



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

APLICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN MANZANA (*MALUS DOMESTICA*) COMO AGENTES DE BIOCONTROL POSTCOSECHA

APPLICATION OF ESSENTIAL OILS IN APPLE (*Malus x domestica*
Borkh.) AS POSTHARVEST BIOCONTROL AGENTS

Autor

Pedro Gabriel Martínez Aznar

Directores

Pedro Marco Montori

Celia M. Cantín Mardones

Facultad de Veterinaria

Curso 2022-2023

1	ÍNDICE	
1	ÍNDICE	1
2	RESUMEN	2
3	INTRODUCCIÓN	4
3.1	Importancia de la manzana a nivel nacional	4
3.2	Pérdidas pre y postcosecha que afectan a la manzana	5
3.3	Métodos de conservación postcosecha de la manzana	8
4	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	11
5	DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA EMPLEADA	12
5.1	Diseño experimental	12
5.2	Determinación de la capacidad fungicida de AEs <i>In vitro</i>	12
5.2.1	Obtención y mantenimiento de aceites esenciales de plantas medicinales aromáticas	12
5.2.2	Obtención y mantenimiento de cepas fúngicas	12
5.2.3	Método de difusión de aceites esenciales en disco	13
5.2.4	Método de dilución de aceites esenciales en medio de cultivo PDA	14
5.2.5	Método de dilución en PDB	15
5.2.6	Método de actividad volátil	16
5.2.7	Método de germinación de esporas en cultivo DRBC	16
5.3	Determinación de la capacidad fungicida de AEs <i>In vivo</i>	17
5.3.1	Selección y preparación de frutas	18
5.3.2	Preparación del inóculo de hongos patógenos	18
5.3.3	Preparado de soluciones de aceites esenciales y controles	19
5.3.4	Tratamientos e inoculación de hongos patógenos	19
5.4	Análisis estadístico	20
6	RESULTADOS	22
6.1	Capacidad fungicida de AEs <i>In vitro</i>	22
6.1.1	Difusión de aceites esenciales en disco	22
6.1.2	Dilución de aceites esenciales en medio de cultivo PDA	22
6.1.3	Dilución en caldo PDB	22
6.1.4	Actividad volátil	24
6.1.5	Germinación de esporas en cultivo DRBC	24
6.2	Capacidad fungicida de los AEs <i>In vivo</i>	25
7	DISCUSIÓN	34
7.1	<i>In vitro</i>	34
7.2	<i>In vivo</i>	37
8	CONCLUSIONES	40
9	BIBLIOGRAFÍA	43
10	ANEXOS	I

2 RESUMEN

La manzana (*Malus x domestica*) es un fruto de pepita de gran importancia en cuanto a superficie productiva en España, el cual también tiene relevancia en la cesta de la compra de la población española. Aunque su valor nutricional es claro, su consumo ha disminuido notablemente durante los últimos 30 años entre la población española a pesar de la gran producción nacional. Factores que pueden afectar al precio y la calidad del fruto provienen tanto de las etapas precosecha como postcosecha. Entre los factores bióticos alterantes de la calidad, los hongos son de gran importancia, ya que se manifiestan fundamentalmente durante el transporte y almacenamiento. Para evitar pérdidas causadas por daños de podredumbres fúngicas, comúnmente se hace uso de fungicidas de síntesis química. Sin embargo, a causa de sus efectos nocivos para el medio ambiente y la salud humana, estos productos químicos están siendo sustituidos gradualmente. Una alternativa para ellos pueden ser los aceites esenciales (AEs) de plantas aromáticas.

El objetivo de este Trabajo Fin de Máster (TFM) fue la búsqueda de AEs de plantas aromáticas provenientes de Aragón como alternativa a los fungicidas de origen químico. Para alcanzar este objetivo se desarrolló una parte de ensayos *in vitro* y otra *in vivo*, en las cuales se trabajó con AEs de *Mentha rotundifolia*, *Origanum virens*, *Salvia officinalis* y *Valeriana officinalis*, para los que se evaluó su capacidad antifúngica frente a los hongos *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium expansum*.

Los métodos utilizados durante la parte *in vitro* consistieron en la difusión de AEs en disco, la dilución de AEs en Agar Dextrosa Patata (PDA), dilución de AEs Caldo de Patata Dextrosa (PBD), medición de la actividad volátil y generación de esporas en Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBD). La parte *in vivo* consistió en la evaluación de las infecciones provocadas por los cinco hongos en manzana protegidas con los AEs testados.

De la parte *in vitro* de este TFM se concluyó que un 10% de concentración de los AEs es excesivo, aunque *S. officinalis* presentó aun así un efecto nulo. Se concluyó también que las concentraciones fungicidas ideales del resto de AEs se encontraba entre 0,25 y 1%. En la parte *in vivo* se aplicaron los AEs a una concentración de 0,5% y 5%. Los resultados mostraron que *M. fructicola* presentaba un crecimiento anómalamente disminuido. Por otro lado, el AE de *M. rotundifolia* y *O. virens* al 5% demostraron ser una posible alternativa a los fungicidas químicos contra *P. expansum* y contra *B. cinerea* respectivamente. Mientras *A. alternata* mostró ser susceptible a *M. rotundifolia*, pero no de forma concluyente. *R. stolonifer* demostró ser muy resistente a los tratamientos.

ABSTRACT

The apple (*Malus x domestica*) is a pome fruit of great importance in the productive surface in Spain, which is also relevant in the shopping basket of the Spanish population. Although its nutritional value is recognized, its consumption in Spanish households has significantly decreased during the last 30 years despite the large national production. Factors that might affect the price and quality of the fruit may occur during the pre- and post-harvest periods. Among the disturbing biotic agents, fungi are of great importance, since they become visible during transport and storage. To avoid losses caused by fungal rot damage, chemical fungicides are commonly used. However, because of their adverse effects to the environment and human health, these chemicals are gradually being replaced. An alternative for them could be the use of essential oils (EOs) from aromatic plants.

The aim of this Master Thesis was to search for EOs from aromatic plants from Aragon as an alternative to chemical fungicides. In order to achieve this objective, different assays were carried out during an *in vitro* and an *in vivo* part, in which EOs from *Mentha rotundifolia*, *Origanum virens*, *Salvia officinalis* and *Valeriana officinalis* were used, evaluating their antifungal effect against *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer* and *Penicillium expansum*.

The methods used during the *in vitro* part consisted of disc diffusion of EOs, dilution of EOs in Potato Dextrose Agar (PDA), dilution of EOs in Potato Broth Dextrose (PBD), measurement of volatile activity and spore generation in Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC). The *in vivo* part consisted of the evaluation of infection wounds caused by the five fungi on apples protected with the tested EOs.

From the *in vitro* part of this Thesis, it was concluded that a 10% concentration of the EOs was excessive, although *S. officinalis* still showed no effect. From these same trials, it was found that the ideal fungicidal concentrations of the other AEs were between 0.25 and 1%. In the *in vivo* part, the EOs were applied at concentrations of 0.5% and 5%, from which it was concluded that *M. fructicola* showed abnormally reduced growth. The 5% EO of *M. rotundifolia* and *O. virens* proved to be a possible alternative to chemical fungicides against *P. expansum* and *B. cinerea*, respectively. *R. stolonifer* proved to be highly resistant to the treatments, while *A. alternata* showed to be susceptible to *M. rotundifolia*, but not conclusively.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Importancia de la manzana a nivel nacional

En España, según el informe del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPAMA, 2022a) dentro de la composición de la cesta de compra de los hogares españoles durante el año 2021, las frutas frescas supusieron un 14,4 % en volumen. Este consumo doméstico fue de 4.249.491,29 miles de kg, 91,8 kg per cápita (MAPAMA, 2022a). El informe citado anteriormente también muestra que las frutas de pepita tuvieron un consumo per cápita en 2021 de 16,25 kg, un 17,7% del consumo total de frutas frescas. Este informe muestra que la manzana en concreto supuso aprox. un 10,02% del consumo total de fruta fresca y señala que perdió relevancia frente al año anterior, con un descenso del 15,7% en volumen doméstico consumido. A esto anterior, el MAPAMA añade que este descenso de consumo se debe al incremento del precio medio en un 3,1%, acabando en 1,59 euros/kg. Aun así, durante el año 2021 la manzana fue la fruta más consumida fuera de casa.

Los datos a cerca de fruta de pepita en España durante el segundo cuatrimestre de la campaña 2021-2022 (septiembre 2021 a abril 2022) indican que el consumo doméstico de manzana en España se redujo en un 13% respecto al mismo periodo del año anterior (MAPAMA, 2022b). Por otro lado, este mismo informe señala que hubo una alta oferta a nivel nacional, la cual aumentó conforme la anterior temporada un 18%, llegando a las 617.095 toneladas de manzanas. En el caso concreto de la comunidad autónoma de Aragón en la temporada 21-22 produjo aprox. 80.000 toneladas de este fruto. Aragón se sitúa así en segundo puesto de mayor productor dentro de España, por detrás de la comunidad autónoma de Cataluña, la cual produjo en la temporada 21-22 aprox. 300.000 toneladas (Portal de Aragón, n.d.).

La manzana es no solo importante en la actividad económica del país, sino que también aporta diversos nutrientes importantes para la dieta humana (MAPAMA, n.d.; Hussein, Fawole y Opara, 2019). Este fruto aporta hidratos de carbono como azúcares, fructosa, glucosa y sacarosa; y fibra, soluble e insoluble. Son también una fuente importante de flavonoides, como los flavonoles, procianidinas y catequinas (Fernández-Jalao, Sánchez-Moreno y De Ancos, 2019). Estos últimos compuestos, han sido señalados por su posible relación inversamente proporcional con la incidencia de cáncer (Woo, 2013), como el de pulmón. Además, las procianidinas, las cuales están en importantes cantidades en las manzanas, suponen un potente antioxidante que podría modular la función inmunitaria (MAPAMA, n.d). Los aportes a la salud humana de la manzana no acaban ahí. Así, otros autores como Bondonno et al. (2017)

relacionaban la interacción de la fibra y flavonoides de la manzana y la microbiota intestinal, con la prevención de enfermedades cardiovasculares.

3.2 Pérdidas pre y postcosecha que afectan a la manzana

La manzana y otros productos del campo están siempre expuestos a diferentes agentes que acaban alterando la calidad de los mismos y dañándolos, haciendo que lleguen a ser incomedibles en muchos casos, y contribuyendo al preocupante desperdicio de alimentos que supone un reto para nuestra sociedad. Estas pérdidas pueden ser antes de la cosecha del fruto, precosecha, o durante el almacenamiento o venta del mismo, postcosecha.

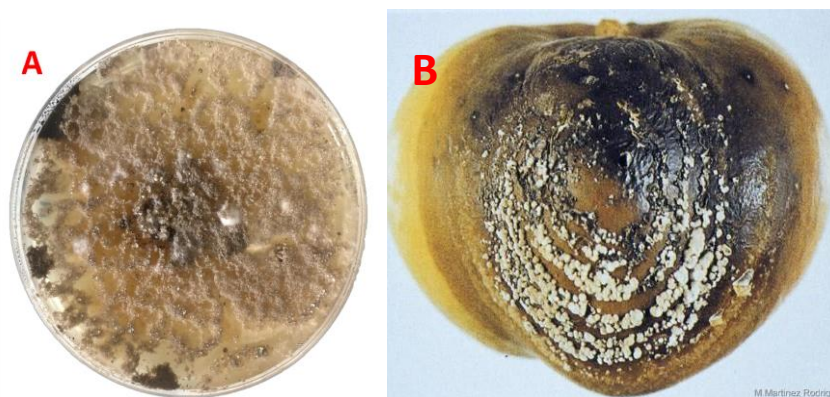
En el caso de los daños precosecha, existen factores como la luz y temperatura o heridas por maquinaria o plagas pueden acabar generando defectos cosméticos en la fruta como el russetting (Musacchi y Serra, 2018), el cual afecta al valor final de la fruta. Alteraciones similares pueden suceder por un mal manejo del fruto o por rozaduras de las ramas del árbol o mecánicas (Abi Tarabay et al., 2018), incluso lluvias intensas pueden aumentar la incidencia de grietas en las manzanas (Tyagi et al., 2017). Las alteraciones de la calidad del fruto antes de su recolecta no son solo físicos, sino que también pueden ser de origen macrobiótico como daño por aves (Steensma et al., 2016); pueden ser causados por deficiencia en nutrientes como el calcio, que acaba causando la alteración conocida como bitter pit (Torres et al., 2017); o incluso pueden ser de origen fúngico (Patriarca, 2019).

Sin embargo, los agentes fúngicos tienen mayor incidencia durante la postcosecha (Patriarca, 2019) y son una de las tipologías de enfermedades postcosecha que causan mayores pérdidas económicas (Elshafie et al., 2015). Como indica Elshafie et al. (2015), estas infecciones acaban reduciendo la vida útil del producto e incluso generan sustancias peligrosas para la vida humana como la patulina (Camele et al., 2012). Ejemplos importantes de estas infecciones en manzana son las producidas por *Monlinia* spp. (Elshafie et al., 2015), *Botrytis cinerea* (Sapper et al., 2020), *Alternaria alternata* (Yan et al., 2020), *Rhizopus stolonifer* (Xu et al., 2021) o *Penicillium expansum* (Sapper et al., 2020), que se detallan a continuación:

M. fructicola (Fig. 1. A) es un hongo que provoca junto *M. laxa* y *M. fructigena* la conocida podredumbre marrón, que se encuentra entre las enfermedades postcosecha más comunes e importantes de frutas de pepita (El Khetabi et al., 2021; Zhu et al., 2016). La podredumbre puede generarse en la manzana a través de una infección latente o por una contaminación de la superficie del fruto, la cual si no se detiene se desarrolla durante el transporte y almacenamiento del producto (El Khetabi et al., 2021). Esta podredumbre (Fig. 1. B) se ha observado en manzanas

como una alteración de forma circular, de color marrón tirando a negro o de color beige (Di francesco et al., 2015).

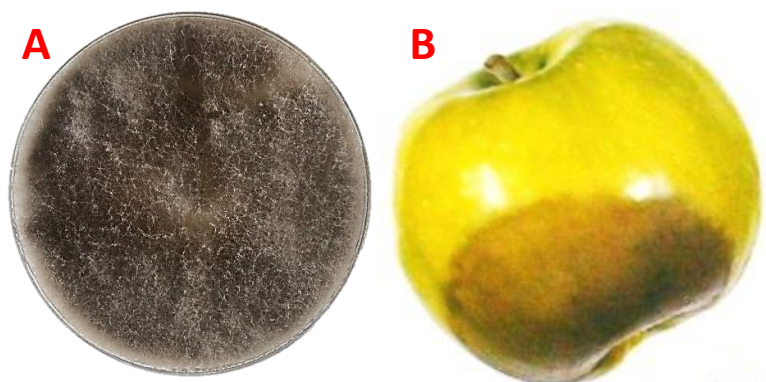
Figura 1. A- Cepa de *Monilinia fructicola* utilizada en este estudio. B- Manzana afectada por *Monilinia fructicola*



(Fig. B: Inteligencia de Negocios Técnicos Agrícolas, 2012).

Botrytis cinerea (Fig. 2. A), conocido como podredumbre gris (Mohammadi, Hashemi y Hosseini, 2015; Sapper et al., 2020), es otro patógeno que se encuentra entre los patógenos más dañinos para un gran abanico de frutas (Rguez et al., 2020). Esta podredumbre es una enfermedad bastante común en las manzanas y frutos ricos en pectinas (Sapper et al., 2020). Al igual que otros hongos, *B. cinerea* infecta los frutos a través de heridas, golpes o aberturas naturales, y estas infecciones se desarrollan durante la postcosecha (Sapper et al., 2020), provocando lesiones blandas, acuosas y de color ligeramente marrón (Fig. 2. B).

Figura 2. A- Cepa de *Botrytis cinerea* utilizada en este estudio. B- Manzana afectada por *Botrytis cinerea*

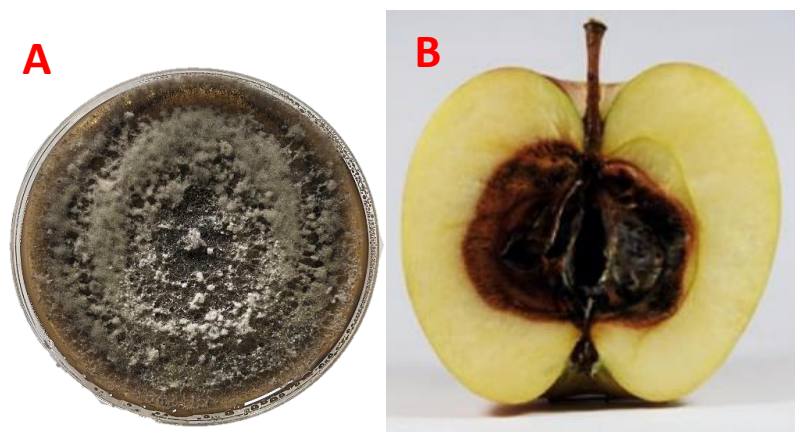


(Fig. B: Inteligencia de Negocios Técnicos Agrícolas, 2012).

Alternaria alternata (Fig. 3. A) es un hongo que produce la podredumbre negra (Perina et al., 2014), una enfermedad que daña a diversos productos del campo (Moumni et al., 2021, Sajid, 2020; Perina et al., 2014) entre los que se encuentra la manzana (Reuveni et al., 2007), aunque es poco frecuente en algunas variedades como ‘Granny Smith’ o ‘Golden Delicious’ (Elfar, Zoffoli y Latorre, 2019). Esta podredumbre (Fig. 3. B) se caracteriza por provocar que la carne del fruto

alrededor del lóculo se seque o quede muy blanda y húmeda (Ntasiou et al., 2015). No es usual que se observen síntomas en el exterior (Reuveni et al., 2007). Además, el género *Alternaria* spp. genera micotoxinas como el ácido tenuazónico, el alterfokxu, nariol éter monometálico o el alternariol, las cuales son carcinogénicas para el ser humano (Sajid, 2020).

Figura 3. A- Cepa de *Alternaria alternata* utilizada en este estudio. B- Manzana afectada por *Alternaria alternata*



(Fig. B: Lolas, 2020).

Rhizopus stolonifer (Fig. 4. A) también es una enfermedad muy importante en el periodo de postcosecha de las frutas de pepita (Yang y Jiang, 2015). Es un hongo muy difícil de controlar ya que se difunde de forma muy rápida en el ambiente infectando frutos adyacentes a temperaturas que no bajen de los 5 °C (Yang y Jiang, 2015; Alizadeh-Salteh et al., 2010). Este hongo provoca la podredumbre blanda (El Ouadi et al., 2017) que se caracteriza por lesiones húmedas y de color marrón que ablandan la carne del fruto (Fig. 4. B; Khokhar et al., 2019).

Figura 4. A- Cepa de *Rhizopus stolonifer* utilizada en este estudio. B- Manzana afectada por *Rhizopus stolonifer*

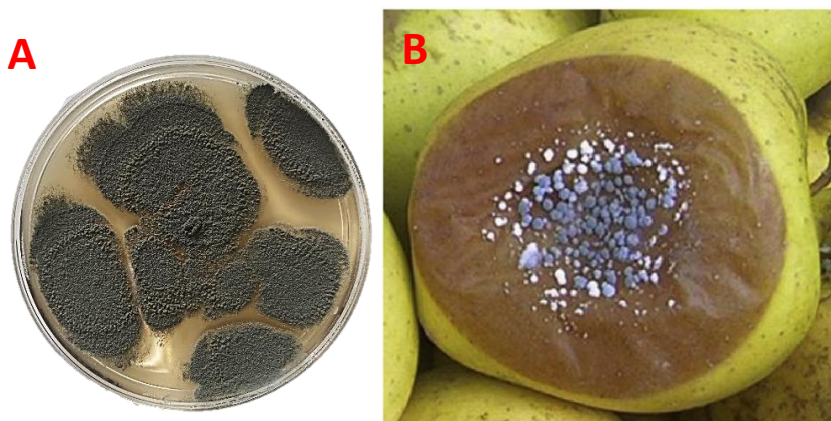


(Fig. B: El Ouadi et al., 2017).

Penicillium expansum (Fig. 5. A) provoca en los frutos la podredumbre azul, una de las principales enfermedades de origen fúngico que afectan a las manzanas durante la postcosecha (El Ouadi et al., 2017; Venturini, Blanco y Oria, 2002). Esta lesión aparece en la manzana como

manchas circulares de color marrón (Fig. 5. B) con márgenes definidos entre el tejido sano y enfermo, el cual es blando y acuoso (El Ouadi et al., 2017); además de presentar acumulaciones de esporas de color azul verdoso (Luciano-Rosario, Keller y Jurick, 2020). Y como se mencionó anteriormente, este hongo produce la conocida patulina, una micotoxina peligrosa para el ser humano (Camele et al., 2012).

Figura 5. A- Cepa fúngica de *Penicillium expansum* utilizada en este estudio. B- Manzana afectada por *Penicillium expansum*



(Fig. B: El Ouadi et al., 2017).

3.3 Métodos de conservación postcosecha de la manzana

Para prevenir el crecimiento y proliferación de estos hongos las manzanas se conservan a bajas temperaturas y en atmósferas controladas. Aun así, como se ha mencionado anteriormente, hongos como *R. stolonifer* siguen actuando bajo estas condiciones. Para evitar pérdidas de producción a causa de daños producidos por los hongos se suele hacer uso de fungicidas sintéticos principalmente (El Khetabi et al., 2021). Ejemplos de estos químicos que se han utilizado a lo largo del tiempo son el captan, benomilo e iprodiona contra *M. fructicola* y *B. cinerea* (Tsao y Zhou, 2000); difenoconazol, fludioxonil, propiconazol y procloraz contra *A. alternata* (Moummni et al., 2021; Bautista-baños et al., 2013); tiabendazol, benomilo, propiconazol y maneb contra *R. stolonifer* (Yan et al., 2020; Bautista-baños et al., 2013); o imazalil y tiabendazol contra *P. expansum* (Venturini, Blanco y Oria, 2002). Sin embargo, muchos microorganismos han acabado desarrollando resistencias a estas sustancias, como *Penicillium* spp. al tiabendazol o *Botrytis* spp. al benomilo (Venturini, Blanco y Oria, 2002); o incluso ha sido su uso ilegalizado de varios países como el benomilo y la iprodiona (Tsao y Zhou, 2000).

El uso de estos productos, sus limitaciones legales, el detrimento de su efectividad, sus consecuencias negativas en la naturaleza (El Khetabi et al., 2021; Camele et al., 2012; Yang y Jian, 2015) y la concienciación por parte del consumidor en la búsqueda de productos libres de

sustancias químicas, ha hecho considerar nuevas alternativas para la conservación postcosecha. Actualmente se están investigando y poniendo diferentes alternativas. Existen métodos físicos como la irradiación con UV, la cual puede debilitar e incluso inactivar a patógenos como *Penicillium italicum* o *Penicillium digitatum* (Kahramanoğlu et al., 2020; Papoutsis et al., 2019); la aplicación de plasma frío para reducir las colonias de *A. alternata* o *P. italicum* en fresas y uvas (Siddique, Hardy y Bayliss, 2018); la combinación de diferentes factores como una temperatura a 18 °C y actividad de agua de 0,94 reduce la producción de micotoxinas de *A. alternata* (Sanzani, Reverberi y Geisen, 2016); o el uso de agua caliente entre 40 y 65 °C, el cual se ha aplicado de forma extensa en diferentes frutos para prevenir las pérdidas a causa de patógenos fúngicos (Papoutsis et al., 2019). También están presentes métodos biológicos que consisten en la aplicación de microorganismos antagónicos al patógeno, como por ejemplo *Candida stellimalicola* y *Pseudomonas fluorescens* para combatir *P. italicum* (Wang et al., 2020); o *Candida oleophila* y *Debaryomyces* spp. contra *B. cinerea*, *P. expansum* o *A. alternata* (Dai et al., 2021). Por otro lado, se hace uso de sustancias químicas ‘Reconocidas generalmente como Seguros’ (GRAS) como bicarbonato sódico o sorbato potásico se han utilizado para combatir hongos como *P. italicum* y *P. digitatum* (Papoutsis et al., 2019); o ácidos orgánicos y sus sales, compuestos bastante usados como compuestos antimicrobianos (Palou, Valencia-Chamorro y Pérez-Gago, 2015). También existen métodos de control de estos agentes fúngicos de la postcosecha que consisten en la combinación de diferentes factores, como los recubrimientos con ceras y elementos químicos o incluso calor (Bautista-baños et al., 2013). Un recubrimiento muy común y efectivo a la hora de proteger frutas es el quitosán (Bautista-baños et al., 2013), un biopolímero comestible y con propiedades antimicrobianas contra patógenos como *B. cinerea* (Palou, Valencia-Chamorro y Pérez-Gago, 2015). Estos recubrimientos se pueden combinar con agentes antimicrobianos como los aceites esenciales (AEs).

Los AEs provenientes de plantas aromáticas han sido clasificados como sustancias GRAS por la FDA (Yan et al., 2020). En los últimos años se han llevado a cabo varias investigaciones para estudiar la aplicación de estos como alternativa a los fungicidas (Sapper et al., 2020; Camele et al., 2012; Palou, Valencia-Chamorro y Pérez-Gago, 2015).

En la Tabla 1 se presentan ejemplos de diferentes investigaciones llevadas a cabo sobre la aplicación de AEs *in vitro* e *in vivo* contra los hongos mencionados anteriormente.

Tabla 1. Ejemplos de ensayos previos de aplicación de AEs frente a hongos patógenos in vitro e in vivo.

Hongo	Aceite Esencial	Tipo de ensayo	Referencia	
<i>M. fructicola</i>	<i>Origanum vulgare</i> L.	in vitro	Elshafie et al. (2015)	
	<i>Thymus vulgaris</i>	in vivo	Hassani et al. (2011)	
<i>A. alternata</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	in vitro	Perina et al. (2014)	
<i>B. cinerea</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	in vivo/ in vitro	Vitoratos et al. (2013)	
	<i>Citrus limon</i> y chitosan	in vivo/ in vitro	Perdones et al. (2012)	
	<i>Eucalyptus citriodora</i> <i>Origanum gratissimum</i> <i>Origanum sanctum</i>	in vivo / in vitro	Tripathi, Dubey y Shukla (2007)	
	<i>Origanum vulgare</i> <i>Thymus capitatus</i> <i>Lavandula angustifolia</i> <i>Rosmarinus officinalis</i> <i>Salvia fruticosa</i>	in vitro	Daferera, Ziogas y Polissiou (2003)	
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	in vivo	Hassani et al. (2011)	
	<i>B. cinerea</i> y <i>R. stolonifer</i>	<i>Thymus danensis</i> <i>Thymus carmanicus</i>	in vivo	Amrollah y Hosein (2013)
	<i>B. cinerea</i> y <i>R. stolonifer</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	in vitro	Tzortzakis y Economakis (2007)
<i>R. stolonifer</i>	<i>Thymus vulgaris</i> y <i>Citrus aurantifolia</i>	in vivo / in vitro	Bosquez-Molina et al. (2010)	
	<i>Origanum vulgare</i> L. y chitosan	in vivo / in vitro	Dos Santos et al. (2012)	
<i>B. cinerea</i> <i>R. stolonifer</i> <i>P. expansum</i>	<i>Melissa officinalis</i>	in vitro	El Ouadi et al. (2017)	

Entre los AEs más utilizados en los artículos consultados se encuentran el de orégano y el de tomillo. Además, diversos investigadores utilizaban no solo AEs sino compuestos de éstos que presentaban actividad antifúngica, como el carvacrol o el timol (Camele, I. et al., 2012).

Por otro lado, algunos de estos AEs de plantas aromáticas se encuentran en Aragón. Ejemplos de plantas aromáticas que sus aceites presentan cualidades y efectos fungicidas que se pueden encontrar en Aragón son menta (Ozcakmak et al., 2016), orégano (Vitoratos et al., 2013), salvia (Alizadeh-Salteh et al., 2020) y valeriana (Letchamo et al., 2004).

4 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Este TFM es planteado en el marco del proyecto de cooperación 'FrutAE: Sistemas ecológicos en base a aceites esenciales procedentes de plantas aromáticas para prevención de heladas y conservación postcosecha de fruta'. Dentro de este proyecto, la Fundación Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID), mediante la participación de la investigadora Celia M. Cantín, participa como centro tecnológico para la generación de conocimiento en la extracción de aceites esenciales, tratamiento y procesado del aceite, encapsulado, formulación, ejecución de ensayos de eficacia, y validación de protocolos de trabajo. Este proyecto pretende sustituir productos químicos sintéticos utilizados en pre y postcosecha, por productos inocuos para el medio ambiente y la salud, cuya formulación contenga aceites esenciales naturales, ecológicos y locales.

La **hipótesis de partida** es la siguiente: "La aplicación de AE de plantas aromáticas medicinales a manzanas presentan un efecto inhibitorio de las podredumbres típicas de esta especie, reduciendo, por tanto, la aparición daños de origen fúngico en el fruto; esto permitiría disminuir o incluso evitar el uso de fungicidas de tipo químico".

De acuerdo con la hipótesis establecida, se abordó como **objetivo general** de esta investigación obtener AEs de plantas aromáticas provenientes de Aragón que supongan una alternativa a los fungicidas de origen químico y por ende que posean efecto fungicida contra las podredumbres más características de la manzana y protejan al fruto contra estos hongos durante su conservación postcosecha. Para alcanzar este objetivo general se establecen los siguientes **objetivos parciales**:

1. Realizar un estudio del arte sobre las podredumbres que afectan a la manzana, métodos de conservación postcosecha de frutos de pepita, AE de plantas medicinales y el uso de estos últimos para la conservación postcosecha de alimentos.
2. Determinación de la actividad antifúngica de los AEs seleccionados contra los hongos a testar *in vitro*.
3. Determinación de la actividad antifúngica de los AEs seleccionados contra los hongos a testar *in vivo*, con la manzana como matriz alimentaria.

5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA EMPLEADA

5.1 Diseño experimental

Para alcanzar el objetivo general y objetivos parciales de este trabajo fin de máster se elaboró un diseño experimental en el que primero se trabajó *in vitro*, para determinar la capacidad fungicida de los AEs seleccionados, y posteriormente *in vivo*, en la que se aplicaron estos aceites esenciales directamente sobre fruta fresca.

El estudio *in vitro* consistió en evaluar la eficacia antifúngica de los AEs obtenidos de *M. rotundifolia*, *O. virens*, *S. officinalis* y *V. officinalis* frente a los hongos causantes de podredumbres en manzana, *M. fructicola*, *B. cinerea*, *A. alternata*, *P. expansum* y *R. stolonifer*. Los resultados de la parte *in vitro* sirvieron para diseñar la posterior parte *in vivo*.

En la parte *in vivo* se evaluó la eficacia antifúngica de los AEs procedentes de *M. rotundifolia*, *O. virens* y *V. officinalis* en matriz alimentaria frente los mismos hongos de la parte *in vitro*, determinado su capacidad antifúngica postcosecha tras su aplicación sobre manzanas, y comparar estos resultados con los obtenidos en la parte *in vitro*.

La parte experimental de este TFM se llevó a cabo en las instalaciones del Centro y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) y la Estación Experimental de Aula Dei-CSIC (EEAD-CSIC).

5.2 Determinación de la capacidad fungicida de AEs *In vitro*

5.2.1 Obtención y mantenimiento de aceites esenciales de plantas medicinales aromáticas

Los AEs de *M. rotundifolia*, *O. virens* y *S. officinalis* fueron suministrados por el Laboratorio de Plantas Aromáticas del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). La obtención de estos AEs fue realizada en una planta de destilación semi industrial mediante destilación por arrastre de vapor. Esta extracción fue realizada en un rango de presión de vapor de 0,5 a 1 bar. El AE de *V. officinalis* fue adquirido comercialmente a la empresa *Esenciales, Aceites y Esencias, SL*. Los AEs fueron conservados en recipientes opacos impidiendo la incidencia de la luz del sol, y evitando su contacto con el aire.

5.2.2 Obtención y mantenimiento de cepas fúngicas

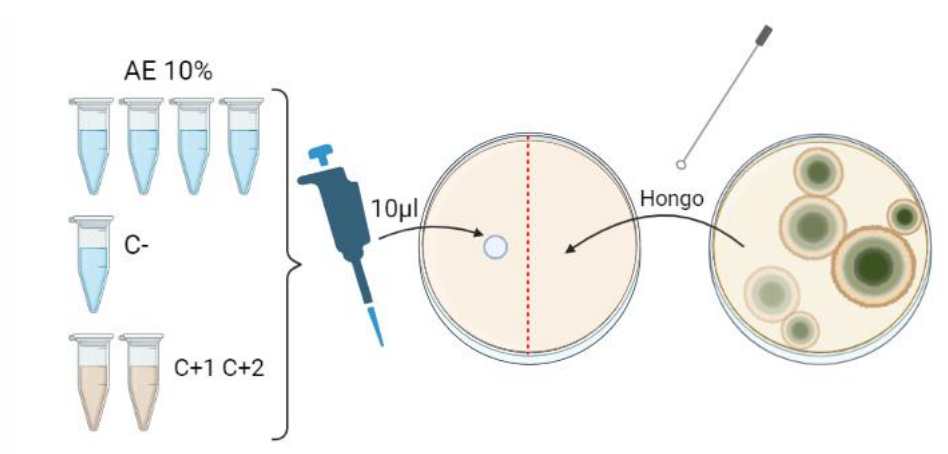
La cepa de *M. fructicola* fue cedida por el grupo de Patología Postosecha del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA). Las cepas de *B. cinerea*, *A. alternata*, *P. expansum* y *R. stolonifer* fueron obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Estas cepas se reaislaron en placas de Petri con Agar Patata y Dextrosa (PDA) para verificar que se trataba de cultivo puro, y obtener un stock de referencia suficiente para los ensayos a realizar. Las cepas de referencia y su stock se mantuvieron en una estufa a 24°C.

5.2.3 Método de difusión de aceites esenciales en disco

Se realizó una evaluación preliminar de la capacidad antifúngica de los AEs utilizando el método de difusión en disco (Fig. 6) siguiendo la metodología empleada por Mironescu y Georgescu (2008).

Figura 6. Representación gráfica del método de difusión de los cuatro AEs en discos de papel utilizando como medio de cultivo Agar Dextrosa Patata (PDA).



AE: Aceite Esencial. C-: Control negativo, diluyente y agua estéril. C+1: Control positivo 1, TIRAM y diluyente. C+2: Control positivo 2, Ciproconazol y diluyente. Creado con BioRender.

Se prepararon los inóculos de los AEs de *O. virens*, *M. rotundifolia*, *S. officinalis* y *V. officinalis* a una concentración del 10%, utilizando como diluyente Tween 80 al 0,05%, etanol al 3% y agua destilada estéril (Venturini, Blanco y Oria, 2002; Atares, 2021). Como control positivo se utilizaron dos fungicidas comerciales, Thiuram Flow 50% (TIRAM, Dimetilditiocarbamato) y ATEMI 10% (Ciproconazol) a las concentraciones que se aplican en campo (5 ml/l y 0,2 g/l respectivamente). Como control negativo se utilizó el diluyente (Tween 80 al 0,05%, etanol al 3% y agua destilada estéril).

Para la realización de este ensayo, se prepararon 8 placas de Agar Patata Dextrosa (PDA) para cada hongo, los cuales se inocularon a 2 cm del centro de la placa con un asa de siembra estéril. Se utilizaron 4 placas para determinar la capacidad antifúngica de los AEs, para lo que se inocularon 10 µl de cada AE por placa, en un disco de papel estéril de 6 mm de diámetro, dispuestos simétricamente al hongo a 2 cm del centro de la placa. Otras 2 placas se utilizaron para inocular en el disco de papel 10 µl de los controles positivos. Y otra placa para inocular en

el disco de papel 10 µl del control negativo. En la octava placa, se inoculó el hongo en el centro y se colocaron 4 discos de papel estéril a una misma distancia del centro y entre ellos; en cada disco se inocularon 10 µl de cada uno de los AEs para evaluar todos los AEs a la vez.

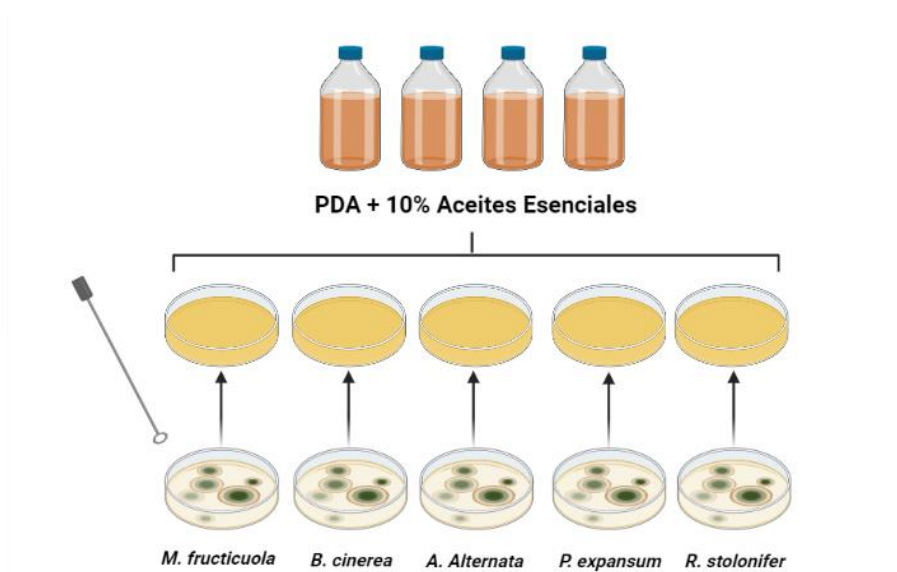
Tras la inoculación, las placas se incubaron a 24 °C durante 144 h; cada 24 h se midió el diámetro de la colonia fúngica con un pie de rey digital.

5.2.4 Método de dilución de aceites esenciales en medio de cultivo PDA

El método de dilución de AEs en medio de cultivo sólido permite evaluar la eficacia fungicida de los AEs en contacto directo con los hongos. Para ello, se prepararon 4 frascos con 300 ml de PDA estéril, destinados a un AE diferente. En cada frasco se añadieron las concentraciones correspondientes para obtener una solución final de AE al 10%, Tween 80 al 0,05%, como surfactante, y etanol al 3%. A diferencia del ensayo preliminar (difusión de AEs en disco), en vez de agua estéril se utilizó el propio PDA como diluyente. La mezcla de componentes se realizó con el medio de cultivo atemperado a 45 y 50°C, para asegurar la mezcla homogénea sin deteriorar las propiedades antimicrobianas de los AEs (Viuda-Martos et al., 2007). El contenido final de cada frasco se vertió en placas Petri de 52 mm de diámetro para obtener, al menos, 20 placas para AEs y 5 placas como control negativo (simplemente con PDA).

Tras servir el medio y dejarlo solidificar durante 24 h, se inocularon los hongos en el centro de cada placa con un asa de siembra estéril (Fig. 7). Las placas se incubaron en una estufa a 24°C durante 144 h. Cada 24 h se midió el diámetro de la colonia fúngica con un pie de rey digital.

Figura 7. Representación gráfica del método de dilución de los cuatro AEs en el medio de cultivo Agar Dextrosa Patata (PDA).

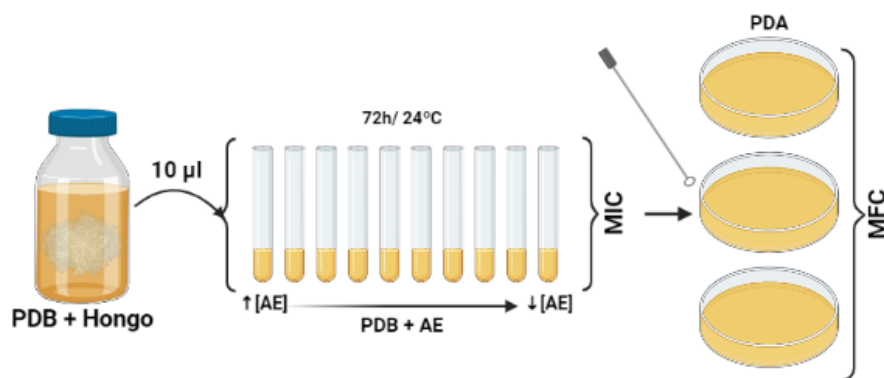


AE: Aceite Esencial. Creado con BioRender.

5.2.5 Método de dilución en PDB

La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) se define como la menor concentración de aceite que no muestra crecimiento en los tubos de ensayo, mientras que la Concentración Mínima Fungicida (MFC) se define como la menor concentración de aceite que no muestra crecimiento en placa de cultivo (Mohammadpour et al., 2012). La obtención del MIC y del MFC de los AEs contra los hongos se realizó mediante la dilución de los AEs en Caldo Patata Dextrosa (PDB) (Fig. 8) siguiendo la metodología de Mohammadpour et al. (2012).

Figura 8. Representación gráfica del método de dilución en el Caldo Dextrosa Patata (PDB) para la determinación del MIC y MFC de cada AE contra los hongos estudiados, mediante la utilización de distintas concentraciones.



AE: Aceite Esencial. MIC: Concentración Mínima Inhibitoria. MFC: Concentración Mínima Fungicida. Creado con BioRender.

Para la obtención del MIC se prepararon 10 tubos de ensayo con PDB estéril por cada AE, de los que contenían las siguientes concentraciones: 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 y 0,0156 %; para la difusión de los AEs se utilizó Tween 80 al 0,05 % y etanol al 3 % (Venturini, Blanco y Oria, 2002; Atares, 2021). Como control positivo se utilizaron los dos fungicidas utilizados anteriormente a las mismas concentraciones, y como control negativo se utilizó un tubo con diluyente para cada hongo.

En estos ensayos, se partió directamente de inóculo fúngico en medio líquido. Para ello, se prepararon 3 frascos con PDB estéril, en los que se inocularon *M. fructicola*, *B. cinerea* y *A. alternata* con un asa de siembra estéril desde el stock de referencia. Estos frascos se mantuvieron en movimiento constante, para evitar la formación de agregados micelares, y a 24°C durante 5 días. De estos frascos, con crecimiento micelar, se inocularon 100 µl a cada tubo con las diferentes diluciones de AE, y a los controles. Los tubos se incubaron a 24°C durante 72h. Cada 24h se verificó la presencia o ausencia de crecimiento en los tubos.

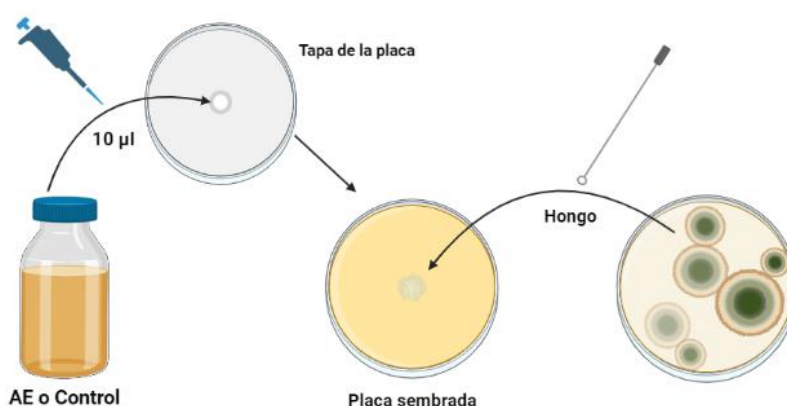
Tras obtener los resultados del MIC, se tomó inóculo con un asa de siembra estéril de las diluciones de AE que no presentaron crecimiento, y de la dilución más baja de AE que presentó

crecimiento. Cada inóculo fue sembrado en superficie por agotamiento en una placa de Petri de 52 mm de diámetro con PDA. Estas placas fueron incubadas en una estufa a 24°C durante 72h. Cada 24h se observó la presencia o ausencia de crecimiento micelar en las placas.

5.2.6 Método de actividad volátil

Para la evaluación del uso de vapores de AE contra el crecimiento micelar se realizó un ensayo de actividad volátil (Fig. 9), siguiendo la metodología utilizada por Venturini, Blanco y Oria (2002).

Figura 9. Representación gráfica del método de inoculación de los cuatro AEs en discos de papel colocados en la tapa de las placas donde se realiza la siembra e incubación de los hongos a estudiar.



AE: Aceite Esencial. Creado con BioRender.

A la tapa de placas de Petri de 52 mm de diámetro con medio de cultivo PDA se adhirió un disco de papel estéril. Se emplearon 5 placas para cada AE (*O. virens*, *S. officinalis*, *M. rotundifolia* y *V. officinalis*) y 5 placas para el control negativo. Posteriormente, se inocularon 10 µl de AE al 100% de concentración en el disco adherido a la tapa; en las placas destinadas al control negativo se inocularon 10 µl de agua estéril.

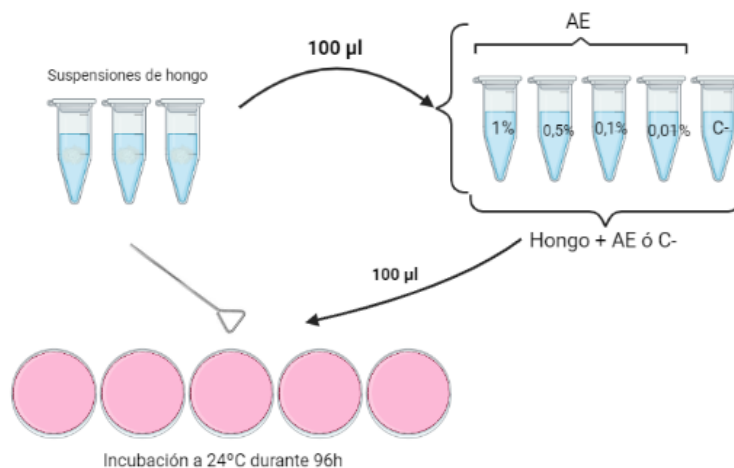
Posteriormente, los hongos (*M. fructicola*, *B. cinerea*, *A. alternata*, *P. expansum* y *R. stolonifer*) fueron inoculados en el centro de la placa con un asa de siembra estéril desde el stock de referencia. Las placas se incubaron a 24°C durante 2 semanas. Cada 24 h se midió con un pie de rey digital los diámetros de las colonias fúngicas que crecían en dichas placas.

5.2.7 Método de germinación de esporas en cultivo DRBC

Para la evaluación del uso de AEs frente a la germinación de esporas de origen fúngico se prepararon 5 diluciones (1, 0,5, 0,1 y 0,01 %) en microtubos de cada AE (*M. rotundifolia*, *O. virens*, *S. officinalis* y *V. officinalis*) utilizando 0,05% de Tween 80, 3% de etanol y agua estéril

como diluyente (Venturini, Blanco y Oria, 2002) obteniendo un volumen final de 0,9 ml; el control negativo consistió en 0,9 ml del diluyente (0,05% de Tween 80, 3% de etanol y agua estéril) (Fig. 10).

Figura 10. Representación gráfica del método de generación de esporas de *M. fructicola*, *B. cinerea* y *A. alternata* utilizando el medio de cultivo DRBC.



AE: Aceite Esencial. C-: TIRAM y diluyente. Creado con BioRender.

La suspensión de esporas de *M. fructicola*, *B. cinerea* y *A. alternata* se obtuvo mediante raspado superficial con asa de siembra de los hongos en medio sólido (stock de referencia), y se resuspendió en 1 ml de agua estéril. De las suspensiones de hongo resultantes se inocularon 100 µl a cada dilución de AE y control negativo.

Tras la inoculación de los hongos en los microtubos con AE y control negativo se dejaron incubar durante 2 h a 24°C. Después se inocularon 100 µl de cada uno en placas de Petri con medio de cultivo DRBC (Dicloran, Rosa de Bengala, Cloranfenicol). El inóculo se sembró por extensión con un asa estéril de drigalsky. Tras la siembra, las placas se incubaron a 24°C durante 4 días. Cada 24 h se cuantificó la cantidad de colonias presentes (esporas germinadas) en cada placa.

5.3 Determinación de la capacidad fungicida de AEs *In vivo*

Tras determinar el efecto antifúngico de los AEs testados *in vitro* y obtener las conclusiones correspondientes, se llevó a cabo un ensayo *in vivo* para evaluar la capacidad antifúngica de los mismos sobre manzana fresca (*Malus x domestica*). Tras evaluar los resultados *in vitro*, se utilizaron los AEs obtenidos de *M. rotundifolia*, *O. virens* y *V. officinalis*, eliminando el AE de *S. officinalis* por su escasa capacidad antifúngica. Las cepas fúngicas patógenas fueron las mismas que las utilizadas en la parte anterior del estudio. El ensayo *in vivo* se realizó por repetido (con un espacio de 2 semanas), con el fin de obtener una mayor robustez estadística en los datos.

Para alcanzar los objetivos de este TFM, se conservaron y prepararon los frutos a utilizar en el experimento, se preparó nuevo stock de referencia de los microorganismos además de suspensiones de los mismos, y se elaboraron suspensiones de los AEs a testar. Para cada uno de los hongos estudiados, se llevaron a cabo los siguientes tratamientos y controles:

1. AE de *M. rotundifolia* al 0,5% y 5% de concentración.
2. AE de *O. virens* al 0,5% y 5% de concentración.
3. AE de *V. officinalis* al 0,5% y 5% de concentración.
4. Control negativo 1, mismo diluyente que el empleado para la suspensión de los AEs (3% de etanol, 0,05% de Tween 80 y agua destilada estéril).
5. Control negativo 2, agua destilada estéril. Este control se realizó para comprobar si el etanol al 3% interfiere en los resultados de la capacidad antifúngica *in vivo* de los AEs.
6. Control positivo, fungicida Thiuram a la concentración utilizada en campo (5 ml/l).

5.3.1 Selección y preparación de frutas

Este estudio se llevó a cabo en manzanas (*Malus x domestica*), de la variedad 'Golden Delicious', procedentes del Valle del Manubles (Comarca de Calatayud, Zaragoza). Las manzanas fueron cosechadas y directamente transportadas hasta la EEAD-CSIC, donde se conservaron en atmósfera normal a una temperatura de 1°C ($\pm 0,5$) hasta el momento de su utilización (4 semanas de conservación).

Previamente a comenzar el ensayo, se desecharon aquellos frutos afectados con cualquier tipo de herida, golpe o abrasión superficial. Posteriormente, la superficie de los frutos se desinfectó sumergiendo las manzanas en agua con un 1% de hipoclorito de sodio durante 1 hora a temperatura ambiente (Mohammadi, Hashemi y Hosseini, 2015). Tras un aclarado exhaustivo con agua, se dejaron secar a temperatura ambiente 24 h antes del ensayo.

5.3.2 Preparación del inóculo de hongos patógenos

Dos días antes del ensayo se prepararon microtubos con suspensiones de 10^4 esporas/ml de cada hongo objetivo: *M. fructicola*, *B. cinerea*, *A. alternata*, *P. expansum* y *R. stolonifer*. Este inóculo se obtuvo mediante raspado superficial, con asa de siembra estéril, de estos hongos cuyo grado de esporulación estaba en un estado avanzado en placa Petri con PDA. Las esporas y micelio obtenidos se depositaron en un tubo con agua destilada estéril, que posteriormente se filtró con una gasa estéril para eliminar el micelio y poder posteriormente visualizar claramente las esporas en el microscopio.

Para calcular la concentración de esporas, se dispusieron 10 μl de la suspensión filtrada en un hematocitómetro (cámara Neubauer), y se hizo un recuento en el microscopio. De esta forma, y mediante diluciones, se ajustaron las concentraciones a 10^4 esporas/ml (Venturini, Blanco y Oria, 2002); esta suspensión final se repartió en alícuotas en microtubos de 1,5 ml, que se mantuvieron en refrigeración hasta su utilización.

5.3.3 Preparado de soluciones de aceites esenciales y controles

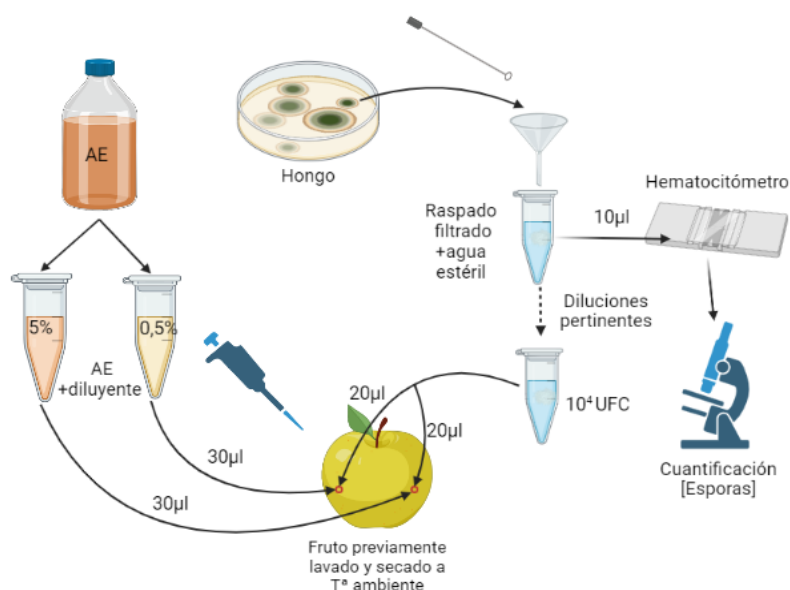
Las suspensiones de aceites esenciales se realizaron a partir de los mismos extractos utilizados en los ensayos *in vitro* (*O. virens*, *M. rotundifolia* y *V. officinalis*) en condiciones de esterilidad. A partir de estos AEs se realizaron suspensiones de concentración 0,5% y 5% en microtubos. Para estas suspensiones se utilizó la metodología anteriormente mencionada de Venturini, Blanco y Oria (2002) y Atares (2021), siendo el diluyente Tween 80 (0,05%) y etanol (3%) junto a agua estéril. Los microtubos preparados se mantuvieron en refrigeración hasta su utilización.

A su vez se realizaron suspensiones para el control negativo 1, consistente en Tween 80 (0,05%), etanol (3%) y agua estéril (96,95%); para el control negativo 2, consistente en agua estéril; y las suspensiones del control positivo se realizaron a partir del fungicida Thiuram (0,5%), Tween 80 (0,05%), etanol (3%) y agua estéril (96,45%).

5.3.4 Tratamientos e inoculación de hongos patógenos

En el ensayo se realizaron un total de 30 tratamientos con AEs: los 3 AEs seleccionados a 2 concentraciones diferentes frente a cada uno de los 5 hongos (Fig. 11). Además, se realizó, para cada hongo, 1 control positivo y 2 controles negativos. Para cada tratamiento se utilizaron 3 repeticiones de 5 frutos (15 frutos por tratamiento). En la zona ecuatorial de cada uno de los frutos, se realizaron dos heridas de unos 2 mm de diámetro, perforando la pulpa del fruto con una aguja estéril. Para cada uno de los tratamientos con AEs, se inocularon 30 μl de la suspensión al 0,5% del AE correspondiente en la herida de la izquierda; y 30 μl de la disolución al 5% del mismo aceite en la herida de la derecha. Así mismo, en las manzanas destinadas a los controles negativos se inocularon 30 μl de la suspensión de control negativo 1 en la herida de la izquierda; y en la herida de la derecha 30 μl del control negativo 2. Por último, se realizó una única perforación en el ecuador de la manzana en el tratamiento del control positivo, donde se inocularon 30 μl de la suspensión de control positivo.

Figura 11. Esquema de actuación en el ensayo *in vivo*. Representación gráfica de la preparación de inóculos de AE con una concentración de 0,5 y 5%, de inóculos de hongo con una concentración de 10^4 esporas y la inoculación de éstos en las perforaciones del fruto.



AE: Aceite Esencial. UFC: Unidades Formadoras de Colonias. [Esporas]: Concentración de esporas de la suspensión del raspado del hongo. Creado por Biorender.

Los frutos, tras ser inoculados con los tratamientos y controles correspondientes, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 hora. Seguidamente se inocularon 20 µl del microorganismo correspondiente en cada una de las heridas donde se había inoculado AE, control negativo o control positivo.

Tras la inoculación con los hongos, las manzanas fueron dispuestas en cajas (15 manzanas en cada caja, Fig. 19) y fueron almacenadas en arcones de plástico herméticos (para limitar la entrada del aire exterior, Fig. 20) y con papel humedecido en su interior con el fin de mantener una alta humedad relativa y facilitar el crecimiento del hongo. En cada arcón se introdujeron tres cajas con manzanas inoculadas con el mismo hongo para evitar contaminaciones cruzadas.

Se midió, con un pie de rey digital, el diámetro del daño generado por el hongo (de forma concéntrica a partir de la herida provocada en el día 0) los días 3, 7 y 10 tras la inoculación. En cada medición se tomaron fotografías de los frutos de cada tratamiento y repetición.

5.4 Análisis estadístico

El análisis y tratamiento de datos de los diámetros de las heridas medidas durante la parte *in vivo* de este TFM se realizó mediante un modelo lineal mixto. Se especificó el tiempo como variable de medidas repetidas y la variable “manzana” como un efecto aleatorio, permitiendo

así un intercepto (punto de intersección de la recta de regresión con el eje Y) diferente para cada manzana. En este modelo se incluyeron los patógenos, los tratamientos con AEs y controles, y el tiempo desde la aplicación de los tratamientos como predictores. El diámetro de la herida en el fruto fue la variable respuesta, la cual fue transformada logarítmicamente para cumplir los supuestos de homocedasticidad, normalidad y linealidad del modelo. Los análisis estadísticos fueron ejecutados con el paquete 'nlme' del software R (Pinheiro et al. 2022). Las diferencias entre tratamientos y entre patógenos fueron evaluadas mediante el paquete effects (Fox y Weisberg 2019).

6 RESULTADOS

6.1 Capacidad fungicida de AEs *In vitro*

6.1.1 Difusión de aceites esenciales en disco

En este ensayo se observó que todos los AEs fueron efectivos, en mayor o menor medida, frente a *A. alternata* (Fig. 23). En el caso de *M. fructicola* (Fig. 21), todos los AEs salvo el de *M. rotundifolia* tuvieron algún efecto antifúngico. Sin embargo, el resto de los hongos presentaron una mayor resistencia que los dos primeros en este ensayo. *B. cinerea* (Fig. 22) solo fue inhibido por *S. officinalis*. *P. expansum* (Fig. 25) demostró cierta inhibición frente al AE de *O. virens*. Mientras que *R. stolonifer* (Fig. 24) fue muy resistente y no fue afectado en absoluto por ninguno de los AEs.

6.1.2 Dilución de aceites esenciales en medio de cultivo PDA

Todos los hongos fueron inhibidos en este ensayo ante los AEs al 10% de concentración, con la excepción del AE de *S. officinalis*, en cuyas placas se podía visualizar crecimiento de todos los hongos excepto *M. fructicola* (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto inhibitorio del método de dilución en agar de AEs a un 10 % de concentración sobre el crecimiento de los hongos tras una incubación de 144 horas a 24 °C.

144 h	<i>O. virens</i>	<i>M. rotundifolia</i>	<i>S. officinalis</i>	<i>V. officinalis</i>
<i>M. fructicola</i>	X	X	X	X
<i>B. cinerea</i>	X	X	12,58	X
<i>A. alternata</i>	X	X	7,46	X
<i>R. stolonifer</i>	X	X	28,92	X
<i>P. expansum</i>	X	X	10,03	X

X: no hay crecimiento. Resultados expresados en mm.

6.1.3 Dilución en caldo PDB

El MIC más habitual de los AEs contra los patógenos ensayados, *M. fructicola*, *B. cinerea* y *A. alternata*, fue 0,25%, aunque hubo excepciones (Tabla 3). Frente a *M. fructicola*, el AE de *O. virens* y *M. rotundifolia* el MIC fue de 0,125%. Mientras que el *S. officinalis*, *B. cinerea* tuvo un MIC de 0,5%. *A. alternata* mostró tener una mayor resistencia frente a los AEs con unos valores de MIC frente a los AE de *O. virens* y *S. officinalis* de 1%. El ensayo mostró como *A. alternata* es más resistente contra los AEs utilizados que los otros dos hongos testados.

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (MIC) de AEs frente a hongos en PDB tras 72 h a 24 °C.

Especie Hongo	A.E.	1 %	0,5 %	0,25 %	0,125 %	0,0625 %	MIC (%)
M. fructicola	ORE	-	-	-	-	+	0,125
	MEN	-	-	-	-	+	0,125
	SAL	-	-	-	+	+	0,25
	VAL	-	-	-	+	+	0,25
B. cinerea	ORE	-	-	-	+	+	0,25
	MEN	-	-	-	+	+	0,25
	SAL	-	-	+	+	+	0,5
	VAL	-	-	-	+	+	0,25
A. alternata	ORE	-	+	+	+	+	1
	MEN	-	-	-	+	+	0,25
	SAL	-	+	+	+	+	1
	VAL	-	-	-	+	+	0,25

AE: Aceite Esencial. Rojo (-): no presenta crecimiento. Verde (+): presenta crecimiento. ORE: *O. virens*. MEN: *M. fructicola*. SAL: *S. officinalis*. VAL: *V. officinalis*.

En cuanto al MFC, los valores de cada hongo frente a cada AE fueron los mismos que el MIC, a excepción de *M. fructicola* ante el AE de *O. virens* que tuvo un MFC de 0,25% (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración mínima fungicida (MFC) de AEs frente a hongos en PDA tras 72 h a 24 °C.

Especie Hongo	A.E.	1 %	0,5 %	0,25 %	0,125 %	0,0625 %	MFC (%)
M. fructicola	ORE	-	-	-	+	+	0,25
	MEN	-	-	-	-	+	0,125
	SAL	-	-	-	+	+	0,25
	VAL	-	-	-	+	+	0,25
B. cinerea	ORI	-	-	-	+	+	0,25
	MEN	-	-	-	+	+	0,25
	SAL	-	-	+	+	+	0,5
	VAL	-	-	-	+	+	0,25
A. alternaria	ORI	-	+	+	+	+	1
	MEN	-	-	-	+	+	0,25
	SAL	-	+	+	+	+	1
	VAL	-	-	-	+	+	0,25

AE: Aceite Esencial. Rojo (-): no presenta crecimiento. Verde (+): presenta crecimiento. ORE: *O. virens*. MEN: *M. fructicola*. SAL: *S. officinalis*. VAL: *V. officinalis*.

6.1.4 Actividad volátil

Los resultados de este ensayo (Tabla 5) mostraron que *M. fruticola* fue inhibido por los AEs de *M. rotundifolia*, *O. virens*, *S. officinalis* y *V. officinalis*. En el caso de *B. cinerea* y *A. alternata* fueron inhibidos únicamente por los AEs de *O. virens* y *M. rotundifolia*, mientras que los AEs de *S. officinalis* y *V. officinalis* solo ralentizaron el crecimiento de estos hongos. Por otro lado, *P. expansum* y *R. stolonifer* crecieron abundantemente por la placa, salvo con el AE de *M. rotundifolia* ante el cual el primero fue totalmente inhibido y el segundo presentó una leve inhibición.

Tabla 5. Efecto inhibitorio de la Actividad Volátil de AEs frente al crecimiento micelar de hongos en PDA tras 144 h a 24 °C.

144 horas	C-	<i>O. virens</i>	<i>M. rotundifolia</i>	<i>S. officinalis</i>	<i>V. officinalis</i>
<i>M. fruticola</i>	Cont.	X	X	X	X
<i>B. cinerea</i>	52	39	X	52	52
<i>A. alternaria</i>	41,85	10,65	2	21,99	24,17
<i>R. stolonifer</i>	52	17,02	26,1	52	52
<i>P. expansum</i>	52	41	X	40	36

Cont.: Contaminación. X: no hay crecimiento. Resultados expresados en mm.

6.1.5 Germinación de esporas en cultivo DRBC

M. fructicola fue inhibido por todos los AEs a 1 y 0,5% de concentración (Tabla 6, 7, 8 y 9). Sin embargo, los resultados obtenidos no son coherentes ya que en el control negativo presenta menor recuento de UFC que el de los AEs.

En el caso de *B. cinerea* hubo efecto inhibitorio por parte del AE de *O. virens* (Tabla 6) y *M. rotundifolia* al 1% de concentración (Tabla 7). Los otros dos AEs mostraron resultados ante este hongo muy similares al control negativo. *A. alternata* no presentó inhibición de generación de esporas ante los 4 AEs. Fue excepción el 1% de AE de *M. rotundifolia* que hubo resultado nulo.

Tabla 6. Esporulación de hongos en presencia de AE de *O. virens* en DRBC tras 96 h a 24 °C.

96 h [ORE]	C -	1 %	0,5 %	0,1 %	0,01 %
<i>M. fruticola</i>	2,6	3,0	2,7	3,2	2,8
<i>B. cinerea</i>	4,5	2,3	4,1	4,2	4,1
<i>A. alternata</i>	4,4	4,0	4,2	4,4	4,1

Recuentos expresados en Log UFC (Unidades Formadoras de Colonia).

Tabla 7. Esporulación de hongos en presencia de AE de *M. rotundifolia* en DRBC tras 96 h a 24 °C.

96 h [MEN]	C -	1 %	0,5 %	0,1 %	0,01 %
<i>M. fructicola</i>	2,6	2,3	-	3,2	3,0
<i>B. cinerea</i>	4,5	2,7	4,5	4,6	4,2
<i>A. alternata</i>	4,4	-	4,4	4,7	4,2

Recuentos expresados en Log UFC (Unidades Formadoras de Colonia). (-): resultado nulo.

Tabla 8. Esporulación de hongos en presencia de AE de *S. officinalis* en DRBC tras 96 h a 24 °C.

96 h [SAL]	C -	1 %	0,5 %	0,1 %	0,01 %
<i>M. fructicola</i>	2,6	2,5	3,4	3,8	3,9
<i>B. cinerea</i>	4,5	4,7	3,9	4,7	4,7
<i>A. alternata</i>	4,4	4,2	4,2	4,1	3,7

Recuentos expresados en Log UFC (Unidades Formadoras de Colonia) (-): resultado nulo.

Tabla 9. Esporulación de hongos en presencia de AE de *V. officinalis* en DRBC tras 96 h a 24 °C.

96 h [VAL]	C -	1 %	0,5 %	0,1 %	0,01 %
<i>M. fructicola</i>	2,6	2,3	2,0	3,9	3,8
<i>B. cinerea</i>	4,5	4,7	4,7	4,4	3,4
<i>A. alternata</i>	4,4	4,4	4,3	4,3	4,0

Recuentos expresados en Log UFC (Unidades Formadoras de Colonia).

6.2 Capacidad fungicida de los AEs *In vivo*

En el ensayo *in vivo*, se midió con un pie de rey digital los diámetros (mm) de las heridas en los frutos provocadas por los microorganismos inoculados. Estas medidas se realizaron en los días 3, 7 y 10 del ensayo. Supusieron una excepción las manzanas infectadas con *R. stolonifer* del Experimento 2, de las cuales se tomaron medidas de sus heridas el día 3, 5 y 7. Esto se debió a que en el Experimento 1, a partir del día 7 *R. stolonifer* colonizaba por completo los frutos infectados con el mismo. Estas mediciones no permitían vislumbrar una diferencia notable entre tratamientos y controles (Fig. 12), lo que hacía a *R. stolonifer* un sujeto de pruebas difícil del que obtener resultados. Este crecimiento y forma de esporulación coincidía al completo con lo descrito por otros autores (Yang y Jiang, 2015; Alizadeh-Salteh et al., 2010), suponiendo un grave problema al que hubo que estar muy pendiente para evitar contaminaciones cruzadas.

Figura 12. Manzanas inoculadas con 20 μl de una suspensión de 10^4 esporas de *R. stolonifer*; y 30 μl de Control negativo 1 (herida izqda.), diluyente; y 30 μl de Control negativo 2 (herida drcha.), agua destilada estéril. Días transcurridos tras la inoculación: 7.



Los resultados obtenidos del Experimento 1 y durante el Experimento 2 fueron comparados y analizados junto a las fotografías tomadas cada día de medición. Esto permitió descartar las mediciones que pudieran ser erróneas debido a una contaminación externa por parte de otro microorganismo.

En el caso de *A. alternata* al final del Experimento 1, el AE de *M. rotundifolia* al 5% fue el tratamiento con mayor efecto (Fig. 17). El resto de los tratamientos frente a este hongo obtuvieron una efectividad inferior al control positivo y de los controles negativos. Sin embargo, en el Experimento 2, contra este microorganismo el AE de *M. rotundifolia* al 5% fue el tratamiento con menor efecto en el día 10. En este segundo experimento todos los tratamientos sin excepción demostraron una eficacia menor que el control positivo y el control negativo 2 (agua estéril).

En el caso de *B. cinerea*, en el Experimento 1 se pudo observar que todos los tratamientos a excepción del AE de *M. rotundifolia* al 0,5% presentaron una actividad antifúngica mayor que los controles negativos (Fig. 17). Los diámetros de herida de los frutos tratados con estos AEs se concentraban en el rango de 0 a 20 mm. Fue diferente en el Experimento 2, donde los únicos tratamientos con un efecto mayor a los controles negativos son el AE de *V. officinalis* al 5% y el AE de *O. virens* al 5%, siendo este último el único que sus resultados del día 7 se sitúan por debajo de los 20 mm. En ambos experimentos ningún aceite superó la efectividad del control positivo, aunque entre ellos el AE de *O. virens* al 5% fue el que más se aproximó a la efectividad del fungicida sintético (Fig. 13 y 14).

Figura 13. Manzanas inoculadas con 20 μl de una suspensión de 10^4 esporas de *B. cinerea*; y 30 μl de AE *O. virens* al 0,5% (herida izqda.) y 30 μl de AE *O. virens* al 5% (herida drcha.). Días transcurridos tras la inoculación: 10. Experimento 1.



Figura 14. Manzanas inoculadas con 20 μl de una suspensión de 10^4 esporas de *B. cinerea*; y 30 μl de una suspensión de Thiuram a 5 mg/l. Días transcurridos tras la inoculación: 10. Experimento 1.



En el caso de *M. fructicola*, en el Experimento 1 los tratamientos con mayor efecto fueron el AE de *V. officinalis* al 5% y el AE de *O. virens* al 5%, con mayor efectividad que el control positivo. El AE de *M. rotundifolia* al 0,5% fue el único con menor efectividad que los controles negativos. Sin embargo, en el Experimento 2 (Fig. 17), los tratamientos y controles contra *M. fructicola* presentaron medidas que se encontraban entre los 4 y 12 mm. En este caso, el fungicida de elección presentó heridas de un diámetro mayor que los controles negativos.

En el caso de *P. expansum*, en ambos experimentos el AE de *M. rotundifolia* al 5% fue el de mayor efectividad, incluso más que el control positivo (Fig. 15 y 16). El resto de los tratamientos en el Experimento 1 presentaron resultados muy similares entre ellos y a los controles; mientras

que en el Experimento 2, el AE de *O. virens* al 5% y el AE de *M. rotundifolia* al 0,5% presentaron diámetros de herida menores a los controles negativos. Estos últimos AEs demostraron en el Experimento 2 un efecto muy similar al control positivo, el cual durante el día 3 y 7 fue el más efectivo (Fig. 17).

Figura 15. Manzanas en las que se ha inoculado 20 μ l de una suspensión de 10^4 esporas de *P. expansum*; y 30 μ l de AE *M. rotundifolia* al 0,5% (herida izqda..) o 30 μ l de AE *M. rotundifolia* al 5% (herida drcha..). Días transcurridos tras la inoculación: 10. Experimento 1.

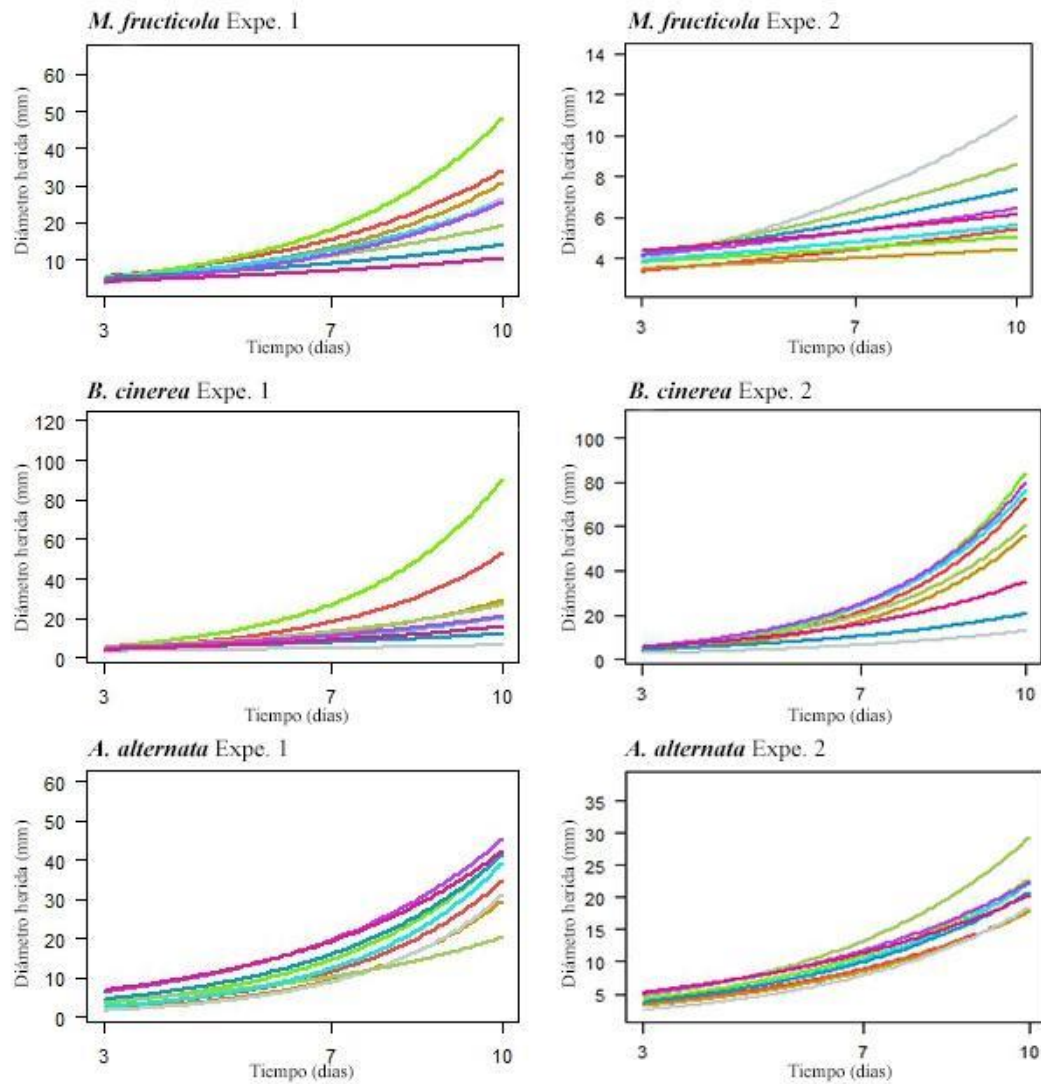


Figura 16. Manzanas en las que se ha inoculado 20 μ l de una suspensión de 10^4 esporas de *P. expansum*; y 30 μ l de una suspensión de Thiuram a 5 mg/l. Días transcurridos tras la inoculación: 10. Experimento 1.



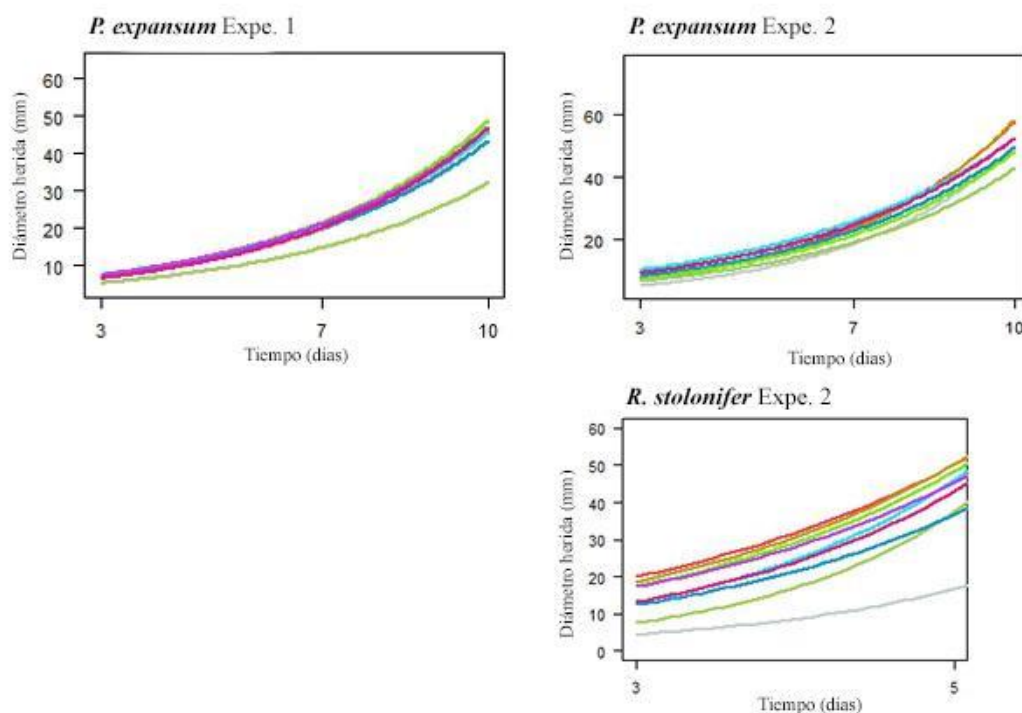
En el caso de *R. stolonifer*, los únicos resultados obtenidos son del Experimento 2 como se ha explicado anteriormente. Ningún AE tuvo mayor efecto antifúngico que el fungicida de elección (Fig. 17). Aun así, entre todos los AE el de *M. rotundifolia* al 5% y el de *O. virens* al 5% fueron los que demostraron mayor efecto contra *R. stolonifer*.

Figura 17. Evolución predicha por el modelo estadístico del diámetro de herida provocada por el hongo en el fruto, en función del hongo inoculado y del número de días transcurridos desde la inoculación.



●: Control Negativo 1, diluyente y agua estéril. ●: Control Negativo 2, Agua estéril. ●: Control positivo, TIRAM y diluyente. ●: AE de *O. virens* al 0,5%. ●: AE de *O. virens* al 5%. ●: AE de *M. rotundifolia* al 0,5%. ●: AE de *M. rotundifolia* al 5%. ●: AE de *V. officinalis* al 0,5%. ●: AE de *V. officinalis* al 5%. Expe. 1: Experimento 1. Expe. 2: Experimento 2.

Figura 17. (Continúa)



●: Control Negativo 1, diluyente y agua estéril. ●: Control Negativo 2, Agua estéril. ●: Control positivo, TIRAM y diluyente. ●: AE de *O. virens* al 0,5%. ●: AE de *O. virens* al 5%. ●: AE de *M. rotundifolia* al 0,5%. ●: AE de *M. rotundifolia* al 5%. ●: AE de *V. officinalis* al 0,5%. ●: AE de *V. officinalis* al 5%. Expe. 1: Experimento 1. Expe. 2: Experimento 2.

Se pudo comprobar que en cada experimento no hubo diferencias grandes entre el control negativo 1 y el control negativo 2 (Fig. 18). Es excepción en ambos experimentos *B. cinerea*, el cual ante agua estéril obtuvo menor diámetro de herida al día 10 que ante la presencia de un 3% de etanol. *R. stolonifer* demostró un crecimiento bastante superior al resto de hongos ante ambos controles negativos.

En el caso del fungicida de elección, el control positivo, *M. fructicola* y *A. alternata* demuestran un crecimiento más mermado en el Experimento 2 que en el primero. *P. expansum* fue el hongo contra el que menor actividad antifúngica demostró el fungicida. Por otro lado, el control positivo demostró ser bastante efectivo contra el crecimiento de *R. stolonifer* durante los primeros 5 días.

El tratamiento con AE de *M. rotundifolia* al 0,5%, tuvo menor efecto contra *B. cinerea* y *R. stolonifer* (Fig. 18). En el Experimento 1 mostró una efectividad diferente que en el Experimento 2 frente a *M. fructicola* y *A. alternata* (una diferencia de diámetro de heridas de hasta

aproximadamente 20 mm), pero *P. expansum* y *B. cinerea* presentaron la misma respuesta entre el Experimento 1 y el Experimento 2.

El tratamiento con AE de *M. rotundifolia* al 5% fue más efectivo contra *M. fructicola* y *A. alternata*. En ambos experimentos los resultados de este tratamiento son muy similares (Fig. 18). Es excepción *B. cinerea*, cuyos valores en el Experimento 2 son un poco más elevados que en el primero; y *M. fructicola*, que en el Experimento 2 parece volverse aún más sensible al susodicho AE. Por otro lado, *R. stolonifer* no llega a alcanzar los 40 mm de diámetro de herida el día 5 del Experimento 2.

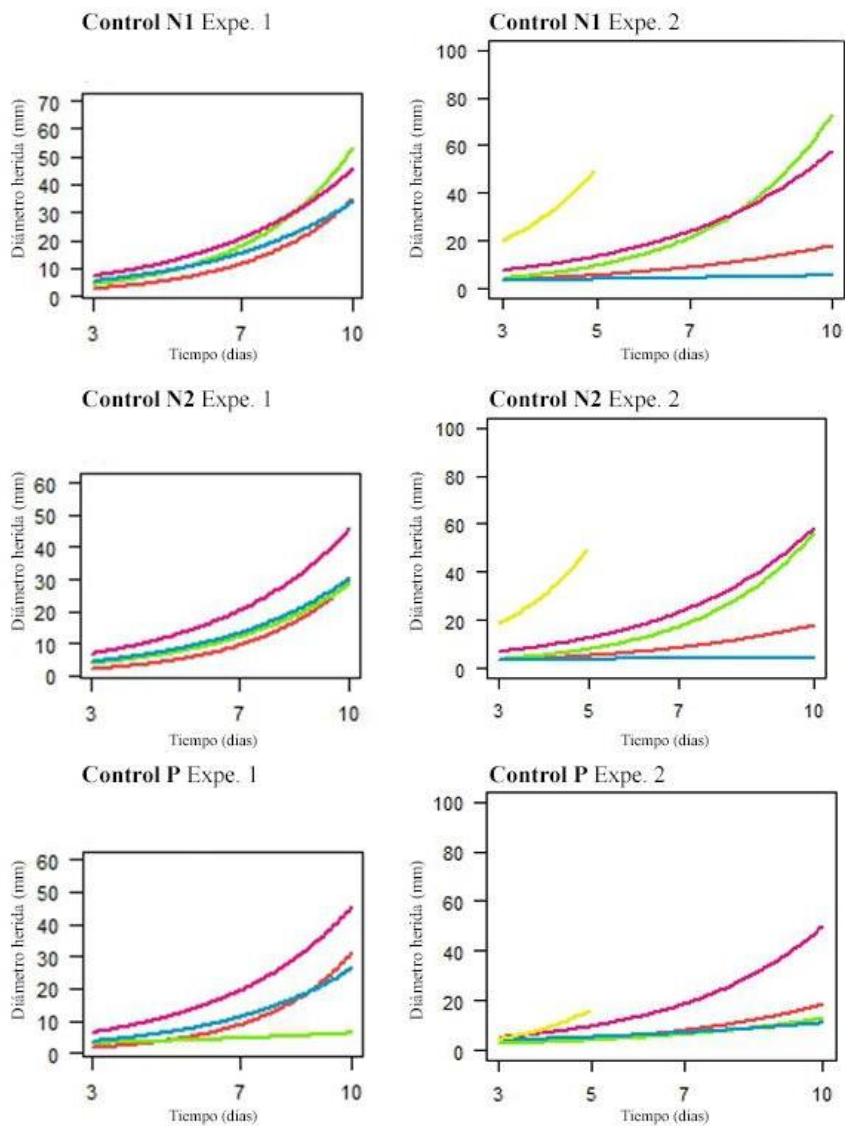
El tratamiento con AE de *O. virens* al 0,5% obtuvo diferentes respuestas entre experimentos (Fig. 18). El único factor en común es el efecto contra *P. expansum*, el cual es muy leve. En el Experimento 2 *B. cinerea* presenta un crecimiento elevado del diámetro de las heridas a partir del día 7 y *M. fructicola* produjo heridas más pequeñas. Mientras que *A. alternata* presenta el día 10 de este experimento un diámetro de herida aprox. 20 mm menor que los del Experimento 1.

El tratamiento con AE de *O. virens* al 5% fue más efectivo contra *M. fructicola* y contra *B. cinerea*, cuyos diámetros de herida no superan los 20 mm (Fig. 18). Todos los resultados respecto a este tratamiento son muy similares entre el Experimento 1 y el Experimento 2, siendo el menos afectado *R. stolonifer*, el cual no llega a alcanzar los 40 mm. Aunque *R. stolonifer* ante el tratamiento de *O. virens* al 0,5% sí que sobrepasó los 40 mm al quinto día.

El tratamiento con AE de *V. officinalis* al 0,5% presenta grandes diferencias entre experimentos al igual que el AE de *O. virens* al 0,5% (Fig. 18). Las grandes diferencias observadas en el Experimento 2, es la poca eficacia contra *B. cinerea*, siendo de los más afectados en el primer experimento; y la gran eficacia contra *A. alternata* que (al igual que en el tratamiento con *O. virens* al 0,5%) presenta heridas de hasta aprox. 20 mm menores que las del Experimento 1. El factor común para este tratamiento es su mayor efectividad contra *M. fructicola* y los valores aproximados de 40 mm de diámetro de herida por aparte de *P. expansum*.

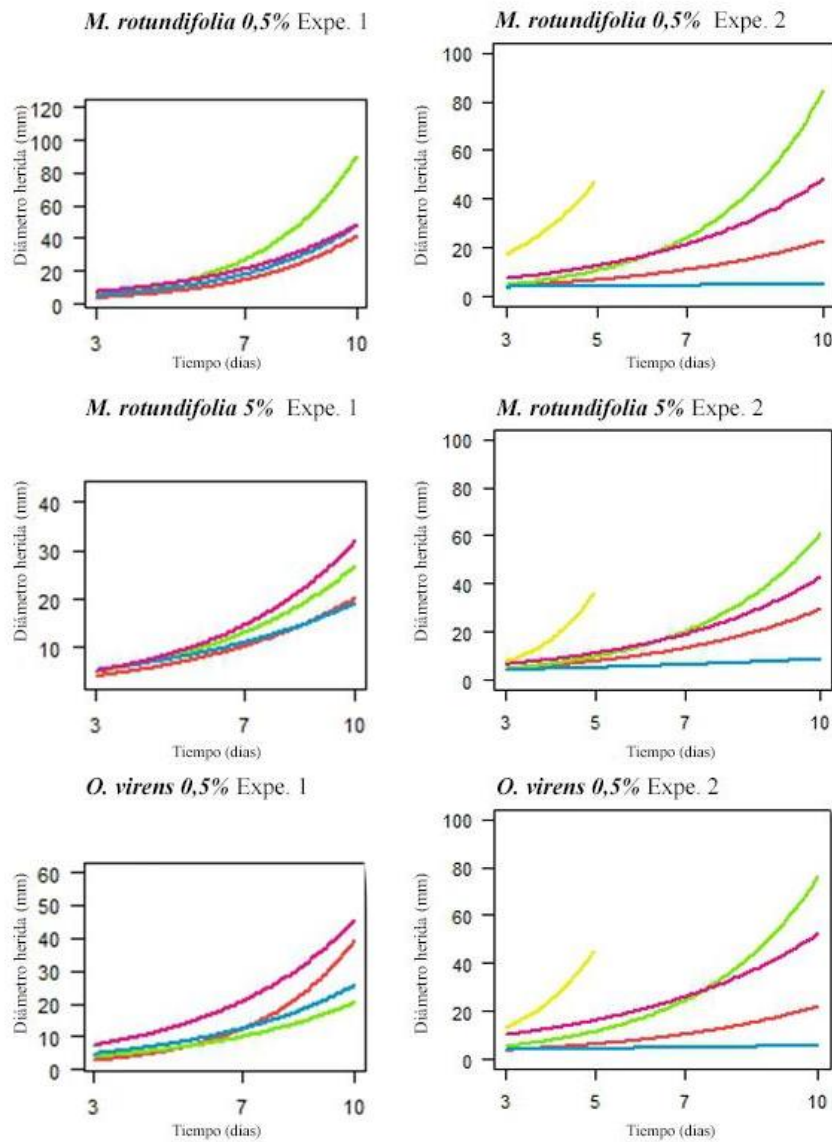
El tratamiento con AE de *V. officinalis* al 5% presenta resultados muy similares que en el tratamiento con el mismo AE a una concentración de 0,5% (Fig. 18). La única diferencia es la constante efectividad entre Experimento 1 y Experimento 2 contra *B. cinerea*. Aunque este microorganismo, a diferencia del primer experimento, el día 10 del Experimento sus heridas superaron los 20 mm.

Figura 18. Evolución predicha por el modelo estadístico del diámetro de herida provocada por el hongo en el fruto, en función del tratamiento o control aplicado y del número de días transcurridos desde la inoculación.



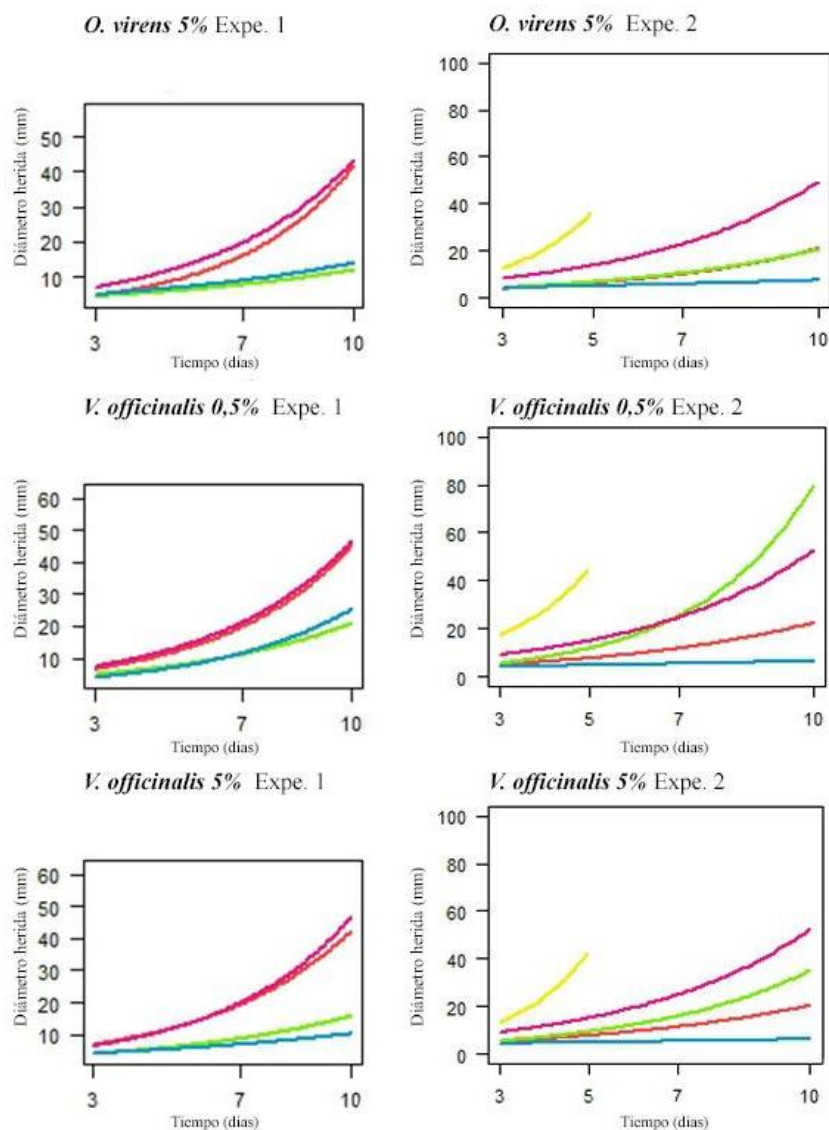
■: *M. fructicola*. ■: *B. cinerea*. ■: *A. alternata*. ■: *R. stolonifer*. ■: *P. expansum*. Expe. 1: Experimento 1. Expe. 2: Experimento 2. Control N1: Control Negativo 1, diluyente y agua estéril. Control N2: Agua estéril. Control P: Control positivo, TIRAM y diluyente.

Figura 18. (Continúa).



■: *M. fructicola*. ■: *B. cinerea*. ■: *A. alternata*. ■: *R. stolonifer*. ■: *P. expansum*. Expe. 1: Experimento 1. Expe. 2: Experimento 2.

Figura 18. (Continúa).



●: *M. fructicola*. ●: *B. cinerea*. ●: *A. alternata*. ●: *R. stolonifer*. ●: *P. expansum*. Expe. 1: Experimento 1. Expe. 2: Experimento 2.

7 DISCUSIÓN

7.1 *In vitro*

En el ensayo de difusión de AE en PDA se demostró que un 10% de concentración de los AE inhibió al completo el crecimiento y esporulación de los hongos. Fue excepción, como se ha mencionado anteriormente, el AE de *S. officinalis*. El resto de los AEs en contacto estrecho con el patógeno a esa concentración fueron totalmente eficaces con crecimiento 0 de parte de los hongos. Por otro lado, en otras investigaciones (Ozcakmak et al., 2016) obtuvieron el mismo

efecto frente a *Penicillium verrucosum* pero utilizando solo un 0,25% de concentración del AE de *Origanum onites* L. (durante 8 días) o *Mentha piperita* L (durante 6 días).

Ante los resultados anteriores se decidió hallar la concentración de AE necesaria para la inactivación de los hongos. Mediante los resultados de los ensayos de dilución en caldo PDB y de cultivo en DRBC se pudo observar que en el primero el valor de MIC y MFC se encontraba entre el 0,25 y 1%, y en el segundo se necesitaba un 1% de AE para ver un descenso de la generación de esporas. Se ha demostrado mediante cultivo en PDA un MIC de 0,02 µl/ml por parte de *Origanum vulgare* frente al crecimiento micelar y esporulación de *B. cinerea* (Vitoratos et al., 2013), unos valores muy alejados de los obtenidos en este TFM. De *Mentha piperita* sí que se han mostrado valores MIC frente a *B. cinerea* y *R. stolonifer* más cercanos a los obtenidos en esta investigación, de más de un 0,1% (Hadian et al., 2008). Ante los datos anteriores y ante lo obtenido en los ensayos descritos de la parte *in vitro* de este TFM se decidió utilizar unas concentraciones de AE en la parte *in vivo* más cercanas al valor de 1% que de 10%, el cual había demostrado ser excesivo.

A. alternata mostró en los ensayos *in vitro* de esta investigación una mayor resistencia que *M. fructicola* y *B. cinerea* ante todos los AEs, en el caso del cultivo en DRBC; y frente a *O. virens* y *S. officinalis*, en el caso del cultivo en PDB. Otros autores demostraban también que *A. alternata* era bastante resistente por parte de *A. alternata* al AE de *Origanum majorana* durante 7 días, necesitando una concentración al 1 % para conseguir aprox. entre un 75 y 90% de inhibición del crecimiento micelar (Moumni et al., 2021). Aunque, estos últimos autores sí que obtuvieron un efecto fungicida al 100 % contra este mismo hongo utilizando otro AE, *Cymbopogon citratus*, a una concentración menor, de 0,8%.

En cuanto a qué aceites demostraron mayor efectividad *in vitro*, *O. virens*, *V. officinalis* y *M. rotundifolia* tuvieron efectos antifúngicos importantes y claros sobre *M. fructicola* y *B. cinerea*. Por el contrario, el AE de *S. officinalis* mostró una actividad antifúngica menor que el resto de los AEs tanto en el ensayo de dilución en caldo PDB y cultivo DRBC incluso este mismo AE en el ensayo de difusión de AE en PDA fue el único que a un 10% de concentración no consiguió inhibir por completo el crecimiento de los hongos (a excepción de *M. fructicola*). En otras investigaciones se ha demostrado también una muy baja efectividad *in vitro* por parte del AE *S. officinalis* ante el crecimiento de *R. stolonifer* (Alizadeh-Salteh et al., 2010) y ante el crecimiento de *P. verrucosum* (Ozcakmak et al., 2016). Aun siendo que el género *Rhizopus* y *Penicillium* habían demostrado una gran resistencia ante todos los AEs en los primeros ensayos de este TFM, no se desestimaron los resultados de estos últimos artículos y se decidió prescindir del AE de *S. officinalis* para la parte *in vivo* de la investigación.

Como se ha mencionado anteriormente, *R. stolonifer* y *P. expansum* demostraron un crecimiento bastante elevado durante tres ensayos de la parte *in vitro* de este TFM. Al demostrar la baja capacidad antifúngica de los AEs frente a estos hongos y la elevada capacidad de esporulación del primero, fueron descartados estos hongos para el ensayo en caldo PDB y el de esporulación en DRBC. Otras investigaciones también demostraron esta misma resistencia por parte de *P. expansum* ante AEs como *Solidago canadensis* (Elshafie et al., 2019); y de parte de *R. stolonifer* ante el AE de *Cymbopogon citratus* L (Tzortzakis y Economakis, 2007) o ante el AE de *M. piperita* (Hadian et al., 2008). Sin embargo, en la investigación de Hadian et al. (2008) sí mostraba susceptibilidad ante el AE de *Lavandula angustifolia* y *Foeniculum vulgare*. A su vez otros autores demostraron que estos dos hongos no poseían una resistencia equiparable a la obtenida en la parte *in vitro* de este TFM. En estos artículos se obtuvieron resultados como que tanto *P. expansum* como *R. stolonifer* eran inhibidos al 100% por el AE de *Melissa officinalis* a concentración de 1 y 2 μl /disco respectivamente (El Ouadi et al., 2017); que *R. stolonifer* no mostraba ser más resistente que *B. cinerea* ante AE de tomillo (Plotto, Roberts, D.D. y Roberts, R.G., 2003); o que para inhibir el crecimiento de *R. stolonifer* al 100% se necesitaron 200 ppm de AE de *Syzygium aromaticum* (Sameza et al., 2016). Por todo ello, en vez de prescindir de *R. stolonifer* y de *P. expansum* se decidió posponer su observación para la parte *in vivo* de esta investigación.

Por otro lado, en el mismo artículo de Alizadeh-Salteh et al. (2010) se muestran resultados bastante satisfactorios de la capacidad antifúngica de los vapores del AE *S. officinalis* ante *R. stolonifer*. Esto último se contrapone a los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* de este TFM, donde los vapores de *S. officinalis* no mostraron de forma clara una capacidad antifúngica. En otros artículos se experimentó con la capacidad antifúngica de otros AEs, demostrando que la fracción volátil del AE de *Melissa officinalis* era capaz de inhibir el crecimiento de *B. cinerea*, *P. expansum*, y *R. stolonifer* inoculado en discos de papel a una concentración de 40 μl , 80 μl y 160 μl respectivamente (El Ouadi et al., 2017). Otros investigadores (Yan et al., 2020) demostraron que al cabo de 72 horas los vapores del AE de *Mentha piperita* a 150 $\mu\text{l/L}$ inhibían al 95% el crecimiento micelar de *R. stolonifer*. Sin embargo, en el experimento realizado en este TFM sobre la actividad volátil de los AEs objetivos, el único que demostró un efecto antifúngico fue el de *Mentha rotundifolia*. Este AE aun habiendo sido inoculado en los discos de papel a una concentración del 100%, al cabo de 144 horas solo había inhibido en un 50 % el crecimiento de *R. stolonifer*. Por esto último, se presupuso que los vapores de la mayoría de los AEs utilizados no tenían un efecto antifúngico importante en las concentraciones que se iban a utilizar. Debido a que la efectividad volátil de los aceites no era de importancia relevante, en la parte *in vivo* de

esta investigación se decidió mantener en el mismo arcón las cajas de frutos infectados con el mismo microorganismo, pero con diferente tratamiento de AE, para de esta forma facilitar la logística del experimento.

En el caso de *M. fructicola*, este fue el hongo más susceptible a los tratamientos ensayados durante la parte *in vitro*. Estos resultados no acabaron de ser muy fiables debido a lo observado en el ensayo en DRBC, donde el control negativo de *M. fructicola* presentaba menor UFC que en los tratados con AE. Por lo tanto, la capacidad antifúngica del AE de *S. officinalis* mostrada contra *M. fructicola* en los ensayos *in vitro* de este TFM se pusieron en duda. Estos resultados podrían deberse a la propia cepa de referencia y no al tratamiento con AE, lo cual se puso a prueba en la parte *in vivo* frente a otros tratamientos y controles. Otros autores consiguieron inhibir de forma satisfactoria el crecimiento de este hongo utilizando compuestos activos de AEs como el Tymol y el Carvacrol (Elshafie et al., 2015) o usando AE de *S. canadensis* (Elshafie et al., 2019), tratamiento en el cual *M. rotundifolia* fue el hongo más afectado. En otros casos se demostraba la efectividad de 800 µl/L de AE de lavanda frente *M. fructicola* (Xiong et al., 2021) o consiguieron más de un 90% de inhibición *in vitro* por parte del AE de limón al 0,5% frente a este mismo hongo (Mitidieri et al., 2021). Por lo tanto, en este TFM se supuso en un principio que el comportamiento anómalo de *M. fructicola* durante el ensayo de DRBC se podría deber a algún error humano, y se pospusieron las conclusiones sobre este hongo para la parte *in vivo*.

7.2 *In vivo*

Tras obtener los resultados de la parte *in vitro* de la investigación realizada durante este TFM, se decidió usar durante la parte *in vivo* un 5 y 0,5% de concentración de los AEs de *M. rotundifolia*, *O. virens* y *V. officinalis* frente a los 5 hongos objetivos. Se decidió la concentración de 0,5% debido a los resultados comentados anteriormente, y la concentración de 5% para asegurar resultados en caso de que la matriz alimentaria influyera negativamente en la eficacia de los AEs. En diversas investigaciones al utilizar AEs *in vivo* obtuvieron resultados satisfactorios con concentraciones menores a las propuestas en este TFM, como un 100% de inhibición de *B. cinerea* y *R. stolonifer* usando 1000 µl/l de *Lavandula angustifolia* (Hadian et al., 2008); o contra *Alternaria* en tomate usando 5000 mg/l de *Thymus capitatus* (Plotto, Roberts, D.D. y Roberts, R.G., 2003). Por otro lado, otras investigaciones solo consiguieron un 20% de inhibición de *B. cinerea* al usar 1500 ppm de *Zataria multiflora* en fresas (Mohammadi, Hashemi y Hosseini, 2015).

Respecto a los controles negativos utilizados en la parte *in vivo*, se pudo comprobar efectivamente que el etanol al 3% de concentración no tenía un efecto fungicida y, por lo tanto, no alteraba los resultados de los AEs.

Los únicos tratamientos observados en este ensayo que pueden suponer una alternativa a los fungicidas convencionales fueron el AE de *M. rotundifolia* al 5% contra *A. alternata* y *P. expansum*; y el AE de *V. officinalis* al 5% y de *O. virens* al 5% contra *M. fructicola*. Estos resultados mencionados anteriormente fueron observados durante el Experimento 1. Sin embargo, *A. alternata* y *M. fructicola* en el Experimento 2 mostraron resultados diferentes frente a estos mismos tratamientos. La diferencia entre experimentos en el caso de *A. alternata* aparece únicamente en la Figura 18 derivada del análisis estadístico, mientras que ni en la Figura 17 ni observando los datos del ensayo sin tratar (no incluidos) se encuentra esta anomalía, sino que se mantiene el efecto fungicida del AE de *M. rotundifolia* al 5%.

En los ensayos *in vitro* de este TFM *A. alternata* no demostró de forma clara susceptibilidad frente a los AEs testados. Otros autores mostraban la resistencia de este microorganismo *in vivo* ante el AE de *Thymus vulgaris* a 1000 µg/ml (Perina et al., 2014). En el caso del ensayo *in vivo* de este TFM, este hongo sí demostró una gran susceptibilidad ante un AE, el cual fue el de *M. rotundifolia* al 5% como se mencionó anteriormente.

El crecimiento anómalo en el Experimento 2 de *M. fructicola* sin embargo podría ser el crecimiento habitual de la cepa de referencia utilizada. Esto se debe a que en el Experimento 1 se inocularon aprox. 200 µl de la suspensión de este microorganismo en el Control negativo y Control positivo por un error de la micropipeta utilizada. Esta puede ser la razón detrás de que los controles negativos de *M. fructicola* muestren resultados superiores al resto de tratamientos en el Experimento 1. Sin embargo, los frutos del Experimento 1 tratados con AEs fueron inyectados con 20 µl del inóculo de *M. fructicola* y mostraron resultados muy superiores al Experimento 2. *M. fructicola* demostró en la parte *in vitro* de esta investigación ser bastante susceptible ante la presencia de AE y poseer un crecimiento ralentizado. Esto último se asemeja a los resultados comentados del Experimento 2 de la parte *in vivo*. Como se mencionó anteriormente, diferentes autores trataban *M. fructicola* sin encontrar resultados tan extraños como los obtenidos en el ensayo en DRBC de la parte *in vitro* y en el ensayo de la parte *in vivo* de este TFM. La susceptibilidad hacia los tratamientos de AE demostrada por *M. fructicola* coincide con otros artículos (Elshafie et al., 2015 y 2019; Xiong et al., 2021; Mitidieri et al., 2021) pero ésta podría deberse a un problema de crecimiento de la cepa de referencia o una contaminación de esta.

En el caso de *P. expansum*, en la parte *in vitro* de este trabajo fin de máster demostró una gran resistencia ante los AEs testados. Como se ha mencionado anteriormente, en la parte *in vivo* se mostraba como el AE de *M. fructicola* al 5% tenía mayor efecto fungicida que el fungicida de elección. A su vez, incluido ante el control positivo, el diámetro de heridas provocadas por este hongo alcanza aprox. el día 10 el valor de 50 mm. De esto último es excepción *M. rotundifolia* al 5%, donde solo llega a alcanzar aprox. 30 mm. Por lo tanto, frente *P. expansum* el AE de *M. rotundifolia* a un 5% de concentración podría ser una alternativa al fungicida elegido. Mediante el ensayo de dilución en disco se ha demostrado una baja eficacia por parte del AE de *Mentha piperita* contra *Penicillium* spp. (Mironescu y Georgescu, 2008). Sin embargo, otros artículos consiguieron inhibir *P. expansum* mediante el uso de *M. officinalis* (El Ouadi et al., 2017) y resultados similares al de este TFM usando *M. piperita* frente *Penicillium verrucosum* (Ozcakmak et al., 2016).

Frente a *R. stolonifer* y *B. cinerea* ninguno de los AEs examinados durante el ensayo *in vivo* tuvo mayor efectividad que el fungicida de elección. En el caso de *R. stolonifer* el único agente con efecto fungicida ante este hongo es el fungicida de elección. El AE de *M. rotundifolia* al 5% y el de *O. virens* al 5% demostraron un mayor efecto contra este microorganismo que el resto de AEs, pero siguen teniendo menor efectividad que el control positivo. Lo cual coincide con los ensayos *in vitro* de este TFM, donde se demostró la alta resistencia de *R. stolonifer* a los AEs. Como se ha mencionado anteriormente, otros autores han obtenido resultados satisfactorios contra este hongo utilizando AEs como la *M. spicata* (Yan et al., 2020; Filho et al., 2021) u *O. vulgare* L. junto con chitosan (Dos Santos et al., 2012). Resultados que no se han podido plasmar en este TFM.

Aunque en el Experimento 1 *B. cinerea* mostró susceptibilidad ante los tratamientos con AEs, durante el Experimento 2 provocó en la mayoría de los frutos heridas de mayor tamaño que los demás hongos, a excepción de *R. stolonifer*. A esta afirmación los resultados no fueron similares ante el control positivo y ante el AE de *O. virens* al 5%. Por ende, el AE de *O. virens* al 5% es el tratamiento más efectivo y similar al efecto antifúngico del fungicida de control. En otras matrices alimentarias como fresas (Vitoratos et al., 2013) o uvas (Jacometti, Wratten y Walter, 2010) también se ha destacado la satisfactoria capacidad antifúngica del AE de *O. vulgare* L. frente a este mismo hongo.

8 CONCLUSIONES

1. El contacto directo con los AEs de *M. rotundifolia*, *O. virens* y *V. officinalis* manifestó ser el método *in vitro* más efectivo a la hora de inactivar los hongos testados. El uso de un 10% de concentración de AEs resultó ser excesivo.
2. *M. fructicola* exhibió un crecimiento anómalo o una gran sensibilidad a los AEs utilizados.
3. Los resultados obtenidos frente a *A. alternata* no fueron totalmente concluyentes, aunque, el AE de *M. rotundifolia* fue el que mayor eficacia presentó en la parte *in vivo*.
4. Contra *B. cinerea*, el único AE que mostró una efectividad de forma consistente fue *O. virens* al 5%, pudiendo suponer una alternativa a los fungicidas.
5. *R. stolonifer* manifestó, durante todos los ensayos, una gran resistencia ante los AEs utilizados. Ninguno de los tratamientos es eficaz como alternativa a los fungicidas ante este microorganismo.
6. Aunque los resultados no son totalmente consistentes, el AE de *M. rotundifolia* a un 5%, podría suponer una alternativa a los fungicidas químicos frente a *P. stolonifer*.
7. En general, el AE de *S. officinalis* no presentó una capacidad antifúngica suficiente, siendo la menor de todos los AEs investigados.
8. Los AE de *M. rotundifolia* y *O. virens* fueron los AEs más eficaces en los ensayos *in vitro*, mientras que en los ensayos *in vivo*; el AE de *M. rotundifolia* fue el único que mostró de forma consistente ser un tratamiento alternativo a los fungicidas.
9. El uso de AEs puede ser una alternativa comercial frente al uso de fungicidas convencionales de origen químico. Sin embargo, es necesario profundizar en el conocimiento respecto a las concentraciones y forma de aplicación de los AEs para obtener resultados extrapolables a su uso de forma comercial.

CONCLUSIONS

1. Direct contact with the AEs of *M. rotundifolia*, *O. virens* and *V. officinalis* proved to be the most effective *in vitro* method to inactivate the fungi tested. The use of 10% concentration resulted in being excessive.
2. *M. fructicola* showed anomalous growth or high sensitivity to the AEs used.
3. Results against *A. alternata* were not conclusive, although, *M. rotundifolia* EO showed the higher efficacy in the *in vivo* part.
4. Against *B. cinerea* the only EO that showed sound effectiveness was *O. virens* at 5%, which could be an alternative to fungicides.
5. *R. stolonifer* showed a high resistance to all the EO used in all the trials. None of the treatments is effective as an alternative to fungicides against this micro-organism.
6. Although the results are not entirely consistent, 5% EO from *M. rotundifolia* could be an alternative to chemical fungicides against *P. stolonifer*.
7. Overall, *S. officinalis* EO showed a lower antifungal capacity than the other EOs.
8. *M. rotundifolia* and *O. virens* were the most effective EOs in the *in vitro* trials, while in the *in vivo* ones, the EO of *M. rotundifolia* was the only one that proved to be an alternative treatment to fungicides.
9. The use of AEs can be a commercial alternative to the use of conventional fungicides of chemical origin. However, more research is needed on the concentrations and application of AEs in order to obtain results that can be extrapolated to their commercial use.

Comunicaciones Científicas

NOTA: La parte in vitro de este Trabajo Fin de Máster se ha presentado en el III Congreso Cyta-CESIA Junior 2022 en formato póster (Fig. 26).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación del Grupo de Cooperación FrutAE del Programa de Desarrollo Rural para Aragón 2014-2020 (Convocatoria 2021). El autor agradece al Dr. Sergi García Barreda (CITA) por su ayuda con el análisis estadístico de los datos.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Abi Tarabay, P., Chahine-Tsouvalakis, H., Tohmé Tawk, S., Nemer, N. y Habib, W. (2018). "Reduction of food losses in Lebanese apple through good harvesting and postharvest practices". *Annals of Agricultural Sciences*, 63(2), pp. 207–213. doi:10.1016/j.aos.2018.11.006.
- Alizadeh-Salteh, S., Arzani, K., Omidbeigi, R. y Safaie, N. (2010). "Essential Oils Inhibit Mycelial Growth of *Rhizopus stolonifer*". *Europ.J.Hort.Sci*, (6), pp. 1611–4426. Disponible en: <https://www.pubhort.org/ejhs/2010/2005797.htm> [Consultado 8-4-2022].
- Amrollah, N. y Hosein, M. (2013). "Evaluation of the antifungal activity of the Iranian thyme essential oils on the postharvest pathogens of Strawberry fruits". *African Journal of Biotechnology*, 10(48), pp. 9864–9869. doi:<https://doi.org/10.5897/ajb10.2018>.
- Atares, M. (2021). *Valorización de extractos de plantas aromáticas cultivadas y silvestres de Aragón como inhibidores de crecimiento de la microbiota asociada a la trufa negra (Tuber melanosporum) y otras bacterias patógenas*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza.
- Bautista-Baños, S., Sivakumar, D., Bello-Pérez, A., Villanueva-Arce, R. y Hernández-López, M. (2013). "A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain". *Crop Protection*, 49, pp. 8–20. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.011>.
- Bondonno, N.P., Bondonno, C.P., Ward, N.C., Hodgson, J.M. y Croft, K.D. (2017). "The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds". *Trends in Food Science & Technology*, 69, pp.243–256. doi:10.1016/j.tifs.2017.04.012.
- Bosquez-Molina, E., Jesús, E.R., Bautista-Baños, S., Verde-Calvo, J.R. y Morales-López, J. (2010). "Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings". *Postharvest Biology and Technology*, 57(2), pp. 132–137. doi:<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.03.008>.
- Camele, I., Altieri, L., De Martino, L., De Feo, V., Mancini, E. y Rana, G.L. (2012). "In Vitro Control of Post-Harvest Fruit Rot Fungi by Some Plant Essential Oil Components". *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), pp. 2290–2300. doi:10.3390/ijms13022290.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N. y Polissiou, M.G. (2003). "The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*". *Crop Protection*, 22(1), pp. 39–44. doi:[https://doi.org/10.1016/s0261-2194\(02\)00095-9](https://doi.org/10.1016/s0261-2194(02)00095-9).

- Dai, Y., Wang, Z., Leng, J., Sui, Y., Jiang, M., Wisniewski, M., Liu, J. y Wang, Q. (2021). "Eco-friendly management of postharvest fungal decays in kiwifruit". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(30), pp. 8307–8318. doi:<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1926908>.
- Di Francesco, A., Fruk, M., Martini, C., Jemric, T. y Mari, M. (2015). "First Report of Asiatic Brown Rot (*Monilinia polystroma*) on Apple in Croatia". *Plant Disease*, 99(8), p. 1181. doi:10.1094/pdis-12-14-1290-pdn.
- dos Santos, N.S.T., Athayde Aguiar, A.J.A., de Oliveira, C.E.V., Veríssimo de Sales, C., de Melo e Silva, S., Sousa da Silva, R., Stamford, T.C.M. y de Souza, E.L. (2012). "Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.)". *Food Microbiology*, 32(2), pp. 345–353. doi:10.1016/j.fm.2012.07.014.
- El Khetabi, A., Ezrari, S., El Ghadraoui, L., Tahiri, A., Ait Haddou, L., Belabess, Z., Merah, O. y Lahlali, R. (2021). "In Vitro and In Vivo Antifungal Activities of Nine Commercial Essential Oils against Brown Rot in Apples". *Horticulturae*, 7(12), pp. 545-563. doi:10.3390/horticulturae7120545.
- El Ouali, Y., Manssouri, M., Bouyanzer, A., Majidi, L., Bendaif, H., Elmsellem, H., Shariati, M.A., Melhaoui, A. y Hammouti, B. (2017). "Essential oil composition and antifungal activity of *Melissa officinalis* originating from north-Est Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples". *Microbial Pathogenesis*, 107, pp. 321–326. doi:10.1016/j.micpath.2017.04.004.
- Elfar, K., Zoffoli, J.P. y Latorre, B.A. (2019). "Alternaria spp. on apparently healthy apples as a potential inoculum source for moldy core development and the effect of resistant and susceptible apple cultivars". *European Journal of Plant Pathology*, 155(3), pp. 743–754. doi:10.1007/s10658-019-01802-2.
- Elshafie, H.S., Gruľová, D., Baranová, B., Caputo, L., De Martino, L., Sedlák, V., Camele, I. y De Feo, V. (2019). "Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oil Extracted from *Solidago canadensis* L. Growing Wild in Slovakia". *Molecules*, 24(7), p. 1206. doi:10.3390/molecules24071206.
- Elshafie, H.S., Mancini, E., Sakr, S., De Martino, L., Mattia, C.A., De Feo, V. y Camele, I. (2015). "Antifungal Activity of Some Constituents of *Origanum vulgare* L. Essential Oil Against Postharvest Disease of Peach Fruit". *Journal of Medicinal Food*, 18(8), pp. 929–934. doi:10.1089/jmf.2014.0167.
- Fernández-Jalao, I., Sánchez-Moreno, C. y De Ancos, B. (2019). "Effect of high-pressure processing on flavonoids, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and antioxidant activity

- of apple 'Golden Delicious' from different geographical origin". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 51, pp. 20–31. doi:10.1016/j.ifset.2018.06.002.
- Filho, J.G.O., Silva, G. da C., Egea, M.B., de Azeredo, H.M.C. y Ferreira, M.D. (2021). "Essential Oils as Natural Fungicides to Control *Rhizopus stolonifer*-Induced Spoiled of Strawberries". *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(5), pp. 13244–13251. doi:10.33263/briac115.1324413251.
- Fox, J. y Weisberg, S. (2019). *An R Companion to Applied Regression, Third Edition*. 3ªed. Thousand Oaks, California: Sage Publications, Inc. Disponible en: <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/index.html> [Consultado 20-12-2023].
- Gorinstein, S., Martin-Belloso, O., Lojek, A., Milan, Soliva-Fortuny, R., Park, Y.-S., Caspi, A., Libman, I. y Trakhtenberg, S. (2002). "Comparative content of some phytochemicals in Spanish apples, peaches and pears". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(10), pp. 1166–1170. doi:10.1002/jsfa.1178.
- Hadian, J., Ghasemnezhad, M., Ranjbar, H., Frazane, M. and Ghorbanpour, M. (2008). "Antifungal Potency of Some Essential Oils in Control of Postharvest Decay of Strawberry Caused by *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger*". *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(5), pp. 553–562. doi:10.1080/0972060x.2008.10643666.
- Hassani, A., Fathi, Z., Ghosta, Y., Abdollahi, A., Meshkatalasadat, M.H. y Marandi, R.J. (2011). "Evaluation Of Plant Essential Oils for Control of Postharvest Brown and Gray Mold Rots on Apricot". *Journal of Food Safety*, 32(1), pp. 94–101. doi:<https://doi.org/10.1111/J.1745-4565.2011.00353.x>.
- Hussein, Z., Fawole, O.A. y Opara, U.L. (2019). "Harvest and Postharvest Factors Affecting Bruise Damage of Fresh Fruits". *Horticultural Plant Journal*, 6(1), pp. 1-13. doi:10.1016/j.hpj.2019.07.006.
- Inteligencia de Negocios Técnicos Agrícolas (2012). "Patógenos en peras y manzanas en cámara frigorífica". *Inteligencia de Negocios Técnicos Agrícolas* [Blog]. 30 de enero. Disponible en: <https://www.tecnicoagricola.es/patogenos-en-peras-y-manzanas-en-camara-frigorifica/> [Consultado 25-1-2023].
- Jacometti, M.A., Wratten, S.D. y Walter, M. (2010). "Review: Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards". *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(1), pp. 154–172. doi:10.1111/j.1755-0238.2009.0067.x.
- Kahramanoğlu, I., Nisar, M.F., Chen, C., Usanmaz, S., Chen, J. y Wan, C. (2020). "Light: An Alternative Method for Physical Control of Postharvest Rotting Caused by Fungi of Citrus Fruit". *Journal of Food Quality*, 2020. doi:<https://doi.org/10.1155/2020/8821346>.

- Letchamo, W., Ward, W., Heard, B. y Heard, D. (2004). "Essential Oil of *Valeriana officinalis* L. Cultivars Their Antimicrobial Activity as Influenced by Harvesting Time under Commercial Organic Cultivation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), pp. 3915–3919. doi:10.1021/jf0353990.
- Lolas, M. (2020). "Sarna y pudriciones de la manzana: conocimiento y eliminación de sus fuentes de inóculo". *Boletín Técnico de Pomáceas*, 111, pp. 8-12. Disponible en: <https://pomaceas.utralca.cl/wp-content/uploads/2021/11/111.-Enfermedades-del-manzano.-G.-D%C3%ADaz-y-M.-Lolas.-Julio-2020.pdf> [Consultado 28-1-2023].
- Luciano-Rosario, D., Keller, N.P. y Jurick, W.M. (2020). "*Penicillium expansum*: biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mould of pome fruit". *Molecular Plant Pathology*, 21(11), pp. 1391–1404. doi:10.1111/mpp.12990.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2022a). *Informe del consumo alimentario en España 2021*. Madrid: MAPAMA. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-consumo-alimentario-2021-baja-res_tcm30-624017.pdf [Consultado 28-1-2023].
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2022b). *Fruta de pepita, Informe de campaña 2021/22-Segundo cuatrimestre (sep 21-abr 22)*. Madrid: MAPAMA. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/informedefrutadepepitacampana2021-22sep21-abr22_tcm30-623656.pdf [Consultado 28-1-2023].
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (n.d.). *Buenas prácticas sobre alimentación, Frutas, Manzana*. Madrid: MAPAMA. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/manzana_tcm30-103008.pdf [Consultado 31-01-2023].
- Mironescu, M. y Georgescu, C. (2008). "Preliminary researches on the effect of essential oils on moulds isolated from surfaces". *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 14, pp. 30-33. Disponible en: https://journal-of-agroalimentary.ro/admin/articole/12738L11_Vol_XIV_2008_Mironescu_Monica.pdf [Consultado 8-4-2022].
- Mitidieri, M.S., Barbieri, M. O., Brambilla, M. V. y Piris, E. (2021). "In vitro effect of lemon essential oil and garlic extract on *Monilinia fructicola* growth". *Agrociencia Uruguay*, 25(NE1), pp. 403. doi:10.31285/agro.25.403.

- Mohammadi, A., Hashemi, M. y Hosseini, S.M. (2015). "Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 28, pp. 73–80. doi:10.1016/j.ifset.2014.12.011.
- Mohammadpour, H., Moghimipour, E., Rasooli, I., Fakoor, M.H., Alipour Astaneh, S., Shehni Moosaie, S. y Jalili, Z. (2012). "Chemical Composition and Antifungal Activity of *Cuminum cyminum* L. Essential Oil from Alborz Mountain Against *Aspergillus* species". *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 7(2), pp. 50–55. doi:10.17795/jjnpp-3445.
- Moumni, M., Romanazzi, G., Najar, B., Pistelli, L., Ben Amara, H., Mezrioui, K., Karous, O., Chaieb, I. y Allagui, M.B. (2021). "Antifungal Activity and Chemical Composition of Seven Essential Oils to Control the Main Seedborne Fungi of Cucurbits". *Antibiotics*, 10(2), p. 104. doi:10.3390/antibiotics10020104.
- Musacchi, S. y Serra, S. (2018). "Apple fruit quality: Overview on pre-harvest factors". *Scientia Horticulturae*, 234, pp. 409–430. doi:10.1016/j.scienta.2017.12.057.
- Ntasiou, P., Myresiotis, C., Konstantinou, S., Papadopoulou-Mourkidou, E. y Karaoglanidis, G.S. (2015). "Identification, characterization and mycotoxigenic ability of *Alternaria* spp. causing core rot of apple fruit in Greece". *International Journal of Food Microbiology*, 197, pp. 22–29. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.008.
- Ozcakmak, S., Gul, O., Dervisoglu, M., Yilmaz, A., Sagdic, O. y Arici, M. (2016). "Comparison of the Effect of Some Essential Oils on the Growth of *Penicillium verrucosum* and its Ochratoxina Production". *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), pp. 13006. doi:10.1111/jfpp.13006.
- Palou, L., Valencia-Chamorro, S. y Pérez-Gago, M. (2015). "Antifungal Edible Coatings for Fresh Citrus Fruit: A Review". *Coatings*, 5(4), pp. 962–986. doi:https://doi.org/10.3390/coatings5040962.
- Papoutsis, K., Mathioudakis, M.M., Hasperué, J.H. y Ziogas, V. (2019). "Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold)". *Trends in Food Science & Technology*, 86, pp. 479–491. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.053.
- Patriarca, A. (2019). "Fungi and mycotoxin problems in the apple industry". *Current Opinion in Food Science*, 29, pp. 42–47. doi:10.1016/j.cofs.2019.08.002.
- Perdones, A., Sánchez-González, L., Chiralt, A. y Vargas, M. (2012). "Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry". *Postharvest Biology and Technology*, 70, pp. 32–41. doi:https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.04.002.

- Perina, F.J., Amaral, D.C., Fernandes, R.S., Labory, C.R., Teixeira, G.A. y Alves, E. (2014). "Thymus vulgaris essential oil and thymol against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler: effects on growth, viability, early infection and cellular mode of action". *Pest Management Science*, 71(10), pp. 1371–1378. doi:10.1002/ps.3933.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D. EISPACK, Heisterkamp, S., Van Willigen, B., Ranke, J. y R Core Team (2022). *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models, version 3.1-157*. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html> [Consultado 20-12-2023].
- Plotto, A., Roberts, D.D. y Roberts, R.G. (2003). "Evaluation of Plant Essential Oils as Natural Postharvest Disease Control of Tomato (*Lycopersicon esculentum*)". *Acta Horticulturae*, (628), pp. 737–745. doi:10.17660/actahortic.2003.628.93.
- Portal de Aragon. (n.d.). Frutas y hortalizas. Disponible en: <https://www.aragon.es/-/frutas-y-hortalizas> [Consultado 30-01-2023].
- Khokhar, I., Mukhtar, I., Wang, J., Jia, Y. y Yan, Y. (2019). "A report of *Rhizopus oryzae* causing postharvest soft rot of apple fruit in China". *Australasian Plant Disease Notes*, 14(1). doi:10.1007/s13314-019-0337-6.
- Reuveni, M., Sheglov, N., Eshel, D., Prusky, D. y Ben-Arie, R. (2007). "Virulence and the Production of Endo-1,4- β -glucanase by Isolates of *Alternaria alternata* Involved in the Moldy-core Disease of Apples". *Journal of Phytopathology*, 155(1), pp. 50–55. doi:10.1111/j.1439-0434.2006.01201.x.
- Rguez, S., Ben Slimene, I., Abid, G., Hammemi, M., Kefi, A., Elkahoui, S., Ksouri, R., Hamrouni Sellami, I. y Djéballi, N. (2020). "Tetraclinis articulata essential oil reduces *Botrytis cinerea* infections on tomato". *Scientia Horticulturae*, 266, p. 109291. doi:10.1016/j.scienta.2020.109291.
- Riad, E. M. R. S., y Ziedan, E. S. H. (2015). "First record of core rot disease on apple fruit cv. anna 106 local cultivar in Egypt". *International Journal of Agricultural Technology*, 11(6), pp. 1371-1380. Disponible en: <http://www.ijat-aatsea.com/> [Consultado 20-1-2023].
- Sajid, A. (2020). "In vitro evaluation of plant essential oils against *Alternaria alternata* causing fruit rot of grapes". *Asian Journal of Agriculture and Biology*, 8(2), pp. 168–173. doi:10.35495/ajab.2019.11.532.
- Sameza, M.L., Nguemnang Mabou, L.C., Tchameni, S.N., Boat Bedine, M.A., Tchoumboungang, F., Jazet Dongmo, P.M. y Boyom Fekam, F. (2016). "Evaluation of Clove Essential Oil as a Mycobiocide Against *Rhizopus stolonifer* and *Fusarium solani*, Tuber Rot Causing Fungi in Yam (*Dioscorea rotundata* Poir.)". *Journal of Phytopathology*, 164(7-8), pp. 433-440. Doi:10.1111/jph.12468.

- Sanzani, S.M., Reverberi, M. y Geisen, R. (2016). "Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination". *Postharvest Biology and Technology*, 122, pp. 95–105. doi:<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.07.003>.
- Sapper, M., Martin-Esparza, M.E., Chiralt, A. y Gonzalez Martinez, C. (2020). "Antifungal Polyvinyl Alcohol Coatings Incorporating Carvacrol for the Postharvest Preservation of Golden Delicious Apple". *Coatings*, 10(11), p. 1027-1041. doi:10.3390/coatings10111027.
- Siddique, S.S., Hardy, G.E.St.J. y Bayliss, K.L. (2018). "Cold plasma: a potential new method to manage postharvest diseases caused by fungal plant pathogens". *Plant Pathology*, 67(5), pp. 1011–1021. doi:<https://doi.org/10.1111/ppa.12825>.
- Steensma, K., Lindell, C., Leigh, D., Burrows, C., Wieferich, S. y Zwamborn, E. (2016). "Bird Damage to Fruit Crops: A Comparison of Several Deterrent Techniques". *Proceedings of the Vertebrate Pest Conference*, 27(27), pp. 196-204. doi:10.5070/v427110693.
- Ticha, A., Salejda, A.M., Hyspler, R., Matejicek, A., Paprstein, F. y Zadak, Z. (2015). "Sugar Composition of Apple Cultivars and its Relationship to Sensory Evaluation". *Zywnosc. Nauka. Technologia. Jakosc*, 22, pp. 137-150. doi:10.15193/zntj/2015/101/062.
- Tomá-Barberán, F. A. y Clifford, M. N. (2000). "Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, pp. 1073-1080. doi:[10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1073::AID-JSFA568>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1073::AID-JSFA568>3.0.CO;2-B).
- Torres, E., Recasens, I., Lordan, J. y Alegre, S. (2017). "Combination of strategies to supply calcium and reduce bitter pit in 'Golden Delicious' apples". *Scientia Horticulturae*, 217, pp. 179–188. doi:10.1016/j.scienta.2017.01.028.
- Tripathi, P., Dubey, N.K. y Shukla, A.K. (2007). "Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(1), pp. 39–46. doi:<https://doi.org/10.1007/s11274-007-9435-2>.
- Tsao, R. y Zhou, T. (2000). "Antifungal Activity of Monoterpenoids against Postharvest Pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*". *Journal of Essential Oil Research*, 12(1), pp. 113–121. doi:10.1080/10412905.2000.9712057.
- Tyagi, S., Sahay, S., Imran, M., Rashmi, K. y Maheh, S. S. (2017). "Pre-harvest Factors Influencing the Postharvest Quality of Fruits: A Review". *Current Journal of Applied Science and Technology*, 23 (4), pp. 1-12. DOI: 10.9734/BJAST/2017/32909. Disponible: <https://onx.la/041fd> [Consultado 10-1-2023].

- Tzortzakis, N.G. y Economakis, C.D. (2007). "Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), pp. 253–258. doi:10.1016/j.ifset.2007.01.002.
- Venturini, M.E., Blanco, D. y Oria, R. (2002). "In Vitro Antifungal Activity of Several Antimicrobial Compounds against *Penicillium expansum*". *Journal of Food Protection*, 65(5), pp.834–839. doi:10.4315/0362-028x-65.5.834.
- Vitoratos, A., Bilalis, D., Karkanis, A. y Efthimiadou, A. (2013). "Antifungal Activity of Plant Essential Oils Against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*". *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1), p. 86. doi:10.15835/nbha4118931.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. y Pérez-Álvarez, J.A. (2007). "Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils". *Journal of Food Safety*, 27(1), pp. 91-101. doi:10.1111/j.1745-4565.2007.00063.x.
- Wang, Z., Sui, Y., Li, J., Tian, X. y Wang, Q. (2020). "Biological control of postharvest fungal decays in citrus: a review". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(4), pp. 861–870. doi:https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1829542.
- Woo, H.D. (2013). "Dietary flavonoid intake and risk of stomach and colorectal cancer". *World Journal of Gastroenterology*, 19(7), p. 1011-1019. doi:10.3748/wjg.v19.i7.1011.
- Xiong, X., Zhang, L., Li, X., Zeng, Q., Deng, R., Ren, X. y Kong, Q. (2021). "Antifungal mechanisms of lavender essential oil in the inhibition of rot disease caused by *Monilinia fructicola* in postharvest flat peaches". *Canadian Journal of Microbiology*. doi:10.1139/cjm-2020-0484.
- Xu, Y., Wei, J., Wei, Y., Han, P., Dai, K., Zou, X., Jiang, S., Xu, F., Wang, H., Sun, J. y Shao, X. (2021). Tea tree oil controls brown rot in peaches by damaging the cell membrane of *Monilinia fructicola*. *Postharvest Biology and Technology*, 175, p.111474. doi:10.1016/j.postharvbio.2021.111474.
- Yang, X. y Jiang, X. (2015). "Antifungal activity and mechanism of tea polyphenols against *Rhizopus stolonifera*". *Biotechnology Letters*, 37(7), pp. 1463–1472. doi:10.1007/s10529-015-1820-6.
- Yan, J., Wu, H., Shi, F., Wang, H., Chen, K., Feng, J. y Jia, W. (2020). "Antifungal activity screening for mint and thyme essential oils against *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of strawberry and peach fruits". *Journal of Applied Microbiology*, 130(6), pp. 1993–2007. doi:10.1111/jam.14932.
- Zhu, X.-Q., Niu, C.-W., Chen, X.-Y. y Guo, L.-Y. (2016). "Monilinia Species Associated with Brown Rot of Cultivated Apple and Pear Fruit in China". *Plant Disease*, 100(11), pp. 2240–2250. doi:10.1094/pdis-03-16-0325-re.

10 ANEXOS

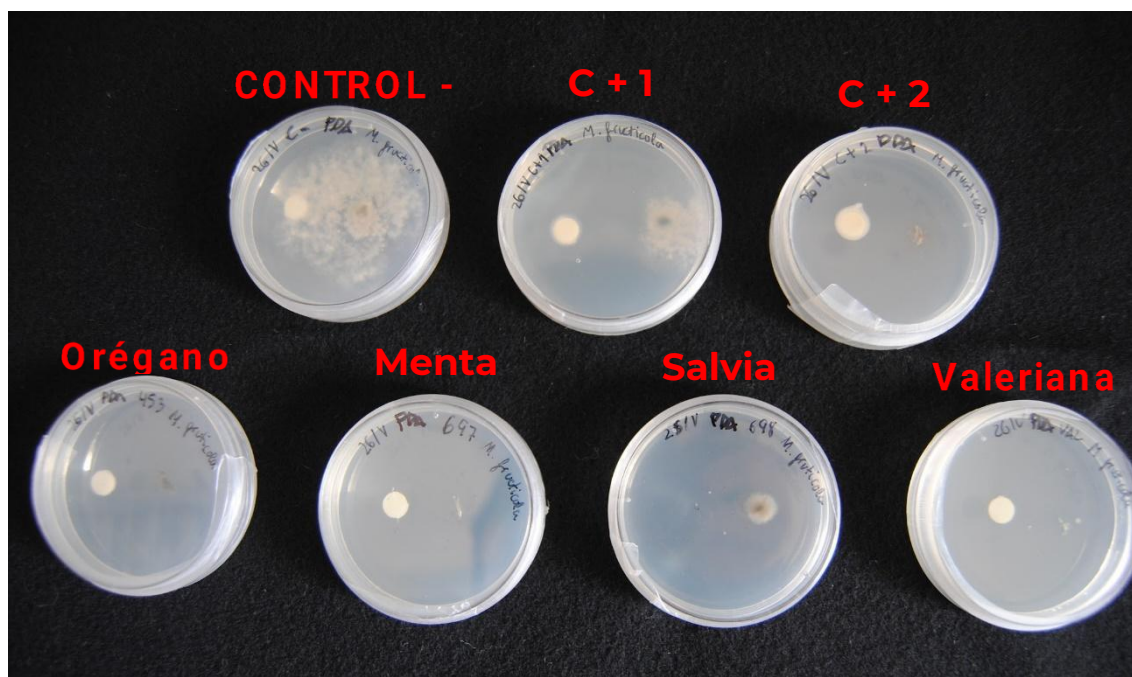
Figura 19. Caja con 5 manzanas y sus 3 repeticiones infectadas con un hongo patógeno, e inoculadas con un tratamiento en cada una de sus dos perforaciones en el ecuador. La caja se encuentra apilada con otras dos cajas dentro de un arcón. Días transcurridos tras la inoculación: 0.



Figura 20. Arcones sellados que contienen cajas con manzanas sometidas a diferentes tratamientos e infectadas con dos hongos distintos (*A. alternata* y *P. expansum*).

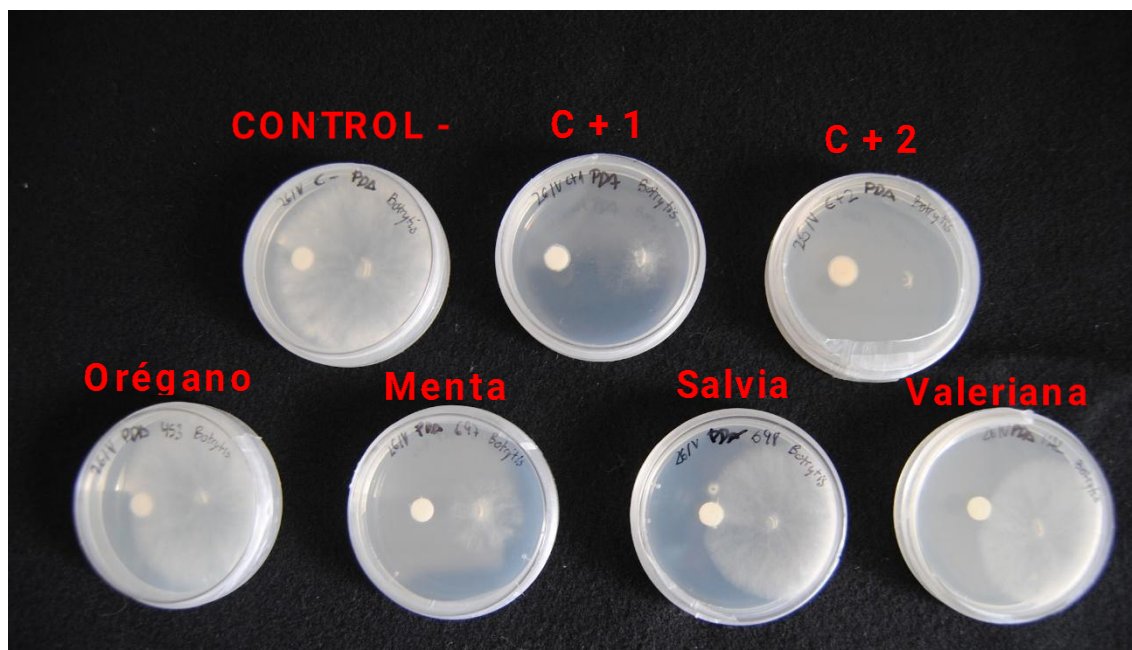


Figura 21. Placas Petri con medio PDA, inoculadas con *Monilinia fructicola* y un disco de papel que contiene 10 μ l de AE (al 10% de concentración) o control, tras 144h a 24 °C.



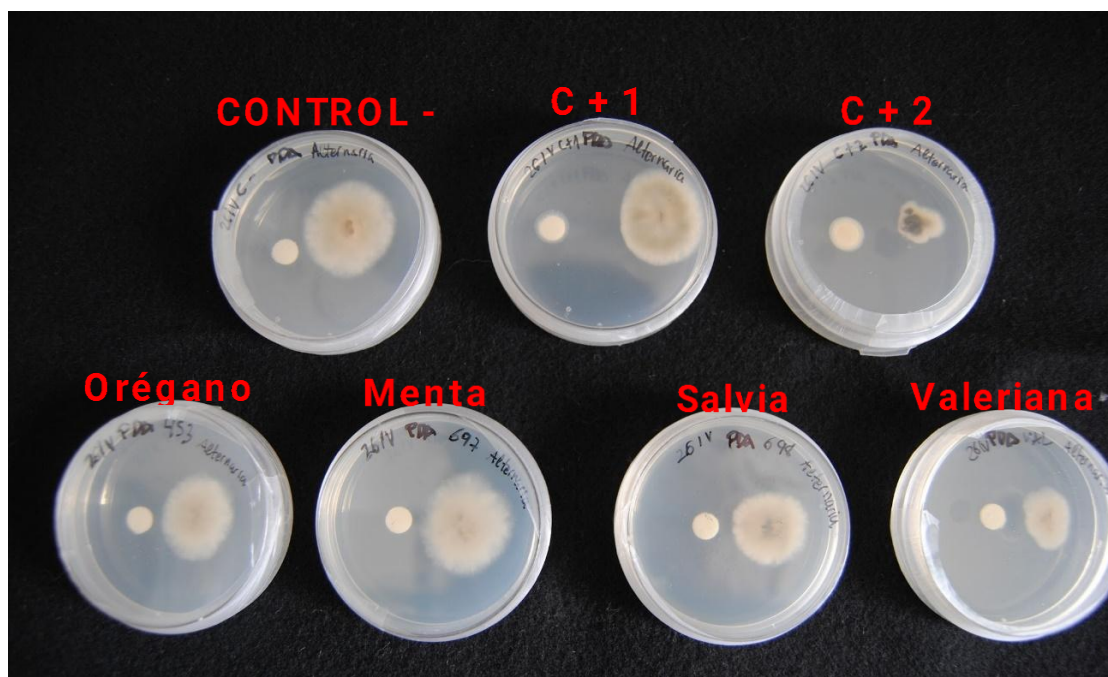
Control -: Diluyente y Agua estéril. C+1: Control negativo 1, TIRAM y diluyente. C+2: Control negativo 2, Ciproconazol y diluyente. Orégano: AE de *O. virens*. Menta: AE de *M. rotundifolia*. Salvia: AE de *S. officinalis*. Valeriana: AE de *V. officinalis*.

Figura 22. Placas Petri con medio PDA, inoculadas con *Botrytis cinerea* y un disco de papel que contiene 10 μ l de AE (al 10% de concentración) o control, tras 144h a 24 °C.



Control -: Diluyente y Agua estéril. C+1: Control negativo 1, TIRAM y diluyente. C+2: Control negativo 2, Ciproconazol y diluyente. Orégano: AE de *O. virens*. Menta: AE de *M. rotundifolia*. Salvia: AE de *S. officinalis*. Valeriana: AE de *V. officinalis*.

Figura 23. Placas Petri con medio PDA, inoculadas con *Alternaria alternata* y un disco de papel que contiene 10 μ l de AE (al 10% de concentración) o control, tras 144h a 24 °C.



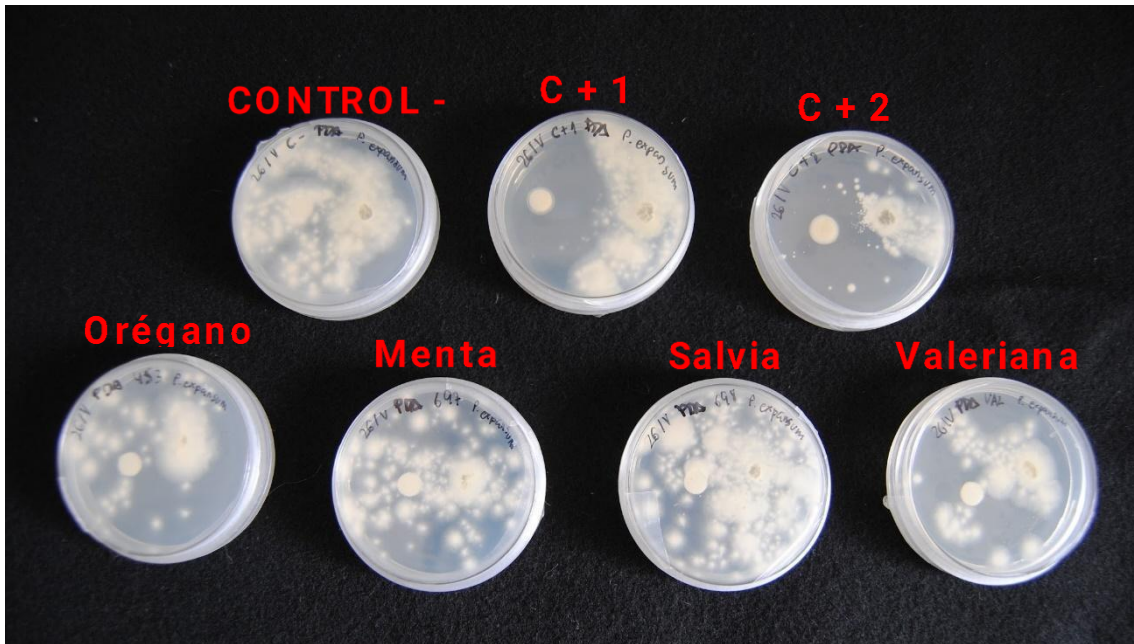
Control -: Diluyente y Agua estéril. C+1: Control negativo 1, TIRAM y diluyente. C+2: Control negativo 2, Ciproconazol y diluyente. Orégano: AE de *O. virens*. Menta: AE de *M. rotundifolia*. Salvia: AE de *S. officinalis*. Valeriana: AE de *V. officinalis*.

Figura 24. Placas Petri con medio PDA, inoculadas con *Rhizopus stolonifer* y un disco de papel que contiene 10 μ l de AE (al 10% de concentración) o control, tras 144h a 24 °C.



Control -: Diluyente y Agua estéril. C+1: Control negativo 1, TIRAM y diluyente. C+2: Control negativo 2, Ciproconazol y diluyente. Orégano: AE de *O. virens*. Menta: AE de *M. rotundifolia*. Salvia: AE de *S. officinalis*. Valeriana: AE de *V. officinalis*.

Figura 25. Placas Petri con medio PDA, inoculadas con *Penicillium expansum* y un disco de papel que contiene 10 μ l de AE (10%) o control, tras 144h a 24 °C.



Control -: Diluyente y Agua estéril. C+1: Control negativo 1, TIRAM y diluyente. C+2: Control negativo 2, Ciproconazol y diluyente. Orégano: AE de *O. virens*. Menta: AE de *M. rotundifolia*. Salvia: AE de *S. officinalis*. Valeriana: AE de *V. officinalis*.

Figura 26. Poster presentado en el III Congreso Cyta- CESIA Junior “Utilización de aceites esenciales para la conservación postcosecha de fruta de pepita”.

Utilización de aceites esenciales para la conservación postcosecha de fruta de pepita

C. Corchero^{1,2,3}, P. G. Martínez^{1,2,3}, C.M. Cantín³, J. Navarro^{1,2}, P. Marco^{1,2}

¹Departamento de Ciencia Vegetal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Avda. Montañana, 50059, Zaragoza, España.
²Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Zaragoza, España.
³Departamento de Pomología, Estación Experimental Aula Dei (EEAD-CSIC), Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2 (EEAD CSIC-Universidad de Zaragoza), Zaragoza, España.
⁴Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.

INTRODUCCIÓN

La manzana (*Malus domestica*), se trata de una de las frutas más producidas en España (Venturini *et al.*, 2002), siendo este el 5º productor con 600.000 t/año. Las grandes pérdidas económicas postcosecha son ocasionadas por las especies de hongos (El Ouadi *et al.*, 2017; Poniatowska *et al.*, 2012):

- *Monilia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum* y *Rhizopus stolonifer*.

Por todo ello, frente a fungicidas convencionales se han planteado alternativas mediante el uso de:

- Aceites esenciales (AEs): *Origanum virens*, *Salvia officinalis*, *Valeriana officinalis* y *Mentha rotundifolia*.
- Hidrolatos de cada AE, subproducto de la destilación del AE.

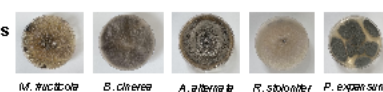
OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es determinar la capacidad inhibitoria de AEs obtenidos de plantas aromáticas de cultivo de Aragón frente a los principales hongos alterantes post-cosecha de la manzana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de partida:

- **AEs:** *O. virens* (600) - *M. rotundifolia* (473) - *S. officinalis* (719) - *V. officinalis* (VAL) y sus hidrolatos.
- **Cepas fúngicas**



Los ensayos realizados fueron (Venturini *et al.*, 2002):

- **Método de difusión en Agar**

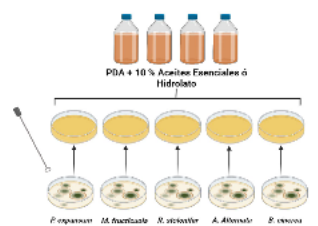


Figura 1 Representación del método de difusión de los cultivos fúngicos en el medio de cultivo. Agua Dulce, Dextrosa (10%), Caseína y Biotina.

- **Determinación del MIC y MFC**

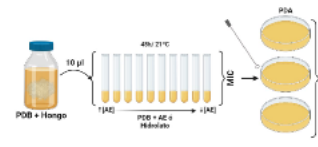


Figura 2 Representación del método de determinación del MIC y MFC de cada AE o hidrolato en el medio de cultivo. PDB + Hongo, PDB + AE o Hidrolato.

RESULTADOS

- Los AEs tuvieron mayor efecto inhibitorio que los hidrolatos a una misma concentración (Figura 3 y 4).
- *S. officinalis* y *V. officinalis* fueron los que menor efecto tuvieron.
- *O. virens* y *M. rotundifolia* presentaron una gran capacidad antifúngica, afectando a la velocidad de crecimiento.
- Se obtuvieron los MIC y MFC para conocer los rangos efectivos de concentración de cada AE (Tabla 1 y 2).

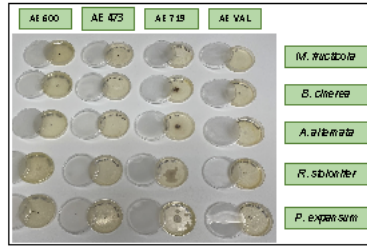
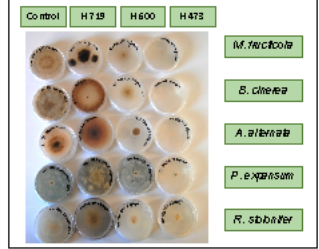



Figura 3 y 4 Efecto de los aceites de los AEs (Figura 3) al 100% (600, 473, 719 y VAL) y los hidrolatos (Figura 4) al 100% (H60, H73 y H79) sobre el crecimiento de los principales hongos alterantes de Aragón (CITA y IA2) (Figura 1).

TUBOS	AE	1%	0.5%	0.25%	0.125%	0.0625%	MIC (µg)
M. fructicola	600	-	-	-	-	-	0.125
	473	-	-	-	-	-	0.125
	719	-	-	-	-	-	0.25
	VAL	-	-	-	-	-	0.25
B. cinerea	600	-	-	-	-	-	0.25
	473	-	-	-	-	-	0.25
	719	-	-	-	-	-	0.5
	VAL	-	-	-	-	-	0.25
A. alternata	600	-	-	-	-	-	1
	473	-	-	-	-	-	0.25
	719	-	-	-	-	-	1
	VAL	-	-	-	-	-	0.25
P. expansum	600	-	-	-	-	-	0.25
	473	-	-	-	-	-	0.25
	719	-	-	-	-	-	1
	VAL	-	-	-	-	-	0.25

CONCLUSIONES

1. Los AEs en general, y los de *O. virens* y *M. rotundifolia* en particular, mostraron capacidad antifúngica *in vitro*, principalmente frente a *M. fructicola*, *B. cinerea* y *A. alternata*.
2. La capacidad antifúngica es notable a bajas concentraciones de AEs, sin embargo son necesarias altas concentraciones de hidrolatos.
3. El uso de hidrolatos puede ser una interesante alternativa de bajo coste para inhibir o ralentizar el crecimiento fúngico en fruta.

REFERENCIAS


Venturini *et al.*, 2002. Journal of Food Protection 65: 834-839. doi: 10.4315/JFP-02-0284-65-834
 Poniatowska *et al.*, 2012. Eur J Plant Pathol 135: 389-395. doi:10.1007/s10559-012-0130-2
 El Ouadi *et al.*, 2017. Microbial Pathogenesis 107: 321-326. doi: 10.1016/j.micpath.2017.04.004

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado en el marco del Grupo de Cooperación CITA-IA2-IA3-PRUTIE, Gobierno de Aragón. Los autores agradecen al grupo de Patología Postcosecha del IITA la ceder de la cepa de *M. fructicola*.

CONTACTO

Claudia Corchero: claudia.corchero@gmail.com
 Pedro G. Martínez: pedrogmartinez@gmail.com



Martínez, P.G., Corchero C., Cantin, C.M., Navarro, J., Marco, P. (2022) “Utilización de aceites esenciales para la conservación postcosecha de fruta de pepita”, III Congreso CyTA-CESIA Junior. Zaragoza, 20 junio 2022. DOI: 10.26754/uz.978-84-18321-39-9. Abstract disponible en: <https://zaguan.unizar.es/record/118761>.