

Controlling green mould rot of lemons by means of ultraviolet-C irradiation

Control de la podredumbre verde de limones por medio de la radiación ultravioleta-C

M.A. Parra^{1*}, J.A. Martínez¹

¹Grupo de Protección de Cultivos. Dpto. Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Spain.

*ma.parra@upct.es

Abstract

Green mould rot caused by *Penicillium digitatum* is the most important postharvest disease of lemon fruits in Spain causing more than 60% of total losses due to decay along the commercialization period. However, synthetic fungicides have been withdrawn from the market mainly due to selection of resistant fungal isolates and toxicity to humans and environment. The objective of this work consisted of evaluating the effect of ultraviolet-C illumination (UV-C) on the *in vitro* and *in vivo* growth of *P. digitatum* by means of evaluating the mycelial growth curves at 15°C and 85% RH for 10 days, then incidence and severity of decay were daily monitored. Mycelial growth rate decreased *in vitro* but not grown on irradiated fruits. In this case, UV-C reduced growth from the fifth day after irradiating whereas this reduction was immediately observed after inoculating fruits irradiated two days before. Results suggested that UV-C was mainly useful to reduce fungal growth mediated by some mechanism of inducible defence.

Keywords: *Penicillium digitatum*; mycelial growth rate; inducible defences.

Resumen

La podredumbre verde ocasionada por *Penicillium digitatum* es la enfermedad poscosecha más importante de limones en España, siendo responsable de más del 60% de las podredumbres que afectan a este fruto. Sin embargo, el control de la enfermedad es difícil debido a la restricción al uso de fungicidas de síntesis y a la aparición de aislados resistentes a estos fungicidas. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la radiación ultravioleta-C (UV-C) sobre el crecimiento de *P. digitatum* *in vitro* e *in vivo*, estudiando las curvas del crecimiento del micelio a 15°C y 85% HR durante 10 días. Se evaluó diariamente la incidencia y severidad de la podredumbre. El crecimiento del hongo *in vitro* fue más lento cuando éste fue irradiado. Sin embargo, este efecto no se observó cuando el hongo fue irradiado en los frutos inoculados, excepto a partir del quinto día de radiación. El descenso de la tasa de crecimiento fue inmediato cuando los frutos fueron inoculados dos días después de la radiación. Estos resultados sugirieron que la UV-C actuó principalmente induciendo las defensas del fruto.

Palabras clave: *Penicillium digitatum*; crecimiento del micelio; inducción de defensas.

1. INTRODUCCIÓN

El limón es uno de los principales productos de la Región de Murcia, no estando exento de problemas durante su comercialización. La incidencia de enfermedades durante el almacenamiento es la mayor problemática de este producto, derivando en importantes pérdidas económicas comprendidas entre el 3 y el 6% [1]. Estas pérdidas son ocasionadas generalmente por los hongos *Penicillium digitatum* y *P. italicum*, causantes de las podredumbres verde y azul de limones, respectivamente. Sin embargo, el control de estas podredumbres es difícil debido a la aparición de resistencias y las restricciones al uso de fungicidas de síntesis impuestas fundamentalmente por la UE. Por ello, se está investigando activamente en métodos alternativos de control. Una de estas alternativas consiste en la aplicación de radiación UV-C, método físico de control que ya están utilizando algunas empresas hortofrutícolas para reducir la podredumbre de los frutos durante su comercialización. La radiación UV-C puede actuar ejerciendo un efecto germicida [2] y/o induciendo las defensas naturales de los frutos [3].

El objetivo del trabajo consistió en establecer el tipo de efecto de la radiación ultravioleta de alta energía (UV-C) contra *Penicillium digitatum* en limón, con el fin de valorar y optimizar la aplicación de este tratamiento en la mejora de la conservación de este producto.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y origen del aislado de *Penicillium digitatum*

Los limones se cosecharon el 28 de enero en un huerto próximo a la cooperativa Campounión de Beniaján (Murcia). No se sometieron a ningún tratamiento previo tras la cosecha. Se trasladaron por transporte convencional al laboratorio de la UPCT donde se pre-almacenaron y desinfectaron, dando por comenzado el experimento el día 1 de febrero.

El aislado de *P. digitatum* procede de la colección de cultivos MAPYS (Microorganismos de la Agricultura, Poscosecha y Sostenibilidad). Las características de este aislado se describen en Parra y Martínez (2016) [4].

2.2 Aplicación de los tratamientos

Las experiencias *in vitro* se realizaron sembrando fragmentos del micelio del hongo obtenido a partir de un cultivo de 6 días, sobre medio sintético de agar de patata y dextrosa (PDA Scharlab®, Barcelona).

Para las experiencias *in vivo*, los frutos libres de defectos externos se lavaron con agua de abastecimiento y se desinfectaron con lejía comercial diluida al 4%. Se secaron y se establecieron los lotes. Se preparó una suspensión de conidios del aislado de *P. digitatum* y se ajustó la concentración a 10^6 conidios * mL⁻¹. Los frutos se inocularon con 10 µL de esta suspensión en una herida realizada con un punzón que alcanzó al albedo. Un grupo de frutos fueron irradiados con el hongo inoculado y el otro grupo se inoculó 2 días después de recibir la radiación. Los frutos se almacenaron en una cámara a 15°C y 85% HR.

El tratamiento aplicado consistió en irradiar las muestras con un equipo comercial de radiación UV-C instalado en la línea de producción de la empresa S.A.T. 9821 Grupo CFM de Fuente Álamo (Murcia). El equipo fue programado para irradiar 11 W * m⁻². Se establecieron 4 niveles de radiación: 0 (control), 10, 30 y 60 s de exposición, equivalente a una radiación total de 1, 3 y 6 kJ * m⁻².

2.3 Variables estudiadas

Previo a la inoculación del patógeno se midió el estado de madurez de los frutos de limón, aplicando los índices habituales [4]. Para la prueba *in vitro* se determinó diariamente el área de crecimiento de la colonia (cm²) de acuerdo con Parra y Martínez [4] y para la severidad de la

podredumbre desarrollada a partir de la inoculación de los frutos se consideró el radio de la podredumbre medido desde el punto de inoculación hasta el mismo borde, independientemente de la presencia o no de micelio.

2.4 Tamaño de la muestra y análisis estadístico

En la experiencia *in vitro* se tomaron cuatro placas por tratamiento y los promedios de las áreas de las colonias se representaron en un gráfico XY o de dispersión junto con la desviación estándar como medida del error.

En el experimento *in vivo* se establecieron tres repeticiones por tratamiento (dosis de radiación), cada uno de ellas contenía 16 frutos. Se representó en un gráfico de dispersión el valor medio de la evolución del radio de la podredumbre desarrollada a intervalos diarios junto con la desviación estándar.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el experimento *in vitro* se apreció un ligero retardo del crecimiento del hongo irradiado que fue proporcional a la dosis de radiación recibida (Fig. 1a). La radiación no afectó a la latencia del hongo, puesto que en todos los casos el micelio empezó a emerger a partir del primer día tras la aplicación de la dosis radiactiva, incluido el control sin irradiar (Fig. 1a). Este efecto sobre el crecimiento puso de manifiesto el daño directo de la radiación sobre el crecimiento de las hifas del hongo que persistió durante 4 días a todas las dosis, desvaneciéndose proporcionalmente a la dosis aplicada. Sin embargo, no se pudo llegar a la misma conclusión cuando el hongo creció sobre los frutos inoculados. En este caso, la radiación no tuvo efecto sobre la germinación de los conidios ni en el crecimiento del micelio posterior (Fig. 1b). Sin embargo, pudo comprobarse un efecto de la radiación sobre el crecimiento del hongo a partir del 5^o día de la aplicación, especialmente con la dosis de 30 s ($3 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$). Este resultado sugiere, de forma indirecta, que se indujeron mecanismos de defensa contra el patógeno. Este hecho se pudo potenciar con la ejecución del experimento de irradiación de los frutos y posterior inoculación (Fig. 1c). En este caso, se obtuvo un efecto claro en la reducción del crecimiento del hongo desde el inicio del experimento, especialmente con la dosis de 30 s, mostrando que el efecto de la radiación sobre el crecimiento del micelio del hongo fue debido a un efecto indirecto que achacamos a la inducción de las defensas del fruto. En efecto, se ha documentado que la radiación ultravioleta aplicada a ciertas dosis induce las defensas de los frutos cítricos por medio de la activación de las actividades enzimáticas PAL y POD [5] y la inducción de fitoalexinas escoparona y escopoletina. [6].

4. CONCLUSIONES

La radiación UV-C se mostró poco efectiva para causar daños en la germinación de conidios de *Penicillium digitatum* (datos no presentados) y para reducir el crecimiento del micelio del hongo. La desaceleración de la tasa de crecimiento de las hifas fue directamente proporcional a la dosis de radiación aplicada. Sin embargo, este efecto no se observó cuando el patógeno creció sobre los frutos causando podredumbre. Por el contrario, la reducción del crecimiento del hongo observada cuando creció sobre los frutos se debió básicamente a algún mecanismo de inducción de defensas.

5. AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento a la S.A.T. 9821 Grupo CFM de Fuente Álamo por el suministro del material vegetal y la financiación de este trabajo.

6. REFERENCIAS

- [1] Tuset J.J. 1987. Podredumbres de los Frutos Cítricos. Generalitat Valenciana. Conselleria D'Agricultura i Pesca, Valencia. 206 pp.
- [2] Haro-Mazo J.F., Guerrero-Beltrán J.A. 2013. Efectos de la radiación UV-C en frutas y verduras. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos. 68-77.
- [3] Guerrero R.F., Puertas B., Jiménez M.J., Cacho J., Cantos-Villar E. 2010 Monitoring the process to obtain red wine quality loss. Food and Chem. 122: 195-202.
- [4] Parra, M.A., Martínez, J.A. 2017. Phenotypic variability and pathogenicity of different isolates of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* obtained from lemon fruits (*Citrus limon* (L.) Burm.) En: Proceedings of the 5th Workshop on Agri-Food research WiA-16. Editores: F. Artés-Hernández, J.A. Fernández-Hernández, J. Calatrava, E. Aguayo, J.J. Alarcón, J.E. Cos. Editorial: CRAI Biblioteca, Universidad Politécnica de Cartagena, Murcia, España. 130-133.
- [5] Barkai-Golan, R. 2001. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. Elsevier. 418 pp.
- [6] Charles, M.T., Arul, J. 2007. UV treatment of fresh fruits and vegetables for improved quality: A status report. Stewart Postharvest Review. 3-6.

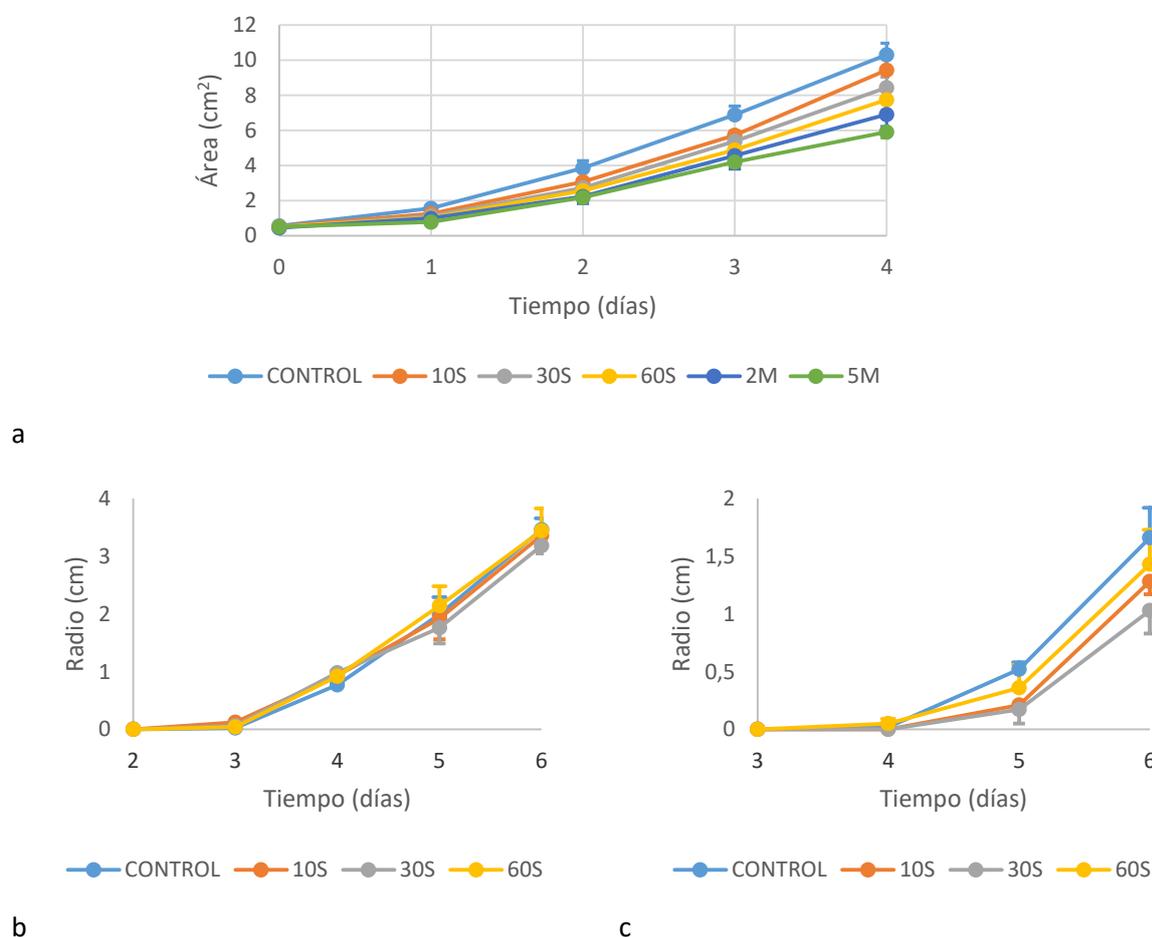


Figura 1. Curvas de cinética de crecimiento de *Penicillium digitatum* tras irradiación con fuente de UV-C. [a] Limones inoculados e irradiados. [b] Limones inoculados dos días después de su radiación. [c] Crecimiento *in vitro* sobre PDA a 15°C.