

New strategies for controlling the development of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* in lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.), based on the induction of its natural defenses

M.A. Parra, J.A. Martínez

Departamento de Producción Vegetal, Paseo Alfonso XIII, 48, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203, Cartagena, España. E-mail: ma.parra@upct.es

Resumen

Se pretende abordar el desarrollo de una estrategia de control integrado de enfermedades poscosecha (IDM – “Integrated Disease Management”) de limón, uno de los principales frutos producidos en la Región de Murcia, basada en la utilización de procedimientos aplicados de inducción a las defensas naturales de los frutos aplicados antes y después de la recolección con el fin de aumentar sus resistencia a las enfermedades poscosecha y prolongar la calidad durante el almacenamiento. Esta estrategia se basa en la optimización de una combinación de tratamientos y procedimientos aplicados de tal manera que la acción conjunta de todos ellos se convierta en una especie de protocolo o acción integrada y segura de apuesta por la calidad en detrimento de la aparición de podredumbres.

Palabras clave: Fisiopatías; podredumbres; patógenos poscosecha; fitoanticipinas; fitoalexinas.

Abstract

The study of a new strategy for integrating control postharvest diseases (IDM - "Integrated Disease Management") of lemon, one of the main fruits produced in the region of Murcia, based on the management of both pre and postharvest systems and procedures in order to induce the natural defenses of harvested fruits, is developed. The overall aim is based on an increase of the fruit resistance against postharvest diseases and maintains its quality during storage. This strategy would consist of a combination of some treatments and procedures in order to create an integrated system by combining all of them under an adequate strategy based on improving the quality and extending the shelf-life at the expense of fruit decay.

Keywords: Physiological disorders; decay; postharvest pathogens; phytoanticipins; phytoalexins.

1. Introducción

Murcia es una región eminentemente agrícola donde la producción y superficie destinada a los productos hortofrutícolas es muy elevada y constituye una de sus principales fuentes de riqueza, siendo el pilar básico del crecimiento de su economía. La producción regional hortofrutícola se acerca a los 3 millones de toneladas, destacando, por grupos, las hortalizas con 1.504.000 tm, los cítricos con 631.500 tm y los frutales (incluyendo la uva de mesa) con 502.150 tm [1]. Estos datos denotan el elevado número de empresas y cooperativas agrícolas afincadas en la Región de Murcia que deben mover cada año este elevadísimo volumen de productos frescos (frutas, hortalizas y ornamentales) cuyo destino es básicamente el mercado exterior. Se estima que el 12% de la población regional trabaja en este sector y su aportación al PIB regional es de un 4,9%. La facturación global de estos productos frescos se sitúa, según campañas, en torno a los 2.600 millones de euros anuales [1].

Dado que el destino de los productos hortofrutícolas frescos producidos en la Región es fundamentalmente el mercado exterior, estos productos son sometidos necesariamente a los procesos de transporte y almacenamiento hasta que llegan a manos del consumidor. Los productos hortofrutícolas frescos están vivos, es decir, respiran y presentan un metabolismo particular porque ya no están sujetos al aporte de nutrientes y energía de la planta de donde proceden. En este proceso, los vegetales van disminuyendo gradualmente sus defensas físicas y químicas contra el ataque de patógenos poscosecha y van perdiendo calidad general, textura e hidratación [2, 3].

La aparición de podredumbres es la principal causa de pérdidas económicas de los productos frescos almacenados, incluso bajo buenas prácticas de almacenamiento. Esto es debido, como a la pérdida gradual de las defensas, al uso restringido de productos sintéticos efectivos por las nuevas normativas destinadas a eliminar o reducir el uso de los fungicidas de síntesis

(normativas EU No 540/2011 de 25 de mayo de 2011 y Reglamento (CE) Nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de octubre de 2009) y a la aparición de resistencias a estos fungicidas por el uso continuado de determinados principios activos [4]. Las pérdidas que ocurren en cítricos durante su almacenamiento y transporte oscilan comúnmente entre el 3 y el 6%. Otro dato adicional corresponde a la fruta de pepita que, durante un período habitual de almacenamiento refrigerado, se alcanza con facilidad el valor de pérdidas comprendido entre el 2 y 3% debidas exclusivamente a podredumbres [5-7]. En la actualidad, las pérdidas económicas se cifran entre el 4 y 8% en aquellos países donde se utiliza comúnmente la refrigeración como principal método de conservación e incluso hasta el 50% cuando existen restricciones al uso de la refrigeración [8].

Bajo todo este panorama descrito en las líneas anteriores, se deduce que es difícil encontrar una solución plenamente eficaz en el control de las podredumbres de los frutos actuando únicamente en un determinado punto de la producción. Por ello, para optimizar una estrategia conjunta se deben considerar los siguientes puntos:

- 1.- Cuidados durante el cultivo con el fin de conseguir un producto de calidad.
- 2.- Cosecha cuidadosa, evitando los daños mecánicos.
- 3.- Almacenamiento adecuado.

Adicionalmente, es recomendable la utilización de fitosanitarios o plaguicidas admitidos en los frutos cítricos pero, ante la sucesiva eliminación de materias activas por la aplicación de normativas, es necesario experimentar con métodos físicos y/o químicos de baja o nula toxicidad para la reducción o eliminación de los fitosanitarios sintéticos. En este punto, ya hay estudios acerca del efecto de la aplicación de varias estrategias alternativas o complementarias al uso de plaguicidas. Éstas se resumen en las siguientes [9-14]:

- 1.- Sustancias naturales con actividad antimicrobiana.
- 2.- Tratamientos físicos para reducir las podredumbres.
- 3.- Uso de microorganismos antagonistas a los patógenos.

4.- Potenciación de la respuesta defensiva de la planta u órgano cosechado ante patógenos mediante el uso de elicitores.

La investigación actual sobre el tema está poniendo de manifiesto que pueden desarrollarse estrategias alternativas al uso de plaguicidas que se basen fundamentalmente en la aplicación de sustancias de nula o muy baja toxicidad, tratamientos físicos de defensa o la aplicación de microorganismos inocuos o antagonistas que presenten toxicidad únicamente contra los microorganismos patógenos [15].

Tanto las plantas intactas como sus órganos cosechados tienen mecanismos de defensa contra los patógenos. Una buena parte de estos mecanismos son compuestos defensivos propios de las plantas, denominados defensas preformadas, mientras que otros son inducidos a su síntesis en una respuesta defensiva, aun estando presentes ya en la planta (fitoanticipinas). Otro tipo de sustancias defensivas no se encuentran en la planta sana, pero se inducen cuando se infectan con un patógeno reconocido (fitoalexinas), entre otros mecanismos [2, 3, 16].

Los objetivos del trabajo se remarcaban a continuación:

- 1.- Realizar una revisión y aplicación exhaustiva de los sistemas modernos de control de este tipo de podredumbres que, de acuerdo con la bibliografía, eliminen o reduzcan el uso de los habituales fungicidas de síntesis y aplicar experimentalmente métodos de potenciación de las defensas naturales, como medida alternativa al uso de los fungicidas para el control de estas podredumbres. Los métodos y procedimientos seleccionados se especifican en las siguientes secciones.
- 2.- Estudio y aplicación de inductores y procedimientos de inducción de defensas en frutos de limón.
- 3.- Estudio de los mecanismos de mantenimiento de los compuestos de defensa inducidos y no inducidos durante la comercialización de los mismos.

El objetivo final, fruto de la integración de los objetivos, va encaminado a desarrollar una estrategia de control integrado de enfermedades poscosecha (IDM – “Integrated Disease Management”) de frutos de limón.

2. Materiales y Métodos

Para el aislamiento de los patógenos *Penicillium digitatum* y *P. italicum*, se tomará material sano de varias localizaciones y se someterá a condiciones controladas para obtener las podredumbres (Fig. 1). Se purificarán los aislados obtenidos y se identificarán a nivel de especie por la aplicación de la PCR y posterior secuenciación. Se estudiarán los caracteres fenotípicos de los aislados. El plan de actuación en la inducción a la síntesis de compuestos naturales de defensa se realizará, según el mecanismo de acción perseguido, durante el período de crecimiento de los frutos, una vez cosechados y durante su almacenamiento. Los tratamientos en campo se realizarán por pulverización a frutos debidamente marcados.

Se medirá el estado de madurez de los frutos cosechados por medio del índice de madurez que relaciona el contenido en sólidos solubles (°Brix) y la acidez por valoración con NaOH. Adicionalmente se medirá el color por medio de un colorímetro triestímulo Minolta representado por los valores L*, a*, b*, C* y h°. A partir de estos valores, se calculará el índice de color (IC), que mide la madurez de los frutos de limón de acuerdo con el color del flavedo y se expresa como $IC = 1.000 \times (a/(L \times b))$. Estos valores permitirán correlacionar la madurez de los frutos con eficacia del sistema de inducción.

Las variables resultado que medirán la bondad de los tratamientos reductores de las podredumbres serán la incidencia, medida como el porcentaje total de frutos afectados de podredumbre y el porcentaje por grado de desarrollo. Para este caso se diferenciará entre frutos blandos sin micelio, con micelio blanco y con micelio esporulado (se distingue por el color de la masa de conidios, Fig. 2). Para medir la severidad de las podredumbres se calculará el Índice de Desarrollo de la Podredumbre (IDP), propuesto por Martínez y González, [4] y que se obtiene aplicando la siguiente ecuación:

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

donde: P₁ es el número de frutos sin podredumbre; P₂ es número de frutos podridos sin micelio; P₃ es el número de frutos con micelio blanco y P₄ 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 inducción de defensas se valorará de acuerdo con la metodología descrita en Lu *et al.* [17].

3. Resultados y Discusión

Se espera tener resultados en varias vertientes que consideramos básicas para ser estudiadas con el objetivo final de obtener un IDM eficaz y ahondar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la resistencia:

- 1.- Mecanismos de potenciación de las defensas naturales de los frutos de limón.
- 2.- Caracterización de la microbiota natural de los limones de la Región que presenten actividad antagónica contra los patógenos poscosecha de los frutos de limón y mecanismo de acción (especialmente aquellos microorganismos capaces de aumentar las defensas).
- 3.- Identificar las principales acciones capaces de potenciar significativamente las defensas con el fin de establecer un plan IDM lo más simple y práctico posible.

4. Conclusiones

El desarrollo de esta Tesis Doctoral permitirá poner de manifiesto los mecanismos de síntesis de compuestos naturales de defensa de los cítricos y su efecto sobre la reducción de las podredumbres. Pretende sentar las bases del conocimiento de las podredumbres más habituales en uno de los productos hortofrutícolas frescos más producidos en la Región de Murcia y establecerá un sistema de control integrado de enfermedades poscosecha IDM.

5. Agradecimientos

A la empresa S.A.T. Nº 9821 Grupo CFM, Murcia, por la financiación y colaboración en este estudio. La autora M.A. Parra agradece a la UPCT la adjudicación de una Beca de Iniciación a la Actividad Investigadora (año 2015).

6. Referencias bibliográficas

- [1] INFO. 2013. Los productos hortofrutícolas en la Región de Murcia. Ed: Instituto de Fomento de la Región de Murcia. Murcia, España. Pág. 11.
- [2] Barkai-Golan R. 2001. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. Development and Control. Ed: Elsevier. Amsterdam, Holanda, Pág. 418.

[3] Narayanasamy P. 2006. Postharvest Pathogens and Disease Management. Ed: Wiley Interscience. Hoboken, New Jersey. Pág. 578.

[4] Martínez J.A., González R. 2012. Control de las podredumbres verde y azul de los cítricos con extractos de aceites esenciales de clavo y canela. Levante Agrícola 441: 202-209.

[5] Palazón I.J. 1973. Las podredumbres en frutos conservados por frío. ITEA 13: 3-20.

[6] Tuset J.J. 1987, Podredumbres de los Frutos Cítricos. Ed: Conselleria D'Agricultura i Pesca, Generalitat Valenciana. Valencia, España. Pág. 206.

[7] FAO. 1993. Prevención de Pérdidas de Alimentos Poscosecha: frutas, hortalizas, raíces y tubérculos: manual de capacitación. Ed: FAO. Roma, Italia. Pág. 124.

[8] Mari M., Neri F., Bertolini P. 2010. New approaches for postharvest disease control in Europe. En: Post-harvest Pathology. Ed: Springer. Dordrecht, Holanda. Pág.: 119-135.

[9] Hernández-Lauzardo A.N., Bautista-Baños S., Velázquez-del Valle, M.G., Hernández-Rodríguez, A. 2007. Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. Revista Mexicana de Fitopatología 25(1): 66-74.

[10] Martínez J.A. 2007. Nuevas estrategias de control de las podredumbres ocasionadas por, *Penicillium* sp. en los frutos cítricos: aceites esenciales. Levante Agrícola 388: 393-402.

[11] Palou L., Smilanick J.L., Droby S. 2008. Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. Stewart Postharvest Review 4(2). doi: 10.2212/spr.2008.2.2.

[12] Tamm L., Thürig B., Fliessbach A., Goltlieb A.E., Karavani S., Cohen Y. 2011. Elicitors and soil management to induce resistance against fungal plant diseases. NJAS-Wagen. J. Life Sc. 58: 131-137.

[13] Martínez J.A. 2012. Natural fungicides obtained from plants. En: Fungicides for Plant and Animal Diseases. Ed: InTech. Rijeka, Croacia. Pág. 298.

[14] Moscoso-Ramírez P.A., Palou L. 2013. Evaluation of postharvest treatments with chemical resistance inducers to control green and blue molds on orange fruit. Postharvest Biol. Technol. 85: 132-135.

[15] Terry L.A., Joyce D.C. 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. Postharvest Biol. Technol. 32: 1-13.

[16] Adikaram N., Karumanayake C., Abayasekara C. 2010. The role of pre-formed antifungal substances in the resistance of fruits to postharvest pathogens. En: Post-harvest Pathology. Ed: Springer. Dordrecht, Holanda. Pág.: 1-11.

[17] Lu L., Lu H., Wu C., Fang W., Yu C., Ye C., Shi Y., Yu T., Zheng X. 2013. *Rhodosporidium paludigenum* induces resistance and defense-related responses against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. Postharvest Biol. Technol. 85: 196-202.

Tablas y Figuras



Figura 1. Desarrollo de podredumbre natural en frutos almacenados en cámara húmeda a temperatura ambiente



Figura 2. Limón afectado de *Penicillium digitatum* (masa esporógena verde) y *P. italicum* (masa esporógena azul)