tipos de herida..... 26

CAPITULO III.

Página

Figura 1. Crecimiento de *Penicillium digitatum* en frutos de naranja bajo el efecto de tratamientos de control postcosecha 35

Figura 2. Modelo de regresión para tiabendazol; x= dosis de tiabendazol en ppm en la prueba de efectividad *in vivo* para el control de *Penicillium digitatum* en frutos de naranja. 2010..... 37

Figura 3. Modelo de regresión para fludioxonil; x= dosis de fludioxonil en ppm en la prueba de efectividad *in vivo* para el control de *Penicillium digitatum* en frutos de naranja. 2010 38

CUADROS

CAPITULO I.

Página

Cuadro 1. Incidencia del moho verde en naranja inoculada con *P. digitatum* a nueve diferentes concentraciones 17

CAPITULO II.

Página

Cuadro 1. Prueba de medias de crecimiento de *Penicillium digitatum* para los tratamientos donde ocurrió la infección del hongo..... 27

CAPITULO III.

Página

Cuadro 1. Efectividad biológica *in vitro* de varios productos para el control de *P. digitatum* en PDA. 2010 34

Cuadro 2. Efectividad biológica *in vivo* de varios productos para el control de *Penicillium digitatum* en frutos de naranja en postcosecha.2010 36

“CONTROL POSTCOSECHA DE *Penicillium digitatum* EN FRUTOS DE NARANJA”

Paulina González Fierro
Colegio de Postgraduados, 2010

El moho verde de los cítricos causado por *Penicillium digitatum* es la más importante enfermedad postcosecha en el mundo. Este estudio evaluó el efecto de nueve concentraciones de esporas en la germinación y crecimiento postcosecha de *P. digitatum* en naranjas. Todos los frutos fueron infectados cuando se inocularon con una solución de esporas a una concentración de 6×10^5 e/ml. El 50% de los frutos fueron infectados cuando se inocularon con 3×10^5 e/ml, solo algunos frutos mostraron síntomas. Los síntomas no aparecieron en frutos inoculados con 3×10^4 e/ml o menos. Las más altas concentraciones de esporas desarrollaron más rápido los síntomas, demeritando la calidad postcosecha del fruto y acortando su vida de anaquel. Los frutos infectados de todos los tratamientos se colapsaron para el día ocho después de la inoculación. Fueron evaluados tres tratamientos: piquete con tres niveles de presión (0.2, 0.4 y 0.6 Kg/cm²), cortada en tres longitudes (1, 3 y 6 cm) y golpe o deformación en tres niveles de presión (3, 4 y 5 Kg/cm²). La infección no ocurrió cuando las heridas fueron superficiales y no penetraron hasta el albedo con los tratamientos de golpe o deformación. El piquete y la cortada resultaron eficientes y estadísticamente similares como métodos de inoculación. Se evaluó el efecto de diferentes tratamientos para el control postcosecha de *Penicillium digitatum in vitro* y en frutos de naranja. El hongo se aisló de frutos enfermos de limón (*Citrus aurantifolia*) del estado de Colima. Se hicieron ensayos *in vitro* para determinar la efectividad biológica de Tricon®, Timorex gold®, Extracto de neem (*Azadirachta indica*), Tiabendazol, Fludioxonil y Pirimetanil a diferentes dosis, así como un testigo (solo PDA). Cada tratamiento con cuatro repeticiones. Tricon® a dosis mayores de 40 ml/L, Tiabendazol y Fludioxonil a todas sus dosis inhibieron el 100% del crecimiento del hongo. El extracto de neem no inhibió el crecimiento del hongo y aparentemente favoreció su crecimiento. La dosis mayor de Pirimetanil (1980 ppm) y de Timorex gold® (4059 ppm) resultaron con una eficiencia de 71 y 48% respectivamente. Posteriormente se realizaron pruebas de efectividad *in vivo* tomando como referencia las dosis *in vivo* que tuvieron control. Se evaluaron los siguientes tratamientos: Tricon ® (70,140, 225 ml/L), Tricon h ® (70,140, 225 ml/L), tiabendazol (240, 420, 840 ppm), fludioxonil (20, 200, 2000 ppm), Timorex gold®

Melaleuca alternifolia (1000, 1500 ppm) y testigo (frutos inoculados y sumergidos en agua destilada esteril). Cada tratamiento con cuatro repeticiones. Tiabendazol a dosis mayores a 420 ppm resulto en un 100% de control. Fludioxonil (2000 ppm) y tiabendazol (240 ppm), resultaron en un 47 y 48% de eficiencia. Tricon® con y sin herida, así como Timorex gold ® fueron similares al tratamiento testigo.

Palabras clave: Concentración de esporas, Herida, Efectividad, Control Biológico, Postcosecha, *Penicillium digitatum*.

“POST-HARVEST CONTROL OF *Penicillium digitatum* IN ORANGE FRUITS”

Paulina González Fierro
Colegio de Postgraduados, 2010

Citrus green mold caused by *Penicillium digitatum* is its most important post-harvest disease worldwide. This study evaluated the effect of nine spore concentrations on the germination and postharvest growth of *P. digitatum* on oranges. All fruits were infected when inoculated with a spore concentration of 6×10^5 /ml. 50% of the fruits were infected when inoculated with 3×10^5 spores/ml, only some fruits presented symptoms. Symptoms did not appear on fruits inoculated with 3×10^4 s/ml or less. The higher the spore concentration the faster the symptoms developed, devaluating the post-harvest fruit quality and shortening its shelf life. Infected fruits of every treatment collapsed eight days after inoculation. Three inoculation treatments were evaluated: puncture with 3 pressure levels (0.2, 0.4 y 0.6 Kg/cm²), cut on 3 lengths (1, 3 and 6 cm) and bruise or deformation on 3 pressure levels (3, 4 and 5 Kg/ cm²). Infection did not occur when the injuries were superficial and did not penetrate until the albedo, and with the bruise or deformation treatments, (Puncture and cut resulted efficient and statistically similar as inoculation methods. The postharvest control *in vitro* and in orange fruits was evaluated. The fungus was isolated from infected fruits of Mexican lemon (*Citrus aurantifolia*) of the state of Colima. Assays was performed *in vitro* to determine the biological effectiveness of Tricon[®], Timorex gold[®], Neem extract (*Melaleuca alternifolia*), Thiabendazole, Fludioxonil and Pyrimethanil at different doses, and a control treatment (only PDA). Four repetitions per treatment. Tricon[®] at doses higher 40ml/L, Thiabendazole and Fludioxonil in all doses resulted in 100% control. The neem extract was statistically similar to control treatment. Pyrimethanil (1980 ppm) and Timorex gold[®] (4059 ppm) resulted 71 and 48% efficient respectively. Later, postharvest control *in vivo* was evaluated with the following treatments and doses: Tricon[®] (70,140, 225 ml/L), Tricon h[®] (70,140, 225 ml/L), thiabendazole (240, 420, 840 ppm), fludioxonil (20, 200, 2000 ppm), Timorex gold[®] (*Melaleuca alternifolia*) (1000, 1500 ppm) and control treatment (inoculated fruits and submerged in sterile distilled water. Four repetitions per treatment. Thiabendazole at doses over 240 ppm resulted in 100% control. Fludioxonil (2000

ppm) and thiabendazole (240 ppm) resulted in 47 and 48%. Tricon[®] and Timorex gold[®]'s were similar to the control treatment.

Key words: Concentration of spores, Injury, Effectiveness, Biological control, Postharvest *Penicillium digitatum*.

INTRODUCCION GENERAL

México ocupa el cuarto lugar junto con España como productor de cítricos en el ámbito mundial con una superficie cultivada de aproximadamente 535,400 hectáreas y un volumen de producción de 7.04 millones de toneladas de fruta. (FAO, 2008) La naranja es la especie citrícola más importante con 73 % de la superficie cultivada a escala nacional, seguida por los limones (limón mexicano, persa y verdadero) con 26 % y la mandarina y toronja con 1.5 y 1.4 %, respectivamente (SAGARPA, 2004).

Las pérdidas postcosecha ocasionadas por microorganismos que atacan durante el periodo de traslado de la huerta hacia la empacadora pueden ser muy importantes ya que en estos procesos se dan los factores ambientales favorables para el desarrollo del hongo, así como los daños mecánicos que este aprovecha para penetrar.

Las enfermedades de postcosecha de los cítricos que más pérdidas económicas ocasionan son la podredumbre verde, causada por *Penicillium digitatum*, y la podredumbre azul, causada por *P. italicum* (Eckert and Eaks, 1989). *Penicillium digitatum*, el agente causal del moho verde de los cítricos ha llegado a causar pérdidas postcosecha del 55 al 80 % por pudrición de frutos en el mundo (Salvador, 2007).

Hong *et. al.* (1998) mencionan que la enfermedad de cítricos provocada por *P. digitatum* inicia a través de las heridas o daños mecánicos ocasionados durante la cosecha, empaque o el transporte. También Barkai-Golam (2001) menciona que los frutos son particularmente susceptibles a la infección durante las épocas de lluvia y con temperaturas óptimas en un rango de 20-27°C.

En estados tempranos el hongo causan un hundimiento, posteriormente se desarrolla micelio blanco del centro del área afectada hacia afuera. La esporulación es de color verde oliva para el caso de *Penicillium digitatum*. El hundimiento se caracteriza por tener tres círculos. El círculo verde de esporas, rodeado por una banda de micelio blanco sin esporular donde apenas se están formando los conidióforos. Y esta banda está rodeada de una banda definida de suave

hundimiento el cual no ha desarrollado el micelio blanco (Barkai-Golan, 2001). Son varios los factores que provocan la muerte rápida de los frutos de naranja. La concentración de esporas así como el tipo y tamaño de la herida juegan un papel muy importante.

Se han realizado varios estudios para determinar los factores que favorecen la pudrición de los cítricos. Por ejemplo, Green (1932) estudió la influencia que tienen los ácidos que se encuentran en la corteza de frutos sanos de naranja frente a la infección del moho verde. Bates (1933), señaló que el número de infecciones aumentaba con la profundidad de las heridas y particularmente cuando estas alcanzaban el albedo. Roistaker *et. al.* (1948) hicieron rasguños de 1 mm de profundidad y 10 mm de largo para provocar la infección de frutos. Además, Eckert y Kolbezen (1963) también utilizaron el método de raspar la superficie de las naranjas para producir lesiones de 2.6 pulgadas de diámetro.

Hipótesis

Con base a lo anterior se plantea la hipótesis de que cuanto mayor es la concentración de esporas de la solución de inóculo, mayor será el porcentaje de incidencia de la enfermedad, así como más rápido el desarrollo del hongo.

En cuanto al tipo de herida se espera que las heridas que traspasen el flabedo, serán las que harán posible la penetración del hongo y desarrollo de la enfermedad.

Por otro lado, el “moho verde” de los cítricos (*Penicillium digitatum*), se puede manejar mediante la aplicación de control químico, biológico y mediante el uso de extractos vegetales.

OBJETIVOS

- Determinar la concentración de esporas mínima óptima para asegurar el 100% de infección de frutos de naranja por *Penicillium digitatum*.
- Determinar el tipo de herida necesario para que ocurra un 100% de infección de frutos de naranja por *Penicillium digitatum*.
- Evaluar la efectividad biológica de diferentes productos para el control de *Penicillium digitatum* en frutos de naranja en postcosecha.

LITERATURA CITADA

- Barkai-Golan. 2001. Postharvest diseases of fruits and vegetables- Development and control. 268-269
- Bates. G. R. 1933. Oil glands of citrus as an avenue of infection. Nature. Lond. 130, 751.
- Eckert J. W. y Kolbezen M. J. 1963. Control of *Penicillium* decay of oranges with certain volatile aliphatic amines. Phytopathology. 53(9): 1053-1059
- FAO, 2008. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. www.fao.org.
- Green F. M. 1932. The infection of oranges by *Penicillium*. J. Pomology Hort. Sci. 10:184:215
- Hong, C. X., Michailides, T. J., and Holtz, B. A. 1998. Effects of wounding, inoculum density, and biological control agents on postharvest brown rot of stone fruits. Plant Dis. 82:1210-1216.
- Roistaker, C.N., Eaks I. L., Klotz, L.J. 1948. Ammonia gas to control blue –green mold decay of citrus fruits. Plat disease Rep. 39(3):202-207
- Salvador, A., Navarro, P., Martínez, J. J.M. 2007. XI Simposium Internacional de citricultura. Cd. Victoria, Tamaulipas, México
- SAGARPA, 2004. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.sagarpa.com.mx.

CAPITULO I. EFECTO DE NUEVE CONCENTRACIONES DE ESPORAS EN LA GERMINACION Y CRECIMIENTO DE *Penicillium digitatum* EN FRUTOS DE NARANJA EN POSTCOSECHA

**Paulina González Fierro
Colegio de Postgraduados, 2010**

RESUMEN

El moho verde causado por *Penicillium digitatum* es la enfermedad postcosecha de mayor importancia económica en cítricos en el mundo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de nueve concentraciones de esporas en la germinación y crecimiento de *P. digitatum* en frutos de naranja en postcosecha. El crecimiento de *P. digitatum* se observó en un 100% cuando la concentración fue igual o mayor a 6×10^5 esporas/ml. A partir de la concentración 3×10^5 e/ml, solo algunos frutos presentaron síntomas y las concentraciones 1×10^4 y 3×10^4 esporas/ml no presentaron ningún síntoma. El uso de bajas concentraciones de esporas dio como resultado un crecimiento lento, ya que los síntomas comenzaron a presentarse a partir del día cuatro y cinco contrario a lo observado en las concentraciones altas donde se obtuvieron síntomas al primer y segundo día después de la inoculación. Estos resultados indican que a mayor concentración de esporas, los síntomas se presentarán en menor tiempo, demeritando la calidad postcosecha del fruto y por lo tanto teniendo menor vida de anaquel. Sin embargo, para todos los tratamientos, los frutos enfermos se colapsaron ocho días después de la inoculación.

Palabras clave: *Penicillium digitatum*, moho verde, concentración de esporas, germinación, crecimiento.

THE EFFECT OF NINE SPORE CONCENTRATIONS ON THE GERMINATION AND GROWTH OF *Penicillium digitatum* IN POSTHARVEST ORANGES

Paulina González Fierro, MC
Colegio de Postgraduados, 2010

SUMMARY

The green mold, caused by *Penicillium digitatum*, is the most important post-harvest disease of citrus worldwide. The objective of this study is to evaluate the effect of nine different spore concentrations on the germination and growth of *P. digitatum* in postharvest oranges. Growth was observed in 100% of the inoculations when the spore concentration was equal or higher than 6×10^5 s/ml. After a spore concentration of 3×10^5 s/ml, only some fruits presented symptoms and with 1×10^4 y 3×10^4 s/ml concentrations symptoms did not appear. The use of lower concentrations caused a slower growth, since the symptoms could be observed at days four and five after inoculation; not the same for higher concentrations, where they appeared at the first or second day. These results indicate that at higher spore concentrations the symptoms could be observed faster, devaluating the fruit post-harvest quality and, therefore, shortening its shelf life. However, the infected fruits of every treatment collapsed eight days after inoculation.

Key words: *Penicillium digitatum*, green mold, spore concentration, germination, growth.

1. INTRODUCCION

El hongo *P. digitatum* Sacc. (Moho verde) y *P. italicum* (Moho azul) son los principales patógenos de los cítricos. Estos, penetran por heridas u orificios naturales causando las enfermedades más comunes y devastadoras en postcosecha. Estudios han mostrado que *P. digitatum*, que ocasiona el “moho verde” de los cítricos crece más rápidamente en temperaturas moderadas (20-27°C) y por lo tanto, predomina durante el transporte y almacenamiento a corto plazo. *P. italicum* puede desarrollarse en almacenamiento como hiperparásito de *P. digitatum*. Los conidios de *Penicillium* están presentes durante el ciclo de cultivo en la atmosfera de las áreas de cultivo de cítricos, así como en los empaques y sus alrededores, en la maquinaria de éstos o en las manos de los trabajadores (Barkai-Golan, 2001). La enfermedad inicia a través de las heridas o daños mecánicos provocados durante la cosecha, empaque o el transporte (Hong, C. et. al., 1998). Los frutos son particularmente susceptibles a la infección durante las épocas de lluvia y con temperaturas óptimas en un rango de 20-27°C. En estados tempranos de la enfermedad, el hongo causa un hundimiento en el fruto, posteriormente se desarrolla micelio blanco del centro del área afectada hacia el margen del círculo. La esporulación es de color verde oliva para el caso de *Penicillium digitatum*. El hundimiento se caracteriza por tener tres círculos. El círculo verde de esporas, rodeado por una banda de micelio blanco sin esporular donde apenas se están formando los conidióforos, y esta banda está rodeada de una banda definida de suave hundimiento el cual no ha desarrollado el micelio blanco (Barkai-Golan, 2001). Son varios los factores que provocan la muerte rápida de los frutos de naranja. La concentración de esporas así como el tipo y tamaño de la herida juegan un papel muy importante. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de nueve concentraciones de esporas en la germinación y crecimiento de *P. digitatum* en frutos de naranja en postcosecha.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Aislamientos e identificación de *Penicillium digitatum*

El hongo se aisló de frutos enfermos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) en postcosecha, con síntomas de una colonia circular de moho blanco con una masa de conidios gris oliváceo en el centro de la colonia en cajas Petri con papa-dextrosa-agar (PDA). Cultivos monospóricos del hongo se identificaron morfológicamente como *Penicillium digitatum* de acuerdo a sus características de crecimiento en medio de cultivo.

2.2 Preparación del inóculo

Se obtuvieron los conidios puros de cultivos monospóricos y se suspendieron en agua destilada estéril. Para la determinación de la concentración de esporas se utilizó el hematocitómetro se prepararon las dosis siguientes: 1×10^4 , 3×10^4 , 6×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 3×10^5 , 6×10^5 , 9×10^5 y 1×10^6 . Adicionalmente se utilizó una solución testigo que correspondió a agua destilada estéril.

2.3 Inoculación e incubación de frutos de naranja

Los frutos de naranja fueron lavados y sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante dos minutos: posteriormente se colocaron otros 2 minutos en agua destilada estéril y finalmente se secaron con sanitas estériles. Se inocularon los frutos realizándoles una herida en la parte ecuatorial del mismo, de dos milímetros de ancho por cinco milímetros de profundidad, la herida se realizó con una pinza estéril de acero inoxidable. Con la ayuda de un micropipeta, se colocó una gota de (20 μ l) de la solución de esporas (12000 esporas) en la herida. Los frutos se incubaron en charolas desinfectadas y cubiertas con una bolsa de plástico para mantener la humedad alta y se marcaron. La temperatura media de la atmósfera controlada fue de 25° C y 95% de Humedad Relativa.

2.4 Mediciones de crecimiento de *P. digitatum* en naranjas

Los frutos se examinaron diariamente durante ocho días y se realizaron las mediciones del diámetro del crecimiento del hongo, mediante un vernier digital. Los datos del crecimiento final de la colonia se sometieron al análisis de varianza usando el paquete estadístico SAS.

3. RESULTADOS

La germinación y crecimiento de *P. digitatum* fue dependiente de la concentración de esporas. El Cuadro 1 muestra el porcentaje de frutos con crecimiento después de la inoculación con las nueve diferentes concentraciones de esporas.

Cuadro 1. Incidencia del moho verde en naranja inoculada con *P. digitatum* a nueve diferentes concentraciones. ^zLa eficiencia de infección fue calculada dividiendo el porcentaje de frutos enfermos entre el número de esporas aplicadas por fruto.

Concentración de esporas	Numero de esporas por herida	Incidencia	Eficiencia de infección ^z
1X10 ⁶	(20,000 esporas/herida)	100	.005
9X10 ⁵	(18,000 esporas/herida)	100	.005
6X10 ⁵	(12,000 esporas/herida)	100	.008
3X10 ⁵	(6,000 esporas/herida)	50	.008
1X10 ⁵	(2,000 esporas/herida)	50	.025
9X10 ⁴	(1,800 esporas/herida)	33.3	.0185
6X10 ⁴	(1,200 esporas/herida)	33.3	.0185
3X10 ⁴	(600 esporas/herida)	0	0
1X10 ⁴	(200 esporas/herida)	0	0

Cuando la concentración de esporas que se inoculó fue $\leq 3 \times 10^4$ esporas por mililitro, no hubo crecimiento. Con una concentración $\geq 6 \times 10^4$ esporas por mililitro, se observó una incidencia de 33.3% hasta una concentración de 3×10^5 e/ml donde se obtuvo un 50% de frutos con crecimiento. Así mismo, a partir de 6×10^5 e/ml se observó un 100% de frutos enfermos.

El pronóstico de incidencia de *P. digitatum* fue calculado mediante una regresión lineal (Figura 1) donde se puede apreciar que a mayor concentración de esporas, el porcentaje de incidencia aumenta hasta alcanzar un 100% a una concentración de 6×10^5 esporas.

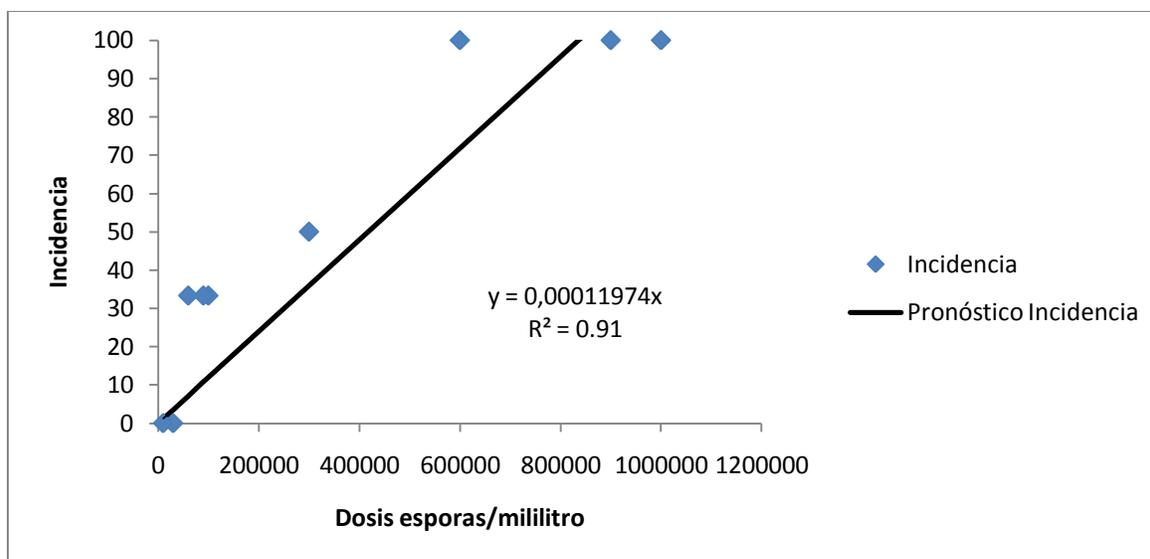


Figura 1. Regresión para determinar el porcentaje de incidencia de *P. digitatum* sobre frutos de naranja en postcosecha.

Las figuras 2 y 3 muestran las curvas de crecimiento de micelio y esporulación del hongo a las diferentes concentraciones.

La germinación del hongo en las dosis de inculo más altas ($\geq 3 \times 10^5$) fue más rápido y por lo tanto presentó crecimiento desde el primer día, a diferencia de las dosis medias y bajas ($\leq 1 \times 10^5$) donde se observó crecimiento hasta el día cuatro y cinco e incluso en las más bajas ($\leq 3 \times 10^4$) donde no se observó crecimiento.

Las concentraciones más altas ($\leq 9 \times 10^5$) ocasionaron un crecimiento tanto micelial como de esporulación mayor (Figura 2 y 3), lo cual indica que a mayor nivel de inculo, se tendrá un mayor daño en la fruta.

Sin embargo, todos los frutos donde hubo crecimiento se encontraron colapsados el día ocho después de la inoculación.

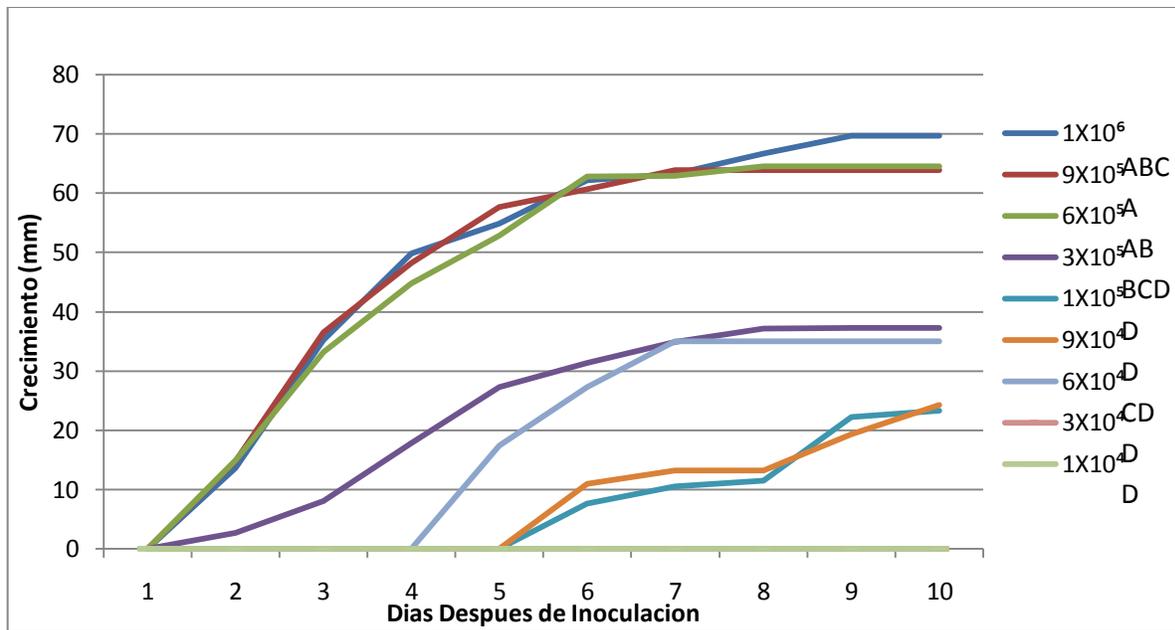


Figura 2. Curva de crecimiento del micelio de *Penicillium digitatum* a nueve concentraciones de esporas. *Letras iguales indican que no existen diferencias significativas (Tukey, $P > 0.05$).

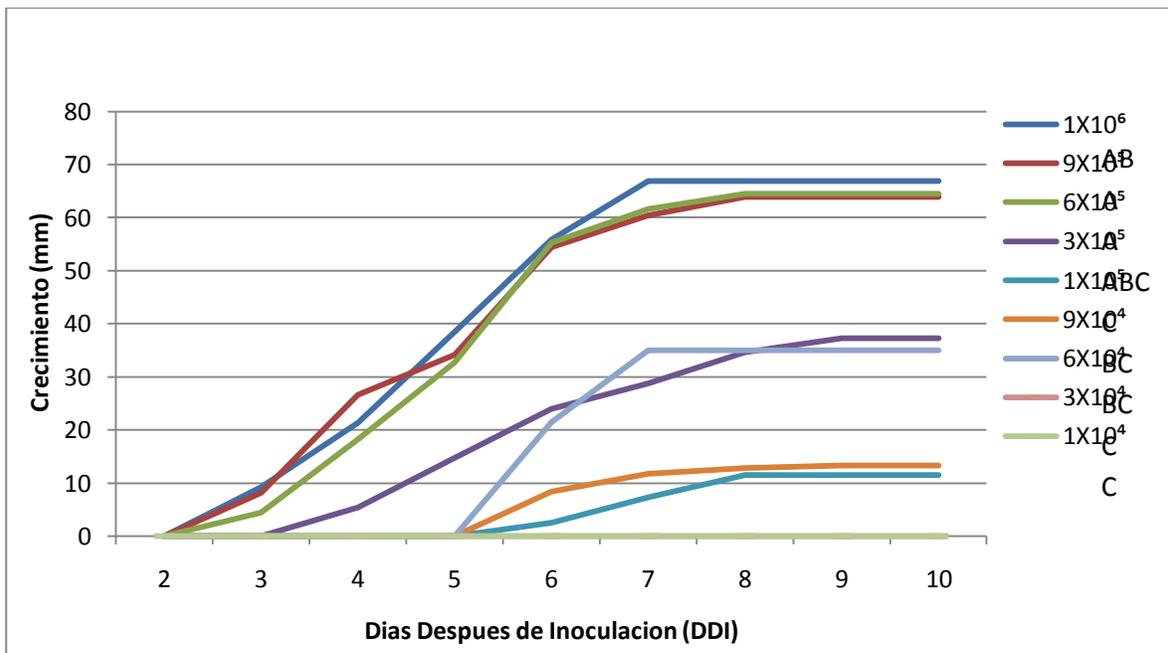


Figura 3. Curva de crecimiento de la esporulación de *Penicillium digitatum* a nueve concentraciones de esporas. *Letras iguales indican que no existen diferencias significativas (Tukey, $P > 0.05$).

Las curvas de crecimiento no mostraron diferencias significativas en cuanto al efecto de concentración de esporas ya que para todos los tratamientos donde hubo un 100% de incidencia,

la severidad del moho verde *P. digitatum* incrementó en un patrón sigmoideal conforme al aumento de la concentración de esporas.

4. DISCUSION

El efecto de la concentración de esporas en el crecimiento de hongos ha sido estudiado anteriormente para otros frutos en postcosecha como manzana (Baert *et. al.*, 2008) y frutos de hueso (Hong *et., al.*, 1998). Este estudio provee información cuantitativa en cuanto a la concentración de esporas óptima necesaria para que se de la infección del fruto de naranja por *Penicillium digitatum*. El moho verde presentó síntomas en frutos inoculados con concentraciones de 6×10^5 esporas por ml (12,000 esporas por herida), lo cual no ha sido considerado en la mayoría de los estudios realizados para pruebas de efectividad de productos químicos y/o biológicos ya que en casi todos los frutos se inoculan con concentraciones de esporas muy superiores a esta cantidad. Por mencionar algunos, Palou *et. al.*, 2001 estudiaron el control postcosecha del moho verde y azul en naranjas usando agua caliente, carbonato y bicarbonato de sodio con una concentración de esporas de 1×10^6 esporas por ml. Por otro lado, Holmes *et. al.*, 1999, estudiaron la sensibilidad de *P. digitatum* y *P. italicum* a fungicidas utilizando una concentración de esporas mayor a 1×10^7 esporas/ml. En otro estudio, Kanetis *et., al* (2008) realizaron un estudio donde utilizaron una solución de 1×10^6 esporas/ml. Para ambos estudios la concentración de esporas utilizada es muy alta, tomando en cuenta que en este caso, la dosis optima de inóculo fue de 6×10^5 esporas por ml. En cuanto al crecimiento del hongo, se observó un patrón sigmoideal, lo que coincide con lo reportado por Hong *et., al* (1998) para la pudrición café de las frutas de hueso. La eficiencia de infección de *Penicillium digitatum* es de 0.08 (Cuadro 1), ésta es menor al compararla con la eficiencia de infección de *M. fructicola* de 0.13 en frutos heridos de nectarinas y duraznos según lo mencionan Hong *et., al* (1998). El uso de bajas concentraciones de esporas en la inoculación de *P. digitatum* en frutos de naranja dio como resultado un lento proceso de germinación de esporas y de expresión de síntomas, sin embargo en todas las concentraciones en que hubo frutos enfermos, el patógeno cubrió casi toda la superficie del fruto en el día ocho en todos los tratamientos.

5. CONCLUSIONES

La concentración óptima para que ocurra un 100% de incidencia es 6×10^5 esporas/ml (12,000 esporas por herida).

A menores concentraciones de esporas, la germinación y crecimiento del hongo es más lento, así como para las concentraciones $\leq 3 \times 10^4$ esporas/ml donde no ocurre la infección.

Las concentraciones mayores a la dosis óptima 6×10^5 esporas/ml favorecen la germinación y crecimiento del hongo, provocando mayor daño en el fruto.

Para todas las concentraciones donde ocurrió la infección, los frutos se encontraron colapsados para el día ocho después de la inoculación.

6. LITERATURA CITADA

1. Baert, K., Devlieghere, F. Li Bo., Debevere, J., De Meulenaer, B. 2008. The effect of inoculum size on the growth of *Penicillium expansum* in apples. *Food Microbiology* 25:212–217
2. Barkai-Golan. 2001. Postharvest diseases of fruits and vegetables- Development and control. 268-269
3. Hong, C. X., Michailides, T. J., Holtz, B. A. 1998. Effects of wounding, inoculum density, and biological control agents on postharvest brown rot of stone fruits. *Plant Dis.* 82:1210-1216.
4. Palou, L., Smilanick, J. L., Usall, J., Viñas, I. 2001. Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. *Plant Dis.* 85:371-376
5. Kanetis, L., Förster, H., Adaskaveg, J. E. 2008. Optimizing efficacy of new postharvest fungicides and evaluation of sanitizing agents for managing citrus green mold. *Plant Dis.* 92:261-269
6. Holmes, G. J., Eckert, J. W. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* 89:716-721

CAPITULO II. EFECTO DE TRES TIPOS DE HERIDA EN LA INFECCION Y CRECIMIENTO DE *Penicillium digitatum* EN FRUTOS DE NARANJA EN POSTCOSECHA

**Paulina González Fierro
Colegio de Postgraduados, 2010**

RESUMEN

Se evaluó en naranja Valencia el efecto de tres tipos de herida en la infección y crecimiento de *Penicillium digitatum*. Para ello se hicieron inoculaciones artificiales. Los tratamientos fueron los siguientes; piquete con 3 niveles de presión (0.2, 0.4 y 0.6 Kg/cm²), cortada en 3 longitudes (1, 3 y 6 cm) y golpe o deformación con 3 niveles de presión (3, 4 y 5 Kg/cm²). Cuando las heridas son superficiales y no penetran hasta el albedo, no ocurre la infección. Tal fue el caso de los tratamientos por golpe o deformación donde no hubo presencia de lesiones. Los demás tratamientos, ocasionaron infección y ambos métodos de inoculación (piquete y cortada) resultaron ser efectivos en el procedimiento de inoculación artificial de frutos. Estos dos tratamientos no presentaron diferencias estadísticamente significativas sin importar la presión y longitudes ensayadas.

Palabras clave: naranja, herida, infección, crecimiento, *Penicillium digitatum*.

THE EFFECT OF THREE TYPES OF INJURIES ON INFECTION AND GROWTH OF *Penicillium digitatum* ON POSTHARVEST ORANGES

Paulina González Fierro
Colegio de Postgraduados, 2010

SUMMARY

It was evaluated on Valencia oranges the effect of three different types of injury on the infection and growth of *Penicillium digitatum*. To do that, artificial inoculations were realized. The treatments were the following ones: puncture with 3 pressure levels (0.2, 0.4 y 0.6 Kg/cm²), cut on 3 lengths (1.3 y 6 cm) and bruise or deformation on 3 pressure levels (3.4 y 5 Kg/ cm²). When the injuries are superficial and do not penetrate until the albedo, the infection does not occur. This was the case of bruise or deformation treatments, where was not injury presence. The rest of treatments, caused infection and both inoculation methods (puncture and cut) resulted efficient in artificial inoculation process. These two treatments did not show significant differences regardless of the pressure and lengths tested.

Key words: orange, injury, infection, growth, *Penicillium digitatum*.

1. INTRODUCCION

Las pérdidas postcosecha ocasionadas por microorganismos que atacan durante el periodo de traslado de la huerta hacia la empacadora y de esta al consumidor final, pueden ser muy importantes ya que en estos procesos se dan los factores ambientales favorables para el desarrollo del hongo, así como los daños mecánicos que este aprovecha para penetrar.

(Hong *et. al.* 1998) mencionan que la enfermedad de cítricos provocada por *P. digitatum* inicia a través de las heridas o daños mecánicos ocasionados durante la cosecha, empaque o el transporte. También Barkai-Golam (2001) menciona que los frutos son particularmente susceptibles a la infección durante las épocas de lluvia y con temperaturas óptimas en un rango de 20-27°C.

Se han realizado varios estudios para determinar los factores que favorecen la pudrición de los cítricos. Por ejemplo, Green (1932) estudió la influencia que tienen los ácidos que se encuentran en la corteza de frutos sanos de naranja frente a la infección del moho verde. Bates (1933), señaló que el número de infecciones aumentaba con la profundidad de las heridas y particularmente cuando estas alcanzaban el albedo. Roistaker *et., al* (1948) hicieron rasguños de 1 mm de profundidad y 10 mm de largo para provocar la infección de frutos. Además, Eckert y Kolbezen (1963) utilizaron el método de raspar la superficie de las naranjas para producir lesiones de 2.6 pulgadas de diámetro.

El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto de tres tipos de herida para provocar la infección de frutos de naranja por *Penicilium digitatum* para conocer el medio de penetración más adecuado en la inoculación artificial del moho verde de los cítricos.

2. MATERIALES Y METODOS

Para la realización del experimento se utilizaron frutos de naranja variedad Valencia con aproximadamente el mismo tamaño y madurez y sin afectaciones visibles. Los frutos se desinfectaron mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 3 minutos. Posteriormente se colocaron otros 2 minutos en agua destilada estéril para eliminar los residuos de cloro y finalmente se secaron con sanitas estériles. Después, se acomodaron en charolas desinfectadas y acondicionadas con bolsa de plástico para conservar la humedad alta y se etiquetaron de acuerdo al tratamiento correspondiente. La temperatura de incubación fue de 23°C y la humedad relativa varió entre 95.9 y 100%. A cada fruto se le realizó una herida diferente en la zona ecuatorial del fruto. Los tratamientos fueron los siguientes; piquete con tres niveles de presión (0.2, 0.4 y 0.6 Kg/cm²), cortada en 3 longitudes (1, 3y 6 cm) y golpe o deformación con 3 niveles de presión (3, 4 y 5 Kg/cm²) para lo cual se utilizó el texturómetro universal con puntal cónico de 0.8 cm de diámetro, puntal plano de 3 cm de diámetro y una navaja de un filo. El aislamiento del hongo se obtuvo anteriormente de frutos enfermos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) provenientes del estado de Colima. El hongo se aisló en cajas petri con medio PDA y posteriormente se preparó una solución de esporas a una concentración de 6×10^4 esporas por mililitro mediante el uso de hematocitómetro. Con la ayuda de un micropipeta se colocó en la herida una gota de (20µl) de la solución de esporas inmediatamente después de provocarles la herida. Cada tratamiento se evaluó con 4 repeticiones (frutos). Los frutos se examinaron diariamente durante ocho días y se realizaron las mediciones del crecimiento del hundimiento, micelio y esporulación del hongo. Los datos se sometieron al análisis de varianza usando el paquete estadístico SAS.

3. RESULTADOS

Las lesiones típicas del hongo se observaron cuando se realizó la herida con piquete y cortada. Para ambos tratamientos, 24 horas después de la inoculación se observaron lesiones en forma de mancha acuosa o hundimiento con diámetros de entre 2 y 4 cm de diámetro. A las 48 horas después de la inoculación se comenzó a formar un halo blanco sobre la superficie dañada con medidas entre 1 y 4 cm de diámetro. Para el día 4 el crecimiento blanco de micelio ya cubría perfectamente las áreas de inoculación. Así mismo comenzó a formarse un cambio de color en el centro de las lesiones de blanco a un gris oliváceo por la esporulación del hongo con medidas de 1 a 4 cm de diámetro. La mayoría de los frutos estuvieron completamente cubiertos por el crecimiento del hongo para el día 7.

Como lo mencionan Kavanagh y Wood (1967), en naranja Valencia se necesitan heridas mayores o iguales a 4 mm de profundidad para asegurar un alto nivel de infección. En todos los tratamientos de piquete hubo infección. En el caso de cortada ocurrió lo mismo. La infección de *P. digitatum* no se presentó para los tratamientos de golpe en sus tres niveles. (Figura 1)

La incidencia fue de 100% para los tratamientos de piquete en sus tres niveles de presión (0.2, 0.4 y 0.6 Kg/cm²), y para la cortada de (3 y 6cm), la cortada de 1 cm tuvo un 75% de incidencia (Figura 1).

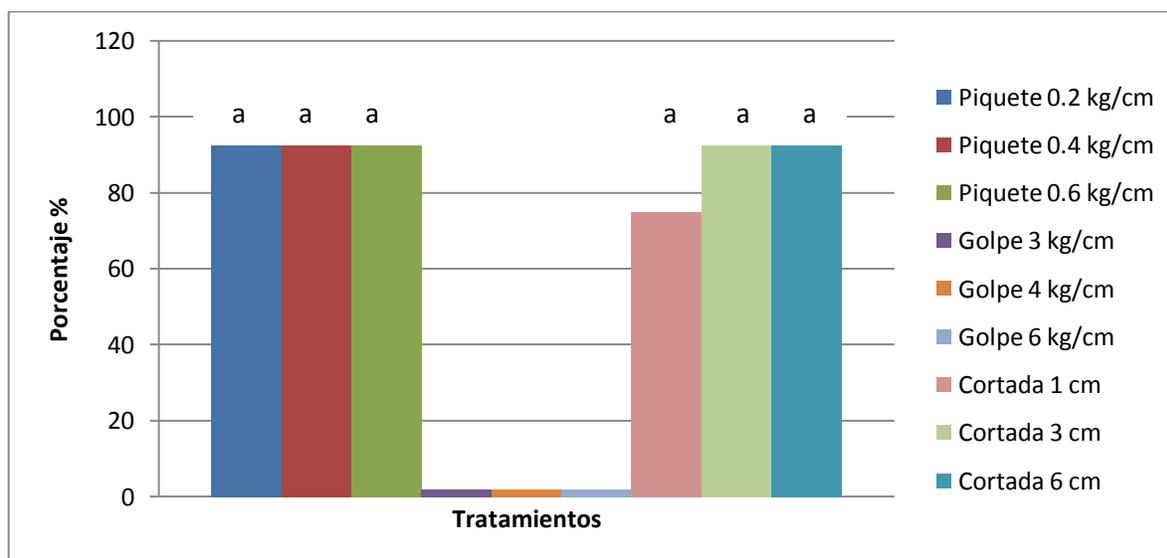


Fig. 1. Porcentajes de incidencia de *P. digitatum* para los tres diferentes tipos de herida.

Como se puede observar en el Cuadro 1 no hay diferencias significativas entre los tratamientos de piquete a sus tres presiones así como cortada en sus tres longitudes.

Cuadro 1. Prueba de medias de crecimiento de *Penicillium digitatum* para los tratamientos donde ocurrió la infección del hongo. *Letras iguales indican que no existen diferencias significativas (Tukey, $P > 0.05$).

TRATAMIENTO	MEDIA*
Piquete 0.2 Kg/cm	6,52667 ^a
Piquete 0.4 Kg/cm	6,325 ^a
Piquete 0.6 Kg/cm	6,37 ^a
Cortada 1 cm	5,18 ^a
Cortada 3 cm	6,47 ^a
Cortada 6 cm	6,49 ^a

4. DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran claramente que *P. digitatum* es un patógeno de herida de las naranjas ya que únicamente los tratamientos que provocaron una herida de profundidad superior a los 4 mm permitieron la formación de lesiones. Esto concuerda con los estudios hechos por Kavanagh y Wood (1967) que encontraron que las lesiones se desarrollaban más rápida y fácilmente cuando las soluciones de esporas se aplicaban en las heridas que dañan las vesículas de aceite, pero contradicen lo concluido por Fresneda y Camacho (1984) ya que ellos no encontraron apropiadas las punciones para la inoculación artificial de frutos de naranja. En nuestro estudio, ambos tratamientos (piquete y cortada) mostraron un 100% de infección en los frutos inoculados. Únicamente en los tratamientos de golpe, en ninguno de sus niveles ocurrió la infección. Esto, como lo mencionan Kavanagh y Wood (1967) confirma el hecho de que el tejido del flabedo es resistente y el albedo susceptible a *P. digitatum*. Por lo tanto, heridas que no traspasen el flabedo no permitirán la entrada e infección por el patógeno.

5. CONCLUSIONES

La infección por *P. digitatum* ocurre cuando las heridas en el fruto sobrepasan la capas superficiales del flabedo, permitiendo que el inoculo entre en contacto con el albedo.

En el presente estudio, se obtuvieron resultados altos >75% de incidencia para los tratamientos de piquete y cortada en sus tres niveles de presión y longitud respectivamente.

El tratamiento de golpe o deformación del fruto no permitió la entrada del patógeno hacia el albedo, por lo que no ocurrió la infección.

6. LITERATURA CITADA

1. Barkai-Golan. 2001. Postharvest diseases of fruits and vegetables- Development and control. 268-269
2. Bates, G. R. 193. Oil glands of citrus as an avenue of infection. Nature. Lond. 130, 751.
3. Eckert, J. W. y Kolbezen M. J. 1963. Control of *Penicillium* decay of oranges with certain volatile aliphatic amines. Phytopathology. 53(9): 1053-1059
4. Fresneda, J. A; Camacho J. L. 1984. Influencia del tipo de herida en naranja y toronja por *Penicillium digitatum*. Ciencias de la agricultura. 18:33-38 pp.
5. Green, F. M. 1932. The infection of oranges by *Penicillium*. J. Pomology Hort. Sci. 10:184:215
6. Hong, C. X., Michailides, T. J., and Holtz, B. A. 1998. Effects of wounding, inoculum density, and biological control agents on postharvest brown rot of stone fruits. Plant Dis. 82:1210-1216.
7. Kavanagh, J. Z; R. K. S. Wood, 1967. The role of wounds in the infection of oranges by *Penicillium digitatum* Sacc. InterScience. 60(3) 375-383 pp.
8. Roistaker, C.N., Eaks I. L. y Klotz L.J. 1948. Ammonia gas to control blue –green mold decay of citrus fruits. Plat disease Rep. 39(3):202-207

CAPITULO III. EFECTO DE FUNGICIDAS, EXTRACTOS VEGETALES Y *Trichoderma viridae* y *T. harzianum* SOBRE EL CONTROL EN POSTCOSECHA DE *Penicillium digitatum* EN FRUTOS DE NARANJA (*Citrus sinensis* L. Osbeck)

**Paulina González Fierro
Colegio de Postgraduados, 2010**

RESUMEN

El efecto de diferentes tratamientos para el control postcosecha de *Penicillium digitatum* se evaluó *in vitro* y en frutos de naranja. El hongo se aisló de frutos enfermos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) del estado de Colima. Los tratamientos *in vitro* fueron: Tricon® (*Trichoderma viridae* y *T. harzianum*) (1,5,10,40,70, 100 ml/L), Tiabendazol (420, 840, 1680 ppm), Extracto de Neem (*Azadirachta indica*) (1,5,10,15, 20%), fludioxonil (20, 200, 2000 ppm), pirimetanil (19.8, 198, 1980 ppm), Timorex gold® (Aceite esencial del árbol de té *Melaleuca alternifolia*: 40, 403, 4059 ppm) y testigo (solo PDA). Cada tratamiento con cuatro repeticiones. Posteriormente se colocaron discos de 5 mm con *P. digitatum* en el centro de la caja Petri y el diámetro del hongo se evaluó cada 24 horas. Tricon® a dosis mayores de 40ml/L, y todas las dosis evaluadas de tiabendazol y fludioxonil no permitieron el crecimiento del hongo. En las pruebas postcosecha de efectividad biológica *in vivo* se evaluaron Tricon ® (70,140, 225 ml/L), Tricon h ® (70,140, 225 ml/L), tiabendazol (240, 420 y 840 ppm), fludioxonil (20, 200 y 2000 ppm), Timorex gold® *Melaleuca alternifolia* (1000 y 1500 ppm) y testigo (frutos inoculados pero no tratados). Frutos de naranja sanos de aproximadamente el mismo tamaño y estado de madurez se inocularon por punción con 12000 conidias (20 µl de una suspensión de 6×10^5 esporas/ml) con cuatro repeticiones por tratamiento. Después de 12 horas se aplicaron los tratamientos por inmersión del fruto en la solución del producto durante 3 minutos. Los frutos se colocaron en charolas y se cubrieron con bolsas estériles para mantener la humedad. Se evaluó el crecimiento de la mancha hasta que los frutos del tratamiento testigo estuvieron completamente cubiertos con el hongo. El único tratamiento que obtuvo un 100% de efectividad fue el tiabendazol a dosis mayores de 420 ppm. El fludioxonil en su dosis más alta (2000 ppm) no tuvo diferencias significativas con tiabendazol a su dosis más baja (240 ppm) con un 47 y 48% de efectividad. Tricon® y Timorex gold ® no fueron efectivos.

Palabras clave: Efectividad, *in vitro*, *in vivo*, Control Biológico, Postcosecha.

THE EFFECT OF FUNGICIDES, VEGETAL EXTRACTS AND *Trichoderma viridae* & *T. harzianum* FOR THE POSTHARVEST CONTROL OF *Penicillium digitatum* ON ORANGE FRUITS (*Citrus sinensis* L. Osbeck)

**Paulina González Fierro
Colegio de Postgraduados, 2010**

SUMMARY

The effect of different treatments for the postharvest control of *Penicillium digitatum* was evaluated *in vitro* and on orange fruits. The fungus was isolated from infected fruits of lemon (*Citrus aurantifolia*) of the state of Colima. Tricon[®] (*Trichoderma viridae* y *T. harzianum*) (1,5,10,40,70, 100 ml/L), thiabendazole (420, 840, 1680 ppm), neem (*Azadirachta indica*) extract (1,5,10,15, 20%), fludioxonil (20, 200, 2000 ppm), pyrimethanil (19.8, 198, 1980 ppm), Timorex gold[®] (Tea tree essential oil *Melaleuca alternifolia* 40, 403, 4059 ppm) and control (only PDA) were the *in vitro* treatments. The fungus was placed in the center of each petri dish with PDA mixed with every treatment and fungal growth was evaluated every 24 hours. Each treatment with four repetitions. Tricon[®] in doses over 40ml/L and all evaluated doses of thiabendazole and fludioxonil were 100% efficient. For the *in vivo* efficiency test, healthy lemon fruits of approximately the same size and age were puncture inoculated with 12000 conidia (20 µl of spore suspension with 6×10^5 spores/ml). After 12 hours the treatments included Tricon[®] (70,140, 225 ml/L), Tricon h[®] (70,140, 225 ml/L), thiabendazol (240, 420, 840 ppm), fludioxonil (20, 200, 2000 ppm), Timorex gold[®] *Melaleuca alternifolia* (1000, 1500 ppm) and control (inoculated but not treated fruits) were applied by dipping the fruit in the product solution for 3 minutes. Each treatment with four repetitions. Inoculated fruits were placed in trays and covered with plastic bags to maintain high relative humidity. Fungal growth was daily measured until the control fruits were completely covered by the fungus. Thiabendazole at 420 and 840 ppm was the only treatment 100% effective. Fludioxinil at 2000 ppm was not significantly different from thiabendazole at 240 ppm with 47 and 48% effectiveness. Tricon[®] and Timorex gold[®] were not effective.

Key words: *In vitro* and *in vivo* efficiency, Biological Control, Postharvest.

1. INTRODUCCION

Los cítricos son frutales ampliamente cultivados en el mundo con alrededor de 535,400 hectáreas y un volumen de producción de 7.04 millones de toneladas de fruta (FAO, 2008), consumidos y tecnificados a nivel mundial. Brasil, Estados Unidos, China, México, España e India son los mayores productores en el mundo. Un 65% de la producción mundial corresponde a naranja y un 18% a mandarinas, sumando en conjunto el 83%, un 16% corresponde a Lima- Limón y el 5% a toronjas-pomelos (Rosenberger *et. al.*, 2006). Las enfermedades de postcosecha de los cítricos que más pérdidas económicas ocasionan son la podredumbre verde, causada por *Penicillium digitatum*, y la podredumbre azul, causada por *P. italicum* (Eckert and Eaks, 1989). *P. digitatum*, el agente causal del moho verde de los cítricos ha llegado a causar pérdidas postcosecha del 55 al 80 % en el mundo (Salvador, 2007). Ambas enfermedades se controlan mediante la aplicación de fungicidas sintéticos como imazalil, tiabendazol u ortofenilfenato sódico (Montecinos *et al.*, 2007). Por otro lado, Smilanick *et al.*, 2006a menciona que aplicaciones de bicarbonato de sodio, imazalil, tiabendazol, pirimetanil, fludioxonil y fenilfenato de sodio son usados para el manejo postcosecha del moho verde y azul en cítricos en California. Los fungicidas (benomilo, tiabendazol y tiofanato-metil) se introdujeron a finales de 1960 (Femenía, 2007), registrados inicialmente para controlar cenicillas en frutos de hueso y otras enfermedades causadas por hongos, como es el caso de la caída prematura de los frutos provocada por *Colletotrichum acutatum*, y de antracnosis postcosecha de cítricos por *Colletotrichum gloeosporioides* (Timmer *et al*, 2000). Su uso se ha ampliado para controlar enfermedades postcosecha como el “moho gris” (*Botrytis* sp.) y el “moho azul” (*Penicillium expansum*) (Femenía, 2007). La resistencia a los benzimidazoles se observó en *B. cinerea* y *P. expansum* en pera desde 1970 en Oregon y Washington (Bertrand y Saulie Carter, 1978). El tiabendazol fue el fungicida postcosecha más utilizado postcosecha en manzanas y peras en el Noroeste de los EE.UU, pero la resistencia desarrollada ahí resultó en la incapacidad de controlar al moho azul, *P. expansum* (Lennox *et al*, 2004; Li and Xiao, 2008a). Por esta razón, en la actualidad existe una tendencia a sustituir los fungicidas químicos por estrategias alternativas de control, como el uso de microorganismos antagonistas, aislados de la superficie de frutos, en el control de sus enfermedades postcosecha (Hernández , 2007). El uso del Quitosano para el control postcosecha de *Botrytis cinérea* en uvas de mesa es otro caso (Romanazzi, 2002). Los tratamientos térmicos son otra alternativa para el control de *P. digitatum*

en frutos de naranja (Mariángeles and Meier, 2007). *Trichoderma viridae* es un antagonista efectivo contra *P. digitatum* en frutos de naranja en postcosecha (Hernández, 2007: Díaz and Vila, 1990). Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la efectividad biológica de varios productos químicos y de control biológico y extractos vegetales para el manejo postcosecha del moho verde en frutos de naranja.

2. MATERIALES Y METODOS

Aislamiento del patógeno. *Penicillium sp.* se aisló de frutos enfermos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) en postcosecha, con síntomas de una suave área húmeda, rodeada por una colonia circular de moho blanco. Después de 24-36 horas se pueden observar esporas verdes asexuales en el centro de la colonia, rodeada por una amplia banda de micelio blanco en limón mexicano del estado de Colima y se sembró en cajas Petri con papa-dextrosa-agar (PDA). Cultivos monospóricos del hongo se identificaron morfológicamente como *Penicillium digitatum* de acuerdo a sus características de crecimiento en medio de cultivo (micelio blanco y masa de conidios color gris oliváceo).

Pruebas de efectividad biológica *in vitro*. Los siguientes productos orgánicos y químicos se probaron *in vitro* contra *Penicillium digitatum*: T1: Tricon® (*Trichoderma viridae* y *T. harzianum*) (1,5,10,40,70,100 ml/L), T2: tiabendazol (420, 840, 1680 ppm), T3: Extracto de neem (*Azadirachta indica*) (1,5,10,15,20%), T4: fludioxonil (20, 200, 2000 ppm), T5: pirimetanil (19.8, 198, 1980 ppm), T6: Timorex gold® (Aceite esencial del árbol de té *Melaleuca alternifolia* 40, 403, 4059 ppm) y T7: testigo. Cada tratamiento se hizo con cuatro repeticiones en un diseño experimental completamente al azar. La dosis del producto se agregó a papa-dextrosa-agar (PDA) antes de su solidificación y vaciado en cajas de Petri: al testigo no se le agregó ningún producto. Un disco de PDA con hongo se sembró en el centro de la caja Petri y el diámetro de la colonia se midió diariamente con un vernier digital durante 10 días. La eficiencia de los productos se calculó con la fórmula de Abbott (Abbott, 1925).

Donde: $[(T_{\text{testigo}} - T_x) / T_{\text{testigo}}] * 100$

Ttestigo: crecimiento de la colonia en las cajas testigo

Tx: crecimiento de la colonia en la caja con cada tratamiento

Los datos se analizaron con el programa **Statistical Analysis System** (versión 9.1) y pruebas de comparación de medias de Tukey. Valores de p-values > 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Efectividad biológica *in vivo* sobre frutos de naranja.

Tratamientos. Los tratamientos *in vivo* se seleccionaron de aquellos que mostraron mayor eficacia *in vitro*. Tiabendazol se agregó a la dosis más baja (240 ppm), ya que todas las dosis tuvieron un 100% de eficiencia *in vitro*. Tricon® se evaluó de dos formas T1) El fruto se sumergió en el tratamiento sin provocarle herida y después de 48 horas se inoculo y T2) El fruto se hirió y se sumergió en el tratamiento, después de 48 horas se le colocó el inóculo sobre la herida (Tricon h). Todos los tratamientos se inocularon con 20 µl de una solución de esporas de *P. digitatum* a una concentración de 6×10^5 esporas/ml (12000 esporas por inoculación). Los tratamientos fueron: T1: Tricon® (70,140, 225 ml/L), T2: Tricon h ® (70,140, 225 ml/L), T3: tiabendazol (240, 420, 840 ppm), T4: fludioxonil (20, 200, 2000 ppm), T5: Timorex gold® *M. alternifolia* (1000, 1500 ppm) y T6: testigo (los frutos se sumergieron en agua destilada estéril).

Material vegetal. Frutos de naranja del estado de Veracruz, con similares condiciones de madurez y tamaño se lavaron y desinfestaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2% y se secaron con sanitas estériles.

Inoculación y tratamientos. Los frutos de naranja desinfestados, fueron colocados al azar en charolas de unicel previamente desinfestadas y cubiertos con bolsas estériles para mantener alta humedad. Los frutos se inocularon con una punción de cinco milímetros de profundidad por dos milímetros de ancho y sobre la herida se colocaron 12000 conidios (20 µl de una suspensión de 6×10^5 esporas/ml. Después de 24 horas de la inoculación, los frutos se sumergieron por tres minutos en cinco litros de la solución de cada tratamiento. Los frutos testigo se inocularon y posteriormente se sumergieron en agua destilada estéril. Los frutos se colocaron nuevamente en las charolas. El crecimiento del hongo se midió por 10 días. Para el caso de Tricon® y Tricon h ® los tratamientos se hicieron 48 horas antes de la inoculación.

Los datos se analizaron por medio del ANOVA con el programa **Statistical Analysis System** (versión 9.1) y pruebas de comparación de medias de Tukey. Valores de p-values > 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

La eficiencia de los productos se calculó a partir de la fórmula de eficacia de Abbott (Abbott, 1925).

Determinación de la DL₅₀. La DL₅₀ se determinó con la dosis a la cual se inhibió el 50% del crecimiento de *P. digitatum*.

3. RESULTADOS

Pruebas de efectividad biológica *in vitro*. Tricon® a partir de la dosis 40 ml/L inhibió el crecimiento del hongo con 100% de efectividad, estadísticamente similar a la dosis de 10 ml/L (89%). Tiabendazol y fludioxonil en todas sus dosis también fueron 100% eficientes. El extracto de neem no inhibió el crecimiento del hongo y aparentemente favoreció su crecimiento. La dosis mayor de Pirimetanil (1980 ppm) y de Timorex gold® (4059 ppm) resultaron con una eficiencia de 71 y 48% respectivamente.

Cuadro 1. Efectividad biológica *in vitro* de varios productos para el control de *P. digitatum* en PDA. 2010.

Producto	Dosis	Diámetro o colonia (mm)*	Eficacia Abbot
Tricon®	1 ml/L	33.17bc	38.02
Tricon®	5 ml/L	30.39bcd	43.23
Tricon®	10 ml/L	5.82fg	89.13
Tricon®	40 ml/L	0.00g	100
Tricon®	70 ml/L	0.00g	100
Tricon®	100 ml/L	0.00g	100
Tiabendazol	420 ppm	0.00g	100
Tiabendazol	840 ppm	0.00g	100
Tiabendazol	1680 ppm	0.00g	100
Extracto de neem	1%	61.25a	0
Extracto de neem	5%	67.39a	0
Extracto de neem	10%	61.53a	0
Extracto de neem	15%	68.55a	0

Extracto de neem	20%	68.66a	0
Fludioxonil	20 ppm	0.00g	100
Fludioxonil	200 ppm	0.00g	100
Fludioxonil	2000 ppm	0.00g	100
Pirimetaniil	19.8 ppm	24.08cde	55.01
Pirimetaniil	198 ppm	18.13def	66.13
Pirimetaniil	1980 ppm	15.43ef	71.16
Timorex gold®	40 ppm	52.33bcd	11.31
Timorex gold ®	403 ppm	40.66b	31.09
Timorex gold ®	4059 ppm	30.57bcd	48.18
Testigo		48.18a	

*Letras iguales indican que no existen diferencias significativas (Tukey, $P > 0.05$).

Efectividad biológica *in vivo*. El tiabendazol a 420 ppm inhibió totalmente el crecimiento del hongo. Fludioxonil a 2000 ppm y tiabendazol a 240 ppm inhibieron parcialmente al hongo. El resto de los tratamientos fueron similares al testigo (Fig. 1)

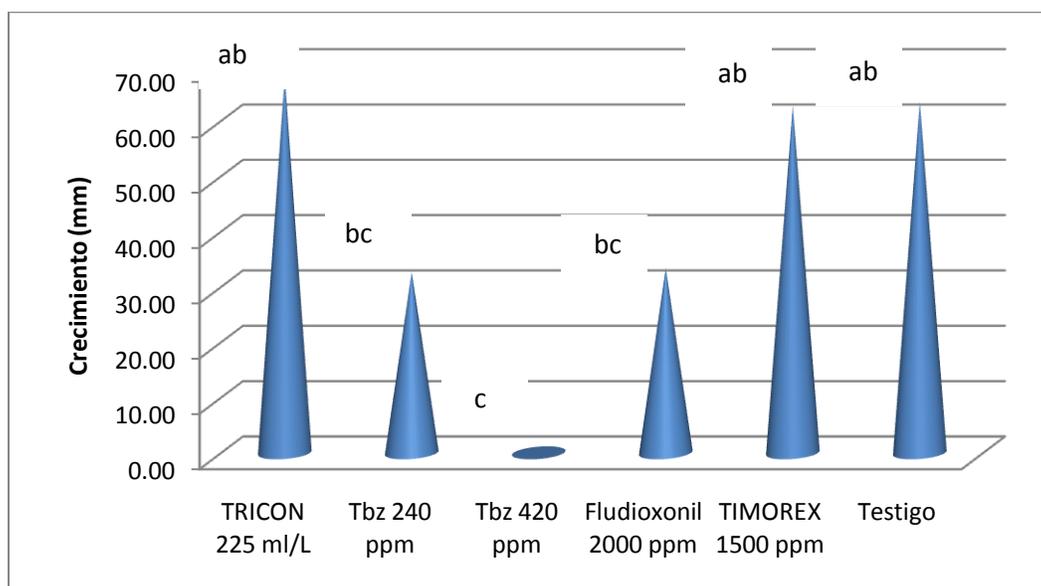


Figura 1. Crecimiento de *Penicillium digitatum* en frutos de naranja bajo el efecto de tratamientos de control postcosecha.

Tiabendazol a 420 ppm fue el único que inhibió totalmente el crecimiento del hongo (Fig. 1) y fue estadísticamente superior a los demás tratamientos (Cuadro 2). Fludioxonil a 2000 ppm y tiabendazol a 240 ppm tuvieron una eficacia similar del 47 y 48% respectivamente según las

pruebas de medias de Tukey (Figura 1 y Cuadro 2). El resto de tratamiento y dosis no fueron efectivos.

Cuadro 2. Efectividad biológica *in vivo* de varios productos para el control de *Penicillium digitatum* en frutos de naranja en postcosecha. 2010.

Producto	Dosis	Diámetro de la colonia (mm)*	Eficacia Abbot
Tricon h®	70 ml/L	67.96ab	0
Tricon h®	140 ml/L	69.93ab	0
Tricon h®	225 ml/L	65.59ab	0
Tricon®	70 ml/L	63.59ab	0
Tricon ®	140 ml/L	66.17ab	0
Tricon ®	225 ml/L	67.99ab	0
Tiabendazol	240 ppm	32.74bc	48.44
Tiabendazol	420 ppm	0c	100
Tiabendazol	840 ppm	0c	100
Fludioxonil	20 ppm	59.1ab	6.79
Fludioxonil	200 ppm	65.67ab	0
Fludioxonil	2000 ppm	33.42bc	47.36
Timorex gold®	1000 ppm	64.03ab	0
Timorex gold ®	1500 ppm	62.76ab	1.16
Testigo		63.49ab	

*Letras iguales indican que no existen diferencias significativas (Tukey, $P > 0.05$).

Determinación de la DL₅₀. Tiabendazol fue superior al resto de los tratamientos ($p = 0,001$) y ($R^2 = 0.99$) La DL₅₀ fue de 330 ppm. (Figura 2)

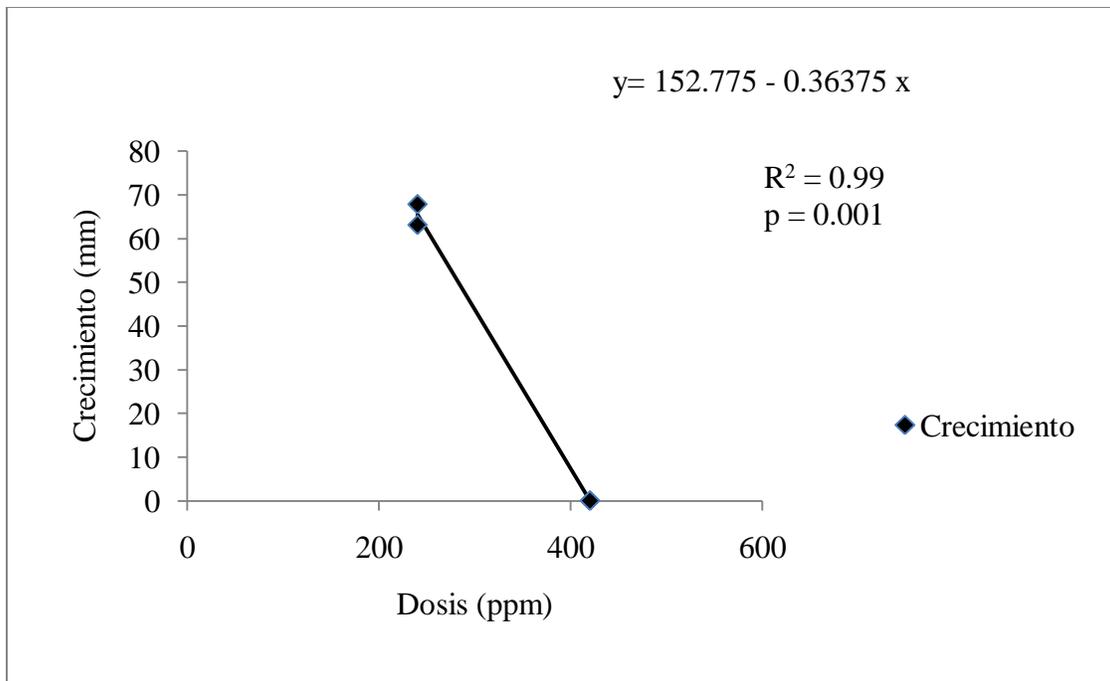


Figura 2. Modelo de regresión para tiabendazol; x= dosis de tiabendazol en ppm en la prueba de efectividad *in vivo* para el control de *Penicillium digitatum* en frutos de naranja. 2010.

Fludioxonil tuvo una efectividad significativa ($p = 0,032$) y ($R^2 = 0.93$). La DL_{50} fue de 2070 ppm (Figura 3)

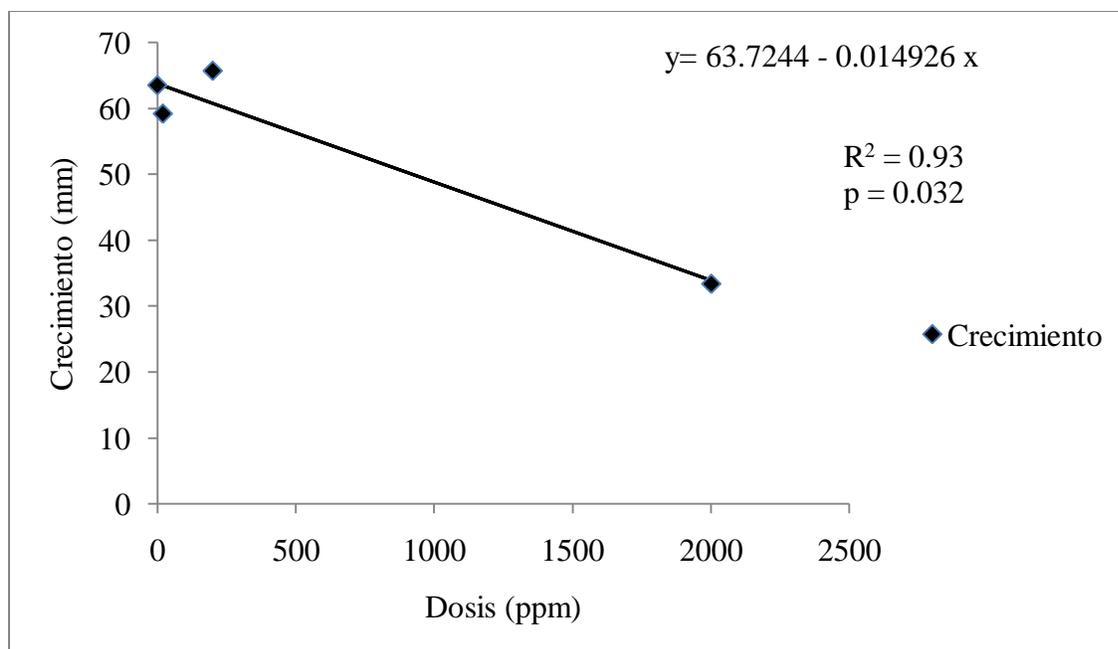


Figura 3. Modelo de regresión para fludioxonil; x= dosis de fludioxonil en ppm en la prueba de efectividad *in vivo* para el control de *Penicillium digitatum* en frutos de naranja. 2010.

4. DISCUSION

El tiabendazol a 420 ppm controló efectivamente el “moho verde” de la naranja en postcosecha provocado por *P. digitatum*; esta concentración efectiva coincide con lo reportado por Smilanick *et al.*, 2006c. Las colonias de *P. digitatum* aisladas de frutos de limón mexicano del estado de Colima resultaron sensibles al tiabendazol desde dosis de 240 ppm con un 48% de efectividad; a 420 ppm el control de 100%. La efectividad del tiabendazol se comprueba en este estudio a pesar de su uso continuo en México para el control del moho verde. La efectividad aun a bajas concentraciones coincide con lo reportado por Kanetis *et. al.*, 2008, quienes aislaron *P. italicum* de diferentes empaques de Estados Unidos y lo encontraron sensible a $0.12 \mu\text{g ml}^{-1}$ (120 ppm) de tiabendazol. Lo cual coincide con el presente trabajo donde *P. digitatum* mostró sensibilidad a 240 ppm de tiabendazol.

Fludioxonil y pyrimetamil, combinados con Captan® fueron más efectivos que el tiabendazol contra *P. italicum* en manzanas (Rosenberger *et., al.* en 2006). Sin embargo, Kanetis *et al.* 2008, encontraron cepas de *P. italicum* resistentes al tiabendazol en diferentes empaques de Estados Unidos, esta puede ser la razón posible por la cual los resultados que reportan Rosenberger *et.,*

al, en 2006 en su trabajo difieren de los que aquí se encontraron, ya que en México aun no se genera resistencia del patógeno a este fungicida.

En el presente trabajo la dosis más alta de fludioxonil (2000 ppm) obtuvo un control de 47% similar a la dosis más baja (240 ppm) de tiabendazol; (48%), (Figura 1) lo que muestra la mayor efectividad del tiabendazol.

El Pirimetanil *in vitro*, a una dosis muy alta (1980 ppm), no controló satisfactoriamente a *P. digitatum*, por lo que fue descartado para las pruebas de efectividad biológicas *in vivo*. Estos resultados no coinciden con Orozco, *et al.*, en 2009 quienes encontraron al Pirimetanil (2,000 ppm) y cera con una efectividad de 97% en el tratamiento de frutos de limón Persa. También Rosenberger *et al*, en 2006, encontraron que la aspersión precosecha con pirimetanil fue el producto más efectivo en el control de enfermedades postcosecha como “moho azul” en arboles de Manzano. Estas discrepancias probablemente se explican por las diferencias genéticas entre las cepas utilizadas o al diferente manejo cultural.

Se observó sinergismo *in vitro* entre *P. digitatum* y el extracto de neem ya que desde el primer día hubo un crecimiento del hongo mayor, aun que las colonias testigo. Este es el primer reporte del uso del extracto acuoso de neem para el control de *P. digitatum*, por lo que es necesario realizar un estudio más a fondo sobre el tema, ya que los resultados pueden ser influenciados por factores como la solubilidad del compuesto activo, el tipo de solvente que se utilice, ya sea agua o alcohol (Amadioha, 2004).

En nuestro estudio, Tricon® *in vitro*, a dosis de 10 hasta 100 ml/L tuvo una efectividad del 89% al 100% respectivamente. Ninguno de los dos tratamientos de Tricon *in vivo* (uno al provocar la herida 48 horas antes de la inoculación y sumergiendo las naranjas en el tratamiento, o el otro en el que se provocó la herida hasta el momento de la inoculación) controló al patógeno.

Trichoderma viridae fue un antagonista efectivo contra *P. digitatum* en naranja; el mayor control se obtuvo al inocular naranjas 48 horas después del tratamiento (Diaz and Vila, 1990).

En el presente trabajo algunos productos sintéticos como el Fludioxonil (20, 200 y 2000 ppm) y naturales como Tricon® a dosis > de 40 ml/L y Timorex gold® a dosis muy alta (4059 ppm) mostraron control de *Penicillium* solo *in vitro*, pero no *in vivo*. *Penicillium* es un patógeno que

penetra solo por herida (Neri *et al.*, 2010) por lo que, para lograr la infección fue necesario romper el flabedo, tejido en el que se concentró la mayor cantidad del producto aplicado al fruto, y de esta manera entrara directamente el inoculo y se diera la penetración, por lo que el patógeno pudo no entrar en contacto directo con el producto y evitar de esa manera, su efecto tóxico (Coscolla, 1993). Este fenómeno no se presenta en medio de cultivo ya que los compuestos fungicidas fueron disueltos homogéneamente en el PDA. Posiblemente la combinación de estos fenómenos biológicos ocasionaron una respuesta diferencial entre los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

5. CONCLUSIONES

Trichoderma viridae no controló *in vivo* a *P. digitatum*, posiblemente por haberse usado un producto formulado y comercial y no haber sido aislado directamente de la superficie de frutos de naranja para la producción de conidios y preparación de la solución de esporas.

El extracto acuoso de neem no controló a *P. digitatum*, por el contrario, promovió el crecimiento del hongo.

Fludioxonil y pirimetanil tuvieron una efectividad muy baja (0% al 47% a dosis de a 20 ppm y 200 ppm respectivamente *in vivo* para fludioxonil y del 71% *in vitro* para pirimetanil a 1980 ppm).

El tiabendazol a dosis mayores de 420 ppm, tuvo una efectividad del 100 % en el control de *P. digitatum* en frutos de naranja.

6. LITERATURA CITADA

1. Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18:265-267.
2. Amadioha, A.C. 2004. Control of Black rot of potato caused by *Rhizoctonia bataticola* using some plant leaf extracts. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 37: 111 – 117.
3. Bertrand, P.F., Saulie, C. J. L. 1978. The occurrence of benomyl-tolerant strains of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in the Mid-Columbia region of Oregon and Washington. *Plant Dis. Rep.* 62: 302–305.
4. Coscolla, R. 1993. Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales. Ed. Mundi Prensa. 205 pp.
5. Diaz, B. A., and Vila A. R. 1990. Biological control of *Penicillium digitatum* by *Trichoderma viride* on postharvest citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology*. 11:179-180
6. Eckert, J.W., and Eaks, I.L. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus. *The citrus industry*. 5: 179-260.
7. FAO, 2008. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. www.fao.org.
8. Hernández, L. A. N., Bautista, B. S., Velázquez, V. M. G., Hernández R. A. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25: 66- 74.
9. Kanetis, L., Förster, H., Adaskaveg, J. E. 2008. Optimizing efficacy of new postharvest fungicides and evaluation of sanitizing agents for managing citrus green mold. *Plant Dis.* 92:261-266
10. Lennox, C.L., Spotts, R.A., Booyse, M. 2004. Incidence of postharvest decay of d' Anjou pear and control with a thiabendazole drench. *Plant Dis.* 88: 474–478.
11. Li, H.X., Xiao, C.L., 2008a. Baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Penicillium expansum* populations from apple in Washington State. *Postharvest Biol. Technol.* 47: 239–245.
12. Montesinos, H. C., Palou C. L., Del Rio M. 2007. Evaluación preliminar de aditivos alimentarios para el control de las podredumbres verde y azul en postcosecha de naranjas.

Departament de Postcollita, Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA), Montcada, Valencia.

13. Mariángeles, C. and Meier, G. 2007. Control de *Penicillium digitatum* en naranjas con tratamientos térmicos. VI jornadas de biología y tecnología de postcosecha y primeras jornadas de postcosecha del cono sur. INTA. E.E.A. Concordia. No. 34
14. Neri, F. I., Donati, F., Veronesi, D., Mazzoni, M., Mari. J. 2010. Evaluation of *Penicillium expansum* isolates for aggressiveness, growth and patulin accumulation in usual and less common fruit hosts. International Journal of Food Microbiology. 143: 109–117.
15. Orozco, S. M., Carrillo, M. S. H., Vazquez, J. J. L. 2009. Chemical control of green mold (*Penicillium digitatum*) with the fungicide Pyrimethanil in Persian Lime. Phytopathology. 99: 97.
16. Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., Di Venere, D., Salerno, M. 2002. Effects of Pre and Postharvest Chitosan Treatments to Control Storage Grey Mold of Table Grapes. Food Microbiology and Safety. 67: 5
17. Rosenberger, D. A., Meyer, F. W., Rugh, A. L., Christiana, R. W. 2006. Effects of preharvest sprays on development of postharvest decays. Plant Disease Management Reports 1:PF018
18. Rosenberger, D. A., Meyer, F. W., Rugh, A. L., Christiana, R. W. 2005. Control of apple blue mold with Scholar applied alone or combined with other products. Plant Disease Management Reports 1:PF042
19. Rosenberger, D. A., Meyer, F. W., Rugh, A. L., Christian, R. W. 2006. Evaluation of Captan as a mixing partner for new postharvest fungicides used on apples. Plant Disease Management Reports 1:PF018
20. Salvador, A., Navarro P., Martínez, J. J.M. 2007. Tecnología postcosecha de cítricos. XI Simposium Internacional de citricultura. Cd. Victoria, Tamaulipas, México
21. Smilanick *et al.*, 2006a Smilanick, J.L., Brown, G.E., Eckert, J.W. 2006. Postharvest Citrus Diseases and their Control. Pp. 339–396 In: W.F. Wardowski, W.M. Miller, D.J. Hall and W. Grierson, Fresh Citrus Fruits, Florida Science Source, Inc., Longboat Key, FL, USA.
22. Smilanick *et al.*, 2006b Smilanick, J.L., Mansour, M.F., Mlikota, G. F., Goodwine, W.R. 2006. The effectiveness of pyrimethanil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control citrus green mold after harvest. Postharvest Biol. Technol. 42 : 75–85.

23. Smilanick *et al.*, 2006c Smilanick, J. L., Mansour, M. F., Sorenson, D. 2006. Pre and postharvest treatments to control green mold of citrus fruit during ethylene degreening. *Plant Dis.* 90:89-96.
24. Femenía, R. M. E. 2007. Caracterización química de cepas de hongos del género *Colletotrichum*: síntesis de gloeosporiol, diseño y síntesis de modelos de agentes fungistáticos. Departamneto de química organica. Facultad de ciencias. Universidad de Cadiz.
25. Timmer, L.W., Garnsey, S. M., Graham, J. H. 2000. Compendium of citrus diseases. American Phytopathological Society. 37-38.