

## Phenotypic variability and pathogenicity of different isolates of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* obtained from lemon fruits (*Citrus limon* (L.) Burm.)

## Variabilidad fenotípica y patogenicidad de diversos aislados de *Penicillium digitatum* y *P. italicum* obtenidos en frutos de limón (*Citrus limon* (L.) Burm.)

M.A. Parra\*, J.A. Martínez

Grupo de Protección de Cultivos. Dpto. Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Spain.

### **Abstract**

Citrus rots caused by species of *Penicillium* range from 60 to 80% of the total citrus fruit rots. The objective of this work consisted of collecting several isolates of the two *Penicillium* species from lemons grown in southeast Spain. These experiments consisted of determining mycelial growth curves, conidiation and mass of aerial mycelium of each isolate grown on PDA at 26 °C. *In vivo* experiments were carried out inoculating a drop of an extract of conidia of about 10<sup>7</sup> conidia/mL with a hypodermal syringe through a puncture reaching the albedo. Lemon fruits inoculated were stored at 15 °C and 75-85% relative humidity, and then incidence and severity of decay were evaluated. Colony and conidiation areas were measured on fruits affected by decay in order to establish the pathogenic characteristics of isolates. Significant differences in growth rates and conidiation were detected among isolates grown in PDA and some differences were identified causing decay in the same way. The most virulent isolate of *P. digitatum* was obtained from Alicante, and from Santomera in the case of *P. italicum*.

**Keywords:** Green mould rot; blue mould rot; decay; mycelial fungal growth; conidiation pathogen virulence.

### **Resumen**

Las podredumbres de los cítricos causadas por las dos especies de *Penicillium* suponen entre el 60 y 80% del total de las podredumbres en estos frutos. En el presente trabajo se recopilaban varios aislados de las dos especies de *Penicillium* obtenidos a partir de limones cultivados en el sureste de España. Las características fenotípicas medidas fueron las curvas de cinética de crecimiento del micelio, la conidiogénesis y la masa del micelio aéreo creciendo en PDA a 26 °C. Las pruebas de patogenicidad se realizaron tras la inoculación de una suspensión de conidios, del orden de 10<sup>7</sup> conidios/mL, con una pipeta estéril sobre una herida realizada con un punzón entre el albedo y el flavedo. Los frutos inoculados se almacenaron a 15 °C y 75-85% de humedad relativa y se evaluaron la incidencia y severidad de las podredumbres por medio del tamaño de la podredumbre y el color de ésta que reflejaba la conidiogénesis. Se puso de manifiesto cierta variabilidad fenotípica entre los aislados en relación a la tasa de crecimiento. El aislado más virulento fue el de Alicante para *P. digitatum* y el de Santomera para *P. italicum*.

**Palabras clave:** Podredumbre verde, podredumbre azul, crecimiento del micelio, conidiogénesis, virulencia del patógeno.

---

\* E-mail: ma.parra@uptc.es

## 1. INTRODUCCIÓN

Entre los factores que merman la calidad de los productos hortofrutícolas durante su comercialización, destacan las alteraciones patológicas o podredumbres. La aparición de estas patologías son los principales factores de pérdidas económicas, incluso bajo buenas prácticas de almacenamiento, debido a que los patógenos pueden infectar y colonizar fácilmente los productos vivos senescentes por su carácter perecedero [1]. En cítricos, las pérdidas que ocurren durante su almacenamiento y transporte oscilan comúnmente entre el 3 y el 6% [2].

Las especies de *Penicillium* no se caracterizan por su variabilidad entre los individuos de la misma especie, a diferencia de otros hongos como son *Botrytis* o *Fusarium*. Sin embargo, varios estudios demuestran la existencia de esta variabilidad entre individuos de las especies de *Penicillium* [1]. Estas diferencias pueden identificarse estudiando las pautas de crecimiento y, morfología de los aislados, así como su patogenicidad. En este sentido, el objetivo del presente trabajo consistió en comprobar la existencia de variabilidad fenotípica entre distintos aislados de *Penicillium digitatum* y de *P. italicum* obtenidos de podredumbres de frutos de limón cosechados en el sureste de España.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Origen de los aislados y obtención de podredumbres

Se cosecharon frutos de limón de tres procedencias distintas: Beniján (Murcia), Santomera (Murcia) y del sur de la provincia de Alicante. La duración del almacenamiento se alargó lo suficiente hasta obtener de forma natural podredumbres verde y azul ocasionadas por *P. digitatum* y *P. italicum*, respectivamente. Una vez aparecieron y se identificaron estas podredumbres de las tres procedencias, se procedió a aislar a los patógenos en medio de cultivo sintético de agar de patata y dextrosa (PDA). Para ello, se cortó, con la ayuda de un bisturí flameado, una pequeña porción del frente de avance del hongo y se sembró en una placa de Petri que contenía PDA. Esta operación se realizó con los seis aislados, tres de *P. digitatum* y otros tantos de *P. italicum*, incubándolos a 26 °C. Estos cultivos se almacenaron en refrigeración y fueron utilizados posteriormente para estudiar sus características fenotípicas y patogénicas.

### 2.2 Determinación de características fenotípicas de los aislados

El área de crecimiento de la colonia (cm<sup>2</sup>) se midió diariamente, previa calibración con el diámetro de la placa Petri, con fotografía digital de ésta y posterior análisis en el software Image Tool for Windows 3.0. La tasa de crecimiento (cm<sup>2</sup>/día) se midió según el procedimiento descrito en [1] y se calculó entre los días 2 y 8, cuando, de acuerdo con los gráficos obtenidos, no había duda de que el hongo se encontraba en la fase lineal de crecimiento. La duración de la fase lineal (días) se midió como los días transcurridos entre el final de la fase exponencial y el inicio de la fase estacionaria o de deceleración. La masa de micelio (g) se calculó pesando el micelio aéreo que, por otro lado, constituye la mayor parte del micelio de este hongo creciendo en medio de cultivo. La conidiogénesis (conidios/cm<sup>2</sup>) se calculó utilizando la ecuación descrita en [3].

### 2.3 Virulencia de los aislados sobre limones

Previo a la inoculación se midió el estado de madurez de los frutos de limón, aplicando el índice de madurez (sólidos solubles \* acidez<sup>-1</sup>) y el índice de color IC, usado habitualmente para identificar la madurez o color del flavedo del limón en procesos de desverdización. La patogenicidad de los aislados se cuantificó aplicando el Índice de Desarrollo de la Podredumbre (IDP) propuesto en [1].

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las fases de latencia fueron insignificantes, tanto para *P. digitatum* como para *P. Italicum* (Fig. 1). Los hongos tardaron menos de 24 horas en iniciar su crecimiento. La fase lineal comenzó en todos los aislados a partir del día 2. Sin embargo, entre los días 1 y 2, la tasa de crecimiento fue menor que en la fase lineal, distinguiéndose una fase intermedia entre el fin de la fase de latencia y el inicio de la fase lineal que no ha sido descrita en la literatura. Esto se traduce en que una vez que el hongo despierta de su fase de latencia, su tasa de crecimiento es relativamente lenta hasta alcanzar su fase lineal. Este resultado contradice el hecho de que tras la fase de latencia ocurre la fase exponencial, que dura unas pocas horas, y posteriormente la tasa de crecimiento se ralentiza y se hace constante durante la fase lineal. Esta curva representaría pues una dificultad en el crecimiento del hongo antes de su desarrollo pleno durante la fase lineal.

El resultado anterior podría ser explicado por la dispersión del hongo dentro de la placa de Petri a partir de la germinación de conidios producidos por la propia colonia principal. Este hecho es muy común en *Penicillium*, ya que se trata de un hongo seco y pulverulento, debido a la elevada tasa de conidiogénesis que presenta. Este hecho desemboca en la formación de colonias satélite que podrían interferir en el desarrollo de la colonia principal ralentizando su crecimiento antes de la entrada en fase lineal.

La tasa de crecimiento del aislado de *P. digitatum* de Alicante triplicó la del de Santomera, por lo que creció mucho más rápido que los otros dos aislados (Tabla 1). Sin embargo, los tres aislados de *P. italicum* crecieron más o menos a la misma velocidad, similar a la del aislado de *P. digitatum* de Alicante. Por otro lado, los parámetros CIELAB de color pusieron de manifiesto un color homogéneo de la esporada entre los aislados de la misma especie y diferentes entre las especies, siendo el color de la esporada de *P. italicum* azulada y verde la de *P. digitatum*.

El mayor valor de producción de conidios se obtuvo en el aislado de *Penicillium italicum* de Santomera, mientras que el menor valor se obtuvo para *Penicillium digitatum* de Alicante. Estos resultados, si se comparan con el área final alcanzada por la colonia a los 10 días, no guardan correlación con el recuento de los conidios, por lo que el área de la colonia no determinó la concentración de conidios. En cuanto al micelio aéreo, los valores oscilan para todos los aislados en torno a 3 g.

El valor del índice de color fue aproximadamente -1 este valor indica un tono verde-amarillento del flavedo dirigido hacia tonos mucho más amarillentos que verdosos. Esta indicación coincide con los valores de los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  que indican, respectivamente, un componente verdoso y amarillento de la corteza. La madurez reflejada en el color se correlacionó también con los parámetros químicos de madurez medidos como contenido en sólidos solubles de la pulpa y su acidez.

Los resultados de IDP (no presentados) indicaron variabilidad en la patogenicidad de los aislados y se correlacionó con la tasa de crecimiento del hongo. A mayor tasa, mayor virulencia.

### 4. CONCLUSIONES

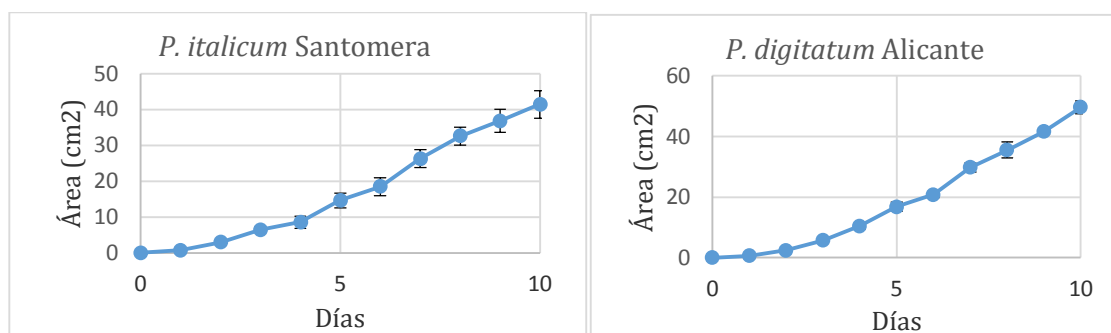
Se ha detectado la presencia de diferencias fenotípicas tanto para *Penicillium digitatum* como para *P. italicum*. Estas diferencias están directamente relacionadas con las características de su crecimiento, por lo que repercuten directamente en la virulencia, muy influenciada por el vigor del patógeno típico en poscosecha, donde se requiere un deterioro de las defensas de los frutos para que se produzca la patogénesis.

## 5. AGRADECIMIENTOS

A la UPCT por la concesión de una Beca de Iniciación a la Actividad Investigadora. A las empresas S.A.T. Grupo CFM y Limonar de Santomera Sdad. Coop. por el suministro del material vegetal.

## 6. REFERENCIAS

- [1] Martínez, J.A., González, R. (2012). Control de las podredumbres verde y azul de los cítricos con extractos de aceites esenciales de clavo y canela. *Levante Agrícola. Especial Postcosecha* 441, 202-209.
- [2] Tuset, J. J. (1987). Podredumbres de los Frutos Cítricos (Conselleria D'Agricultura i Pesca, Generalitat Valenciana, Valencia, España).
- [3] Martínez, J.A., González, R. (2013). Essential oils from clove affect growth of *Penicillium* species obtained from lemons. *Comm. Appl. Biol. Sci. Ghent University* 78(3), 563-572.



**Figura 1.** Curvas de cinética de crecimiento de distintos aislados de *Penicillium digitatum* y *P. italicum* obtenidos de podredumbre verde y azul de limón, creciendo en PDA a 26 °C

**Tabla 1.** Características fenotípicas de diversos aislados de *Penicillium digitatum* y de *P. italicum* obtenidos de podredumbres de limón y creciendo sobre PDA a 26 °C

| Aislado                       | Tasa de crecimiento    | Duración de la fase lineal |
|-------------------------------|------------------------|----------------------------|
|                               | (cm <sup>2</sup> /día) | (días)                     |
| <i>P. digitatum</i> Alicante  | 6,12                   | 8                          |
| <i>P. digitatum</i> Santomera | 2,60                   | 8                          |
| <i>P. digitatum</i> Beniaján  | 1,45                   | 8                          |
| <i>P. italicum</i> Alicante   | 5,13                   | 8                          |
| <i>P. italicum</i> Santomera  | 5,09                   | 8                          |
| <i>P. italicum</i> Beniaján   | 4,57                   | 8                          |