



**Universitat de Lleida**

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària

**AVALUACIÓ DE SISTEMES ALTERNATIUS  
ALS FUNGICIDES SINTÈTICS PER AL  
CONTROL DE LES PODRIDURES VERDA  
I BLAVA EN POSTCOLLITA DE CÍTRICS**

Memòria presentada per  
**Lluís Palou Vall**  
per optar al grau de doctor

Directors:  
Dra. Inmaculada Viñas Almenar  
Dr. Josep Usall i Rodié

Lleida, gener de 2002



*A ma mare Bepeta  
i a mon pare Josep,  
a qui tot ho dec*



*Dolça Catalunya  
terra del meu cor  
qui de tu s'allunya  
d'enyorança es mor*

////////////////////////////////////

*(...) Es sabido que en algunas zonas urbanas la densidad del aire es tal que sus habitantes lo introducen en fundas y lo exportan bajo la denominación de "morcillas". (...)*

*(...) En un lugar cercano al hotel pido e ingiero una hamburguesa. Es un conglomerado de fragmentos procedentes de varios animales. Un análisis somero me permite reconocer el buey, el asno, el dromedario, el elefante (asiático y africano), el mandril, el ñu y el megaterio. (...)*

Eduardo Mendoza  
Sin noticias de Gurb



## AGRAÏMENTS

*A la Inmaculada Viñas i al Josep Usall, no només per la seva excel·lent direcció i tutoria sinó també per la seva comprensió, recolzament i amistat.*

*Al Joe Smilanick, per compartir amb mi part dels seus coneixements i experiència, per la seva amabilitat i pel seu inestimable ajut. “Joe, I really appreciate your help, thank you for your friendship”.*

*Al Joan Pons, per la seva amistat, per facilitar-me el contacte directe amb el sector i per la seva col·laboració i ajut en els treballs de camp i centrals.*

*Als amics i companys del laboratori, la Carla, la Neus, la Maribel, l'Elena, l'Àngels, la Charo i el Xavier per les bones estones viscudes durant gairebé quatre anys. I també a la Carme, la Maria José i el Jose per la feina compartida. També als companys de laboratori a Fresno, la Núria i la Franka.*

*Al Carlos Crisosto per la seva comprensió com a cap meu durant l'època de redacció. “Carlos, gracias por tu amistad y por tu ayuda en la lucha contra la añoranza”.*

*A la CIRIT, Generalitat de Catalunya, per possibilitar econòmicament la realització de la tesi i la meua formació com a investigador.*

*Al Centre UdLIRTA, l'USDA-ARS i la UC per possibilitar la realització dels treballs d'aquesta tesi.*

*Al Grup Exportador de Cítrics del Baix Ebre i Montsià, a la UE i a la CYCIT pel finançament rebut.*

*Finalment, a la meua família de Claravalls, Montblanc i Tornabous, i també a tot el grup d'amics deixats a Catalunya, que tant haig enyorat durant les llargues hores de redacció a Califòrnia, però que al mateix temps tant m'han ajudat a suportar la llunyania.*



Els treballs d'aquesta tesi doctoral han estat realitzats majoritàriament al laboratori de Patologia de l'Àrea de Postcollita del Centre UdL-IRTA de Lleida. Algunes experiències dels capítols 3 i 5 van portar-se a terme a l'USDA-ARS Horticultural Crops Research Laboratory de Fresno (Califòrnia, EUA). Els treballs del capítol 6 van realitzar-se al F. Gordon Mitchell Postharvest Center del Kearney Agricultural Center (UC) de Parlier (Califòrnia, EUA).

Alguns treballs d'aquesta tesi doctoral ha rebut suport econòmic de la CIRIT, del Grup Exportador de Cítrics de les comarques del Baix Ebre i Montsià, de la UE i de la CICYT.



## ABREVIATURES

ARS	“Agricultural Research Service”
CIRIT	Comissió Interdepartamental de Recerca i Tecnologia
CICYT	“Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología”
DOGC	Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya
EUA	Estats Units d’Amèrica
GRAS	“Generally recognized as safe”
HWB	“Hot water brushing”
IRTA	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries
p/p	Pes en pes
p/v	Pes en volum
SOPP	“Sodium Ortho Phenil Phenate”
UC	“University of California”
UE	Unió Europea
US EPA	“United States Environmental Protection Agency”
US FDA	“United States Food and Drug Administration”
USDA	“United States Department of Agriculture”
v/v	Volum en volum

# ÍNDEX

## Resums

Català .....	3
Castellano .....	5
English .....	7

## Introducció general

1. Malalties de postcollita dels fruits cítrics .....	11
1.1. Classificació i descripció de les principals malalties .....	12
1.2. La podridura verda .....	15
1.3. La podridura blava .....	17
2. Control de les malalties de postcollita .....	18
2.1. Estratègies generals de control .....	18
2.1.1. Reduir la contaminació fúngica en precollita .....	19
2.1.2. Mantenir o millorar la resistència dels fruits a la infecció .....	19
2.1.3. Reduir les poblacions dels patògens a les centrals cítriques .....	20
2.1.4. Tractaments antifúngics en postcollita .....	21
2.2. Fungicides de síntesi.....	22
3. Problemàtica de la utilització de fungicides de síntesi .....	22
3.1. Soques dels patògens resistents als fungicides .....	23
3.2. Residus a la fruita .....	24
3.3. Malalties iatrogèniques .....	25
4. Sistemes de control alternatius als fungicides de síntesi .....	25
4.1. Sistemes físics .....	26
4.1.1. Conservació frigorífica .....	26
4.1.2. Conservació frigorífica en atmosferes controlades .....	27
4.1.2.1. Atmosferes controlades convencionals .....	27
4.1.2.2. Atmosferes amb monòxid de carboni .....	28
4.1.2.3. Atmosferes hipobàriques .....	28
4.1.3. Tractaments amb calor: curat i aigua calenta .....	29
4.1.4. Radiació ionitzant .....	32
4.1.5. Llum ultraviolada .....	32
4.2. Sistemes químics .....	33
4.2.1. Substàncies naturals .....	34
4.2.2. Conservants i additius alimentaris .....	36
4.2.3. Ozó .....	38

4.2.4. Altres productes químics .....	39
4.3. Sistemes biològics .....	40
4.3.1. Control biològic .....	40
4.3.2. Obtenció de cultivars resistents .....	42
4.4. Integració de sistemes alternatius .....	43
5. Objectius .....	45
6. Referències bibliogràfiques .....	46
<b>Capítol 1</b> .....	59
Micoflora epífita de los frutos y ambiental en campos de mandarina 'Clemenules' en Tarragona	
Referència: <i>Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.</i> 16: 257-272 (2001)	
<b>Capítol 2</b> .....	81
Micoflora en centrales cítricas de Tarragona	
Referència: <i>Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.</i> En premsa	
<b>Capítol 3</b> .....	103
Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate	
Referència: <i>Plant Dis.</i> 85: 371-376 (2001)	
<b>Capítol 4</b> .....	123
Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins	
Referència: <i>Postharvest Biol. Technol.</i> 24: 93-96 (2002) (Research Note)	
<b>Capítol 5</b> .....	141
Evaluation of food additives and low-toxicity compounds as alternative chemicals for the control of <i>Penicillium digitatum</i> (Pers.: Fr.) Sacc. and <i>Penicillium italicum</i> Wehmer on citrus fruit	
Referència: <i>Pest Manag. Sci.</i> En premsa	
<b>Capítol 6</b> .....	161
Effect of gaseous ozone exposure on the development of green and blue molds on cold stored citrus fruit	
Referència: <i>Plant Dis.</i> 85: 632-638 (2001)	

<b>Capítol 7</b> .....	181
Evaluación de microorganismos antagonicos para el control biológico de las podredumbres verde y azul en post-cosecha de cítricos	
Referència: <i>Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.</i> Enviat per a publicació	
<b>Capítol 8</b> .....	197
Improving control of green and blue molds of oranges by combining <i>Pantoea agglomerans</i> (CPA-2) and sodium bicarbonate	
Referència: <i>Eur. J. Plant Pathol.</i> 107: 685-694 (2001)	
<b>Discussió general</b>	
1. Micoflora en camps i centrals cítriques .....	219
2. Control de les podridures verda i blava amb aigua calenta i carbonats .....	223
3. Control de les podridures verda i blava amb altres substàncies de baixa toxicitat .....	228
4. Efecte de la conservació frigorífica en atmosferes ozonitzades sobre el desenvolupament de les podridures verda i blava .....	231
5. Control biològic de les podridures verda i blava .....	233
6. Referències bibliogràfiques .....	236
<b>Conclusions</b>	
Català .....	243
Castellano .....	247
English .....	251
<b>Altres publicacions derivades</b> .....	255
<b>Annex fotogràfic</b> .....	259

# Resums

---



## Resum

Les pèrdues econòmiques ocasionades per les malalties de postcollita representen actualment un dels principals problemes de la citricultura mundial. En les nostres condicions mediterrànies destaca la incidència de les malalties ocasionades per patògens de ferida, especialment la podridura verda, causada per *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. i la podridura blava, causada per *P. italicum* Wehmer. Tradicionalment i també avui dia, el control d'aquestes malalties es realitza mitjançant tractaments en postcollita amb fungicides de síntesi. L'aplicació massiva i continuada d'aquests productes ha generat problemes greus com són la proliferació de soques dels patògens resistents als fungicides, la presència excessiva de residus als fruits amb el consegüent increment dels riscos per a la salut humana i el medi ambient, i l'aparició de malalties iatrogèniques. Davant aquesta situació, una de les prioritats màximes del sector citrícola és trobar i desenvolupar sistemes de control alternatius. Aquest ha estat l'objectiu bàsic del present treball de tesi doctoral. Després de caracteritzar la població fúngica ambiental i epifita dels fruits en camps de mandariner "Clemenules" representatius de la zona productora de Tarragona (Capítol 1) i quantificar la micoflora i les soques de *Penicillium* spp. resistents a fungicides presents a l'ambient i a la superfície d'equips i instal·lacions en centrals citrícoles de la zona (Capítol 2), s'han avaluat distints mètodes físics, químics i biològics i també combinacions d'ells per al control en postcollita de les podridures verda i blava dels cítrics. Concretament, s'han estudiat amb profunditat els tractaments amb aigua calenta, carbonat sòdic i bicarbonat sòdic (Capítols 3 i 4), s'ha avaluat l'efectivitat d'un bon nombre d'altres additius alimentaris i substàncies de baixa toxicitat (Capítol 5) i s'ha determinat l'efecte de la conservació frigorífica en atmosferes ozonitzades (Capítol 6). Finalment, s'han aïllat, identificat i caracteritzat microorganismes antagònics efectius en el control biològic de les podridures verda i blava i s'ha assajat la seva combinació amb altres tractaments alternatius (Capítols 7 i 8).

Entre les principals conclusions que s'han obtingut, destaca que el gènere *Penicillium* es troba present als camps de mandariner "Clemenules" durant tot el període de recol·lecció i que la fruita arribada del camp és la principal font de contaminació fúngica de les centrals citrícoles de la zona, en les quals existeixen soques tant de *P. digitatum* com de *P. italicum* resistents als fungicides tiabendazol i imazalil. Banys de curta durada en solucions de carbonat sòdic o bicarbonat sòdic al 2 o 3% són més efectius que l'aigua calenta sola per al control de les podridures verda i blava en taronges i mandarines clementines. Es tracta de

tractaments sinèrgics amb la calor (45°C), l'acció dels quals és fungistàtica i no molt persistent. Altres tractaments efectius són banys en solucions calentes de sorbat potàssic, benzoat sòdic, molibdat amònic i molibdat sòdic. L'emmagatzemament en fred (5°C) en atmosferes ozonitzades (0,3 o 1,0 ppm d'ozó) no redueix la incidència de les podridures verda i blava en taronges i llimones, però retarda el seu desenvolupament i inhibeix l' esporulació dels patògens. La soca CPA-2 del bacteri *Pantoea agglomerans* és un antagonista efectiu en el control biològic de les podridures verda i blava en taronges i clementines. La seva acció es complementa satisfactòriament amb un tractament previ de bicarbonat sòdic al 2%.

## Resumen

Las pérdidas económicas ocasionadas por las enfermedades de post-cosecha representan actualmente uno de los principales problemas de la citricultura mundial. En nuestras condiciones mediterráneas destaca la incidencia de enfermedades causadas por patógenos de herida, especialmente la podredumbre verde, causada por *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. y la podredumbre azul, causada por *P. italicum* Wehmer. Tradicionalmente y también hoy en día, el control de estas enfermedades se realiza mediante tratamientos en post-cosecha con fungicidas de síntesis. La aplicación masiva y continuada de estos productos ha generado problemas graves como son la proliferación de cepas de los patógenos resistentes a los fungicidas, la excesiva presencia de residuos en los frutos, con el consecuente incremento de los riesgos para la salud humana y el medio ambiente, y la aparición de enfermedades iatrogénicas. Ante esta situación, una de las prioridades máximas del sector cítrico es encontrar y desarrollar sistemas de control alternativos. Este es el objetivo básico del presente trabajo de tesis doctoral. Después de caracterizar la población fúngica ambiental y epífita de los frutos en campos de mandarina “Clemenules” representativos de la zona productora de Tarragona (Capítulo 1) y cuantificar la micoflora y las cepas de *Penicillium* spp. resistentes a fungicidas presentes en el ambiente y en la superficie de equipos e instalaciones en centrales cítricas de la zona (Capítulo 2), se han evaluado distintos métodos físicos, químicos y biológicos y también combinaciones de los mismos para el control en post-cosecha de las podredumbres verde y azul de los cítricos. Concretamente, se han estudiado en profundidad los tratamientos con agua caliente, carbonato sódico y bicarbonato sódico (Capítulos 3 y 4), se han evaluado un buen número de otros aditivos alimentarios y sustancias de baja toxicidad (Capítulo 5), y se ha determinado el efecto de la conservación frigorífica en atmósferas ozonizadas (Capítulo 6). Finalmente, se han aislado, identificado y caracterizado microorganismos antagonistas efectivos en el control biológico de las podredumbres verde y azul y se ha ensayado su combinación con otros tratamientos alternativos (Capítulos 7 y 8).

Entre las principales conclusiones que se han obtenido, destaca que el género *Penicillium* se encuentra presente en los campos de mandarina “Clemenules” durante todo el periodo de recolección y que la fruta llegada del campo es la principal fuente de contaminación fúngica de las centrales cítricas de la zona, en las cuales existen cepas tanto de *P. digitatum* como de *P. italicum* resistentes a los fungicidas tiabendazol e imazalil. Baños de corta duración en soluciones de

carbonato o bicarbonato sódicos al 2 o 3% son más efectivos que el agua caliente sola para el control de las podredumbres verde y azul en naranjas y mandarinas clementinas. Se trata de tratamientos sinérgicos con el calor (45°C) y de acción fungistática y no muy persistente. Otros tratamientos efectivos son baños en soluciones calientes de sorbato potásico, benzoato sódico, molibdato amónico y molibdato sódico. El almacenamiento en frío (5°C) en atmósferas ozonizadas (0,3 o 1,0 ppm de ozono) no reduce la incidencia de las podredumbres verde y azul en naranjas y limones, pero sí retrasa su desarrollo e inhibe la esporulación de los patógenos. La cepa CPA-2 de la bacteria *Pantoea agglomerans* es un antagonista efectivo en el control biológico de las podredumbres verde y azul en naranjas y clementinas. Su acción se complementa satisfactoriamente con un tratamiento previo de bicarbonato sódico al 2%.

## Summary

Economic losses caused by postharvest diseases are among the major concerns of the citrus industry worldwide. In our Mediterranean conditions, wound pathogens are the principal cause of postharvest decay. Postharvest green mold, caused by *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc., and postharvest blue mold, caused by *P. italicum* Wehmer, are the most economically important citrus postharvest diseases. Typically, these diseases are primarily controlled by application of synthetic fungicides. Alternative methods are needed because the widespread use of these chemicals in commercial packinghouses has led to the proliferation of resistant strains of the pathogens and iatrogenic diseases. Furthermore, concerns about human health risks and the protection of the environment associated with fungicide residues have increased the need to find and develop alternatives to fungicide usage. This is the basic objective of the present doctoral thesis. Firstly, fruit epiphyte and environmental fungal populations in 'Clemenules' orchards in Tarragona (Chapter 1) and fungal populations and fungicide-resistant biotypes of *Penicillium* spp. in the atmosphere and on surfaces of equipment and facilities in Tarragona citrus packinghouses (Chapter 2) were characterized. Then, different physical, chemical, biological, and combined methods were evaluated for the control of citrus postharvest green and blue molds. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate treatments were extensively studied (Chapters 3 and 4); numerous other food additives and low-toxicity compounds were evaluated (Chapter 5); and the effect of gaseous ozone exposure during cold storage was investigated (Chapter 6). Finally, antagonistic microorganisms effective for the biological control of green and blue molds were isolated, identified, characterized, and assayed in combination with other alternative methods (Chapters 7 and 8).

The following are some of the most important conclusions: the pathogenic genus *Penicillium* is present through the entire harvesting period in 'Clemenules' orchards. Fruit from the orchards are the major source of fungal contamination in the packinghouses. Both thiabendazole- and imazalil-resistant biotypes of *P. digitatum* and *P. italicum* were found in Tarragona packinghouses. Brief dips in 2 or 3% sodium carbonate or sodium bicarbonate solutions are more effective than hot water alone for the control of green and blue molds on oranges and clementine mandarins. These treatments are synergic to heat (45°C) and their activity is fungistatic and not very persistent. Other effective treatments are brief dips in hot solutions of potassium sorbate, sodium benzoate, ammonium molybdate, and

sodium molybdate. Storage at low temperature (5°C) under an ozonated atmosphere (0.3 or 1.0 ppm ozone) does not reduce green and blue mold incidence on oranges and lemons but does delay disease development and prevent sporulation of the pathogens. The strain CPA-2 of the bacterium *Pantoea agglomerans* is an effective antagonist for the biological control of postharvest green and blue molds on oranges and clementines. Its action is satisfactorily complemented by a previous 2% sodium bicarbonate treatment.

# Introducció General

---



## 1. Malalties de postcollita dels fruits cítrics

Les malalties de postcollita, aquelles que afecten als fruits durant tot el procés de comercialització, des del moment de la recol·lecció fins que arriben al consumidor, representen actualment un dels principals problemes de la citricultura mundial. La tendència actual és restringir la denominació de malalties per a les que són d'origen parasitari (l'agent causal és un microorganisme viu), i donar el nom d'alteracions o desordres als problemes d'origen abiòtic o fisiològic. Degut al pH baix dels teixits dels cítrics, i de la majoria de fruits en general, els agents patògens productors de la gran majoria de malalties de postcollita són fongs, més concretament floridures; la simptomatologia que produeixen als fruits són les podridures.

Les pèrdues degudes a podridures parasitàries són molt variables i depenen de l'àrea productora, l'espècie i el cultivar, l'edat i condició dels arbres, les condicions climatològiques durant tota la campanya, l'època i la forma de recol·lectar, el maneig dels fruits en postcollita i les condicions d'emmagatzemament (Eckert i Brown, 1986). Diversos seguiments en centrals cítriques i mercats de destí (Bancroft *et al.*, 1984; Ceponis i Capellini, 1985; Ceponis *et al.*, 1986) xifren entre un 4 i un 10% de la producció el total de pèrdues en postcollita de cítrics per a consum en fresc (no processats industrialment) i assenyalen que entre un 75 i un 80% d'aquestes pèrdues són degudes a podridures; la resta es deuen majoritàriament a fisiopaties de la pell i a danys mecànics. Tuset (1987) indica que en les condicions espanyoles les pèrdues parasitàries poden suposar d'un 3 a un 6% de tota la producció comercialitzada en una campanya normal mitja, i poden superar el 8% si la climatologia en el període de recol·lecció és especialment favorable al desenvolupament de les floridures (temperatura superior als 24°C i humitat ambiental elevada). Aquest autor, assumint les dificultats pròpies de realitzar una estimació d'aquest tipus, considera que a l'Estat espanyol, amb una producció total de cítrics de 4 milions de tones (any 1987) destinades en un 60% a l'exportació, en un 10% a la indústria i en un 30% al consum interior, les pèrdues per podridures parasitàries se situen al voltant dels 6.000 milions de pessetes, podent-se duplicar fàcilment aquesta xifra en casos de climatologia favorable a la incidència dels fongs. Això dóna idea de la importància econòmica de les malalties de postcollita, i més si es té en compte que l'any 1996 la producció espanyola ja superava els 4,5 milions de tones (AEA, 1999).

Part del present treball de tesi doctoral s'emmarca en un projecte de desenvolupament d'un programa de producció integrada de cítrics a Catalunya. A les comarques de Tarragona es cultiva més del 99% de la producció catalana de cítrics, que l'any 1998 amb 7.740 ha plantades va ser de 87.272 tones (EAPC, 1998).

Aproximadament el 95% de la producció de Tarragona es concentra a les dues comarques més meridionals, el Baix Ebre i el Montsià, aquesta darrera colindant amb la província de Castelló. La principal espècie cultivada, per damunt de la taronja, és la mandarina clementina (*Citrus reticulata* Blanco), amb unes 4.000 ha plantades l'any 1998. La varietat més important és la "Clemenules", coneguda també com "Clementina de Nules". La superfície plantada pràcticament s'ha duplicat durant els darrers deu anys i el cultiu, encara en contínua expansió, ha passat a constituir un dels principals motors econòmics de la zona. Actualment, la producció de mandarina a Tarragona suposa aproximadament el 3% de la producció total espanyola i la major part d'aquesta producció es destina als mercats foranis, principalment de la UE (EAPC, 1998).

Pel que fa referència a la patologia de postcollita, el primer pas a l'endegar un projecte de producció integrada és caracteritzar les poblacions fúngiques en camps representatius de tota la zona productora i determinar els nivells de contaminació fúngica en les centrals cítriques de la zona. Aquests nivells i, en última instància, la importància econòmica de les malalties de postcollita estaran fortament condicionats per les condicions ambientals locals de la zona productora en qüestió. L'estudi de la presència i distribució dels fongs patògens permetrà establir riscos potencials de pèrdues i planificar adequadament els mitjans de control.

### 1.1. Classificació i descripció de les principals malalties

La classificació més generalitzada de les malalties de postcollita de cítrics s'ha fet atenent al moment en què té lloc la infecció. S'han establert dos grans grups: el grup de les infeccions en precollita i el grup de les infeccions en postcollita (Eckert i Eaks, 1989).

En les malalties del primer grup, les estructures infectives del patògen arriben a les flors o als fruits durant el seu desenvolupament en camp i romanen inactives fins que un cop collits els fruits, o en ocasions al mateix camp, les condicions ambientals i/o canvis en l'estat de l'hoste associats a la maduració propicien el desenvolupament de la malaltia. Aquestes infeccions inactives s'anomenen latents quan no són visibles a simple vista i quiescents quan ho són (Eckert i Ogawa, 1985). Els teixits de fruits joves o immadurs presenten normalment nivells alts de resistència inherent o induïda que eviten l'activació dels patògens (Eckert i Ratnayake, 1981). Simmonds (1963) planteja quatre possibles explicacions de per què els patògens en fase inactiva esdevenen actius: i) per la presència en el fruit verd de toxines que desapareixen en madurar, ii) el fruit verd no proporciona al patògen els elements nutritius adequats, iii)

els requeriments energètics per al desenvolupament de la malaltia només es poden veure satisfets quan el fruit ja ha madurat i iv) la producció d'enzims per part del patògen no és suficient per envair el fruit immadur. La font d'inòcul causant d'aquest tipus de malalties es troba al camp, al sòl o en òrgans vegetals, i l'inòcul es disemina per l'aire i/o per l'aigua de pluja (Viñas, 1990).

En el grup de malalties amb infeccions en postcollita, la infecció té lloc a través de ferides de la pell produïdes principalment durant la recol·lecció, transport o maneig en central dels fruits, encara que també les han pogut produir en camp distints agents biòtics (insectes, àcars, ocells, etc.) o abiòtics (aigua, vent, calamarsa, etc.) (Roth, 1967; Snowdon, 1990). En ferides recents, els teixits frescos queden totalment desprotegits, possibilitant que es produeixi fàcilment la infecció. Encara que no és el cas més generalitzat, alguns patògens com per exemple *Botrytis cinerea*, són capaços de penetrar directament la cutícula del fruit. En alguns casos, i en funció de les condicions ambientals, les ferides esdevenen resistents al cap d'uns dies o inclús al cap d'unes hores (Eckert i Ogawa, 1985). En aquestes malalties la font d'inòcul pot trobar-se al camp però també pot trobar-se a les pròpies centrals cítriques, a les parets, a la superfície de les instal·lacions o als embalatges. En aquest darrer cas, la diseminació de l'inòcul pot tenir lloc, a més de per l'aire, per l'aigua de drénxers o banys o per contacte fruit-embalatge i, en el cas de floridures formadores de nius, també per contacte fruit infectat-fruit sa (Viñas, 1990). Per minimitzar la incidència cal recol·lectar en el període adequat, amb la maduresa dels fruits requerida i sempre amb temps sec. Resulta crítica una recol·lecció el més acurada possible, sense cops ni ferides. També és molt important portar a terme periòdicament a les centrals cítriques una neteja i desinfecció acurades.

La incidència, i conseqüentment la importància econòmica, de les malalties d'ambdós grups es veu enormement influenciada per les condicions ambientals de cada zona productora: la temperatura i la humitat relativa (HR) que es donen al camp, especialment durant el període anterior a la recol·lecció, determinen directament la quantitat d'inòcul disponible i la seva capacitat de diseminació i de contaminació dels fruits (Snowdon, 1990). En àrees amb estius poc plujosos com la zona mediterrània o, com per exemple, Califòrnia o la major part de Sudàfrica, les pèrdues totals per podrits són considerablement menors que en àrees amb estius més plujosos com Florida, Brasil o zones humides d'Austràlia (Eckert i Eaks, 1989).

En aquestes zones més humides són molt importants les infeccions en precollita, principalment a les flors i als fruits joves. Les principals malalties són les anomenades podridures pedunculars, causades pels patògens *Lasiodyplodia theobromae* (Pat.) Griffon i Maubl. (sinònim: *Diplodia natalensis* Pole-Evans) i *Phomopsis citri* H.

Fawc.; la podridura per *Alternaria* o podridura negra, causada per *Alternaria citri* Ellis i Pierce, i de forma secundària també per *A. alternata* (Fr.:Fr.) Keissl.; la podridura marró o aigua, causada per *Phytophthora citrophthora* (R.E Sm. i E.H. Sm.) Leonian o per *P. citricola* Sawada; la podridura gris, causada per *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.; i l'antracnosi, causada per *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. i Sacc. (Fawcett, 1936; Smoot *et al.*, 1971; Whiteside *et al.*, 1993). En les nostres condicions mediterrànies els problemes ocasionats per les podridures pedunculars esdevenen pràcticament anecdòtics; segons els anys i les zones poden tenir certa importància les podridures negra, gris i marró, i també l'antracnosi (Tuset, 1987). Tuset (1998) indica que algunes d'aquestes malalties es troben actualment en progrés i cada cop augmenta més la seva incidència.

En les condicions climàtiques mediterrànies com són les d'Espanya, Itàlia, Israel o Califòrnia destaquen les malalties que s'originen amb infeccions en postcollita (Pratella *et al.*, 1969; Gutter, 1977; Tuset, 1987). Els agents causals d'aquestes malalties solen anomenar-se patògens de ferida. Les més importants són la podridura verda, causada per *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. i la podridura blava, causada per *Penicillium italicum* Wehmer; després destaquen la podridura àcida o amarga, causada per *Geotrichum citri-aurantii* (Ferraris) E.E. Butler (sinònim: *G. candidum* Link ex. Pers.) i la podridura per *Rhizopus*, causada per *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill., i en certes ocasions (Tuset *et al.*, 1992) per *R. oryzae* Went i P. Gerlig (sinònim: *R. arrhizus* Fischer).

Altres podridures considerades com a malalties menors en postcollita de cítrics són (Smoot *et al.*, 1971; Tuset, 1987; Whiteside *et al.*, 1993; Tuset, 1998): la podridura verd-grisosa, causada per *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link; la podridura per *Trichoderma*, causada per *Trichoderma viride* Pers. ex Gray o per *T. aureoviride* Rifai; la podridura rosa, causada per *Gliocladium roseum* Bainier; la podridura per *Fusarium*, causada per *Fusarium oxysporum* Schlecht.:Fr. o *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.; la podridura cotonosa, causada per *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary; la podridura negra, causada per *Aspergillus niger* Tiegh.; i la podridura per *Pleospora*, causada per *Pleospora herbarum* (Pers.:Fr.) Rabenh.

Tuset *et al.* (1980) i Tuset (1987) van quantificar la incidència de les malalties de postcollita en centrals cítriques valencianes. La podridura verda va representar entre un 55 i un 80% del total de podrits parasitaris en taronges i mandarines durant tota la comercialització, i entre un 30 i un 55% del total durant l'emmagatzemament en cambra frigorífica. La podridura blava va resultar ser la segona malaltia més important durant tota la comercialització (entre 2 i 30% del total de podrits), però la primera durant la conservació frigorífica (més del 50% del total de podrits).

## 1.2. La podridura verda

La podridura verda és la malaltia de postcollita dels cítrics més generalitzada arreu del món i la de major importància econòmica en les àrees subtropicals àrides. En les àrees subtropicals humides la seva incidència és similar en nombres absoluts però en proporció queda disminuïda per la tremenda incidència de les podridures pedunculars (Eckert i Brown, 1986).

L'agent causal, *P. digitatum*, és un deuteromicet de la família Moniliaceae. Es tracta d'un fong imperfecte, sense fase sexual coneguda. Les hifes són cilíndriques, sovint solitàries. Els conidiòfors formen rames irregulars tabicades. Les espores asexuals o conidis es generen per escissió en cadenes de longitud variable i poden presentar distints tamanyos i formes inclús dintre de la mateixa cadena; majoritàriament són el·lipsoidals de dimensions 3,5-8,0 x 3,0-4,0 µm (Samson *et al.*, 1995).

Les colònies fúngiques crescudes en medis nutritius artificials són d'aparença similar a la podridura que es desenvolupa en fruits infectats. Smilanick i Eckert (1986) van desenvolupar medis de cultiu selectius per a l'aïllament de *P. digitatum*. El creixement de la floridura és òptim a temperatures al voltant de 24°C i molt lent a temperatures superiors als 30°C o inferiors als 10°C; a 1°C queda pràcticament inhibit (Whiteside *et al.*, 1993). La malaltia es manifesta inicialment com una taca circular a la superfície de la pell envoltant el punt d'infecció, d'uns 0,6-1,2 cm de diàmetre, tova, aquosa i lleugerament descolorida. Aquesta taca s'engrandeix ràpidament a temperatures entre 15 i 28°C i al centre comença a aparèixer miceli aeri de color blanc. Quan el miceli ocupa una àrea d'uns 2,5 cm de diàmetre, es comencen a produir espores de color verd-oliva. L'àrea d'esperulació està envoltada per una ampla franja de miceli blanc i per una altra franja externa molt més prima de teixit tou i descolorit. En condicions d'humitat alta, el fruit queda totalment cobert d'espores i internament descompost al cap d'entre 5 i 10 dies. Tots els fruits cítrics són susceptibles a la podridura verda. La susceptibilitat varia segons l'espècie i el cultivar; en ordre decreixent trobem: taronges, mandarines, llimones i aranges (Eckert i Brown, 1986).

*P. digitatum* pot contaminar els fruits en camp, en magatzem i/o durant la distribució i venda als mercats a través dels conidis que, a partir de fruits malalts, es disseminen molt fàcilment i en grans quantitats per l'aire, sobretot en condicions de baixa humitat ambiental. El fong sobreviu de campanya a campanya al camp, primàriament en forma de conidis. A les centrals cítriques, el cicle d'infecció i esperulació es pot repetir moltes vegades durant la mateixa campanya, de manera que si no s'adopten mesures adequades, la pressió d'inòcul pot anar augmentant a mesura que avança la temporada. Es tracta d'un patògen de ferida estricta: les espores situades

a la superfície del fruit no germinen si no es produeix una ferida o una microferida al flavedo. La germinació dels conidis requereix aigua lliure i nutrients (Green, 1932). Si la ferida penetra uns 2 o 3 mm dins l'albedo o afecta una glàndula d'oli essencial, la infecció esdevé irreversible al cap d'uns 2 dies a 20-25°C (Eckert i Eaks, 1989). En el procés infectiu, *P. digitatum* produeix una exopoligalacturonasa que catalitza la hidròlisi terminal de l'àcid pèctic i resulta en l'acumulació al teixit malalt d'àcid galacturònic lliure; aquest àcid, juntament amb la pròpia exopoligalacturonasa i una pectinmetilesterasa produïda per l'hoste sembla ser el responsable de la maceració dels teixits infectats (Barmore i Brown, 1979). Algunes substàncies presents a l'oli essencial, com per exemple la limonina i la prangolarina en llimones afavoreixen el desenvolupament de la malaltia (Arimoto *et al.*, 1995). D'altra banda, certs compostos químics volàtils produïts a les ferides de la pell indueixen la germinació dels conidis (Eckert i Ratnayake, 1994).

Les ferides causants d'infecció són majoritàriament ferides mecàniques que es produeixen durant la recol·lecció i el maneig en postcollita dels fruits, però que també s'han pogut produir anteriorment al camp (Roth, 1967). No obstant, també pot tractar-se de ferides induïdes fisiològicament, com són les degudes a distintes fisiopaties de la pell, oleocelosis d'etiologies diverses (trencament de glàndules oleíferes i sortida d'oli essencial que és fitotòxic per a les cèl·lules epidèrmiques amb les que contacta) o danys per fred (Whiteside *et al.*, 1993). La incidència d'algun d'aquests desordres pot estar relacionada amb certes pràctiques culturals; per exemple, la fertilització abundant i la irrigació molt freqüent (reg localitzat) poden provocar sobrepressions hídriques en el teixit glandular que poden ser causa d'oleocelosi (Tuset, 1998).

### 1.3. La podridura blava

La podridura blava és, després de la podridura verda, la segona malaltia de postcollita de major importància econòmica en les àrees subtropicals àrides. No obstant, esdevé la primera en certes condicions desfavorables per al desenvolupament de la podridura verda. La temperatura òptima de creixement de la floridura causal, *P. italicum*, és la mateixa que la de *P. digitatum* (24°C), però *P. italicum* creix més lentament que *P. digitatum* a temperatures ambientals (de 15 a 28°C). *P. italicum*, en canvi, és una espècie més adaptada a temperatures inferiors als 10°C, motiu pel qual la incidència de la podridura blava durant la conservació frigorífica dels fruits cítrics és normalment superior a la incidència de la podridura verda (Whiteside *et al.*, 1993).

*P. italicum* és també un deuteromicet de la família Moniliaceae. Les hifes són cilíndriques, més primes i ramificades que les de *P. digitatum*. Els conidiòfors i les cadenes de conidis presenten, a diferència dels de *P. digitatum*, la forma de pinzell típica del gènere *Penicillium*. Els conidis són més petits que els de *P. digitatum* (3,0-5,0 x 2,5-3,5 µm) i són majoritàriament de forma cilíndrica, encara que també poden ser el·lipsoidals o ovalats (Samson *et al.*, 1995).

L'aspecte de la floridura és molt semblant *in vitro* i *in vivo*. Els primers símptomes de la malaltia són iguals que els de la podridura verda. Al centre de la lesió apareix miceli blanc que a temperatura ambient creix més lentament que el de *P. digitatum*, però esporula més ràpidament. En conseqüència, la franja de miceli blanc que envolta l'àrea esporulada, de color blau, és molt menys ampla que en el cas de la podridura verda. També contràriament al cas de la podridura verda, entre el miceli blanc i el perímetre de la lesió queda una ampla franja de teixit tou, descolorit i de consistència aquosa que es pot penetrar fàcilment amb el dit. Les masses d'espores blaves que cobreixen el fruit poden adoptar un color verd-marronès amb l'edat.

El cicle de la malaltia, el procés infecciós i els aspectes epidemiològics que determinen la incidència de la podridura blava són similars als de la podridura verda descrits en el subapartat anterior. *P. italicum* és també un patògen de ferida estricte que infecta totes les espècies de cítrics. A part de les diferències d'adaptació a distintes temperatures que s'han comentat, altres diferències destacables són que en el procés infecciós *P. italicum* produeix una endopoligalacturonasa enlloc de la exopoligalacturonasa produïda per *P. digitatum* (Barmore i Brown, 1981), que la podridura blava és capaç de propagar-se per contacte entre un fruit sa i un fruit malalt (Barmore i Brown, 1982), i que la podridura blava pot resultar predominant en fruits tractats amb benzimidazols perquè els aïllats de *P. italicum* desenvolupen resistències a aquests fungicides més freqüentment que els aïllats de *P. digitatum* (Gutter, 1975). Un altra diferència és que contràriament a altres espècies de *Penicillium* com són *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. frequentans* o *P. variable*, el miceli de *P. italicum* és capaç d'esporular estant submergit en distintos medis líquids (van Gestel, 1983).

## 2. Control de les malalties de postcollita

Els tractaments fungicides en postcollita amb productes químics de síntesi constitueixen, des que van començar a utilitzar-se massivament fa entre 40 i 50 anys, la base del control de les malalties de postcollita de cítrics. L'alt nivell d'eficàcia, la relativa economia i la comoditat d'aplicació van generalitzar la utilització d'aquests productes a totes les àrees productores de cítrics del món i fan que, tot i la greu

problemàtica que comporten, encara resultin imprescindibles avui dia (Eckert i Ogawa, 1985). Malgrat tot, els tractaments en postcollita només són una de les possibles actuacions que cal considerar a l'hora de planificar globalment la lluita contra les malalties.

## 2.1. Estratègies generals de control

És tenint en compte els distints aspectes de l'epidemiologia dels patògens causants de podridures que cada campanya, i per a cada cas particular concret, cal dissenyar les estratègies de control més adequades. A nivell general poden considerar-se les següents:

### 2.1.1. *Reduir la contaminació fúngica en precollita*

Inclou actuacions culturals com no recol·lectar quan la fruita està molla, racionalitzar l'ús del reg i l'adobat, retirar la fusta d'esporga i els fruits del terra o no deixar que embalatges amb fruita recol·lectada restin massa temps sota els arbres. També inclou tractaments fungicides en camp per disminuir la quantitat d'inòcul, tractaments insecticides per evitar picades en la pell dels fruits que posteriorment poden ser una via d'entrada per als patògens, i neteja i desinfecció dels embalatges de camp (Eckert i Brown, 1986).

### 2.1.2. *Mantenir o millorar la resistència dels fruits a la infecció*

El punt clau d'aquest tipus de lluita en les nostres condicions mediterrànies és realitzar una recol·lecció extremadament acurada que eviti al màxim la producció de ferides a la pell. La incidència de *Penicillium* presenta una correlació directa amb el nivell de danys infligits a la fruita durant la collita i posterior maneig (Christ, 1966). Els tractaments en precollita amb reguladors del creixement (2,4-D, àcid giberèlic, etc.) poden incrementar la resistència de la pell a les ferides i retardar-ne la senescència, cosa que redueix la susceptibilitat del fruit a les malalties (Brown, 1980). Tractaments amb algunes d'aquestes substàncies també poden realitzar-se en postcollita abans de l'emmagatzemament; a Califòrnia, per exemple, és normal tractar les llimones amb una solució aquosa de cera que conté de 250 a 500 ppm de 2,4-D (àcid 2,4-diclorofenoxiacètic, isopropil ester) (Eckert i Eaks, 1989).

Altres tractaments de postcollita també poden contribuir al manteniment de la resistència dels fruits. Les pròpies condicions de desverdiment o alguns tractaments de curat (com mantenir la fruita a 34-35°C durant 48-72 h) indueixen la síntesi de lignines i fenols en les ferides, compostos que formen una barrera mecànica a la

invasió del patogen (Ben-Yehoshua *et al.*, 1989; Lanza, 1997). La conservació en fred normal o en atmosferes controlades amb alta humitat ambiental inhibeix la respiració de l'hoste i retarda la senescència de la pell, contribuint així a mantenir la resistència dels fruits al parasitisme (Schifmann-Nadel, 1977; Salunkhe i Desai, 1984). A més a més, els tractaments tèrmics com el curat o els banys en aigua calenta també poden induir en fruits ferits o infectats la producció de substàncies conferidores de resistència com les fitoalexines escoparona i escopoletina o les proteïnes quitinasa i  $\beta$ -1,3 glucanasa (Ferguson *et al.*, 2000). Altres tractaments físics com la radiació ionitzant o la llum ultraviolada, químics com el quitosan, o biològics com els microorganismes antagonics també poden, per diferents mecanismes, induir resistències als fruits cítrics contra les malalties de postcollita (Wilson *et al.*, 1994).

### 2.1.3. Reduir les poblacions dels patògens a les centrals cítriques

La higienització de les centrals, això és, netejar i posteriorment desinfectar totes les instal·lacions i infraestructures del magatzem (zona de recepció de fruita, línies de confecció, cambres frigorífiques, etc.), així com els embalatges, abans de l'inici de la campanya i periòdicament durant la mateixa, resulta imprescindible per evitar reinfeccions dels fruits amb patògens de ferida com *Penicillium* spp. o *G. citri-aurantii* (Gardner *et al.*, 1986). Per a la neteja s'utilitzen comunament aigua a pressió i sabons alcalins i per a la desinfecció diferents productes comercials a base de sals d'amoni quaternari, aldehids o compostos clorats. El fungicida sintètic ortofenil fenol també s'ha emprat com a desinfectant de superfícies. Un disseny adequat de la pròpia central i de les seves instal·lacions pot contribuir enormement a minimitzar la recontaminació de la central (separació eficient de zones brutes i netes, maneig adequat de la fruita destriada, facilitat de neteja dels equips, ubicació de les línies de confecció que permeti un accés fàcil a les zones més brutes, sistemes eficients de desguàs, etc.). Un programa de neteja i desinfecció efectiu hauria d'incloure una planificació temporal i de recursos humans acurada, així com un seguiment periòdic dels nivells de contaminació fúngica de l'ambient i de les superfícies de la central mitjançant mostres amb plaques amb medi patata dextrosa agar (PDA) o un altre medi de cultiu adequat per al creixement de les floridures.

El procediment més habitual per reduir la càrrega d'inòcul patogènic de la fruita que arriba del camp és la neteja amb solucions clorades. Normalment l'aplicació es fa en bany o dutxa a baixa pressió a l'inici de la línia de confecció barrejant el clor amb detergents i esbandint els fruits després. La font de clor majoritàriament és l'hipoclorit sòdic ( $\text{NaClO}$ ), però també pot ser l'hipoclorit càlcic ( $\text{CaCl}_2\text{O}_2$ ), el clor gas ( $\text{Cl}_2$ ) o

distintes cloramines ( $R_xCl_yN$ ). Altres alternatives que s'han provat amb aquest propòsit són el diòxid de clor ( $ClO_2$ ), l'ozó en aigua ( $O_3$ ) o l'àcid peroxiacètic ( $HCH_3CO_3$ ) (Suslow, 1997). L'activitat fungicida de les solucions de clor augmenta amb la concentració, la temperatura i el temps de exposició i disminueix amb el pH (Segall, 1968). És normal clorar les solucions de neteja amb uns 200 ppm de  $NaClO$ . El pH recomanat per al tractament està entre 6,5 i 7,5; a pH superiors l'efecte biocida és reduït perquè en la dissolució aquosa en equilibri hi ha una proporció baixa d'àcid hipocloròs ( $HClO$ ), que és la forma més activa contra els microorganismes, i alta d'ió hipoclorit ( $ClO^-$ ); a pH inferiors la solució és més efectiva però molt inestable, alliberant-se fàcilment clor gas a l'atmosfera. És important prendre periòdicament mostres i controlar els nivells de pH i clor actiu de les solucions. El  $HClO$  oxida la matèria orgànica molt més ràpidament que l'ió  $ClO^-$  i, en conseqüència, presenta una activitat antimicrobiana molt més alta. Aquests tractaments d'higienització maten per contacte les espores fúngiques presents a la superfície del fruit però no controlen els patògens de ferida quan la infecció ja ha començat el seu desenvolupament, no podent, per tant, ésser utilitzats per substituir als fungicides sintètics (Brown i Wardowski, 1984). Tot i això, són tractaments especialment importants quan l'efectivitat dels fungicides comuns no és satisfactòria, ja sigui perquè no controlen un patògen concret o perquè han proliferat soques resistents. L'addició de  $NaClO$  als drenchers o banys on s'apliquen aquests fungicides evita l'acumulació d'espores de *G. citri-aurantii* o de soques de *Penicillium* spp. resistents als fungicides (Eckert i Eaks, 1989). També s'ha comprovat que aquests tractaments controlen de manera efectiva les poblacions bacterianes de la superfície dels cítrics i particularment les poblacions de coliforms fecals perillosos per a la salut humana com poden ser *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. o *Escherichia coli* (Pao i Brown, 1998).

Un altre procediment d'higienització habitual durant un temps als EUA va ser la fumigació de les cambres, especialment les de llimones, amb triclorur de nitrogen ( $NCl_3$ ; Eckert i Eaks, 1989). Aquest compost és un desinfectant eficaç a concentracions més baixes que el clor i, a diferència del clor, és capaç de controlar els podrits en fruita inoculada (Klotz, 1936). Malgrat això, va deixar d'utilitzar-se perquè en ambients humits el  $NCl_3$  es descomposa en  $HClO$  i  $HCl$ , compostos que danyen les estructures metàl·liques de les cambres de conservació.

#### **2.1.4. Tractaments antifúngics en postcollita**

Alguns dels tractaments que s'han comentat anteriorment per ajudar a mantenir la resistència dels fruits a la infecció, poden tenir, a més, una acció directa sobre els

patògens. Tractaments tèrmics com el curat o l'aigua calenta poden exercir una acció directa de control per inhibició tèrmica de la germinació de les espores o del creixement miceliar de les floridures (Barkai-Golan i Phillips, 1991; Lurie, 1998). La conservació a temperatures baixes i/o en atmosferes modificades retarda i en alguns casos inhibeix totalment el desenvolupament de les podridures. El creixement de patògens importants com per exemple *G. citri-aurantii* o *R. stolonifer* queda parat pràcticament de manera indefinida a temperatures pròximes als 0°C (Eckert, 1977). Els factors limitants són els danys per fred, el possible augment de la incidència de malalties causades per patògens que, com *P. italicum*, *A. citri*, *B. cinerea* o *C. herbarum*, estan més adaptats a les baixes temperatures i l'efecte transitori del tractament. Normalment, quan acaba el període de conservació frigorífica i els fruits són retornats a temperatures ambientals, les podridures reestableixen ràpidament el seu desenvolupament normal.

Malgrat tot, la gran majoria de tractaments antifúngics, tant preventius com curatius, que actualment es porten a terme a les centrals cítriques de tot el món es realitzen amb productes químics de síntesi. Malauradament encara són molts pocs els tractaments alternatius disponibles a nivell comercial i els pocs que s'han implementat no han satisfet les expectatives que s'havia dipositat en ells en les fases de recerca experimental.

## 2.2. Fungicides de síntesi

Les matèries actives més utilitzades són els imidazols (imazalil i procloraz), els benzimidazols (tiabendazol i benomil), i l'ortofenilfenat sòdic (SOPP) (Eckert i Brown, 1986). L'aplicació habitual a les centrals espanyoles és en drénxer sobre els embalatges tal qual arriben del camp, en bany o màquina d'escuma barrejats amb detergents com el dodecilbenzè sulfonat sòdic al principi de la línia de confecció, o en dutxa sols o barrejats amb les ceres després del rentat i la primera selecció (Correas i Miranda, 1990). En casos especials, com pot ser quan es detecten en central problemes greus de podridures per *G. citri-aurantii* o *Rhizopus* spp., s'utilitzen la guazatina i el dicloran respectivament (Roger Amat, 1988). Als EUA és freqüent la utilització en taronges i llimones (no en mandarines) de paper impregnat amb bifenil en partides que s'exporten a mercats molt llunyans (Eckert i Brown, 1986).

### 3. Problemàtica de la utilització de fungicides de síntesi

La utilització massiva, continuada i en alguns casos poc controlada dels fungicides sintètics ha generat una sèrie de problemes greus com són la proliferació de soques dels patògens resistents a aquests productes químics i a altres d'estructura o propietats similars, l'increment de residus als fruits amb el consegüent increment dels riscos per a la salut humana i el medi ambient, i l'aparició de malalties iatrogèniques.

#### 3.1. Soques dels patògens resistents als fungicides

Tot i que en postcollita de cítrics ja s'havien detectat casos amb anterioritat (Duran i Norman, 1961; Harding, 1962), va ser als anys 70 quan va tenir-se constància als EUA de què no es tractava d'un problema puntual (Harding, 1972; Houck, 1977). Des d'aquell moment, un gran nombre d'estudis han posat de manifest la importància real a tot el món del problema de les resistències.

Encara que s'ha demostrat que moltes altres espècies fúngiques desenvolupen resistències, la gran majoria d'estudis s'han referit, per la seva importància econòmica, a les desenvolupades per aïllats dels patògens *P. digitatum* i *P. italicum* exposats continuadament a l'ortofenilfenat sòdic i a fungicides dels grups dels imidazols i dels benzimidazols. Per a les dues floridures s'han descrit casos tant de resistència simple com de resistència creuada i múltiple (Gutter *et al.*, 1981; Brown, 1982; De Waard *et al.*, 1982; El-Goorani *et al.*, 1983; Eckert, 1990; Bus *et al.*, 1991). A nivell de l'Estat espanyol, durant la dècada dels 80 van quantificar-se i caracteritzar-se les soques de *Penicillium* spp. resistents a diversos fungicides presents a les cambres frigorífiques i de desverdiment de centrals cítriques de la zona de València (Díaz *et al.*, 1987a, 1987b, Díaz i Vila, 1988, 1989).

La rapidesa del cicle reproductiu (una generació en uns 7 dies a temperatura ambient) i l'enorme facilitat amb què les noves espores són dispersades per l'aire des de fruits malalts cap a fruits sans fan que, comparativament, les espècies del gènere *Penicillium* siguin més propenses a desenvolupar resistències que altres espècies patògenes (Eckert i Eaks, 1989). La gravetat del problema ha fet fracassar distints programes de control de malalties de postcollita. En alguns casos, l'increment sobtat de les podridures i la desconexió de les causes d'aquest increment han portat a augmentar les dosis de fungicides utilitzades, cosa que, degut a l'augment de la pressió de selecció sobre el patògen, lluny de solucionar el problema, només l'ha empitjorat i, a més a més, amb un cost econòmic considerable. En algunes centrals cítriques de Califòrnia, va comprovar-se que, com a conseqüència de la proliferació de soques de *P. digitatum* resistents a l'imazalil, les dosis màximes permeses d'aquest fungicida no

controlaven l' esporulació del patogen i pràcticament no reduïen la incidència de la podridura verda (Eckert *et al.*, 1994). També en centrals californianes, la proporció d'aïllats de *P. digitatum* amb resistència múltiple als fungicides imazalil, tiabendazol i o-fenilfenol es va duplicar en sis anys (Holmes i Eckert, 1999). En aquest estudi, la freqüència de biotipus de *P. digitatum* resistents a l'imazalil va ser molt superior a la de biotipus resistents de *P. italicum*. Gutter (1975) indica que, en canvi, els aïllats de *P. italicum* desenvolupen resistències als benzimidazols més freqüentment que els aïllats de *P. digitatum*.

### 3.2. Residus a la fruita

La problemàtica dels residus de pesticides als fruits és especialment important perquè són parts de la planta que poden ésser consumides en fresc i, per tant, directament ingerides. Quan els productes químics són aplicats en postcollita, la preocupació pels seus possibles efectes nocius encara esdevé més notòria degut a la proximitat temporal entre els tractaments i el consum. Distints informes alerten dels riscos per a la salut humana associats a l'ús de fungicides. En un estudi de l'any 1987 de la "National Academy of Sciences" dels EUA es va posar de manifest que el 90% dels fungicides comercialitzats presentaven components cancerígens. La preocupació encara és més gran quan es consideren els riscos de la presència de residus a la dieta de la mainada (NRC, 1993).

Els residus a la fruita no poden excedir el límit màxim de residus (LMR) establert per l'administració de cada país per a cada matèria activa concreta (Dezman *et al.*, 1986). Aquest límit sol ésser bastant restrictiu, especialment en els països més desenvolupats. Sovint, no obstant, aquest límit difereix de forma important entre uns estats i uns altres, la qual cosa s'utilitza per establir barreres al comerç. A l'Estat espanyol, el LMR en postcollita de cítrics és de 5 ppm per a l'imazalil, procloraz i guazatina, 6 ppm per al tiabendazol, 12 ppm per al SOPP i 0,5 ppm per al dicloran.

La quantitat de residus d'un fungicida sobre el fruit depèn bàsicament de les propietats intrínseques del propi fungicida, de la dosi aplicada i de la forma d'aplicació. En assajos amb equipament comercial de polvorització, els residus d'imazalil en taronges foren més alts quan es va aplicar dissolt en aigua que quan es va aplicar barrejat amb la cera (Brown *et al.*, 1983). Banys en solucions aquoses calentes d'imazalil, per contra, van deixar menys residus i van ser més efectives en el control de la podridura verda en taronges que aplicacions comercials d'imazalil barrejat amb la cera (Smilanick *et al.*, 1997b). Els nivells de residus d'imazalil o tiabendazol sobre la

pell d'aranges o llimones immersos en solucions a 20 o 50°C van variar en funció de la temperatura de la solució i de la data de collita dels fruits (Schirra *et al.*, 1997b, 2000b).

### 3.3. Malalties iatrogèniques

Les malalties iatrogèniques són aquelles que apareixen o incrementen la seva severitat degut a la utilització d'un producte químic en la protecció d'un conreu (Griffiths, 1981). Un dels exemples clàssics d'aquest fenomen, al que Yarwood (1970) denominava "malalties fetes per l'home" és el de la cendrosa als EUA.

Els fungicides sistèmics tenen especificitat en el control dels patògens, però al mateix temps eliminen una àmplia varietat de fongs sapròfits no patogènics, afavorint l'aparició de malalties iatrogèniques (Vyas, 1988). Els benzimidazols són un cas clar de fungicides que han afavorit l'aparició de noves malalties amb importància econòmica. Un exemple en postcollita de cítrics podria ser l'augment de la incidència de la podridura amarga arran dels tractaments químics amb benzimidazols i imazalil contra *Penicillium* spp. *G. citri-aurantii* no és controlat per cap d'aquests fungicides i possiblement es beneficia de la reducció de les poblacions de competidors que sí són sensibles als fungicides (Roger Amat, 1988).

## 4. Sistemes de control alternatius als fungicides de síntesi

Essent la utilització de fungicides de síntesi un mètode de control de malalties poc desitjable pels problemes ambientals i de salut que comporta, la indústria de la conservació i comercialització de fruits cítrics ha d'assumir les exigències d'una legislació cada cop més restrictiva en tot allò referent a l'ús d'aquests productes. D'altra banda, però, existeix cada dia més una demanda social de fruita de qualitat, amb bon aspecte físic i estat sanitari adequat. Davant aquesta situació no és d'estranyar que actualment una de les prioritats màximes del sector cítricol sigui trobar i desenvolupar nous sistemes de control que per sí sols o en combinació garanteixin una eficàcia similar a la dels fungicides sintètics a un cost raonable i sense afectar adversament la qualitat final de la fruita. Aquest és l'objectiu bàsic d'aquesta tesi doctoral i de moltes altres línies de recerca arreu del món.

Aquest objectiu és encara més important en el contexte del control integrat de plagues i malalties o, més ample encara, en el de la producció integrada de cítrics, conceptes que neixen en un intent de racionalitzar les pràctiques agrícoles. Tots els recursos i esforços que s'estan esmerçant en aconseguir un control integrat que permeti minimitzar les aplicacions de pesticides en camp, i obtenir així una fruita lliure

de residus, no tindrien gaire sentit si en postcollita, quan més a prop del consumidor està aquesta fruita, es continuessin utilitzant els tractaments químics de forma indiscriminada. L'objectiu ideal de qualsevol programa de producció integrada seria l'eliminació total dels fungicides sintètics en postcollita, però la manca d'alternatives ha fet que la legislació proposi una fase transitòria en la qual encara s'admeten, però amb restriccions. En el cas de Catalunya, està a punt de publicar-se al DOGC la nova Norma Tècnica per a la Denominació Genèrica Producció Integrada dels Cítrics, la qual preveu la utilització de l'imazalil, l'ortofofenilfenol i el tiabendazol restringida a l'autorització del tècnic assessor i sota el seu control. La Norma estableix també que cal garantir uns continguts de residus als fruits inferiors al 50% del límit establert per la legislació vigent i recomana que aquestes matèries actives no s'apliquin més d'un cop sobre la mateixa fruita (NTDGPIC, 2001).

Segons la seva naturalesa, els sistemes alternatius als fungicides de síntesi poden classificar-se en físics, químics i biològics.

## **4.1. Sistemes físics**

### **4.1.1. Conservació frigorífica**

La conservació a baixes temperatures és el sistema utilitzat comercialment sempre que es pretèn retardar per un període de temps considerable l'arribada als mercats dels fruits cítrics. L'emmagatzemament a temperatura baixa, humitat alta i ventilació adequada ralentix la respiració i disminueix les pèrdues d'aigua dels fruits, retardant l'entrada en la fase de senescència (Grierson i Ben-Yehoshua, 1986). Com ja s'ha comentat, aquest ralentiment de l'activitat metabòlica del fruit afecta al desenvolupament de malalties tant de forma indirecta, ajudant a mantenir la resistència del fruit a la infecció, com de forma directa, retardant o inhibint el creixement dels patògens. No obstant, no es tracta d'una acció permanent i la conservació frigorífica per sí sola no pot garantir una incidència baixa de malalties (Eckert, 1977). En aquest sentit, més que un mètode alternatiu als fungicides sintètics, es podria considerar un sistema complementari a altres tractaments antifúngics de postcollita.

El potencial de conservació en fred dels fruits cítrics és molt variable i depèn de l'espècie, el cultivar i multitud de factors de precollita, collita i postcollita (Grierson i Ben-Yehoshua, 1986). Les condicions de conservació recomanades en general són de 85-95% HR i de 4-8°C per a les taronges, 12-14°C per a les llimones i aranges, 10-12°C per a les llimes i 5-8°C per a les mandarines (Kader i Arpaia, 1992). En les condicions espanyoles, les taronges solen conservar-se al voltant dels 3°C (Roger

Amat, 1988). Les taronges del grup “Navel” són més sensibles al desenvolupament de fisiopaties i podridures durant la conservació frigorífica que les taronges de la varietat “Valencia Late”. Mentre que a 6°C el potencial de conservació de les primeres és de 6-8 setmanes, el de les darreres és de 10-12 setmanes (Arras i De Cicco, 1994).

#### **4.1.2. Conservació frigorífica en atmosferes controlades**

##### **4.1.2.1. Atmosferes controlades convencionals**

La principal finalitat de l'emmagatzemament de fruits cítrics a baixa temperatura en atmosferes amb menys oxigen (O<sub>2</sub>) i més diòxid de carboni (CO<sub>2</sub>) que l'aire és allargar la vida fisiològica dels fruits i mantenir durant més temps la seva qualitat (Brown, 1980). Des del punt de vista del control de malalties, les atmosferes controlades poden tenir, de la mateixa manera que la conservació en fred normal, un efecte directe i indirecte sobre els patògens (Kader, 1986). En aquest sentit, aquest tipus de conservació també pot considerar-se més aviat un sistema complementari que un sistema substitutiu dels tractaments antifúngics.

La utilització d'atmosferes controlades no s'ha generalitzat fins ara a nivell comercial perquè els avantatges que proporciona no compensen els elevats costos d'instal·lació i manteniment. A nivell de recerca, la seva utilització no ha donat, en general, millors resultats que la conservació convencional en fred, ni en la preservació de la qualitat del fruit ni en la prevenció de podridures o danys per fred (Brown, 1980; Grierson i Ben-Yehoshua, 1986). De fet, distints treballs indiquen una major incidència de podrits en fruits cítrics emmagatzemats sota certes condicions d'atmosfera controlada que en fruits emmagatzemats en atmosfera d'aire (Chace, 1969; Harding, 1969; Aharoni i Lattar, 1972). En alguns casos, com el de *G. citri-aurantii*, el patogen creix inclús més ràpid a concentracions baixes d'O<sub>2</sub> que en aire (Wells i Spalding, 1976). En altres estudis, en canvi, s'ha observat un efecte beneficiós de les atmosferes controlades. Per exemple, en taronges “Valencia Late” es va trobar una incidència de podrits menor després de la conservació en 10 o 15% O<sub>2</sub> i 0% CO<sub>2</sub> que després de la conservació en aire (Smoot, 1969). En altres casos l'efecte beneficiós s'ha observat només a l'eliminar de l'atmosfera de la cambra l'etilè produït pels fruits (McGlasson i Eaks, 1972; Wild *et al.*, 1976). Alguns estudis amb mandarines “Satsuma” (Oogaki i Manago, 1977) i “Kinnow” (Singh i Singh, 1996) indiquen un efecte positiu de les atmosferes controlades en la qualitat i en el potencial de conservació del fruit; no obstant, no indiquen com les condicions de conservació afecten a la incidència de podridures.

Segons Kader i Arpaia (1992), les concentracions de gasos en les condicions normals de conservació en atmosfera controlada, en cas que aquesta s'utilitzi, serien de 5% O<sub>2</sub> i 0-5% CO<sub>2</sub> per taronges i llimones i 5% O<sub>2</sub> i 5-10% CO<sub>2</sub> per aranges i llimes.

Altres tipus d'atmosferes controlades que no es basen només en la manipulació de les concentracions d'O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub> inclouen la utilització de monòxid de carboni (CO) i la conservació en atmosferes hipobàriques.

#### *4.1.2.2. Atmosferes amb monòxid de carboni*

Una atmosfera amb el 2-3% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub> enriquida amb el 5-10% CO produeix un efecte fungistàtic sobre la majoria dels fongs causants de podridures en postcollita sense produir fitotoxicitats aparents (El-Goorani i Sommer, 1979; Kader, 1986). Però el CO és un gas inflamable a concentracions entre el 12 i el 75% i el seu ús requereix prendre precaucions per a la seguretat del personal i pot resultar bastant car.

#### *4.1.2.3. Atmosferes hipobàriques*

La conservació o transport de fruits a pressions ambientals inferiors a la atmosfèrica (760 mm Hg) incrementa la difusivitat de compostos volàtils com l'etilè i redueix la pressió parcial de l'O<sub>2</sub> i el CO<sub>2</sub>, permetent en certs casos allargar la conservació de fruites, verdures i flors tallades (Burg i Burg, 1966). Els efectes sobre els patògens no són, en general, superiors als de l'atmosfera controlada convencional i sovint es veuen influenciats per altres factors. L'emmagatzemament a 10°C a una pressió de 170 mm Hg va reduir la incidència de la podridura àcida causada per *G. citri-aurantii* en llimes; no obstant, una pressió de 76 mm Hg la va incrementar (Spalding i Reeder, 1976).

#### *4.1.3. Tractaments amb calor: curat i aigua calenta*

Bàsicament són dos els tipus de tractaments amb calor que poden realitzar-se en postcollita de cítrics per tal de reduir la incidència de malalties: el curat i els tractaments amb aigua calenta.

El curat és un procediment pel qual la fruita arribada del camp s'emmagatzema a altes temperatures (25-40°C) i alta humitat ambiental durant períodes de temps variable (1-4 dies). La durada i característiques del tractament amb aire calent són molt variables a les distintes zones productores de cítrics del món en funció del tipus de fruits que es tractin (Grierson i Ben-Yehoshua, 1986). En general, s'ha comprovat que el tractament redueix significativament la incidència de distintes podridures com per

exemple la marró, la verda, la grisa o l'àcida en taronges, llimones i aranges (Fawcett, 1922; Ben-Yehoshua *et al.*, 1987, 1989; Tuset *et al.*, 1996; Lanza, 1997).

Els tractaments amb aigua calenta permeten assolir els efectes beneficiosos del curat amb una tecnologia molt més simple, pràctica i barata. La immersió dels cítrics en aigua calenta com a sistema de control de malalties de postcollita va començar a provar-se als EUA a la dècada dels 20 contra la podridura marró causada per *Phytophthora* spp. (Fawcett, 1922). Als anys 60 es va comprovar que banys de 5 min en aigua a 53°C controlaven la podridura verda en taronges (Smoot i Melvin, 1963) i llimones (Houck, 1967). Des de llavors, diversos investigadors han posat de manifest en distintes espècies de cítrics els efectes antifúngics de tractaments de poca durada (2-5 min) amb aigua calenta (40-53°C) contra diversos patògens de postcollita (Spalding i Reeder, 1985; Couey, 1989; Barkai-Golan i Phillips, 1991; Barkai-Golan i Apelbaum, 1991; Tuset *et al.*, 1996; González-Aguilar *et al.*, 1997). El factor limitant i el desavantatge principal respecte al curat són els danys irreversibles que l'aigua calenta produeix a la pell dels fruits si s'aplica a una temperatura excessiva i/o durant massa temps. En general, temperatures superiors als 53°C resulten fitotòxiques.

Els efectes tant del curat com de l'aigua calenta sobre els patògens poden ésser directes o indirectes. La principal diferència entre els dos tipus de tractament és que, en general, amb l'aigua calenta aquests efectes són força més accentuats que amb el curat perquè les temperatures aplicades són superiors i, a més, s'aconsegueixen amb un temps de tractament molt més curt. Els efectes directes són possibles perquè tant les espores fúngiques com la majoria de les infeccions inactives estan localitzades o bé a la superfície de la pell o bé a les primeres capes de cèl·lules situades immediatament sota la pell del fruit (Lurie, 1998). Aquests efectes directes no han estat molt estudiats però en general consisteixen en la inhibició de la germinació o del creixement del tub germinatiu, o en danys sobre les hifes en creixement. Depenen de factors intrínsecs del patògen com l'espècie, l'edat, l'activitat metabòlica, la densitat d'inòcul, el contingut d'aigua de les espores, etc. i de factors extrínsecs com la temperatura de l'aire o l'aigua o la durada del tractament (Barkai-Golan i Phillips, 1991). A més, la resposta del patògen depèn del medi de creixement i és diferent *in vitro* i *in vivo* (Dettori *et al.*, 1996). La calor pot causar canvis en el nucli i les parets cel·lulars, destruir mitocondries i vacuoles, i provocar la pèrdua de citoplasma a les espores (Barkai-Golan i Phillips, 1991). Estudis recents (Schirra *et al.*, 2000a) demostren que, a diferència del que es pensava anteriorment, la immersió dels fruits en aigua calenta no redueix el nombre de conidis presents a les ferides de la pell. Una de les principals preocupacions relacionades amb la possible generalització dels tractaments de calor és l'aparició i proliferació de soques termotolerants dels patògens (Ferguson *et al.*, 2000).

Els efectes indirectes es refereixen a la inducció a l'hoste de resistència a la infecció. En aquest sentit, les investigacions més recents apunten a què la calor influeix al mateix temps sobre una sèrie de mecanismes diferents (Schirra *et al.*, 2000a). La calor pot contribuir a mantenir o perllongar l'activitat antifúngica de compostos constituents de la pell dels fruits cítrics o, per altra banda, pot contribuir a induir mecanismes addicionals de defensa contra els patògens, ja sigui provocant canvis físics en la pell o induint la síntesi de substàncies que, d'una manera o una altra, interfereixen amb el desenvolupament normal de la malaltia. El curat de llimones a 36°C durant 3 dies va retardar la senescència del fruit, evitant així la disminució de la concentració de citral, un compost amb activitat antifúngica contra *P. digitatum* present de forma natural en ferides de la pell i que deixa de produir-se a mesura que el fruit envelleix (Ben-Yehoshua *et al.*, 1995). Un dels efectes del curat més estudiats és la inducció en les ferides de la pell de la biosíntesi, catalitzada per l'enzim fenilalanina amoni liasa (PAL), de lignina i materials anàlegs que actuen com una barrera física a la penetració de les hifes del patogen (Ben-Yehoshua *et al.*, 1989; Lanza, 1997); d'aquí precisament va sorgir el nom del tractament, del fet que "cura" ferides. L'aigua calenta pot provocar un efecte similar (Nafussi *et al.*, 2000). El curat, però especialment l'aigua calenta, poden provocar canvis en l'estructura de les ceres epicuticulars del flavedo. Si la cera s'arriba a fondre, pot tancar microferides, microesquerdes i estomes constituint així una barrera física a la invasió del patogen (Porat *et al.*, 2000; D'hallewin i Schirra, 2001). No obstant, en cas de conservació prolongada dels fruits, aquest efecte protector es pot perdre i llavors els estomes danyats i les microfisures esdevenen molt vulnerables a la invasió (D'hallewin i Schirra, 2000). Tant el curat com l'aigua calenta poden induir al fruit la síntesi de compostos amb accentuada activitat antifúngica, coneguts genèricament com fitoalexines. No obstant, la calor per sí mateixa no induïx aquesta síntesi en fruits intactes. La producció en distintes espècies de cítrics de les fitoalexines escoparona i escopoletina fins a dosis efectives per al control de la podridura verda només va tenir lloc en fruits ferits i prèviament inoculats amb el patogen (Kim *et al.*, 1991; Nafussi *et al.*, 2000). Un altre dels mecanismes d'inducció de resistència relacionats amb els tractaments amb calor és l'increment de la biosíntesi de proteïnes com la quitinasa o la  $\beta$ -1,3-glucanasa que són constituents de la pell i que juguen un paper important en la degradació de les hifes. A més a més, es sospita que algunes de les proteïnes sintetitzades pel fruit per a protegir-se d'una possible desnaturalització causada per la calor, proteïnes conegudes com "heat shock proteins" (HSP), també podrien estar implicades en alguns dels mecanismes de defensa contra les floridures (Schirra *et al.*, 2000a).

Un bon nombre d'estudis indiquen que, en cas de conservació frigorífica prolongada de la fruita, tractaments previs tant de curat com d'aigua calenta incrementen la resistència dels fruits als danys per fred (Wild i Hood, 1989; Ben-Yehoshua *et al.*, 1989; Wild, 1993; Rodov *et al.*, 1995; González-Aguilar *et al.*, 1997; Schirra i D'hallewin, 1997; Schirra *et al.*, 1997a, 1998).

Malgrat l'evidència dels seus efectes beneficiosos, el curat dels cítrics no s'està utilitzant a nivell comercial de forma generalitzada degut a l'elevat cost d'escalfar grans quantitats de fruita durant 2 o 3 dies. A Catalunya no és normal realitzar-lo. A la zona de València algunes empreses mantenen les taronges durant unes 70 h a 35°C i 98% HR (Tuset *et al.*, 1992). En algunes zones com Florida, on es realitzen tractaments de desverdiment dels fruits aplicant-los-hi etilè (al voltant de 5 µl) durant de 2 a 4 dies a altes temperatures (fins a 30°C) i 90-95% HR, s'ha observat que aquests tractaments tenen efectes anàlegs als del curat pel que fa al control de patògens de ferida com *P. digitatum* (Brown, 1973). Malgrat això, s'ha constatat que uns nivells excessius d'etilè o una exposició massa prolongada provoquen un augment significatiu de les pèrdues ocasionades per infeccions inactives com les de les podridures pedunculars (Brown i Lee, 1993) o l'antracnosi (Brown, 1975). A més, també s'ha comprovat que l'etilè després durant el procés de curat pot afavorir l'aparició de fitotoxicitats degudes a un excés de calor (Ben-Yehoshua *et al.*, 1990).

#### **4.1.4. Radiació ionitzant**

Els efectes de la radiació ionitzant (irradiació de raigs gamma) sobre els fruits cítrics en general i sobre les malalties de postcollita en particular s'han estudiat extensivament des de la dècada dels 60. L'any 1986 una regulació de la US FDA va permetre la irradiació d'aliments als EUA a una dosi màxima de 1000 Gy (Kader, 1999). L'aplicació de raigs gamma és un mètode curatiu que permet controlar patògens ja establerts als teixits de l'hoste. Els fruits madurs són relativament resistents a la irradiació perquè en aquest estat de desenvolupament pràcticament ja no es dona divisió cel·lular (Eckert, 1977). Els fruits frescos com per exemple els cítrics són més tolerants que les verdures i les flors tallades (Kader, 1999). L'efectivitat dels raigs gamma com a tractament fungistàtic o fungicida depèn del tipus de patògen, el seu estat de creixement i la seva població a l'hoste (densitat d'inòcul). Entre els patògens de postcollita de cítrics, els que infecten els fruits al camp i es presenten majoritàriament com infeccions inactives, com per exemple *A. citri* o *D. natalensis* són més resistents a la irradiació que els patògens de ferida com *Penicillium* spp., *T. viride* o *G. citri-aurantii* (Maxie *et al.*, 1969).

El principal problema de la radiació ionitzant i la causa de què el seu ús no s'hagi generalitzat és que les dosis mínimes requerides per a un control efectiu de les malalties (1000-1750 Gy) resulten fitotòxiques. A les dosis tolerades pels cítrics, difícilment es pot aconseguir l'erradicació dels patògens i els beneficis del tractament, que bàsicament són un retard en la producció dels podrits, no justifiquen el cost de la seva implementació (Maxie *et al.*, 1969; Eckert, 1977). A més a més, fins ara sempre han estat disponibles mitjans de control més barats, efectius i segurs. No obstant, no resulta descartable que davant una eventual prohibició dels fungicides sintètics en un futur es reexameni la utilització de la irradiació, especialment a dosis baixes i en combinació amb altres sistemes de control com podrien ser els tractaments tèrmics o les atmosferes controlades (Kader i Arpaia, 1992).

#### 4.1.5. Llum ultraviolada

La llum ultraviolada (UV) és altament energètica i pot ser fàcilment absorbida pels organismes vius. Quan això passa, els pot danyar directament per reacció amb membranes, enzims o àcids nucleics, o pot activar molècules específiques que es transformen en fototoxines capaces d'interferir amb processos fisiològics essencials de l'organisme (Larson i Berenbaum, 1988). Aquest principi s'ha utilitzat per intentar inactivar les espores de patògens importants de postcollita de cítrics com *P. digitatum*, *P. italicum*, *F. oxysporum* i *F. solani*, però es va observar que en molts casos els conidis presentaven pigments que els protegien de l'acció de la llum UV (Asthana i Tuveson, 1992).

La irradiació a dosis baixes de llum UV llunyana o de baixa longitud d'ona (UV-C, entre 100 i 280 nm) sobre els cítrics ja recollits pot induir resistències a la pell del fruit contra malalties de postcollita (Chalutz *et al.*, 1992b; Ben-Yehoshua *et al.*, 1992). En aquest sentit, la llum UV-C és una hormetina perquè és nociva a dosis altes però a dosis subletals estimula una resposta beneficiosa a l'hoste (Luckey, 1991). Les dosis efectives en la inducció de la resistència s'anomenen hormètiques i en el cas de la podridura verda de les aranges varien de 1,6 a 8,0 kJ m<sup>-2</sup> de llum UV-C (254 nm) en funció de la data de collita (Droby *et al.*, 1993a). El mode d'acció sembla estar relacionat amb la inducció de la biosíntesi de fitoalexines com l'escoparona (Kim *et al.*, 1991; Ben-Yehoshua *et al.*, 1992). A diferència dels tractaments amb calor, que només indueixen aquesta síntesi en ferides i presència del patògen, la llum UV-C també la indueix en fruits no inoculats (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992). També s'ha comprovat que en fruits tractats es produeix un notable increment de l'activitat dels enzims PAL i peroxidasa, enzims relacionats amb la biogènesi de lignina i materials

anàlegs, però no es creu que aquest mecanisme influeixi directament sobre la resistència del fruit (Droby *et al.*, 1993a). El fenomen d'hormesi no es dona amb llum d'altres regions de l'espectre UV de longituds d'ona més altes, ni amb llum UV mitjana (UV-B, entre 280 i 315 nm) ni amb llum UV propera (UV-A, entre 315 i 400 nm).

## 4.2. Sistemes químics

Els productes químics alternatius als fungicides de síntesi tradicionals han d'ésser substàncies, naturals o de síntesi, amb efectes residuals sobre el medi ambient i toxicològics sobre persones i animals coneguts i molt baixos. Per aquest motiu no és d'estranyar que la majoria dels candidats que s'assajen siguin substàncies presents de forma natural en plantes, animals o microorganismes o, en el cas de productes sintetitzats artificialment, siguin additius alimentaris permesos per la legislació.

### 4.2.1. Substàncies naturals

Algunes substàncies naturals derivades de plantes o animals presenten una marcada activitat biocida. Mentre que nombrosos insecticides s'han desenvolupat a partir de metabòlits secundaris de plantes, pràcticament no existeixen fungicides comercials amb aquest origen, tot i que a nivell experimental s'ha trobat que un bon nombre presenten activitat antifúngica, ja sigui fungicida o fungistàtica (Wilson *et al.*, 1991).

Aquesta activitat s'ha comprovat per a diferents extractes de plantes superiors (Grange i Ahmed, 1988). Entre els 345 extractes de plantes que es van assajar contra *B. cinerea*, els més efectius van ésser dels gèneres *Allium* i *Capsicum* (Wilson *et al.*, 1997). Els glucosinolats, un ampli grup de compostos produïts per nombroses espècies de la família de les crucíferes, presenten una marcada activitat antimicrobiana tant *in vitro* com *in vivo* (Mari *et al.*, 1993).

Distints components naturals del flavedo dels fruits cítrics, ja siguin preformats o induïts (fitoalexines), també presenten activitat antifúngica. Entre els components preformats destaquen alguns terpens com el citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal), cumarines com la limetina (5,7-dimetoxicumarina), la 5-geranoxi-7-metoxicumarina o la 7-geranoxicumarina, i furanocumarines com la isopimpinellina (5,8-dimetoxipsoralè) (Angioni *et al.*, 1998). Les fitoalexines més estudiades són l'escoparona (6,7-dimetoxicumarina) i l'escopoletina (6-hidroxi-7-metoxicumarina) (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992, 1995). L'activitat de tots aquests components naturals disminueix sensiblement després de la collita a mesura que el fruit envelleix (Kim *et*

*al.*, 1991). Alguns s'han aconseguit sintetitzar artificialment i utilitzar com a tractaments fungicides, tot i que encara no a nivell comercial (Angioni *et al.*, 1998).

Els olis essencials d'un nombre important d'espècies vegetals (per exemple dels gèneres *Citrus*, *Thymus*, *Origanum*, *Salvia*, *Mentha*, *Rosmarinus*, *Abies*, *Pinus*, *Lavandula*, *Eucalyptus*, etc.) han estat avaluats per la seva capacitat fungitòxica (Singh *et al.*, 1980; Wilson *et al.*, 1997) i alguns dels compostos responsables d'aquesta capacitat, majoritàriament components terpènics, han estat identificats. Entre ells destaquen el carvacrol, el p-anisaldehyd (Caccioni i Guizzardi, 1994), la L-carvona i l'eugenol (Bompeix i Cholodowski-Faivre, 1997). La D-llimonina, el cineol, el  $\beta$ -mircè, l' $\alpha$ -pinè, el  $\beta$ -pinè i el càmfor són components d'olis essencials actius contra *B. cinerea* (Wilson *et al.*, 1997). S'ha observat que alguns d'aquests components presenten certa especificitat. Per exemple, la L-carvona, extreta de *Mentha* spp., és efectiva contra *B. cinerea* però no contra *Penicillium* spp. (Bompeix i Cholodowski-Faivre, 1997).

Certs compostos aromàtics volàtils i components de l'aroma produïts durant la maduració en postcollita d'alguns fruits també presenten activitat inhibidora contra patògens de postcollita. Fumigacions amb acetaldehid, hexanal o benzaldehid podrien resultar interessants, especialment per al control d'infeccions latents, les quals no es poden controlar ni amb fungicides no sistèmics ni amb agents de biocontrol (Wilson *et al.*, 1997; Mari i Guizzardi, 1998).

L'àcid jasmònic i el metil jasmonat, coneguts conjuntament com a jasmonats, són reguladors del creixement naturals amb capacitat inhibidora de la podridura verda causada per *P. digitatum* (Droby *et al.*, 1999).

S'estima que només al voltant del 2% de les plantes superiors han estat avaluades per les seves propietats pesticides i que, d'aquestes, la gran majoria ho han estat per les seves propietats insecticides. De fet, l'activitat fungicida s'ha avaluat en menys de l'1% de les plantes superiors, la qual cosa deixa obert un ampli ventall de possibilitats per al desenvolupament de noves matèries actives (Wilson *et al.*, 1991; Wisniewski *et al.*, 2001).

El quitosan, un polímer d'elevat pes molecular de la  $\beta$ -1,4-glucosamina que s'obté per deacetilació de la quitina present a l'exoesquelet dels artròpodes i que també es troba com a component estructural de la paret cel·lular d'alguns fongs, presenta activitat antifúngica contra un ampli ventall de patògens de postcollita, incluint alguns dels més importants de la postcollita de cítrics (El Ghaouth *et al.*, 1992). Aquest compost pot formar pel·lícules amb les quals es pot embolicar la superfície del fruit i regular l'intercanvi d'humitat i gasos per tal d'allargar el període de conservació. S'ha comprovat que, a més, indueix resistència als teixits dels fruits contra les podridures

de postcollita per estimulació de la formació de barreres estructurals defensives i/o per inducció de la producció d'hidrolases com quitinases, quitosanases o  $\beta$ -1,4-glucanases (Wilson *et al.*, 1994).

Tot i que alguns antibiòtics com la iturina, produïda per *Bacillus subtilis*, són excel·lents fungicides contra una quantitat considerable de patògens vegetals (Gueldner *et al.*, 1988), la utilització de metabòlits secundaris microbians en agricultura no s'ha generalitzat degut bàsicament al perill d'aparició de resistències en soques bacterianes patògenes per als humans o el bestiar (Wisniewski i Wilson, 1992). Altres inconvenients són que poden resultar poc eficaços, altament inestables i, degut a la seva producció en fermentadors, poden presentar uns costos de producció molt elevats (Lievens *et al.*, 1989).

#### 4.2.2. *Conservants i additius alimentaris*

Segons el Codex Alimentarius són additius alimentaris aquelles substàncies que sense ésser consumides normalment i sense ésser ingredients característics dels aliments, s'hi afegeixen amb una finalitat tecnològica u organolèptica distinta a la de mantenir o millorar les seves propietats nutritives. La classificació més generalitzada els agrupa en categories funcionals: colorants, conservants, antioxidants, emulgents, espesants, etc. En general, els additius amb activitat antimicrobiana directa formen el grup dels conservants o preservatius. L'acció d'aquestes substàncies contra els microorganismes pot ésser inhibidora o letal, en funció de la dosi. Molts són productes que a més presenten especificitats i, així, es parla de productes amb acció fungistàtica, bacteriostàtica, fungicida o bactericida (Lück, 1981). En alguns casos pot ocórrer que additius no inclosos al grup dels conservants també presentin certa capacitat directa o indirecta d'inhibir el desenvolupament de microorganismes. Això passa sovint amb productes correctors de pH, com alguns àcids, hidròxids i sals (carbonats, fosfats, etc.), o amb productes classificats com agents depressors de l'activitat d'aigua. Aquestes substàncies contribueixen a garantir l'estabilitat microbiològica de l'aliment al reduir la disponibilitat físico-química d'aigua. Són agents depressors de l'activitat d'aigua diverses sals minerals (alguns clorurs, fosfats, carbonats i sulfats), àcids orgànics i les seves sals (àcid acètic, làctic, cítric, tartàric, etc.), mono, di i oligosacàrids (sacarosa, fructosa, etc.), alcohols (etanol, sorbitol, glicerina, etc.) i proteïnes i derivats (Multon, 1988). Sovint, aquestes substàncies es barregen amb els conservants pròpiament dits per tal d'incrementar la seva eficàcia. La combinació de diferents conservants també pot reportar efectes additius o sinèrgics (Lück, 1981).

Pocs conservants alimentaris s'han assajat contra les principals malalties de la postcollita dels cítrics i, de moment, no n'hi ha cap de registrat per a la seva utilització comercial. L'any 1978, Smoot i McCornack van indicar que solucions al 2% (p/v) de sorbat potàssic eren efectives en el control de soques de *P. digitatum* resistents als benzimidazols. Solucions de sorbat potàssic al 2% escalfades a 50°C van controlar la podridura amarga causada per *G. citri-aurantii* en llimones (Kitagawa i Kawada, 1984). El benzoat i el propionat sòdics van igualar l'efectivitat del sorbat potàssic en el control de la podridura verda en taronges "Valencia Late" (Hall, 1988). Fumigacions amb 1,5-2,5 mg l<sup>-1</sup> d'àcid fòrmic, acètic o propiònic van reduir significativament la incidència de la podridura verda en taronges, llimones i aranges; l'àcid fòrmic, no obstant, va resultar fitotòxic (Sholberg, 1998). La immersió de llimones inoculades artificialment en solucions calentes al 2% (p/p) de diòxid de sofre va controlar *P. digitatum* de forma eficaç (Smilanick *et al.*, 1995).

Entre els additius alimentaris més interessants per al control de podridures causades per *Penicillium* spp. en postcollita de cítrics es troben el bicarbonat i el carbonat sòdics, que no formen part del grup dels conservants. Un dels objectius bàsics d'aquesta tesi és aprofundir en l'estudi d'aquests productes com a sistemes de control de les podridures verda i blava en taronges i mandarines clementines i avaluar la seva eficàcia sols o en combinació amb altres sistemes de lluita. Es tracta d'additius permesos sense restriccions per les legislacions europea i nordamericana per moltes i variades aplicacions en el camp alimentari. Als EUA, són productes catalogats com segurs (GRAS) per la US FDA i s'ha proposat a la US EPA que no es limiti la quantitat de residus d'aquestes substàncies permesa als productes agroalimentaris. A més a més, l'USDA els ha aprovat com a ingredients de productes alimentaris classificats com a orgànics. La utilització del bicarbonat sòdic en el control de *P. digitatum* i *P. italicum* va ésser proposada per Barger al 1928 com una alternativa al bòrax. El carbonat sòdic s'ha utilitzat en llimones a Califòrnia durant més de 70 anys per millorar la neteja dels fruits i controlar podridures (Eckert i Eaks, 1989). Aquests tractaments van ésser desplaçats per fungicides de síntesi més efectius a partir de l'aparició del SOPP als anys 50. No obstant, dins la conjuntura actual reapareixen com a mitjans de control molt interessants perquè els carbonats són de fàcil disponibilitat, barats i poden utilitzar-se sense riscos importants de produir fototoxicitats als fruits tractats. Investigacions recents realitzades a Califòrnia indiquen que la immersió dels fruits en solucions tant de bicarbonat sòdic com de carbonat sòdic resulta efectiva a nivell comercial per al control de la podridura verda en llimones (Smilanick *et al.*, 1995) i taronges (Smilanick *et al.*, 1997a, 1999b). L'efectivitat del tractament depèn bàsicament de tres factors: la temperatura de les solucions, la concentració de sal i el

temps d'immersió dels fruits (Smilanick *et al.*, 1997a). Les sals sòdiques són més efectives que les potàssiques o amòniques (Marloth, 1931; Smilanick *et al.*, 1999b). L'addició d'hipoclorit sòdic a les solucions de bicarbonat sòdic permet eliminar les espores fúngiques de la solució i evitar així recontaminacions en fruits tractats posteriorment. Aquesta addició, a més a més, augmenta significativament el control de la podridura verda respecte al bicarbonat sol (Smilanick *et al.*, 1999b). Una nova variant que s'ha assajat últimament és la substitució dels banys en tancs per l'aplicació dels carbonats en combinació amb un rentat dels fruits amb aigua a alta pressió (1000-3500 kPa). Tot i que aquest rentat no té capacitat de control per sí mateix, l'eficàcia del tractament combinat és equiparable a la dels banys (Sorenson *et al.*, 1999).

#### 4.2.3. Ozó

L'ozó (O<sub>3</sub>) és un gas molt inestable que ocorre a la natura de forma natural i que es descomposa espontàniament o en contacte amb superfícies oxidables. Ja des de fa molt temps s'ha utilitzat per a la desinfecció d'aire o aigua degut al seu elevat potencial d'oxidació i a què pot generar-se artificialment de forma relativament fàcil. Avui dia existeix un gran interès en utilitzar-lo en la indústria alimentària, especialment des que l'any 1997 va ésser declarat per la legislació nordamericana com a compost reconegut com a segur (GRAS) per al contacte directe amb aliments (US FDA, 1997). En postcollita de fruites i verdures, l'ozó pot aplicar-se en aire o aigua com un tractament desinfectant relativament breu realitzat amb anterioritat a l'emmagatzemament o pot aplicar-se com un tractament en aire, continu o intermitent, durant tot el període d'emmagatzemament. En aquest darrer cas es parla de conservació en atmosferes ozonitzades i, en aquest sentit, el tractament es podria equiparar als inclosos en el subapartat de conservació en atmosferes controlades. Els avantatges de l'ozó són l'elevada capacitat biocida per contacte i la manca total de residus en la fruita tractada. Una altra aplicació que s'ha descrit és la seva utilització per reduir els nivells d'etilè en cambres de conservació i endarrerir així el procés de maduració de la fruita (Dickson *et al.*, 1992). El principal inconvenient és que a dosis relativament baixes resulta perillós per a la salut humana i per al seu ús comercial cal implementar mesures especials de seguretat.

Els tractaments amb aigua ozonitzada s'han proposat com a substitutius de les solucions clorades per a la higienització dels fruits cítrics i per a la desinfecció de superfícies en centrals cítriques (Smilanick *et al.*, 1999a). El potencial d'oxidació de l'ozó és 1,5 vegades més gran que el del clor i el temps de contacte necessari per a l'acció biocida és unes 4 o 5 vegades més petit. No obstant, els costos

d'implementació i manteniment són més elevats perquè cal generar el gas i ozonitzar l'aigua del tractament de forma contínua (Suslow, 1998). El tractament és molt efectiu en la reducció de les poblacions fúngiques i bacterianes presents de forma natural en la superfície dels fruits, però, de la mateixa manera que el clor, l'aigua ozonitzada no és capaç de controlar les infeccions provinents del camp i ja establertes en ferides de la pell dels fruits (Smilanick *et al.*, 1999a).

Els resultats disponibles sobre els efectes de la conservació de cítrics en atmosferes ozonitzades són contradictoris. Això també passa amb els resultats d'assajos realitzats amb altres tipus de fruita fresca com pomes, peres, fruites d'òs, maduixes o raïm. Mentre que en alguns treballs l'exposició de fruits cítrics a l'ozó gasós va reportar beneficis clars pel que respecta a la incidència de malalties de postcollita i a la qualitat dels fruits emmagatzemats (Harding, 1968; Jin *et al.*, 1989), en altres treballs no només no s'indiquen beneficis sinó que s'assenyala que el gas va resultar fitotòxic (Klotz, 1936; Hopkins i Loucks, 1949). En general, els resultats tant en un sentit com en l'altre provenen de treballs bastant antics i realitzats normalment amb concentracions d'ozó massa altes per als estàndards actuals de seguretat. Per exemple, segons la legislació californiana, la concentració màxima d'ozó en aire a la que una persona pot estar exposada durant un període de temps curt (15 min) és actualment de 0,3 ppm (v/v). Els efectes de l'ozó gasós a concentracions similars a aquesta sobre el desenvolupament de les podridures verda i blava en fruits cítrics conservats en fred no han estat avaluats.

#### **4.2.4. Altres productes químics**

Als EUA, la US EPA ha obert recentment una nova categoria de fungicides de síntesi, batejada com a "Reduced Risk Fungicides" (fungicides de risc reduït), en la qual s'integren aquelles noves matèries actives que, en comparació amb els fungicides tradicionals, siguin de toxicitat més baixa pels humans i els organismes que no es preten controlar, contaminin menys el medi ambient i/o puguin ésser adoptats en programes de control integrat. En el cas de la postcollita dels cítrics, s'ha demanat el registre en aquesta categoria de l'azoxistrobina, una estrobilurina efectiva contra la podridura verda (Adaskaveg i Förster, 2000).

Entre els tractaments amb altres productes químics que s'han mostrat efectius contra certes malalties de postcollita de cítrics, destaquen els banys en solucions calentes de bòrax (tetraborat sòdic decahidratat), àcid bòric, barrejes de bòrax i àcid bòric, o polibor (octaborat disòdic) (Winston, 1935; Eckert i Eaks, 1989), etanol (Smilanick *et al.*, 1995; Brown i Baraka, 1996) i polisulfur de calci (Smilanick i

Sorenson, 2001). Les solucions de peròxid d'hidrogen van resultar inefectives en el control de la podridura verda (Smilanick *et al.*, 1995).

### 4.3. Sistemes biològics

Encara que en un sentit ample el terme control biològic de malalties vegetals inclouria l'obtenció de cultivars de l'hoste resistents a les malalties i també la utilització de substàncies naturals derivades de plantes o animals, en aquest treball l'utilitzarem per referir-nos només al control mitjançant la utilització de microorganismes antagonics als microorganismes patògens.

#### 4.3.1. Control biològic

Segons Baker i Cook (1974), el control biològic és la reducció de la densitat d'inòcul o de la producció de malaltia per part del patogen o de la seva activitat com a paràsit mitjançant un o més organismes antagonics, per acció natural o a través de la manipulació de l'ambient, l'hoste o el propi antagonista. Segons Nigam i Mukerji (1988), el control biològic és la manipulació directa o indirecta per part de l'home dels agents vius que de forma natural tenen capacitat de control (antagonistes); aquesta manipulació provoca un augment de l'atac d'aquests agents sobre els patògens. La relació biològica entre els antagonistes i els patògens sol ésser bastant específica.

Els principals avantatges del control microbiològic, en comparació amb altres sistemes de lluita, són els següents (Deacon, 1983): i) els antagonistes són més segurs perquè no s'acumulen en els aliments; ii) són persistents al llarg del temps perquè al no alterar de manera substancial les principals característiques del patogen, és molt més difícil que aquest desenvolupi resistències; iii) produeixen un efecte insignificant en el balanç ecològic ja que no destrueixen els enemics naturals de les espècies patògenes; iv) freqüentment són compatibles amb altres sistemes de control, inclosos els productes químics de síntesi.

Les característiques desitjables d'un antagonista o agent de biocontrol són les següents (Wisniewski i Wilson, 1992): i) estabilitat genètica, ii) efectivitat a baixes concentracions, iii) poca exigència pel que fa a requeriments nutritius, iv) efectivitat per a un gran nombre de patògens i per diversos fruits i vegetals, v) capacitat de reproduir-se en medis de creixement econòmics, vi) facilitat d'aplicació, vii) no productora de metabòlits secundaris que siguin tòxics per a les persones o animals, viii) resistència als insecticides i fungicides amb què pot arribar a estar en contacte, ix) compatibilitat amb altres tractaments químics o físics, x) no patogènic sobre l'hoste,

xi) capacitat de sobreviure sota condicions adverses (incloses baixes temperatures i l'emmagatzematge en atmosferes controlades).

El gran potencial del control biològic com a sistema de lluita contra les malalties de postcollita de cítrics ha fet que durant els últims anys s'hagin endegat intenses investigacions en la majoria dels països productors de cítrics com són els EUA, Israel, Austràlia, Itàlia, Sudàfrica i també Espanya. La recerca s'ha centrat bàsicament en el control de patògens de ferida i especialment en el de *P. digitatum* i *P. italicum*. Els factors que determinen majoritàriament les possibilitats d'utilització d'un antagonista són la seva supervivència i la seva efectivitat en condicions ambientals i de frigoconservació. També és molt important la seva capacitat de colonitzar la superfície de la ferida. La fruita emmagatzemada en cambres frigorífiques representa una bona oportunitat per utilitzar el control biològic, ja que la fruita es troba sota condicions ambientals controlades, tant pel que fa a la humitat relativa, com a la temperatura i a la concentració de gasos (Wilson *et al.*, 1991). El resultat d'aquesta recerca ha estat el desenvolupament de l'anomenada primera generació d'agents de biocontrol, és a dir, la identificació de distints microorganismes, majoritàriament llevats i bacteries, però també alguna floridura, que per ells mateixos presenten una bona capacitat de control (Droby *et al.*, 2001). Entre els més destacats d'aquests antagonistes es troben les bacteries *Pseudomonas syringae* (Smilanick *et al.*, 1996; Bull *et al.*, 1997), *Pseudomonas cepacia* (Smilanick i Denis-Arrue, 1992; Huang *et al.*, 1993), *Bacillus subtilis* (Singh i Deverall, 1984; Arras i D'hallewin, 1994) i *Bacillus pumilus* (Huang *et al.*, 1992); els llevats *Candida oleophila* (Wilson *et al.*, 1993; McGuire i Hagenmaier, 1996; Droby *et al.*, 1998), *Candida guilliermondii* (forma teleomòrfica: *Pichia guilliermondii*, i prèviament classificat com *Debaryomyces hansenii*; Chalutz i Wilson, 1990; Droby *et al.*, 1993b; McGuire, 1994) i *Candida famata* (Arras, 1996), i les floridures *Trichoderma viride* (de Matos, 1983; Díaz i Vila, 1990) i *Aureobasidium pullulans* (Schena *et al.*, 1999).

Tot i la intensitat de les investigacions, el control biològic és encara un camp força nou en tot allò referent a la patentabilitat, registre i comercialització dels agents de biocontrol. Als països de la UE, el registre dels productes patentats representa un obstacle important per a la comercialització. La directiva que regeix el registre d'agents de biocontrol és la 91/414/CEE, que està avui dia en fase de revisió i modificació. Als EUA, en canvi, la normativa específica de registre dels agents de biocontrol simplifica molt aquest procediment i els estudis toxicològics són més curts i barats que els dels productes químics de síntesi, principalment perquè no és necessari estudiar la toxicologia crònica. Això és degut al gran interès per part de l'EPA en facilitar l'aparició de pesticides biològics. Així, les úniques formulacions a base d'antagonistes

disponibles actualment al mercat per al control de malalties de postcollita de cítrics han estat registrats als EUA i són l'Aspire® (*Candida oleophila* Montrocher, soca I-182; Ecogen Inc., Langhorne, PA, EUA) i el Bio-Save 1000® (*Pseudomonas syringae* Van Hall, soca ESC-10; EcoScience, Longwood, FL, EUA).

La majoria dels agents de biocontrol han estat assajats solament contra un petit nombre de patògens i en conreus molt concrets. Actualment es comença a dedicar més esforços per identificar antagonistes amb espectre d'acció el més ampli possible, és a dir, efectius contra varies malalties i en diferents conreus. Una assignatura pendent que queda en la majoria dels agents de biocontrol descoberts recentment és la determinació del seu mode d'actuació, tot i que en molts dels casos s'ha assenyalat quin podria ésser. La complexitat que els envolta fa que els pocs estudis que hi ha siguin poc conclouents. Els possibles mecanismes són la secreció d'antibiòtics, la competència per nutrients i/o espai, la inducció de resistències als teixits de l'hoste i la interacció directa amb el patògen (Wilson *et al.*, 1991). L'aplicació dels antagonistes a nivell comercial ha resultat en una gran variabilitat en els resultats i no ha igualat, en general, l'eficàcia dels fungicides sintètics. Per aquest motiu, actualment es treballa en el desenvolupament de l'anomenada segona generació de productes biològics (Droby *et al.*, 2001), en la qual s'intenta millorar la capacitat antagonista dels agents de biocontrol per diversos mitjans com per exemple la seva manipulació genètica o l'addició de nutrients. Una altra possibilitat força interessant, que es presentarà més endavant, és la combinació del control biològic amb altres sistemes de lluita.

#### **4.3.2. Obtenció de cultivars resistents**

L'obtenció de genotips resistents a les malalties de postcollita és, entre les alternatives als fungicides de síntesi, l'opció a més llarg termini de totes. No obstant, les tècniques modernes d'enginyeria genètica podrien permetre assolir aquesta obtenció en un període de temps molt més curt que la selecció genètica tradicional. En aquest cas, però, caldria esbrinar com els mercats acollirien la fruita produïda per aquests cultivars resistents ja que, degut a la polèmica que avui dia envolta a tots els aliments genèticament modificats, la resposta dels consumidors és incerta, i més si es té en compte que les fruites són aliments de consum directe.

#### **4.4. Integració de sistemes alternatius**

Davant el fet que amb els sistemes alternatius que s'han assajat fins ara, siguin físics, químics o biològics, difícilment s'assoleixen els nivells d'efectivitat que

proporcionen els fungicides sintètics, actualment s'estan dedicant molts esforços a nivell mundial en avaluar la integració de dos o més sistemes.

El raspallat amb aigua calenta (HWB) és una tècnica desenvolupada i patentada recentment a Israel que combina un raspallat suau sobre els fruits cítrics amb una dutxa de curta durada (10-20 s) amb aigua a alta temperatura (56-60°C). Els estudis realitzats indiquen que aquesta tècnica redueix significativament la podridura verda sense afectar la qualitat externa ni interna de taronges, aranges i mandarines (Porat *et al.*, 2000). El recobriment individual dels fruits cítrics amb envoltures plàstiques és una pràctica que, a part de poder-se combinar amb la conservació a baixes temperatures per minimitzar les pèrdues d'aigua per transpiració (Grierson i Ben-Yehoshua, 1986), permet millorar l'efecte del curat a altes temperatures (Ben-Yehoshua *et al.*, 1989). La combinació del recobriment dels fruits amb banys d'aigua calenta o amb el tractament de raspallat amb aigua calenta també afavoreix el manteniment de la qualitat en aranges conservades en fred (Rodov *et al.*, 2000).

L'escalfament de les solucions aquoses de fungicides sintètics com l'imazalil o el tiabendazol augmenta la seva efectivitat en comparació amb les solucions a temperatura ambient, permet disminuir les dosis d'aplicació i també té efectes positius en la inducció de resistència als danys per fred (Barkai-Golan i Apelbaum, 1991; Schirra i Mulas, 1995; Tuset *et al.*, 1996; Schirra *et al.*, 1997b; Smilanick *et al.*, 1997b; Schirra *et al.*, 2000b). L'efectivitat dels tractaments amb additius alimentaris, productes químics de baixa toxicitat i algunes substàncies naturals es pot incrementar significativament quan les solucions aquoses d'aquests compostos s'escalfen a temperatures adequades, observant-se un sinergisme entre els efectes propis dels productes i els de l'aigua calenta. Aquest és el cas de substàncies com el carbonat sòdic (Smilanick *et al.*, 1997a; Daus *et al.*, 2000), el sorbat potàssic (Wild, 1987; Kitagawa i Kawada, 1984; Brown i Baraka, 1996), l'etanol i el diòxid de sofre (Smilanick *et al.*, 1995; Brown i Baraka, 1996) i els terpens L-carvona i eugenol, components d'olis essencials presents en plantes superiors (Bompeix i Cholodowski-Faivre, 1997). La temperatura més convenient cal determinar-la per a cada producte, però en general, i de manera semblant al cas de l'aigua calenta sola, temperatures inferiors als 40°C no aporten cap millora i temperatures superiors als 50°C resulten fitotòxiques. En altres casos com per exemple el dels tractaments amb polisulfur de calci contra la podridura verda, les solucions a temperatura ambient resulten del tot inefectives i el control de la malaltia només es produeix quan aquestes solucions s'escalfen a temperatures superiors als 40°C (Smilanick i Sorenson, 2001).

L'aplicació de microorganismes antagonics en combinació amb altres sistemes alternatius, tant físics com químics, és avui dia un camp de recerca molt actiu. La

capacitat de control de la podridura verda per part de l'antagonista *Pseudomonas glathei* en taronges es va veure significativament incrementada quan la fruita tractada amb l'agent de biocontrol es va sotmetre a un tractament de curat a 30°C durant 24 h (Huang *et al.*, 1995). La integració entre un tractament amb llum ultraviolada (UV-C) i un tractament amb l'antagonista *Candida guilliermondii* (llavors classificat com *Debaryomyces hansenii*) va donar millors resultats contra la podridura verda en mandarines que ambdós tractaments per separat (Stevens *et al.*, 1997). El recobriment individual dels fruits amb diferents materials s'ha assajat amb èxit com a sistema portador de diferents microorganismes antagonics; aquest procediment permet, a més, reduir les pèrdues d'aigua del fruit per transpiració i endarrerir la seva senescència (McGuire, 1994; McGuire i Hagenmaier, 1996). Recobriments a base de metilcelulosa i de metilcelulosa formulada addicionant glucosa i clorur càlcic van millorar l'efectivitat de *Candida guilliermondii* en el control de *P. digitatum* en taronges (Potjewijd *et al.*, 1995). Un altre mètode físic que ha mostrat una acció sinèrgica en combinar-se amb el control biològic és el raspatllat amb aigua calenta (Daus *et al.*, 2000).

A continuació es relacionen alguns dels productes amb els quals s'han obtingut els resultats més interessants a l'integrar tractaments químics amb l'aplicació d'agents microbians de biocontrol; la gran majoria d'aquests resultats es refereixen al control integrat de la podridura verda: clorur càlcic (Chalutz *et al.*, 1992a; Droby *et al.*, 1997), carbonat sòdic (Wisniewski *et al.*, 1998; Smilanick *et al.*, 1999b; Daus *et al.*, 2000), àcid nordihidroguaicètic, poli-D-lisina i poli-D-arginina (Wisniewski *et al.*, 1998), quitosan i derivats (Fajardo *et al.*, 1998; El Ghaouth *et al.*, 2000a), 2-deoxi-D-glucosa (El Ghaouth *et al.*, 2000b), lizozima (Wisniewski *et al.*, 2001). Algunes d'aquestes substàncies complementen amb una acció curativa l'activitat dels agents de biocontrol.

A part de la seva efectivitat més gran, altres avantatges de les combinacions respecte a l'aplicació d'agents de biocontrol sols són la seva major estabilitat i el fet que la complexitat dels seus modes d'acció dificulta més el desenvolupament de resistències per part dels patògens (Droby *et al.*, 2001). La integració de tractaments apareix, per tant, com la tecnologia més prometedora per aconseguir igualar l'efectivitat dels fungicides sintètics. Caldria, com a perspectiva de futur, continuar els esforços de recerca en aquesta direcció.

## 5. Objectius

L'objectiu general d'aquesta tesi és el desenvolupament de sistemes alternatius que possibilitin el control de les principals malalties de postcollita sense la utilització

de productes químics de síntesi. El treball de la tesi està centrat en el sector cítricol català, representat bàsicament per la zona productora del sud de Tarragona, comarques del Baix Ebre i Montsià. Després de caracteritzar les poblacions fúngiques en camps i centrals de la zona, es pretèn, com un component important d'un programa de producció integrada de cítrics, oferir alternatives o aprofundir en l'estudi d'alternatives per al control de les podridures verda i blava, causades respectivament per *P. digitatum* i *P. italicum*.

Els objectius particulars que es plantegen són els següents:

1. Caracterització de la micoflora de la superfície dels fruits i ambiental en camps de mandarina clementina "Clemenules" representatius de la zona cítricol de Tarragona durant el període de recol·lecció.
2. Caracterització de la micoflora ambiental i de la superfície d'equips i instal·lacions en centrals cítricoles de Tarragona durant el període de comercialització de les clementines.
3. Quantificació en centrals cítricoles de Tarragona de les soques de *P. digitatum*, *P. italicum* i altres *Penicillium* spp. resistents als fungicides imazalil i tiabendazol.
4. Avaluació de tractaments amb aigua calenta, carbonat sòdic i bicarbonat sòdic per al control de les podridures verda i blava en taronges i mandarines clementines comercialitzades directament o conservades en fred normal.
5. Avaluació *in vivo* d'altres additius alimentaris i compostos de baixa toxicitat per al control de les podridures verda i blava en taronges i llimones.
6. Determinació de l'efecte de l'exposició contínua o intermitent a una atmosfera ozonitzada durant la conservació frigorífica sobre el desenvolupament de les podridures verda i blava en taronges i llimones.
7. Aïllament de bacteris i llevats epifítics i endofítics i determinació *in vivo* en taronges i mandarines de la seva capacitat antagonista contra els patògens *P. digitatum* i *P. italicum*.
8. Avaluació de l'efectivitat de la soca CPA-2 del bacteri *Pantoea agglomerans* en el control biològic de les podridures verda i blava en taronges i mandarines. Determinació de la dinàmica poblacional de l'antagonista a temperatura ambient i en fred normal.

9. Millora del control de les podridures verda i blava en taronges mitjançant la combinació de l'aplicació de la soca CPA-2 de *P. agglomerans* amb tractaments amb bicarbonat sòdic.

## 6. Referències bibliogràfiques

- Adaskaveg, J.E., Förster, H. 2000. "Reduced Risk" fungicides, a new direction for management of postharvest decays on fruit crops in the United States. Proc. Fourth Int. Conf. Postharvest Sci. Postharvest 2000, 26-31 març, Jerusalem, Israel. p. 35 (resum).
- AEA, Anuario de Estadística Agraria. 1999. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, Espanya.
- Aharoni, Y., Lattar, F.S., 1972. The effect of various storage atmospheres on the occurrence of rots and blemishes on Shamouti oranges. *Phytopathol. Z.* 73: 371-374.
- Angioni, A., Cabras, P., D'hallewin, G., Pirisi, F.M., Reniero, F., Schirra, M. 1998. Synthesis and inhibitory activity of 7-geranoxycoumarin against *Penicillium* species in *Citrus* fruit. *Phytochemistry* 47: 1521-1525.
- Arimoto, Y., Sugarawa, F., Yoshida, S., Yamaguchi, I. 1995. Prangolarin is a chemical facilitator for the enhanced development of the infection process in the epicarp of *Citrus limon* by *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2283-2285.
- Arras, G. 1996. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharvest Biol. Technol.* 8: 191-198.
- Arras, G., De Cicco, V. 1994. Metabolic changes and postharvest diseases of orange fruit during storage. Proc. Sixth Int. Symp. Eur. Conc. Act. Prog. COST 94, 19-22 octubre, Oosterbeek, Holanda. pp. 201-208.
- Arras, G., D'hallewin, G. 1994. *In vitro* and *in vivo* control of *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea* in citrus fruit by *Bacillus subtilis* strains. *Agr. Med.* 124: 56-61.
- Asthana, A., Tuveson, R.W. 1992. Effects of UV and phototoxins on selected fungal pathogens of citrus. *Int. J. Plant Sci.* 153: 442-452.
- Baker, K.F., Cook, R.J. 1974. *Biological Control of Plant Pathogen*. Freeman, W.H. & Co., San Francisco, CA, EUA.
- Bancroft, M.N., Gardner, P.D., Eckert, J.W., Baritelle, J.L. 1984. Comparison of decay strategies in California lemon packinghouses. *Plant Dis.* 68: 24-28.
- Barkai-Golan, R., Apelbaum, A. 1991. Synergistic effects of heat and sodium o-phenyl phenate treatments to inactivate *Penicillium* spores and suppress decay in citrus fruits. *Trop. Sci.* 31: 229-233.
- Barkai-Golan, R., Phillips, D.J. 1991. Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. *Plant Dis.* 75: 1085-1089.
- Barmore, C.R., Brown, G.E. 1979. Role of pectolytic enzymes and galacturonic acid in citrus fruit decay caused by *Penicillium digitatum*. *Phytopathology* 69: 675-678.
- Barmore, C.R., Brown, G.E. 1981. Polygalacturonase from citrus fruit infected with *Penicillium italicum*. *Phytopathology* 71: 328-331.

- Barmore, C.R., Brown, G.E. 1982. Spread of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* during contact between citrus fruits. *Phytopathology* 72: 116-120.
- Ben-Yehoshua, S., Kim, J.J., Shapiro, B. 1989. Curing of citrus fruits, applications and mode of action. Proc. Fifth Int. Cont. Atmosphere Res. Conf. Vol. 2, 14-16 juny, Wenatchee, WA, EUA. pp. 179-196.
- Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Fang, D.Q., Kim, J.J. 1995. Preformed antifungal compounds of citrus fruits: effect of postharvest treatments with heat and growth regulators. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1062-1066.
- Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Kim, J.J., Carmeli, S. 1992. Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1217-1221.
- Ben-Yehoshua, S., Shapiro, B., Moran, R. 1987. Individual seal-packaging enables the use of curing at high temperatures to reduce decay and heal injury of citrus fruits. *HortScience* 22: 777-783.
- Ben-Yehoshua, S., Shapiro, B., Shomer, M. 1990. Ethylene enhanced heat damage to flavedo tissue of cured citrus fruit. *HortScience* 25: 122-124.
- Bompeix, G., Cholodowski-Faivre, D. 1997. Fungicides and natural plant products combined with hot dip treatments in water. Proc. Int. Symp. Post-harvest Treatment of Citrus Fruits to Control Decay during Storage and Marketing, 13 octubre, Acireale, Itàlia. pp. 153-164.
- Brown, G.E. 1973. Development of green mold in degreened oranges. *Phytopathology* 63: 1104-1107.
- Brown, G.E. 1975. Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. *Phytopathology* 65: 404-409.
- Brown, G.E. 1980. Fruit handling and decay control techniques affecting quality. A: Citrus Nutrition and Quality. Nagy, S., Attaway, J.A. (Eds.). ACS Symp. Ser. 143, Washington, DC, EUA. pp. 193-224.
- Brown, G.E. 1982. Resistance of decay fungi to benzimidazole fungicides used in Florida citrus packinghouses. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 95: 239-242.
- Brown, G.E., Baraka, M.A. 1996. Effect of washing sequence and heated solutions to degreened Hamlin oranges on *Diplodia* stem-end rot, fruit colour and phytotoxicity. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 2: 1164-1170.
- Brown, G.E., Lee, H.S. 1993. Interactions of ethylene with citrus stem-end rot caused by *Diplodia natalensis*. *Phytopathology* 83: 1204-1208.
- Brown, G.E., Nagy, S., Maraulja, M. 1983. Residues from postharvest nonrecovery spray applications of imazalil to oranges and effects on green mold caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Dis.* 67: 954-957.
- Brown, G.E., Wardowski, W.F. 1984. Use of chlorine and chlorine dioxide in Florida citrus packinghouses to reduce inoculum of decay pathogens. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 97: 97-100.
- Bull, C.T., Stack, J.P., Smilanick, J.L. 1997. *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue molds of citrus. *Biol. Control* 8: 81-88.

- Burg, S.P., Burg, E.A. 1966. Fruit storage at subatmospheric pressures. *Science* 153: 314-315.
- Bus, V.G., Bongers, A.J., Risse, L.A. 1991. Occurrence of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazalil on citrus fruit from different geographic origins. *Plant Dis.* 75: 1098-1100.
- Caccioni, D.R.L., Guizzardi, M. 1994. Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components. *J. Ess. Oil Res.* 6: 173-179.
- Ceponis, M.J., Capellini, R.A. 1985. Wholesail and retail losses in grapefruit marketed in metropolitan New York. *HortScience* 20: 93-95.
- Ceponis, M.J., Capellini, R.A., Lightner, G.W. 1986. Disorders in citrus shipments to the New York market, 1972-1984. *Plant Dis.* 70: 1162-1165.
- Chace, W.G. Jr. 1969. Controlled atmosphere storage of Florida citrus fruit. *Proc. First Int. Citrus Symp.* 3: 1365-1373.
- Chalutz, E., Droby, S., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M. 1992a. Calcium-enhanced biocontrol activity of two yeasts antagonists of citrus postharvest diseases. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 3: 1066-1069.
- Chalutz, E., Droby, S., Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. 1992b. UV-induced resistance to postharvest diseases of citrus fruit. *J. Phytochem. Photobiol.* 15: 367-374.
- Chalutz, E., Wilson, C.L. 1990. Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Dis.* 74: 134-137.
- Christ, R.A. 1966. The effect of handling on citrus wastage. *S. Afr. Citrus J.* 387: 7, 9, 11, 13, 15.
- Correas, J.L., Miranda, G. 1990. Tratamientos químicos de cítricos en post-recolección. *Fruticultura Profesional* 28: 68-78.
- Couey, H.M. 1989. Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pests of fruits. *HortScience* 24: 198-202.
- D'hallewin, G., Schirra, M. 2001. Structural changes in epicuticular wax and storage response of 'Marsh Seedless' grapefruits after ethanol dips at 21 and 50°C. *Acta Hort.* 553: 441-442.
- Daus, A., Weiss, B., Cohen, L., Shachnai, A., Porat, R., Droby, S. 2000. Integration of yeast biocontrol agents, hot water, and food additives for the control of postharvest diseases of citrus fruit. *Proc. Int. Soc. Citriculture Congress 2000*, 3-7 de setembre, Orlando, FL, EUA. p. 165 (resum).
- De Matos, A.P. 1983. Chemical and microbiological factors influencing the infection of lemons by *Geotrichum candidum* and *Penicillium digitatum*. PhD thesis, University of California, Riverside, CA, EUA.
- De Waard, M.A., Groeneweg, H., Van Nistelrooy, J.G.M. 1982. Laboratory resistance to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in *Penicillium italicum*. *Neth. J. Plant Path.* 88: 99-112.
- Deacon, J.W. 1983. *Microbial Control of Plant Pest and Diseases*. Van Nostrand Reinhold Co. Ltd., London, GB.

- Dettori, A., D'hallewin, G., Aggabio, M., Marceddu, S., Schirra, M. 1996. SEM studies on *Penicillium italicum* – 'Star Ruby' grapefruit interactions as affected by fruit hot water dipping. Proc. Int. Soc. Citriculture 2: 1158-1163.
- Dezman, D.J., Nagy, S., Brown, G.E. 1986. Postharvest fungal decay control chemicals: treatments and residues in citrus fruits. Residue Rev. 97: 37-92.
- Díaz, M.A., Vila, R. 1988. El problema de la resistencia a los fungicidas: referencia a la situación en los almacenes españoles de comercialización de cítricos. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 28: 151-158.
- Díaz, M.A., Vila, R. 1989. Imazalil resistant *Penicillium* isolates from spanish citrus packinghouses. Microbiol. Alim. Nutr. 7: 191-192.
- Díaz, M.A., Vila, R. 1990. Biological control of *Penicillium digitatum* by *Trichoderma viride* on postharvest citrus fruits. Int. J. Food Microbiol. 11: 179-184.
- Díaz, M.A., Vila, R., Hernández, E. 1987a. Detección de *Penicillium italicum* resistentes a OPPS, benomilo, TBZ y CGA-64251, procedentes de almacenes españoles de comercialización de frutos cítricos. Alimentaria 184: 59-70.
- Díaz, M.A., Vila, R., Hernández, E. 1987b. Resistencia de *Penicillium digitatum*, aislados en centros españoles de comercialización de cítricos, frente a los fungicidas OPPS, benomilo, TBZ y CGA-64251. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 27: 439-445.
- Dickson, R.G., Law, S.E., Kays, S.J., Eiteman, M.A. 1992. Abatement of ethylene by ozone treatment in controlled atmosphere storage of fruits and vegetables. Proc. Int. Winter Meet. Amer. Soc. Agric. Engin., 15-18 desembre, Nashville, TN, EUA.
- Droby, S., Chalutz, E., Horev, B., Cohen, L., Gaba, V., Wilson, C.L., Wisniewski, M. 1993a. Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mould decay caused by *Penicillium digitatum*. Plant Pathol. 42: 418-424.
- Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., Katz, H., Keren-Tzur, M., Sachnai, A. 1998. Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. Biol. Control 12: 97-101.
- Droby, S., Cohen, L., Weiss, B., Wisniewski, M. 2001. Microbial control of postharvest diseases of fruits and vegetables - current status and future outlook. Acta Hort. 553: 371-376.
- Droby, S., Hofstein, R., Wilson, C.L., Wisniewski, M., Fridlender, B., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A., Timar, D., Chalutz, E. 1993b. Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruits. Biol. Control 3: 47-52.
- Droby, S., Porat, R., Cohen, L., Weiss, B., Shapiro, B., Philosoph-Hadas, S., Meir, S. 1999. Suppressing green mold decay in grapefruit with postharvest jasmonate application. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 124: 184-188.
- Droby, S., Wisniewski, M.E., Cohen, L., Weiss, B., Touitou, D., Eilam, Y., Chalutz, E. 1997. Influence of CaCl<sub>2</sub> on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. Phytopathology 87: 310-315.
- Duran, R., Norman, S.M. 1961. Differential sensitivity to biphenyl among strains of *Penicillium digitatum* Sacc. Plant Dis. Rep. 45: 475-480.
- EAPC, Estadístiques Agràries i Pesqueres de Catalunya. 1998. Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Catalunya, Espanya.

- Eckert, J.W. 1977. Control of postharvest diseases. A: Antifungal Compounds. Vol. 1. Siegel, M.R., Sisler, H.D. (Eds.). Marcel Dekker Inc., New York, EUA. pp. 269-352.
- Eckert, J.W. 1990. Impact of fungicide resistance on citrus fruit decay control. A: Managing Resistance to Agrochemicals. From Fundamental Research to Practical Strategies. Green, M.B., Le Baron, H.M., Moberg, W.K. (Eds.). ACS Symp. Ser. 421, Washington, DC, EUA. pp. 286-302.
- Eckert, J.W., Brown, G.E. 1986. Postharvest citrus diseases and their control. A: Fresh Citrus Fruits. Wardowski, W.F., Nagy, S., Grierson, W. (Eds.). AVI Publishing Co. Inc., Westport, CT, EUA. pp. 315-360.
- Eckert, J.W., Eaks, I.L. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. A: The Citrus Industry. Vol. 5. Reuter, W., Calavan, E.C., Carman, G.E. (Eds.). Pub. 3326, University of California Press, Berkeley, CA, EUA. pp. 179-260.
- Eckert, J.W., Ogawa, J.M. 1985. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. Ann. Rev. Phytopathol. 23: 421-454.
- Eckert, J.W., Ratnayake, M. 1981. Host pathogen interactions in postharvest diseases. A: Postharvest Physiology and Crop Preservation. Lieberman, M. (Ed.). Plenum Press, New York, EUA. pp. 247-264.
- Eckert, J.W., Ratnayake, M. 1994. Role of volatile compounds from wounded oranges in induction of germination of *Penicillium digitatum* conidia. Phytopathology 84: 743-750.
- Eckert, J.W., Sievert, J.R., Ratnayake, M. 1994. Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. Plant Dis. 78: 971-974.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Asselin, A., Benhamou, N. 1992. Anti-fungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. Mycol. Res. 96: 769-779.
- El Ghaouth, A., Smilanick, J.L., Wilson, C.L. 2000a. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. Postharvest Biol. Technol. 19: 103-110.
- El Ghaouth, A., Smilanick, J.L., Wisniewski, M., Wilson, C.L. 2000b. Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. Plant. Dis. 84: 249-253.
- El-Goorani, M.A., El-Kasheir, H.M., Shoeib, A.A. 1983. Resistance to benzimidazole fungicides of *Penicillium italicum* and *P. digitatum* isolated from packinghouses and orchards in Egypt. Plant Dis. 62: 100-102.
- El-Goorani, M.A., Sommer, N.F. 1979. Suppression of postharvest plant pathogenic fungi by carbon monoxide. Phytopathology 69: 834-838.
- Fajardo, J.E., McCollum, T.G., McDonald, R.E., Mayer, R.T. 1998. Differential induction of proteins in orange flavedo by biologically based elicitors and challenged by *Penicillium digitatum* Sacc. Biol. Control 13: 143-151.
- Fawcett, H.S. 1922. Packinghouse control of brown rot. Calif. Citrogr. 7: 232, 254.
- Fawcett, H.S. 1936. Citrus Diseases and their Control. 2a ed. Ed. McGraw-Hill Book Co., New York, EUA.

- Ferguson, I.B., Ben-Yehoshua, S., Mitcham E.J., McDonald, R.E., Lurie, S. 2000. Postharvest heat treatments: introduction and workshop summary. *Postharvest Biol. Technol.* 21: 1-6.
- Gardner, P.D., Eckert, J.W., Baritelle, J.L., Bancroft, M.N. 1986. Management strategies for control of *Penicillium* decay in lemon packinghouses: economic benefits. *Crop Prot.* 5: 26-32.
- González-Aguilar, G.A., Zacarias, L., Mulas, M., Lafuente, M.T. 1997. Temperature and duration of water dips influence chilling injury, decay and polyamine content in "Fortune" mandarins. *Postharvest Biol. Technol.* 12: 61-69.
- Grange, M., Ahmed, S. 1988. *Handbook of Plants with Pest Control Properties*. John Wiley & Sons, New York, EUA.
- Green, F.M. 1932. The infection of oranges by *Penicillium*. *J. Pomol. Hort. Sci.* 10: 184-215.
- Grierson, W., Ben-Yehoshua, S. 1986. Storage of citrus fruits. A: *Fresh Citrus Fruits*. Wardowski, W.F., Nagy, S., Grierson, W. (Eds.). AVI Publishing Co. Inc., Westport, CT, EUA. pp. 479-507.
- Griffiths, E. 1981. Iatrogenic plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 19: 69-82.
- Gueldner, R.C., Reilly, C.C., Pusey, P.L., Costello, C.E., Arrendale, R.F., Cox, R.H., Himmelsbach, D.S., Crumley, F.G., Cutler, H.G. 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *J. Agric. Food Chem.* 36: 366-370.
- Gutter, Y. 1975. Interrelationship of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* in thiabendazole-treated oranges. *Phytopathology* 65: 498-499.
- Gutter, Y. 1977. Problems of decay in marketing citrus fruits: strategy and solutions around the world. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1: 242-244.
- Gutter, Y., Shachnai, A., Schiffmann-Nadel, M., Dinoor, A. 1981. Biological aspects of citrus molds tolerant to benzimidazole fungicides. *Phytopathology* 71: 482-487.
- Hall, D.J. 1988. Comparative activity of selected food preservatives as citrus postharvest fungicides. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 101: 184-187.
- Harding, P.R. Jr. 1962. Differential sensitivity to sodium orthophenylphenate by biphenyl-sensitive and biphenyl-resistant strains of *Penicillium digitatum*. *Plant Dis. Rep.* 46: 100-104.
- Harding, P.R. Jr. 1968. Effect of ozone on *Penicillium* mold decay and sporulation. *Plant Dis. Rep.* 52: 245-247.
- Harding, P.R. Jr. 1969. Effect of low oxygen and low carbon dioxide combination in controlled atmosphere storage of lemons, grapefruit and oranges. *Plant Dis. Rep.* 53: 585-588.
- Harding, P.R. Jr. 1972. Differential sensitivity to thiabendazole by strains of *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. *Plant Dis. Rep.* 56: 256-260.
- Holmes, G.J., Eckert, J.W. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* 89: 716-721.
- Hopkins, E.F., Loucks, K.W. 1949. Has ozone any value in the treatment of citrus fruit for decay? *Citrus Ind.* 30: 5-7, 22.

- Houck, L.G. 1967. Hot water treatments for control of *Penicillium* green mold of Eureka lemons. *Phytopathology* 57: 99 (resum).
- Houck, L.G. 1977. Problems of resistance to citrus fungicides. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1: 263-269.
- Huang, Y., Deverall, B.J., Morris, S.C. 1995. Postharvest control of green mold on oranges by a strain of *Pseudomonas glathei* and enhancement of its biocontrol by a heat treatment. *Postharvest Biol. Technol.* 5: 129-137.
- Huang, Y., Deverall, B.J., Morris, S.C., Wild, B.L. 1993. Biocontrol of postharvest orange diseases by a strain of *Pseudomonas cepacia* under semi-commercial conditions. *Postharvest Biol. Technol.* 3: 293-304.
- Huang, Y., Wild, B.L., Morris, S.C. 1992. Postharvest biological control of *Penicillium digitatum* decay on citrus fruit by *Bacillus pumilus*. *Ann. Appl. Biol.* 120: 367-372.
- Jin, L., Xiaoyu, W., Honglin, Y., Zonggan, Y., Jiayun, W., Yaguang, L. 1989. Influence of discharge products on post-harvest physiology of fruit. *Proc. Sixth Int. Symp. High Voltage Engin.*, 28 agost-1 setembre, New Orleans, LA, EUA. pp. 1-4.
- Kader, A.A. 1986. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technol.* 40: 99-104.
- Kader, A.A. 1999. Current and potential applications of ionizing radiation in postharvest handling of fresh horticultural perishables. *Int. Produce J.* 8: 38-39.
- Kader, A.A., Arpaia, M.L. 1992. Postharvest handling systems: subtropical fruits. A: *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. 2a ed. Kader, A.A. (Ed.). Pub. 3311, University of California Press, Berkeley, CA, EUA. pp. 233-240.
- Kim, J.J., Ben-Yehoshua, S., Shapiro, B., Henis, Y., Carmeli, S. 1991. Accumulation of scoparone in heat-treated lemon fruit inoculated with *Penicillium digitatum* Sacc. *Plant Physiol.* 97: 880-885.
- Kitagawa, H., Kawada, K. 1984. Effect of sorbic acid and potassium sorbate on the control of sour rot of citrus fruits. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 97: 133-135.
- Klotz, L.J. 1936. Nitrogen trichloride and other gases as fungicides. *Hilgardia* 10: 27-52.
- Lanza, G. 1997. Control del "moho verde" (*Penicillium digitatum*) mediante curación ("curing") a alta temperatura. Últimos ensayos en Italia. *Phytoma España* 90: 95-99.
- Larson, R.A., Berenbaum, M.R. 1988. Environmental phytotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 22: 254-260.
- Lievens, K.H., van Rijsbergen, R., Leyns, F., Lambert, B.J., Tenning, P., Swings, J., Joos, H.J.P. 1989. Dominant rhizosphere bacteria as a source for antifungal agents. *Pest. Sci.* 27: 141-154.
- Lück, E. 1981. Conservación química de los alimentos. Ed. Acribia, Saragossa, Espanya.
- Luckey, T.D. 1991. Radiation hormesis. CRC Press, Boca Raton, FL, EUA.
- Lurie, S. 1998. Postharvest heat treatments. *Postharvest Biol. Technol.* 14: 257-269.
- Mari, M., Guizzardi, M. 1998. The postharvest phase: emerging technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica* 26: 59-66.
- Mari, M., Iori, R., Leoni, E., Marchi, A. 1993. *In vitro* activity of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest fruit pathogens. *Ann. Appl. Biol.* 123: 155-164.

- Marloth, R.H. 1931. The influence of hydrogen-ion concentration and of sodium bicarbonate and related substances on *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. *Phytopathology* 21: 169-198.
- Maxie, E.C., Sommer, N.F., Eaks, I.L. 1969. Effect of gamma radiation on citrus fruits. *Proc. First Int. Citrus Symp.* 3: 1375-1387.
- McGlasson, W.B., Eaks, I.L. 1972. A role for ethylene in the development of wastage and off-flavors in stored "Valencia" oranges. *HortScience* 7: 80-81.
- McGuire, R.G. 1994. Application of *Candida guilliermondii* in commercial citrus coatings for biocontrol of *Penicillium digitatum* on grapefruits. *Biol. Control* 4: 1-7.
- McGuire, R.G., Hagenmaier, R.D. 1996. Shellac coatings for grapefruits that favor biological control of *Penicillium digitatum* by *Candida oleophila*. *Biol. Control* 7: 100-106.
- Multon, J.L. 1988. Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias. Ed. Acribia, Saragossa, Espanya.
- Nafussi, B., Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Peretz, J., Ozer, B.K., D'hallewin, G. 2000. Mode of action of hot water dip in reducing decay of lemon fruit. *Proc. Fourth Int. Conf. Postharvest Sci. Postharvest 2000*, 26-31 març, Jerusalem, Israel. p. 8 (resum).
- Nigam, N., Mukerji, K.G. 1988. Biological control. Concepts and practices. A: Biocontrol of Plant Diseases. Vol 1. Mukerji, K.G., Garg, K.L. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL, EUA. pp. 2-9.
- NRC, National Research Council. 1993. Pesticides in the Diets of Infants and Children. National Academy Press, Washington, DC, EUA.
- NTDGPIC, Norma Tècnica per a la Denominació Genèrica Producció Integrada dels Cítrics. 2001. DARP, Generalitat de Catalunya. <http://www.gencat.es/darp/c/camp/pi>
- Oogaki, C., Manago, M. 1977. Studies on the controlled atmosphere storage of 'Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Proc. Int. Soc. Citriculture*. 3: 1127-1133.
- Pao, S., Brown, G.E. 1998. Reduction of microorganisms on citrus fruit surfaces during packinghouse processing. *J. Food Prot.* 61: 903-906.
- Porat, R., Daus, A., Weiss, B., Cohen, L., Fallik, E., Droby, S. 2000. Reduction of postharvest decay in organic citrus fruit by a short hot water brushing treatment. *Postharvest Biol. Technol.* 18: 151-157.
- Potjewijd, R., Nisperos, M.O., Burns, J.K., Parish, M., Baldwin, E.A. 1995. Cellulose-based coatings as carriers for *Candida guilliermondii* and *Debaryomyces* sp. in reducing decay of oranges. *HortScience* 30: 1417-1421.
- Pratella, G.C., Tonini, G., Cessari, A. 1969. Postharvest disease problems of Italian citrus fruit. *Proc. First Int. Citrus Symp.* 3: 1317-1323.
- Rodov, V., Agar, T., Peretz, J., Nafussi, B., Kim, J.J., Ben-Yehoshua, S. 2000. Effect of combined application of heat treatments and plastic packaging on keeping quality of 'Oroblanco' fruit (*Citrus grandis* L. x *C. paradisi* Macf.). *Postharvest Biol. Technol.* 20: 287-294.
- Rodov, V., Ben-Yehoshua, S., Albagli, R., Fang, D.Q. 1995. Reducing chilling injury and decay of stored citrus fruit by hot water dips. *Postharvest Biol. Technol.* 5: 119-127.

- Roger Amat, S. 1988. Defectos y Alteraciones de los Frutos Cítricos en su Comercialización. Lit. Nicolau, Almassora, València, Espanya.
- Roth, G. 1967. Citrus fruit decay in South Africa caused by *Penicillium digitatum* Sacc. Phytopathol. Z. 58: 383-396.
- Salunkhe, D.K., Desai, B.B. 1984. Postharvest Biotechnology of Fruits. Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL, EUA.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. (Eds.). 1995. Introduction to Food-borne Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holanda.
- Schena, L., Ippolito, A., Zahavi, T., Cohen, L., Nigro, F., Droby, S. 1999. Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. Postharvest Biol. Technol. 17: 189-199.
- Schifmann-Nadel, M. 1977. Chemical and physiological changes in citrus fruit during storage and their relation to fungal infection. Proc. Int. Soc. Citriculture 1: 311-317.
- Schirra, M., Agabbio, M., D'hallewin, G., Pala, M., Ruggiu, R. 1997a. Response of Tarocco oranges to picking date, postharvest hot water dips and chilling storage temperature. J. Agric. Food Chem. 45: 3216-3220.
- Schirra, M., Cabras, P., Angioni, A., D'hallewin, G., Ruggiu, R., Minelli, E.V. 1997b. Effect of heated solutions on decay control and residues of imazalil in lemons. J. Agric. Food Chem. 45: 4127-4130.
- Schirra, M., D'hallewin, G. 1997. Storage performance of 'Fortune' mandarins following hot water dips. Postharvest Biol. Technol. 10: 229-238.
- Schirra, M., D'hallewin, G., Ben-Yehoshua, S., Fallik, E. 2000a. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. Postharvest Biol. Technol. 21: 71-85.
- Schirra, M., D'hallewin, G., Cabras, P., Angioni, A., Ben-Yehoshua, S., Lurie, S. 2000b. Chilling injury and residue uptake in cold-stored 'Star Ruby' grapefruit following thiabendazole and imazalil dip treatments at 20 and 50°C. Postharvest Biol. Technol. 20: 91-98.
- Schirra, M., D'hallewin, G., Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L. 1998. Seasonal susceptibility of Tarocco oranges to chilling injury as affected by hot water and thiabendazole postharvest dip treatments. J. Agric. Food Chem. 46: 1177-1180.
- Schirra, M., Mulas, M. 1995. Improving storability of "Tarocco" oranges by postharvest hot-dip fungicide treatments. Postharvest Biol. Technol. 6: 129-138.
- Segall, R.H. 1968. Fungicidal effectiveness of chlorine as influenced by concentration, temperature, pH, and spore exposure time. Phytopathology 58: 1412-1414.
- Sholberg, P.L. 1998. Fumigation of fruit with short-chain organic acids to reduce the potential of postharvest decay. Plant Dis. 82: 689-693.
- Simmonds, J.H. 1963. Studies in the latent phase of *Colletotrichum* species concerning ripe rots of tropical fruits. Queensland J. Agr. Sci. 20: 373-424.
- Singh, V., Deverall, B.J. 1984. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. Trans. Br. Mycol. Soc. 83: 487-490.
- Singh, A.K., Dickshit, A., Sharma, M.L., Dixit, S.N. 1980. Fungitoxic activity of some essential oils. Econ. Bot. 34: 186-190.

- Singh, A., Singh, R., 1996. Quality of Kinnow mandarins as affected by modified atmosphere storage. *J. Food Sci. Technol.* 33: 483-487.
- Smilanick, J.L., Crisosto, C.H., Mlikota, F. 1999a. Postharvest use of ozone on fresh fruit. *Perishables Handling Quarterly* 99: 10-14.
- Smilanick, J.L., Denis-Arrue, R. 1992. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Dis.* 76: 481-485.
- Smilanick, J.L., Eckert, J.W. 1986. Selective medium for isolating *Penicillium digitatum*. *Plant Dis.* 70: 254-256.
- Smilanick, J.L., Gouin-Behe, C.C., Margosan, D.A., Bull, C.T., Mackey, B.E. 1996. Virulence on citrus of *Pseudomonas syringae* strains that control postharvest green mold of citrus fruit. *Plant Dis.* 80: 1123-1128.
- Smilanick, J.L., Mackey, B.E., Reese, R., Usall, J., Margosan, D.A. 1997a. Influence of concentration of soda ash, temperature, and immersion period on the control of postharvest green mold of oranges. *Plant Dis.* 81: 379-382.
- Smilanick, J.L., Margosan, D.A., Henson, D.J. 1995. Evaluation of heated solutions of sulfur dioxide, ethanol, and hydrogen peroxide to control postharvest green mold of lemons. *Plant Dis.* 79: 742-747.
- Smilanick, J.L., Margosan, D.A., Mlikota, F., Usall, J., Michael, I.F. 1999b. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Dis.* 83: 139-145.
- Smilanick, J.L., Michael, I.F., Mansour, M.F., Mackey, B.E., Margosan, D.A., Flores, D., Weist, C.F. 1997b. Improved control of green mold of citrus with imazalil in warm water compared with its use in wax. *Plant Dis.* 81: 1299-1304.
- Smilanick, J.L., Sorenson, D. 2001. Control of postharvest decay of citrus fruit with calcium polysulfide. *Postharvest Biol. Technol.* 21: 157-168.
- Smoot, J.J. 1969. Decay of Florida citrus fruit stored in controlled atmospheres and in air. *Proc. First Int. Citrus Symp.* 3: 1285-1293.
- Smoot, J.J., Houck, L.G., Johnson, H.B. 1971. Market Diseases of Citrus and Other Subtropical Fruits. *USDA Agric. Handb.* 398.
- Smoot, J.J., McCornack, A.A. 1978. The use of potassium sorbate for citrus decay control. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 91: 119-122.
- Smoot, J.J., Melvin, C.F. 1963. Hot water as a control for decay of oranges. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 76: 322-327.
- Snowdon, A.L. 1990. *A Color Atlas of Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables.* CRC Press, Boca Raton, FL, EUA.
- Sorenson, D., Smilanick, J.L., Margosan, D.A. 1999. Postharvest high pressure washing of citrus fruit with sodium bicarbonate to control green mold. *Phytopathology* 89: S74 (resum).
- Spalding, D.H., Reeder, W.F. 1976. Low pressure (hypobaric) storage of limes. *J. Amer. Hort. Sci.* 101: 367-370.
- Spalding, D.H., Reeder, W.F. 1985. Effect of hot water and gamma radiation on postharvest decay of grapefruit. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 98: 207-208.

- Stevens, C., Khan, V.A., Lu, J.Y., Wilson, C.L., Pusey, P.L., Igwebbe, E.C.K., Kabwe, K., Mafolo, Y., Liu, J., Chalutz, E., Droby, S. 1997. Integration of ultraviolet (UV-C) light with yeast treatment for control of postharvest storage rots of fruits and vegetables. *Biol. Control* 10: 98-103.
- Suslow, T. 1997. Postharvest Chlorination. Basic Properties and Key Points for Effective Disinfection. Pub. 8003, University of California Press, Berkeley, CA, EUA.
- Suslow, T. 1998. Basics of ozone applications for postharvest treatment of fruits and vegetables. *Perishables Handling Quarterly* 94: 9-11.
- Tuset, J.J. 1987. Podredumbres de los Frutos Cítricos. Conselleria d'Agricultura i Pesca, Generalitat Valenciana, València, Espanya.
- Tuset, J.J. 1998. Una década de las enfermedades fúngicas de la postrecolección de los agrinos. *Phytoma España* 100: 180-187.
- Tuset, J.J., Hinarejos, C., Mira, J.L., Martínez-Jávega, J.M. 1996. Tratamientos térmicos a los frutos cítricos para el control de las enfermedades de la post-recolección. *Levante Agrícola* 337: 342-347.
- Tuset, J.J., Piquer, J., García Ramos, J. 1980. El podrido de los frutos cítricos en nuestras condiciones ambientales. *ITEA* 40: 34-42.
- Tuset, J.J., Portilla, M.T., Hinarejos, C., Buj, A. 1992. *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*, causing postharvest decay of citrus fruit. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 3: 1040-1043.
- US FDA, United States Food and Drug Administration. 1997. Substances generally recognized as safe, proposed rule. *Federal Register* 62 (74): 18937-18964.
- van Gestel, J.F.E. 1983. Microcycle conidiation in *Penicillium italicum*. *Exp. Mycol.* 7: 287-291.
- Viñas, I. 1990. Principios básicos de la patología de post-cosecha. *Frut* 5: 285-292.
- Vyas, C. 1988. Iatrogenic diseases. A: Nontarget Effects of Agricultural Fungicides. Vyas, C. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, EUA. pp. 87-96.
- Wells, J.M., Spalding, D.H. 1976. Stimulation of *Geotrichum candidum* by low oxygen and high carbon dioxide atmospheres. *Phytopathology* 65: 1299-1302.
- Whiteside, J.O., Garnsey, S.M., Timmer, L.W. (Eds.). 1993. *Compendium of Citrus Diseases*. 2a ed. APS Press, St. Paul, MN, EUA.
- Wild, B.L. 1987. Fungicidal activity of potassium sorbate against *Penicillium digitatum* as affected by thiabendazole and dip temperature. *Sci. Hortic.* 32: 41-47.
- Wild, B.L. 1993. Reduction of chilling injury in grapefruits and oranges stored at 1°C by prestorage hot dip treatments, curing and wax application. *Austral. J. Exp. Agric.* 33: 495-498.
- Wild, B.L., Hood, C.W. 1989. Hot dip treatments reduce chilling injury in long-term storage of "Valencia" oranges. *HortScience* 24: 109-110.
- Wild, B.L., McGlasson, W.B., Lee, T.H. 1976. Effect of reduced ethylene levels in storage atmospheres on lemon keeping quality. *HortScience* 11: 114-115.
- Wilson, C.L., El Ghaouth, A., Chalutz, E., Droby, S., Stevens, C., Lu, J.Y., Khan, V.A., Arul, J. 1994. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plant Dis.* 78: 837-844.

- Wilson, C.L., Solar, J.M., El Ghaouth, A., Wisniewski, M.E. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 81: 204-210.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., Biles, C.L., McLaughlin, R., Chalutz, E., Droby, S. 1991. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. Crop Prot. 10: 172-177.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., Droby, S., Chalutz, E. 1993. A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. Sci. Hortic. 40: 105-112.
- Winston, J.R. 1935. Reducing decay in citrus fruits with borax. USDA Agric. Tech. Bull. 488.
- Wisniewski, M.E., Droby, S., El Ghaouth, A., Wilson, C.L. 1998. The use of food additives to control postharvest decay and enhance biocontrol activity of yeast antagonists. Proc. Int. Congress Plant Pathol. 9-16 agost, Edinburg, Escòcia. Abstract 5.2.61 (resum).
- Wisniewski, M.E., Wilson, C.L. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. HortScience 27: 94-98.
- Wisniewski, M.E., Wilson, C.L., El Ghaouth, A., Droby, S. 2001. Non-chemical approaches to postharvest disease control. Acta Hort. 553: 407-412.
- Yarwood, C.E. 1970. Man made diseases. Science 168: 218.

# Capítol 1

---

## Microflora Epífita de los Frutos y Ambiental en Campos de Mandarino 'Clemenules' en Tarragona

L. Palou<sup>1</sup>, J. Usall<sup>1</sup>, J. Pons<sup>2</sup>, I. Viñas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Àrea de Postcollita, CeRTA, Centre UdL-IRTA, Lleida*

<sup>2</sup>*Estació Experimental de l'Ebre, IRTA, Amposta, Tarragona*

**Referència:** *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* 16: 257-272 (2001).

---



## Resumen

Se caracterizó la micoflora epífita de los frutos y la población fúngica ambiental en campos de mandarino ‘Clemenules’ de las comarcas del Baix Ebre y Montsià (Tarragona). Durante dos campañas consecutivas se realizaron dos muestreos (el primero entre septiembre y diciembre y el segundo entre enero y marzo) en cuatro campos comerciales representativos de la zona y en un campo de producción biológica. El género fúngico mayoritariamente aislado en los dos muestreos fue *Cladosporium* (89,8% del total de colonias aisladas de la superficie de los frutos en el primer muestreo y 80,4% en el segundo; y 72,1% del total de colonias aisladas del ambiente en el primer muestreo y 32,7% en el segundo). La frecuencia del género *Penicillium* fue mayor en el segundo muestreo (8,4% y 25,9% de las colonias aisladas de la superficie de los frutos y del ambiente respectivamente) que en el primero (1,2% y 0,6% respectivamente). Lo mismo ocurrió con otros hongos patógenos como *Alternaria* y *Rhizopus*. Tanto la población fúngica total como la de *Penicillium* presentaron una variabilidad muy elevada, con interacciones significativas entre campañas, muestreos y campos. La población fúngica total se correlacionó fuerte y positivamente con la temperatura ( $r > 0,9$ ). La población fúngica ambiental, pero no la epífita de los frutos, fue más alta en el campo de producción biológica que en los campos comerciales. Con la excepción de los géneros *Rhizopus* y *Mucor*, que se localizaron más frecuentemente en los frutos de la parte baja del árbol, no se encontraron diferencias en el nivel de población fúngica entre alturas ni caras del árbol.

**Palabras clave:** cítricos, clementina, enfermedades de post-cosecha, *Penicillium*

## Summary

### Fruit epiphyte and environmental fungal populations in ‘Clemenules’ mandarin orchards in Tarragona (Spain)

Fruit epiphyte and environmental fungal populations were examined in ‘Clemenules’ orchards in Baix Ebre and Montsià areas (Tarragona, Spain). For two consecutive seasons, sampling was conducted twice (from September to December and from January to March) in four representative commercial orchards and in an organic orchard. *Cladosporium* was the most frequent genus present (89.8% and 80.4% of colonies isolated from the fruit surface at the first and second sampling, respectively; and 72.1% and 32.7% of colonies isolated from the environment at the first and second sampling, respectively). Pathogenic fungi like *Penicillium*, *Alternaria*, or

*Rhizopus* were more frequently isolated in the second sampling (8.4% and 25.9% of *Penicillium* colonies from the fruit surface and the environment, respectively) than in the first sampling (1.2% and 0.6% of *Penicillium* colonies from the fruit surface and the environment, respectively). Both total fungal population and *Penicillium* population were found to be highly variable, with significant interactions among years, samplings and orchards. Total fungal population was highly correlated with temperature ( $r > 0.9$ ). Environmental population, but not fruit epiphyte population, was higher in the organic orchard than in the commercial ones. With the exception of *Rhizopus* and *Mucor*, which were isolated more often from fruits located in the lower area in the tree canopy, the fungal population levels were similar in fruits located at different heights in the tree canopy.

**Key words:** citrus, clementine, postharvest diseases, *Penicillium*

## Introducción

La mandarina clementina (*Citrus reticulata* Blanco), y concretamente el cultivar Clemenules, es el cultivo cítrico de mayor importancia económica en Tarragona. Las enfermedades de la post-recolección son una de las principales causas de las pérdidas de producción comercializable. Las infecciones en post-cosecha se producen mayoritariamente a través de heridas en la piel causadas durante la recolección y el posterior manejo de los frutos, aunque también se pueden originar en el campo por distintos agentes bióticos (insectos, pájaros, etc.) o abióticos (viento, lluvia, granizo, etc.). Las infecciones en pre-cosecha se producen cuando el agente patógeno llega a la flor o al fruto durante su desarrollo en el campo y permanece inactivo hasta que, ya en post-cosecha, las condiciones ambientales y fisiológicas del fruto permiten el desarrollo de la enfermedad (Eckert y Eaks, 1989).

El clima, especialmente la temperatura y la humedad relativa (HR) antes y durante el período de recolección, influye decisivamente en la magnitud de la incidencia de estas enfermedades pues determina la cantidad de inóculo disponible, su grado de diseminación y, en consecuencia, el nivel la población fúngica presente en los frutos en el momento de su llegada a la central citrícola (Eckert y Brown, 1986). En las condiciones climáticas mediterráneas, caracterizadas por veranos poco lluviosos, las infecciones en post-cosecha son las de mayor importancia económica, destacando sobretudo la podredumbre verde, causada por *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., y en menor medida las podredumbres azul, ácida y por *Rhizopus*, causadas respectivamente por *Penicillium italicum* Wehmer, *Geotrichum candidum* Link ex.

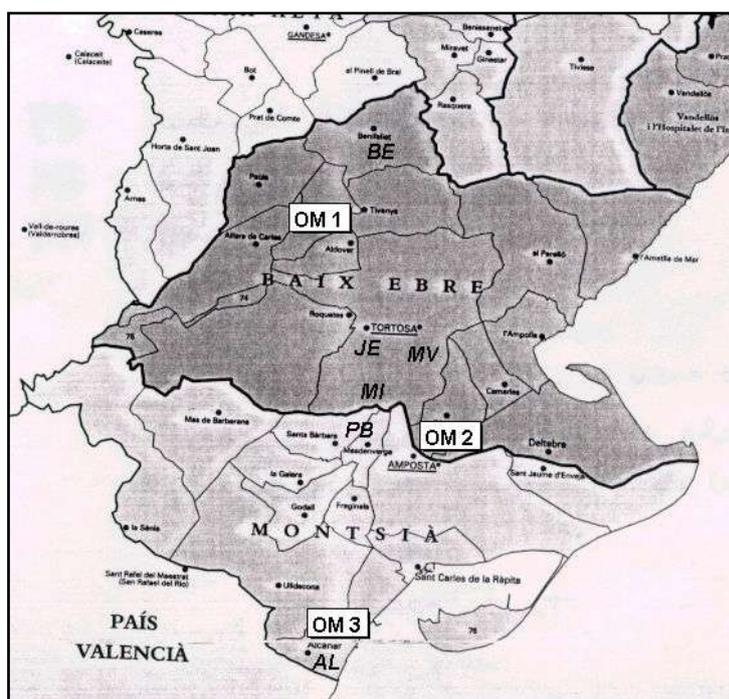
Pers. y *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Lind. (Tuset, 1987). Las infecciones en pre-cosecha más importantes son las podredumbres negra, marrón, gris y la antracnosis, causadas respectivamente por *Alternaria citri* Ell. y Pierce (también de forma secundaria por *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler), *Phytophthora citrophthora* Smith y Smith, *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (Tuset, 1987).

Estudiar la población fúngica para una zona productora concreta es importante porque podría determinar la presencia de hongos patógenos y su distribución, para establecer así los riesgos potenciales de pérdidas y planificar adecuadamente los métodos de control. El objetivo del presente trabajo fue determinar la población fúngica presente en la superficie de los frutos y en el ambiente en campos de mandarina Clemenules de la zona citrícola de Tarragona durante el período de recolección.

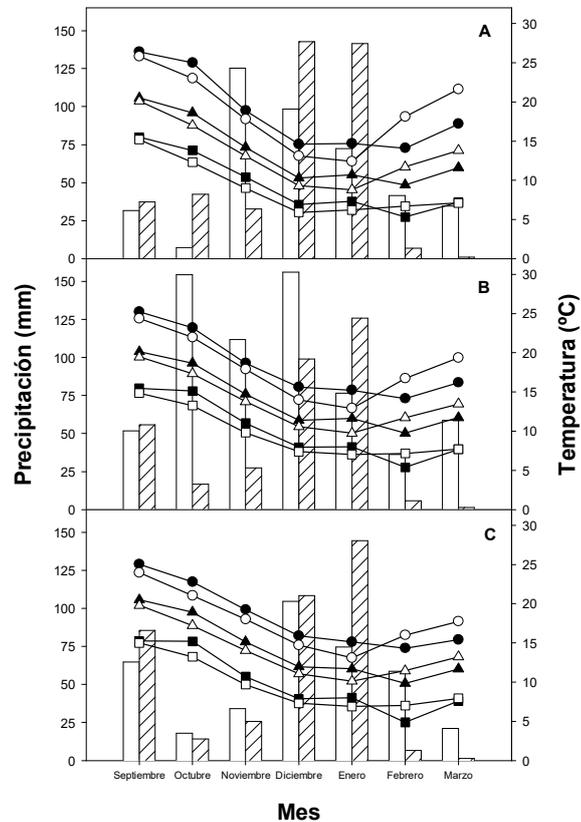
## Material y métodos

**Diseño experimental.** Se muestreó durante dos campañas consecutivas (1995-96 y 1996-97) la micoflora epífita de la superficie de los frutos y la población fúngica ambiental en campos de mandarina Clemenules de la zona citrícola de Tarragona (comarcas del Baix Ebre y Montsià). En cada campaña se realizaron dos muestreos, el primero antes y durante la primera parte del período de recolección (de finales de septiembre a diciembre) y el segundo durante el período de recolección más tardía (de enero a principios de marzo). El primer año se seleccionaron cuatro campos comerciales que por su ubicación fuesen representativos de toda el área productora (campos BE en la zona norte, zona de Benifallet; JE y MI en la zona centro, zona de Amposta y AL en la zona sur, zona de Alcanar), y un campo de producción biológica (campo PB). El segundo año no se pudo acceder al campo JE y se sustituyó por el campo MV, de ubicación y características similares. Tampoco se pudo muestrear el campo PB. En el mapa adjunto (Fig. 1) puede observarse la situación geográfica de los campos, así como la de los tres observatorios meteorológicos (observatorios de Aldover, zona norte; Amposta, zona centro y Alcanar, zona sur) cuyos datos se utilizaron para caracterizar el clima del área productora. Se presentan los valores mensuales de precipitación y temperatura media, media de las máximas y media de las mínimas (Fig. 2), y los de HR media y mínima (Fig. 3) que se registraron en ambas campañas durante los períodos de muestreo. Para el estudio de la micoflora epífita en cada campo se eligieron aleatoriamente diez árboles de la zona central y se marcaron para poder ser identificados en posteriores muestreos. En cada árbol se consideraron

dos orientaciones (cara soleada y cara sombreada) y dos alturas (baja, de la parte media de la copa hacia abajo; y alta, de la parte media de la copa hacia arriba). Se muestrearon, por tanto, cuatro zonas distintas de cada árbol. En cada una de estas zonas la unidad de muestra fue de tres mandarinas, evitándose aquellas situadas en posiciones extremas. Se muestrearon, por consiguiente, un total de 120 frutos por campo en cada uno de los muestreos.



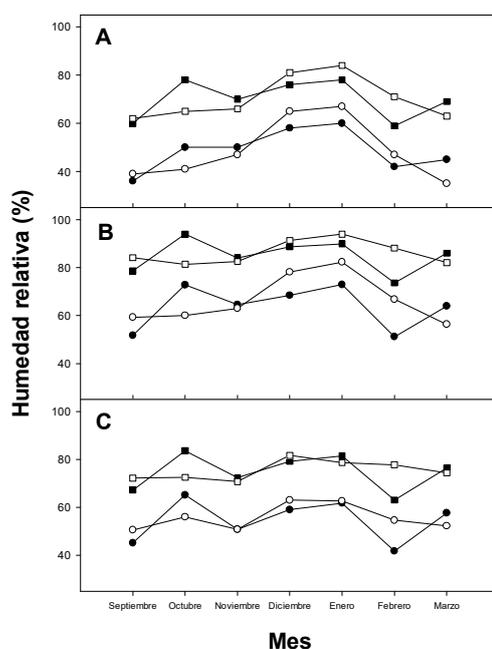
**Fig.1.** Situación geográfica de los campos de mandarina *Clemenules* muestreados (BE, JE, MI, AL, PB, MV) y de los observatorios meteorológicos de Aldover (OM 1), Amposta (OM 2) y Alcanar (OM 3).



**Fig. 2.** Datos mensuales de la precipitación total de las campañas 1995-96 (barras blancas) y 1996-97 (barras rayadas) y de la temperatura media de las máximas (●, ○), media (▲, △) y media de las mínimas (■, □) de las campañas 1995-96 (símbolos negros) y 1996-97 (símbolos blancos) en los observatorios meteorológicos de Aldover (A), Amposta (B) y Alcanar (C).

**Toma de muestras, incubación y recuento.** La micoflora epífita de un fruto se muestreó por impresión ("printing") de éste, sin arrancarlo del árbol, sobre el medio de cultivo de una placa Petri de 9 cm de diámetro. El medio utilizado fue patata dextrosa agar (PDA). Se utilizó una placa por fruto. La micoflora ambiental se muestreó

mediante el método gravimétrico. Se utilizaron cinco placas Petri con medio PDA por campo y muestreo. Las placas se distribuyeron entre dos filas consecutivas de árboles y se abrieron durante 1 min para que las esporas fúngicas se depositasen por gravedad sobre el medio de cultivo. En un intento de minimizar la heterogeneidad de las condiciones de muestreo, las tomas de muestra se realizaron siempre entre las 10 y las 12 h de la mañana. Las placas se incubaron en una cámara climatizada a 25°C y 90% HR durante 7 días, transcurridos los cuales se procedió al recuento e identificación de las colonias fúngicas. La identificación de los géneros se realizó mediante observación microscópica (Webster, 1980; Ellis, 1993a, 1993b; Samson *et al.*, 1995). La frecuencia de cada género fúngico se expresó como número de unidades formadoras de colonias (ufc) por placa, con la excepción de los géneros *Rhizopus* y *Mucor*, con los que, por su distinto hábito de crecimiento, se establecieron dos categorías excluyentes, presencia y ausencia, y cada placa se clasificó como perteneciente a una de las dos.



**Fig. 3.** Datos mensuales de la humedad relativa media (■, □) y media de las mínimas (●, ○) de las campañas 1995-96 (símbolos negros) y 1996-97 (símbolos blancos) en los observatorios meteorológicos de Aldover (A), Amposta (B) y Alcanar (C).

**Análisis estadístico.** Se realizó con el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE UU). Se estudió la correlación entre cada par de variables dependientes (frecuencias de cada género fúngico) y entre la frecuencia de cada género y la frecuencia fúngica total. También se estudió la correlación de las dos variables dependientes más importantes, la frecuencia fúngica total y la frecuencia de *Penicillium*, con la temperatura, precipitación y HR medias mensuales. Para ello se determinó el coeficiente de correlación de Pearson confrontando el número de colonias total o de *Penicillium* de cada placa con el valor de las tres variables climatológicas correspondiente al campo (observatorio más cercano), mes y año en los que se muestreó esa placa.

Para las variables frecuencia fúngica total y frecuencia de *Penicillium*, se estudiaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los datos. A raíz de este estudio, los datos se transformaron a la raíz cuadrada de  $ufc-total/placa+0,5$  en el caso de la población fúngica total y al logaritmo neperiano de  $ufc/placa+1$  en el de *Penicillium*.

(i) *Micoflora epífita de los frutos.* Los datos transformados se sometieron a un análisis de la varianza multifactorial de modelo mixto en el que los factores campaña, árbol y fruto (repetición) se consideraron aleatorios. Puesto que cada muestreo no se pudo realizar en todos los campos, el factor campo se jerarquizó al factor muestreo; el factor árbol se jerarquizó al factor campo, y el resto de factores (altura y orientación) se consideraron cruzados. Debido al gran número de factores implicados en el diseño experimental, se realizó un primer análisis con los factores campaña, muestreo y campo. En función de la significación de las interacciones se realizaron posteriores análisis por separado para cada uno de los distintos niveles de los factores. Cuando resultó procedente, se separaron medias mediante la prueba de la Mínima Diferencia Significativa Protegida de Fisher (MDS;  $p = 0,05$ ).

(ii) *Población fúngica ambiental.* Se realizó el mismo tipo de análisis de la varianza considerando los factores campaña y placa Petri (repetición) aleatorios. El factor campo se jerarquizó al factor muestreo.

(iii) *Géneros Rhizopus y Mucor.* Los datos categorizados en ausencia o presencia de los hongos se contrastaron con las distintas variables explicativas mediante tablas de contingencia. La independencia entre variables se determinó mediante la prueba  $\chi^2$  ( $p = 0,05$ ).

## Resultados

**Micoflora epífita de los frutos.** La media ( $\pm$  error típico) del número total de colonias fúngicas por placa que se aislaron en el conjunto de los campos durante las dos campañas fue de  $157,4 \pm 2,2$  ufc/placa en el primer muestreo y de  $99,2 \pm 2,1$  ufc/placa en el segundo. En el primer muestreo, el 89,8% de las colonias aisladas correspondieron al género *Cladosporium*, el 3,7% al género *Alternaria*, el 1,9% al género *Penicillium*, el 1,2% al género *Epicoccum* y el resto a los géneros *Fusarium*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Aspergillus* y otros géneros. En el segundo muestreo se obtuvo una distribución de géneros similar, con una clara frecuencia mayoritaria de *Cladosporium* (80,4%), un aumento de *Alternaria* (6,3%) y *Fusarium* (1,1%) y un descenso de *Aspergillus*. La principal diferencia respecto al primer muestreo fue el importante incremento de *Penicillium*, que con el 8,4% de las colonias se convirtió en el segundo género más frecuente.

El análisis de la correlación entre frecuencias de los distintos géneros fúngicos mostró una fuerte correlación positiva ( $r > 0,9$ ) en ambos muestreos entre la población fúngica total y la de *Cladosporium* (Tabla 1). La población fúngica total también apareció correlacionada en ambos muestreos positivamente con la de *Penicillium* y negativamente con la de *Epicoccum*. Estas correlaciones fueron de baja magnitud (Tabla 1).

La población fúngica total se correlacionó positivamente con la temperatura, la precipitación y la HR medias mensuales (Tabla 2). Sin embargo, la población de *Penicillium* se correlacionó negativa y débilmente con la temperatura y la HR y no se correlacionó con la precipitación (Tabla 2).

La distribución cuantitativa tanto de la población fúngica total como de la del género *Penicillium* fue irregular y se encontraron diferencias significativas entre campañas, muestreos y campos, así como interacciones significativas entre estos factores ( $p < 0,0001$  en todos los casos; análisis no presentados). Es por ello que la variabilidad entre muestreos se analizó para cada campaña y campo por separado, excepto para los campos JE y BE, que no pudieron muestrearse dos veces cada campaña (análisis no presentados). Con la excepción de la población total en el campo AL en la campaña 1995-96, la población fúngica total disminuyó significativamente ( $p < 0,0001$ ) en el segundo muestreo respecto al primero en todos los campos las dos campañas, mientras que la población de *Penicillium* aumentó ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 4). Los frecuencias fúngicas más altas correspondieron al primer muestreo de la primera campaña, especialmente en los campos JE, PB y MI situados en la zona de Amposta (Fig. 4A-1). En la segunda campaña la micoflora epífita en esta zona fue inferior a la de

las otras dos zonas (Fig. 4B-1). En las zonas de Benifallet (campo BE) y Alcanar (campo AL) no se produjo un contraste tan marcado entre las dos campañas. Las frecuencias más bajas correspondieron al segundo muestreo de la segunda campaña (Fig. 4B-2). En el campo de producción biológica (PB) no se detectaron unos niveles de población especialmente diferentes a los del resto de las parcelas; la población fue más alta que en los campos MI, BE y AL pero más baja que en el campo JE (Fig. 4A). En todos los campos, y con independencia de la campaña y el muestreo, *Cladosporium* fue el género más frecuente en la superficie de los frutos (Fig. 4).

Por otra parte, las variables frecuencia fúngica total y frecuencia del género *Penicillium* se analizaron en función de los factores campo, árbol, orientación y altura para cada muestreo de cada campaña por separado. En los ocho análisis se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre campos y también entre árboles dentro de un mismo campo pero no entre alturas ni orientaciones (análisis no presentados).

La presencia del género *Rhizopus* en la superficie de los frutos resultó ser dependiente de la campaña, el muestreo, el campo y la altura del fruto en el árbol (Tabla 3). Su presencia fue significativamente mayor en la segunda campaña que en la primera, y en el segundo muestreo (4,72% de placas con presencia) que en el primero (2,04%). La presencia fue baja en todos los campos. Los de mayor presencia fueron MV (zona de Amposta; 5,00% de placas con presencia) y AL (zona de Alcanar; 4,17%), y los de menor JE (0,00%) y el campo de producción biológica (PB; 1,25%), ambos en la zona de Amposta. El hongo se localizó con abundancia significativamente mayor en los frutos de la parte baja del árbol (4,11% de placas con presencia) que en los de la parte alta (2,11%).

La presencia del género *Mucor* en la superficie de los frutos fue también poco generalizada, cuantitativamente similar a la del género *Rhizopus*. Resultó ser dependiente del muestreo, el campo y la altura del fruto en el árbol (Tabla 3). Fue más importante en el segundo muestreo (8,47% de placas con presencia) que en el primero (4,17%), y en los frutos de la parte baja del árbol (8,44%) que en los de la parte alta (3,33%). El campo con mayor presencia fue AL (zona de Alcanar; 8,13%) y el campo con menor presencia JE (zona de Amposta; 0,83%). La presencia en el campo de producción biológica (PB) fue similar a la de los campos comerciales (4,17%).

**Tabla 1.** Pares de géneros fúngicos significativamente correlacionados ( $p < 0,01$ ) en el estudio de la población fúngica (ufc/placa) en campos de mandarino Clemenules en Tarragona

Muestreo 1			Muestreo 2		
Par de variables	$r^x$	p	Par de variables	r	p
<b>Superficie de frutos</b>			Superficie de frutos		
<i>Cladosporium-Alternaria</i>	0,161	<0,0001	<i>Cladosporium-Aspergillus</i>	0,126	0,0007
<i>Cladosporium-TOTAL<sup>y</sup></i>	0,941	<0,0001	<i>Cladosporium-Fusarium</i>	-0,167	<0,0001
<i>Alternaria-TOTAL</i>	0,146	<0,0001	<i>Cladosporium-Epicoccum</i>	-0,168	<0,0001
<i>Penicillium-Alternaria</i>	-0,172	<0,0001	<i>Cladosporium-TOTAL</i>	0,967	<0,0001
<i>Penicillium-Aspergillus</i>	0,213	<0,0001	<i>Penicillium-TOTAL</i>	0,245	<0,0001
<i>Penicillium-Cladosporium</i>	-0,138	<0,0001	<i>Alternaria-Fusarium</i>	-0,167	<0,0001
<i>Penicillium-Epicoccum</i>	-0,105	0,0006	<i>Alternaria-Humicola</i>	-0,155	<0,0001
<i>Penicillium-TOTAL</i>	0,196	<0,0001	<i>Alternaria-Epicoccum</i>	-0,147	<0,0001
<i>Epicoccum-Humicola</i>	-0,149	<0,0001	<i>Aspergillus-TOTAL</i>	0,118	0,0015
<i>Epicoccum-TOTAL</i>	-0,090	0,0030	<i>Fusarium-TOTAL</i>	-0,136	0,0003
			<i>Epicoccum-TOTAL</i>	-0,162	<0,0001
<b>Ambiente</b>			Ambiente		
<i>Cladosporium-TOTAL</i>	0,993	<0,0001	<i>Cladosporium-Alternaria</i>	0,774	<0,0001
			<i>Cladosporium-TOTAL</i>	0,934	<0,0001
			<i>Penicillium-TOTAL</i>	0,647	0,0005
			<i>Fusarium-Humicola</i>	0,876	<0,0001

<sup>x</sup> Coeficiente de correlación de Pearson.

<sup>y</sup> Variable frecuencia fúngica total (ufc-total/placa).

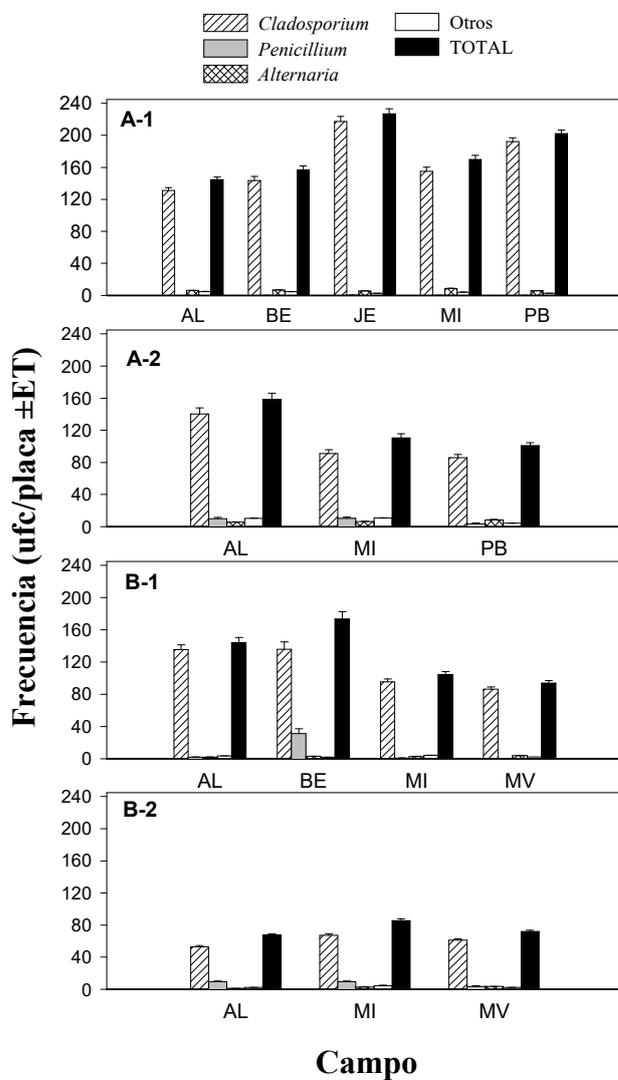
**Tabla 2.** Correlación de la población fúngica total y la población de *Penicillium* (ufc/placa) con las medias mensuales de temperatura (T, °C), precipitación total (P, mm) y humedad relativa (HR, %) en campos de mandarino Clemenules en Tarragona

Par de variables	Superficie de frutos		Ambiente	
	r*	p	r	P
TOTAL – T	0,9320	<0,0001	0,4732	<0,0001
TOTAL – P	0,4549	<0,0001	0,5393	<0,0001
TOTAL – HR	0,1278	<0,0001	0,3012	0,0113
<i>Penicillium</i> – T	-0,2038	<0,0001	-0,2816	0,0182
<i>Penicillium</i> – P	0,0094	0,6900	-0,3539	0,0026
<i>Penicillium</i> – HR	-0,1483	<0,0001	-0,1694	0,1610

\* Coeficiente de correlación de Pearson.

**Población fúngica ambiental.** La media ( $\pm$  error típico) del número total de colonias fúngicas por placa que se obtuvo al muestrear el ambiente del conjunto de los campos durante las dos campañas fue más alta en el primer muestreo ( $89,8 \pm 14,8$  ufc/placa) que en el segundo ( $15,9 \pm 2,8$  ufc/placa). En el primer muestreo el género más abundante fue *Cladosporium*, con una frecuencia relativa del 72,1%, seguido por *Fusarium* (12,9%), *Alternaria* (7,5%), *Humicola* (5,5%), y otros como *Penicillium* (0,6%) en proporciones muy inferiores. En el segundo muestreo disminuyó la frecuencia de *Cladosporium* (32,7%) y aumentó de la de otros géneros como *Penicillium* (25,9%), *Fusarium* (15,4%), *Alternaria* (10,7%), *Humicola* (6,2%) y *Botrytis* (1,9%). En ambos muestreos la presencia de *Rhizopus* y *Mucor* fue prácticamente inapreciable.

La población fúngica total se mostró fuerte y positivamente correlacionada con el género *Cladosporium* en ambos muestreos ( $r > 0,9$ ; Tabla 1). La población de *Penicillium* se mostró significativamente correlacionada con la población total únicamente en el segundo muestreo ( $r = 0,647$ ; Tabla 1).



**Fig. 4.** Frecuencia de distintos géneros fúngicos en la superficie del fruto en campos de mandarino Clemenules de la zona citrícola de Tarragona en el primer (1) y en el segundo (2) muestreo realizado en el período de recolección de las campañas 1995-96 (A) y 1996-97 (B).

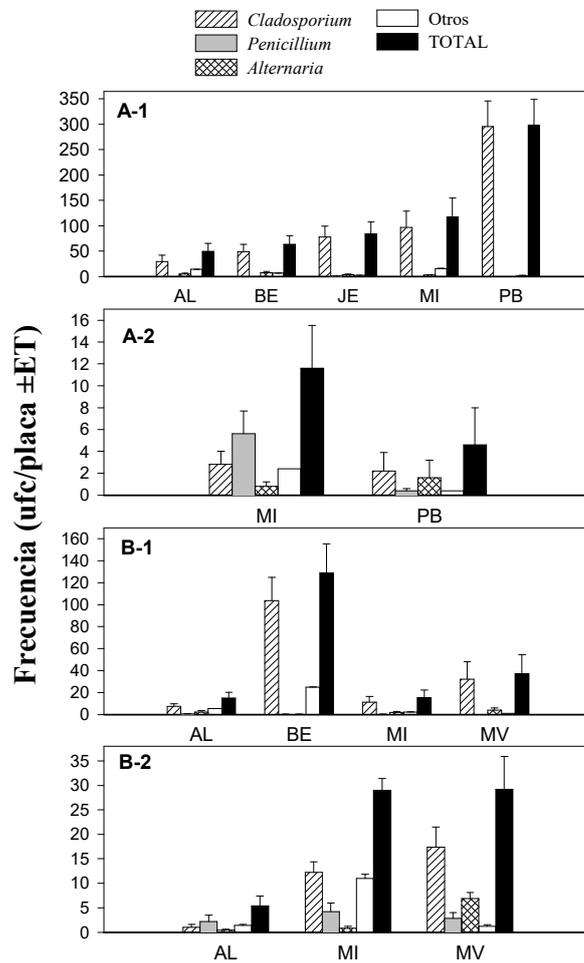
**Tabla 3.** Presencia de los géneros *Rhizopus* y *Mucor* en la superficie de los frutos en campos de mandarino Clemenules en Tarragona. Pruebas Chi-cuadrado de independencia entre la presencia de los hongos y las variables explicativas consideradas ( $p = 0,05$ )

Género fúngico	Variable	Nivel	Presencia (% placas)	$\chi^2$	gl	$p$
<i>Rhizopus</i>	Campaña	95-96	1,77	12,259	1	0,0005
		96-97	4,64			
	Muestreo	1	2,04	10,333	1	0,0013
		2	4,72			
	Campo	AL	4,17	11,316	5	0,0455
		BE	2,92			
		JE	0,00			
		MI	2,92			
		MV	5,00			
		PB	1,25			
	Orientación	Sol	3,22	0,073	1	0,7860
		Sombra	3,00			
	Altura	Baja	4,11	5,971	1	0,0145
Alta		2,11				
<i>Mucor</i>	Campaña	95-96	5,83	0,011	1	0,9148
		96-97	5,95			
	Muestreo	1	4,17	14,450	1	0,0001
		2	8,47			
	Campo	AL	8,13	16,267	5	0,0061
		BE	2,92			
		JE	0,83			
		MI	7,08			
		MV	6,25			
		PB	4,17			
	Orientación	Sol	5,67	0,160	1	0,6888
		Sombra	6,11			
	Altura	Baja	8,44	21,211	1	<0,0001
Alta		3,33				

La població fúngica total se correlacionó positiva y débilmente con la temperatura, la precipitació y la HR ( $r < 0,6$ ; Tabla 2). La població de *Penicillium* se correlacionó negativa y débilmente con la temperatura y la precipitació y no se correlacionó con la HR (Tabla 2).

El análisis de la varianza multifactorial de la frecuencia fúngica total y de la frecuencia de *Penicillium* indicó que, para ambas variables, las diferencias entre muestreos y entre campos fueron significativas ( $p < 0,0001$ ; análisis no presentados). Ante la significación de las interacciones entre los factores campaña y muestreo ( $p = 0,0224$ ) y campaña y campo ( $p = 0,0002$ ) para la frecuencia total, se analizó la variabilidad entre muestreos de esta frecuencia para cada campaña y campo por separado, excepto para los campos JE y BE (análisis no presentados). En la campaña 1995-96, la población fúngica ambiental total disminuyó significativamente en el segundo muestreo respecto al primero tanto en el campo MI ( $p = 0,0083$ ) como en el campo PB ( $p < 0,0001$ ), ambos en la zona de Amposta (Fig. 5A). En la campaña 1996-97, sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre los dos muestreos para ningún campo ( $p = 0,1300$ ,  $0,0898$  y  $0,9618$  para los campos AL, MI y MV respectivamente) (Fig. 5B). Para la variable frecuencia de *Penicillium*, las interacciones en el análisis multifactorial resultaron no significativas ( $p = 0,1977$  para la interacción campaña por muestreo y  $p = 0,9352$  para la interacción campaña por campo). En las dos campañas y en todos los campos hubo un incremento significativo de la población ambiental de *Penicillium* en el segundo muestreo respecto al primero (Fig. 5).

Por otra parte, y con el fin de caracterizar las diferencias entre zonas, las variables frecuencia fúngica total y frecuencia del género *Penicillium* se analizaron también en función del factor campo para cada muestreo de cada campaña por separado (análisis no presentados). En el primer muestreo de la primera campaña, la población fúngica total en el ambiente en el campo de producción biológica (PB, zona de Amposta) fue, con una media de 297,8 ufc/placa, significativamente mayor ( $p = 0,0004$ ) que en el resto de los campos muestreados. Más del 99% de estas colonias correspondieron al género *Cladosporium* (Fig. 5A-1). En el segundo muestreo, la frecuencia total en este campo se redujo a tan sólo 4,6 ufc/placa (Fig. 5A-2). En el primer muestreo de la segunda campaña, como también ocurrió con la micoflora epífita, los niveles más altos de población se dieron en la zona de Benifallet (campo BE) (Fig. 5B-1). En el segundo muestreo, los niveles fueron superiores en la zona de Amposta (campos MI y MV) que en la de Alcanar (campo AL) (Fig. 5B-2). El aumento significativo de la población de *Penicillium* en el segundo muestreo de las dos campañas fue común para todos los campos, y en el campo MI el primer año (Fig. 5A-2) y en el campo AL el segundo (Fig. 5B-2), su frecuencia llegó a superar a la de *Cladosporium*.



**Fig. 5.** de **Campo** Frecuencia distintos  
 de géneros fúngicos en el ambiente de campos de mandarino Clemenules de la zona citrícola de Tarragona en el primer (1) y en el segundo (2) muestreo realizado en el período de recolección de las campañas 95-96 (A) y 96-97 (B).

## Discusión

Los resultados obtenidos deben evaluarse teniendo en cuenta el método de muestreo utilizado. Con el sistema de impresión se pueden recoger esporas presentes en la superficie del fruto pero no se pueden detectar directamente infecciones latentes y quiescentes. Por otra parte, entre las esporas efectivamente recogidas puede ocurrir que debido a las distintas velocidad y características del crecimiento, la presencia de unos hongos enmascare la de otros. Además, el medio de cultivo empleado también puede favorecer el crecimiento de unos hongos sobre el de otros. Todo ello podría explicar el no aislamiento de algunos hongos como *Sclerotinia* o *Colletotrichum*, éste último presente en la mayoría de huertos de cítricos (Whiteside *et al.*, 1993). Por otro lado, el método no resulta adecuado para detectar inóculo de patógenos como *Phytophthora* o *Geotrichum*, puesto que éste se encuentra básicamente en el suelo y llega sobre todo a los frutos más bajos del árbol por salpicaduras provocadas por el agua de lluvia. En este trabajo los muestreos se realizaron con los campos secos, se evitaron los frutos extremos y no se muestrearon frutos sucios.

La micoflora epífita total en los frutos de mandarina fue superior en el primer muestreo que en el segundo tanto en la campaña 1995-96 como en la 1996-97. La población fúngica ambiental total también lo fue en la campaña 1995-96. Teniendo en cuenta las correlaciones halladas entre la población total y los parámetros meteorológicos, especialmente la temperatura, esta diferencia podría atribuirse al hecho de que en la primera campaña, tanto las temperaturas como la precipitación fueron, en las tres zonas, más bajas durante el período correspondiente al segundo muestreo, de enero a febrero. Asimismo, la HR ambiental sufrió un descenso a partir de principios del mes de enero. Esta evolución de las condiciones meteorológicas parece que influyó decisivamente no sólo en la cantidad sino también en la composición de la carga fúngica. En el segundo muestreo descendió la proporción de *Cladosporium*, máximo exponente de la población fúngica total, y aumentó la de la mayoría de los otros géneros aislados, especialmente la de *Penicillium*, cuya frecuencia se correlacionó significativa y negativamente con la temperatura tanto en el ambiente como en la superficie de los frutos.

Tanto en la superficie de los frutos como en el ambiente *Cladosporium* fue el género más abundante, con independencia de la campaña, el muestreo y el campo. Aunque la especie *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link se ha descrito como capaz de producir podredumbre en post-cosecha (Tuset, 1987), no se trata de un patógeno importante de los cítricos, ni de las hojas o los frutos en campo, ni en post-cosecha. Es un hongo saprófito mejor adaptado a la diseminación de las esporas en condiciones de

sequedad que otros habitantes de la filosfera, como pueden ser *Alternaria* o *Botrytis* (Dowding, 1986). Teixidó *et al.* (1999) encontraron que *Cladosporium* era el género más frecuente en los distintos estadios de desarrollo de manzanas 'Golden Delicious' en campos de la zona de Lleida. Trabajos propios en preparación y de Díaz y Vila (1987, 1988b, 1989) apuntan que *Cladosporium* también es uno de los géneros fúngicos de mayor frecuencia en el ambiente y en la superficie de instalaciones en centrales citrícolas españolas.

Entre los patógenos de post-cosecha con importancia económica, *Penicillium* y *Alternaria* fueron los aislados con mayor frecuencia. En un trabajo similar, Usall y Viñas (1989) encontraron que *Alternaria*, y *Cladosporium* en segundo lugar, eran los géneros de mayor presencia en la superficie de manzanas Golden Delicious muestreadas en campos de la zona de Lleida en el período previo a la recolección. *Penicillium* se halló en proporciones insignificantes, por lo que se concluyó que la contaminación de la fruta por parte de *Penicillium expansum* Link, principal hongo patógeno en frigoconservación de fruta dulce, tenía lugar en el almacén. Contrariamente, la presencia en el campo de *P. digitatum* y *P. italicum*, patógenos causantes de las mayores pérdidas en post-cosecha de cítricos, ha sido documentada por distintos autores (Barkai-Golan, 1966; Roth, 1967). Las podredumbres verde y azul, causadas por *P. digitatum* y *P. italicum* respectivamente, son también las principales enfermedades causantes de pérdidas económicas en post-cosecha de mandarinas en Tarragona. En este estudio se constató mediante observación microscópica que tanto *P. digitatum* como *P. italicum* estaban presentes tanto en placas con las que se muestreó la superficie de frutos como en placas con las que se muestreó el ambiente. Como ya se ha comentado, la frecuencia de *Penicillium* y también la de la mayoría de los otros géneros distintos de *Cladosporium* fue, tanto en la superficie de los frutos como en el ambiente, comparativamente mayor en el segundo muestreo que en el primero. Este resultado es importante puesto que a un presumible nivel de inóculo patogénico mayor debe añadirse el hecho de que los frutos llevan más tiempo maduros en el árbol, con lo cual aumenta el porcentaje de frutos afectados por distintos tipos de dermatosis. Estos frutos son extremadamente susceptibles a las infecciones fúngicas, especialmente a las de *Penicillium*, *Colletotrichum* y *Botrytis*, y ello aumenta considerablemente el riesgo de una incidencia alta de podridos en post-cosecha (Tuset *et al.*, 1997). *Rhizopus*, que a diferencia de *Mucor* sí puede ocasionar pérdidas severas de producto comercializable en post-cosecha, también apareció más frecuentemente en el segundo muestreo que en el primero.

En un trabajo en preparación complementario al presente, se constató la presencia generalizada en centrales cítricas de la zona de Tarragona de cepas de *Penicillium* spp. resistentes a los fungicidas tiabendazol e imazalil. La gran mayoría de las cepas resistentes fueron de especies de *Penicillium* distintas de *P. digitatum* y *P. italicum*, aunque también se encontraron aislados de estas especies resistentes a ambos fungicidas. señalaron a *P. variable*, *P. steckii*, y *P. velutinum* como especies de *Penicillium* con cepas resistentes al imazalil presentes en almacenes de cítricos valencianos. La importante presencia de *Penicillium* detectada en los campos de mandarina de Tarragona, especialmente cuando el período de recolección está avanzado, sugiere el campo como primera fuente de inóculo de estas cepas resistentes.

Los resultados de este estudio de las poblaciones fúngicas en campo, junto a la determinación de la carga fúngica en las centrales cítricas, debe ser tenido en cuenta en la planificación de los medios más adecuados de lucha contra las enfermedades de la post-recolección en la zona de Tarragona. En este sentido también es importante comprobar si existen en las centrales de la zona, como ocurre en almacenes de la zona cítrica de Valencia (Díaz y Vila, 1988a), cepas fúngicas resistentes a los fungicidas de post-cosecha. Toda esta información aún cobra más importancia en el contexto de la producción integrada, en el que debe priorizarse, por un lado, el establecimiento de métodos preventivos de control y, por otro, la búsqueda de sistemas curativos sustitutivos de los fungicidas sintéticos (Usall *et al.*, 1999; Palou *et al.*, 1999).

## Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación de la CIRIT (Generalitat de Catalunya) y del Grup Exportador de Cítricos del Baix Ebre i Montsià, así como la colaboración de Miquel Reverter y M. Carme Cerdà.

## Referencias bibliográficas

- BARKAI-GOLAN R., 1966. Reinfestation of citrus fruits by pathogenic fungi in packing house. Isr. J. Agr. Res. 16, 133-138.
- DÍAZ M.A., VILA R., 1987. Estudio de flora fúngica presente en cámaras frigoríficas de conservación de frutos cítricos. Alimentaria 183, 77-82.
- DÍAZ M.A., VILA R., 1988a. El problema de la resistencia a los fungicidas: referencia a la situación en los almacenes españoles de comercialización de cítricos. Rev. Agroquím. Technol. Aliment. 28: 151-158.

- DÍAZ M.A., VILA R., 1988b. Evolución de la flora fúngica durante la desverdización en almacenes españoles de comercialización de cítricos. I. Flora presente en las cámaras de desverdización. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 28, 501-508.
- DÍAZ M.A., VILA R., 1989. Evolución de la flora fúngica durante la desverdización en almacenes españoles de comercialización de cítricos. II. Flora presente en la superficie de la fruta. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 29, 85-89.
- DOWDING P., 1986. Water availability, the distribution of fungi and their adaptation to the environment. En: Water, fungi and plants. Ayres, P.G., Boddy, L., eds. Cambridge University Press. Cambridge, GB. pp. 305-320.
- ECKERT J.W., BROWN G.E., 1986. Postharvest citrus diseases and their control. En: Fresh Citrus Fruits. Wardowski, W.F., Nagy, S., Grierson, W. eds. AVI Publishing Co., Inc. Westport, CT, EE UU. pp. 315-360.
- ECKERT J.W., EAKS I.L., 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. En: The Citrus Industry. Vol. 5. Reuter, W., Calavan, E.C., Carman, G.E. eds. University of California Press. Berkeley, CA, EE UU. pp. 179-260.
- ELLIS M.B., 1993a. Dematiaceous hyphomycetes. 6ª ed. CAB International. Wallingford, GB. 608 pp.
- ELLIS M.B., 1993b. More dematiaceous hyphomycetes. 4ª ed. CAB International. Wallingford, GB. 507 pp.
- PALOU L., USALL J., AGUILAR M.J., PONS J., VIÑAS I., 1999. Control de la podredumbre verde de los cítricos mediante baños con agua caliente y carbonatos sódicos. Levante Agrícola 348, 412-421.
- ROTH G., 1967. Citrus fruit decay in South Africa caused by *Penicillium digitatum* Sacc. Phytopathol. Z. 58, 383-396.
- SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S., FRISVAD J.C., FILTENBORG O., eds., 1995. Introduction to food-borne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn, Holanda. 322 pp.
- TEIXIDÓ N., USALL J., MAGAN N., VIÑAS I., 1999. Microbial population dynamics on Golden Delicious apples from bud to harvest and effect of fungicide applications. Ann. Appl. Biol. 134, 109-116.
- TUSET J.J., 1987. Podredumbres de los frutos cítricos. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Generalitat Valenciana. Valencia. 206 pp.
- TUSET J.J., HINAREJOS C., MIRA J.L., 1997. Enfermedades fúngicas de la post-recolección de los agrios actualmente en progreso. Phytoma-España 90, 69-76.
- USALL J., PONS J., PALOU L., VIÑAS I., SMILANICK J.L., 1999. Alternativas a los productos químicos de síntesis en post-cosecha de cítricos en España y EE UU. Phytoma-España 110, 58-64.
- USALL J., VIÑAS I., 1989. Contaminació fúngica en pre-recol·lecció en pomes destinades a frigoconservació de la comarca del Segrià. Frut 4, 250-253.
- WEBSTER, J. 1980. Introduction to fungi. 2ª ed. Cambridge University Press. Cambridge, GB. 669 pp.
- WHITESIDE J.O., GARNSEY S.M., TIMMER L.W., eds., 1993. Compendium of citrus diseases. 2ª ed. APS Press. St. Paul, MN, EE UU. 80 pp.

# Capítol 2

---

## Micoflora en Centrales Citrícolas de Tarragona

L. Palou<sup>1</sup>, J. Usall<sup>1</sup>, J. Pons<sup>2</sup>, M.C. Cerdà<sup>1</sup>, I. Viñas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Àrea de Postcollita, CeRTA, Centre UdL-IRTA, Lleida*

<sup>2</sup>*Estació Experimental de l'Ebre, IRTA, Amposta, Tarragona*

**Referència:** *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* En premsa.

---



## Resumen

Se caracterizó la microflora ambiental y de la superficie de equipos e instalaciones en centrales cítricas de Tarragona. Durante las campañas 1995-96 y 1996-97 se realizaron tres muestreos a lo largo del período de procesamiento de mandarinas en ocho centrales con un total de 18 cámaras frigoríficas. La flora fúngica, debida mayoritariamente a los géneros *Cladosporium* y *Penicillium*, fue muy alta durante toda la campaña (medias de 25 a 50 ufc/placa). Mientras que *Cladosporium* fue el género más abundante en el primer muestreo (55-60% de las colonias aisladas), la población de *Penicillium* fue aumentando en los muestreos posteriores, especialmente en las superficies de las líneas de confección y de las cámaras frigoríficas, donde llegó a superar a la de *Cladosporium* (40-65% de las colonias aisladas). La presencia del género *Rhizopus* fue generalizada y particularmente importante (35-55%) en la superficie de los envases y líneas de confección. El 33% de las cepas del género *Penicillium* aisladas del ambiente en cinco centrales con 14 cámaras frigoríficas resultaron resistentes al tiabendazol y el 5% al imazalil. De las aisladas de las superficies resultaron resistentes el 35% y el 20% respectivamente. Se encontraron cepas tanto de *P. digitatum* como de *P. italicum* resistentes a ambos fungicidas, aunque su frecuencia fue baja en comparación con la de otras especies de *Penicillium* resistentes. Ante los altos niveles fúngicos detectados y la presencia de cepas de *Penicillium* spp. resistentes, se impone una adecuación e intensificación de las labores de higienización, especialmente en las líneas de confección.

**Palabras clave:** cítricos, enfermedades de post-cosecha, *Penicillium*, resistencia a fungicidas, higienización

## Summary

### Fungal populations in Tarragona citrus packinghouses

Fungal populations in the atmosphere and on surfaces of equipment and facilities were examined in Tarragona citrus packinghouses (Spain). In 1995-96 and 1996-97 seasons, sampling was conducted three times during the mandarin processing period in eight packinghouses with 18 cold storage rooms. Total fungal population, mostly due to the genera *Cladosporium* and *Penicillium*, was very high over the entire sampling period (average from 25 to 50 cfu/plate). While *Cladosporium* was the most frequent genus present at the first sampling (55-60% of isolated colonies), the frequency of *Penicillium* increased at the subsequent samplings, especially on the surfaces of packinglines and cold storage rooms, where it reached even higher levels than *Cladosporium* (40-65% of

isolated colonies). The presence of *Rhizopus* was general and particularly high (35-55%) on surfaces of bins and packinglines. In average, 33% of the *Penicillium* spp. strains isolated from the atmosphere of five local packinghouses with 14 cold storage rooms were thiabendazole-resistant strains and 5% were imazalil-resistant strains. Resistant strains isolated from surfaces were 35% and 20%, respectively. Strains of both *P. digitatum* and *P. italicum* resistant to either thiabendazole or imazalil were found, although their frequency was lower than that of other resistant *Penicillium* spp. Before the high fungal populations detected and the presence of fungicide-resistant biotypes, effective sanitation tasks, especially in the packinglines, are required.

**Key words:** postharvest diseases, *Penicillium*, fungicide resistance, sanitation

## Introducción

Las pérdidas económicas ocasionadas por las enfermedades de post-recolección representan uno de los principales problemas de la citricultura española y mundial (Tuset, 1987; Eckert y Eaks, 1989). Varios factores relacionados con el fruto, el patógeno, las condiciones climatológicas y las condiciones en post-cosecha determinan la incidencia y la severidad de estas enfermedades (Eckert y Eaks, 1989). Entre ellos, la cantidad y la calidad del inóculo fúngico ocupan un lugar destacado. La probabilidad de infección depende de la cantidad de inóculo presente en un punto del fruto susceptible de ser infectado. Esta relación fue demostrada para patógenos tan significativos como *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. (Wild y Eckert, 1982), *Geotrichum candidum* Link: Pers. (Baudoin y Eckert, 1982) o *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (Brown, 1975). Según esto, y con independencia de otros factores, la cantidad de esporas presentes en la central citrícola influye decisivamente en los niveles de pudrición, especialmente en los causados por patógenos de herida como *P. digitatum* o *P. italicum* Wehmer, causantes respectivamente de las podredumbres verde y azul, las enfermedades de post-cosecha de cítricos de mayor impacto económico tanto en España (Tuset, 1987) como en todo el mundo (Eckert y Eaks, 1989).

Los problemas derivados de altos niveles de población fúngica en las centrales se ven significativamente incrementados cuando existen cepas de los patógenos resistentes a los fungicidas sintéticos. Aunque en post-cosecha de cítricos ya se habían detectado casos de resistencia con anterioridad (Duran y Norman, 1961), fue en los años 70 cuando se puso de manifiesto en EE UU la importancia del problema de las resistencias (Houck, 1977). Desde entonces, multitud de estudios han constatado que el fenómeno de las resistencias es una de las causas principales del fracaso de muchos tratamientos

fungicidas de post-cosecha. La gran mayoría de estos estudios se han referido, por su importancia económica, a *P. digitatum* y *P. italicum* frente a los fungicidas del grupo de los bencimidazoles, el ortoifenilfenato sódico y el imazalil, y se han descrito casos tanto de resistencia simple como de resistencia cruzada y múltiple (Brown, 1982; Eckert, 1990; Bus *et al.*, 1991). En España, concretamente en la zona de Valencia, se estudió en la década de los 80 la presencia y características de cepas de *Penicillium* spp. resistentes a diversos fungicidas (Díaz *et al.*, 1987a, 1987b, Díaz y Vila, 1988a, 1989).

A medida que se ha ido cuestionando la aplicación de fungicidas sintéticos para el control de enfermedades en post-cosecha, por la problemática de salud y el efecto medioambiental que conllevan, y se ha ido desarrollando el concepto de producción integrada, ha ido aumentando la importancia de los métodos de control preventivos. Entre ellos pueden citarse los tratamientos culturales y/o fungicidas en campo, los tratamientos para el mantenimiento o la mejora de la resistencia intrínseca de los frutos a la infección y la correcta higienización de las centrales citrícolas (Brown, 1980; Eckert y Eaks, 1989). Identificar y cuantificar la contaminación fúngica presente en las distintas partes de la central citrícola a lo largo de la campaña de comercialización, así como estudiar la presencia de cepas resistentes, es importante para establecer riesgos potenciales de pérdidas y diseñar sistemas adecuados de control. El conocimiento de las áreas y puntos concretos del almacén donde se dan los mayores niveles de contaminación permite adecuar los programas de limpieza y desinfección y optimizar los recursos, y también puede resultar de gran interés en el diseño de nuevas centrales o en el de ampliaciones de infraestructuras ya existentes (Gardner *et al.*, 1986). La composición y abundancia de la flora fúngica presente en las centrales citrícolas depende de las condiciones locales de cada zona productora (Brown, 1990).

Los objetivos de este trabajo fueron cuantificar y caracterizar: 1) la micoflora presente en el ambiente y en la superficie de equipos e instalaciones en centrales citrícolas de la zona de Tarragona a lo largo de la campaña de comercialización de mandarinas y 2) las cepas de *Penicillium* spp. resistentes a los fungicidas tiabendazol e imazalil.

## Material y métodos

**Caracterización de la micoflora.** Se muestreó durante dos campañas consecutivas (1995-96 y 1996-97) la flora fúngica del ambiente y de la superficie de equipos e instalaciones en centrales citrícolas de las comarcas del Baix Ebre y Montsià (Tarragona). Cada campaña se muestrearon ocho centrales, con un total de 18 cámaras frigoríficas. En cada central se muestreó la micoflora ambiental de las siguientes zonas:

zona de recepción (RE), o de llegada de la fruta procedente del campo; zona de confección (CO), o área de ubicación de las líneas de confección; y cámaras frigoríficas (CA). Se muestrearon las siguientes superficies: envases (EN), normalmente palox o cajas de plástico; zona inicial (CO-1, zona de despoblación y primera selección manual de la fruta), zona central (CO-2, zona de segunda selección manual, después de la aplicación de fungicidas y ceras y del secado), y zona final (CO-3, zona de envasado de la fruta confeccionada) de las líneas de confección; y paredes (CA-P) y suelo (CA-S) de las cámaras frigoríficas. Cada campaña se realizaron tres muestreos a lo largo del período de procesamiento de mandarinas en las centrales, el primero a mediados de octubre, el segundo en los meses de noviembre-diciembre y el tercero en enero-febrero.

La micoflora ambiental de cada zona se muestreó mediante el método gravimétrico. Cinco placas Petri de 9 cm de diámetro (repeticiones) con medio patata dextrosa agar (PDA) se distribuyeron equidistantemente por la zona y se abrieron durante 2 min para que las esporas fúngicas se depositasen por gravedad sobre el medio de cultivo. En las cámaras, siempre que fue posible, se colocó una placa en cada esquina y una en el centro. Las superficies se muestrearon mediante placas Rodac (Replicant Organism Direct Agar Contact) de 5,5 cm de diámetro con medio PDA. El medio, sobresaliendo ligeramente por encima del plástico de la placa, se ponía en contacto con la superficie realizando una ligera presión para que las esporas quedasen adheridas al mismo. Se utilizaron cinco placas (repeticiones) en los envases, dos en cada una de las tres partes de las líneas de confección, una en cada una de las cuatro paredes de las cámaras y una en el suelo de éstas. Las placas se incubaron en una cámara climatizada a 20°C y 90% de humedad relativa (HR) durante 7 días, transcurridos los cuales se procedió al recuento e identificación de las colonias fúngicas. La identificación se hizo a nivel de género y, cuando fue necesario, se realizó mediante observación microscópica (Webster, 1980; Ellis, 1993a, 1993b; Samson *et al.*, 1995). La frecuencia de cada género fúngico se expresó como número de unidades formadoras de colonias por placa (ufc/placa), con la excepción de los géneros *Rhizopus* y *Mucor*, con los que, por su distinto hábito de crecimiento, se establecieron dos categorías excluyentes, presencia y ausencia, y cada placa se clasificó como perteneciente a una de las dos.

**Determinación de cepas de *Penicillium* spp. resistentes a fungicidas.** Se determinó la presencia de aislados de *Penicillium* spp. resistentes a los fungicidas tiabendazol (TBZ) e imazalil (IZ) en el ambiente y en la superficie de instalaciones e infraestructuras en centrales citrícolas de las comarcas del Baix Ebre y Montsià. Hacia finales de la campaña global de cítricos (mes de mayo), se muestrearon cinco centrales con un total de 14 cámaras frigoríficas. Para la toma de muestras, se prepararon placas Petri y Rodac con tres tipos distintos de medio de cultivo: PDA (control), PDA con 10

ppm de materia activa (m.a.) de tiabendazol (PDA+TBZ) y PDA con 1 ppm m.a. de imazalil (PDA+IZ). Estas dosis de fungicida (Brown, 1990) corresponden a las llamadas dosis de resistencia, obtenidas experimentalmente, y a las cuales se considera que únicamente las cepas resistentes son capaces de crecer. El tiabendazol (Tecto 60<sup>®</sup> WP, Tecnidex) y el imazalil (Fecundal 50<sup>®</sup> EC, Janssen) se añadieron al medio estéril a unos 40°C en el interior de una cabina de flujo laminar. La toma de muestras y la incubación de las placas se realizaron de la forma descrita en el subapartado anterior, sólo que en este caso cada repetición estuvo constituida por tres placas, una de cada tipo. El muestreo del ambiente se realizó en las cámaras frigoríficas (CA) y en la zona de ubicación de la línea de confección, considerando ahí dos subzonas: principio de la línea o zona sucia (CO-1) y final de la línea o zona limpia (CO-2). Se utilizaron cuatro repeticiones por cámara frigorífica y por subzona. Las superficies se muestrearon en cada una de estas dos subzonas y en las paredes (CA-P) y el suelo (CA-S) de las cámaras frigoríficas. Se utilizaron tres repeticiones en cada subzona, una repetición en cada una de las cuatro paredes de las cámaras y una en el suelo. En el proceso de recuento se diferenciaron tres grupos, identificando las colonias visualmente: *P. digitatum*, *P. italicum*, y otras *Penicillium* spp.

**Análisis estadístico.** Se realizó con el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE UU). En el estudio de la micoflora, se calcularon las frecuencias relativas de cada género fúngico en función de la población fúngica total y se sometieron a un análisis de la varianza bifactorial (factores muestreo y zona o superficie) tomando las campañas y las centrales como repeticiones. Para las dos variables dependientes más importantes, población fúngica total y población de *Penicillium*, se estudiaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los datos. A raíz de este estudio, los datos de frecuencia absoluta se transformaron al logaritmo neperiano de  $\text{ufc}/\text{placa}+1$ . Los datos transformados se sometieron al análisis de la varianza con los factores muestreo y zona (o superficie) como fijos y los factores campaña y central como repeticiones. Las separaciones de medias se realizaron mediante la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (MDS) protegida de Fisher ( $p = 0,05$ ).

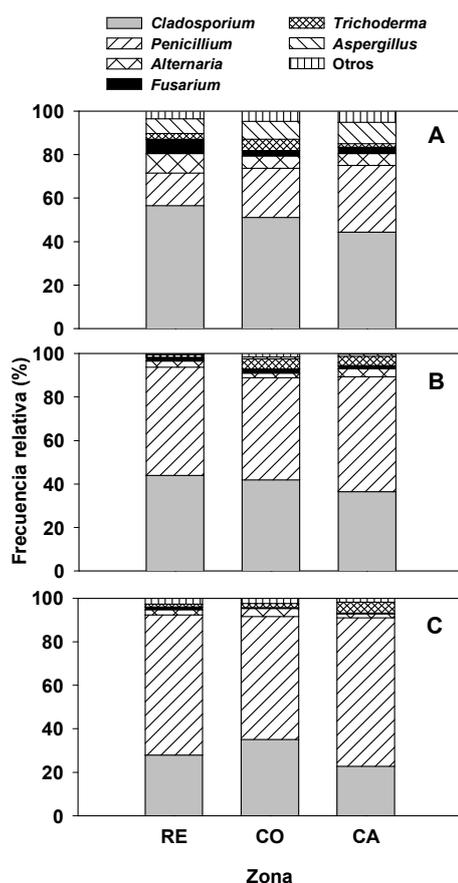
En el caso de los géneros *Rhizopus* y *Mucor*, los datos de las dos campañas y de todas las centrales se categorizaron en ausencia o presencia de los hongos y se contrastaron con las variables explicativas muestreo y zona (o superficie) mediante tablas de contingencia. La independencia entre variables se determinó mediante la prueba de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ,  $p = 0,05$ ).

En el estudio de las cepas resistentes, los datos, expresados como  $\text{ufc}/\text{placa}$ , se transformaron al logaritmo neperiano de  $\text{ufc}/\text{placa}+1$  y los de cada tipo de placa (PDA, PDA+TBZ y PDA+IZ) se sometieron a un análisis de la varianza para estudiar posibles

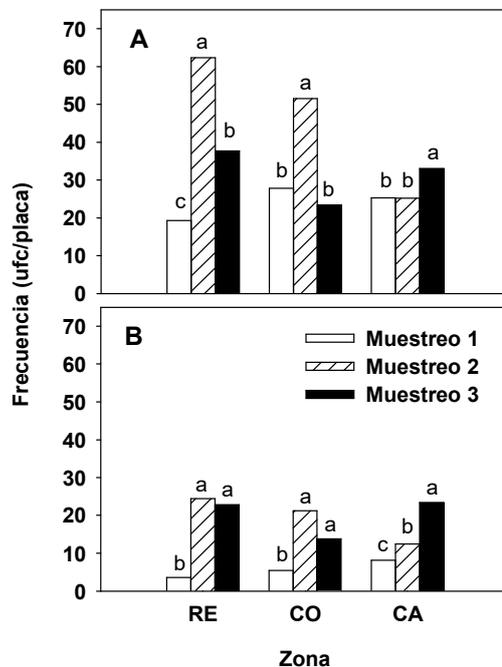
diferencias entre zonas (o superficies). La separación de medias se realizó mediante la prueba de la MDS protegida de Fisher ( $p = 0,05$ ).

## Resultados

**Micoflora ambiental.** La media del número total de colonias fúngicas por placa que se aislaron del ambiente en el conjunto de las centrales durante las dos campañas fue de 24,5 ufc/placa en el primer muestreo, de 39,6 en el segundo y de 31,9 en el tercero. En el primer muestreo, el 48,4% de las colonias aisladas correspondieron al género *Cladosporium*, el 23,7% al género *Penicillium*, el 9,5% al género *Aspergillus*, el 6,6% al género *Alternaria*, el 4,1% al género *Fusarium*, el 3,4% al género *Trichoderma*, y el resto (4,3%) a géneros como *Epicoccum*, *Humicola*, *Botrytis*, *Geotrichum* y otros (datos no presentados). Aunque esta distribución fue similar para las tres zonas muestreadas, la mayor frecuencia relativa de *Cladosporium* se dió en RE, seguido de CO y de CA ( $p = 0,0315$ ; Figura 1A). Contrariamente, la frecuencia relativa de *Penicillium* fue mayor en CA, seguido de CO y de RE ( $p < 0,0001$ ). En el segundo muestreo (Figura 1B), el género predominante en todas las zonas pasó a ser *Penicillium*, con un 50,7% de las colonias frente a un 39,4% de colonias de *Cladosporium*. Las diferencias entre zonas no fueron significativas ni para *Penicillium* ( $p = 0,3982$ ) ni para *Cladosporium* ( $p = 0,1416$ ). Las proporciones de *Alternaria*, *Fusarium*, y sobre todo de *Aspergillus*, disminuyeron respecto al primer muestreo. La misma tendencia, aún más acentuada, se observó en el tercer muestreo (Figura 1C). *Penicillium*, con una media del 64,7% de las colonias fue el género más frecuente en las tres zonas, y más en CA que en RE o CO ( $p = 0,0276$ ). *Cladosporium* ocupó el segundo lugar con el 26,6% de las colonias, y *Trichoderma* el tercero con el 3,5%. *Cladosporium* se aisló con una frecuencia significativamente mayor en CO que en RE y CA ( $p = 0,0047$ ).



**Fig. 1.** Frecuencia relativa de los géneros fúngicos aislados en el primer (A), segundo (B) y tercer (C) muestreos del ambiente de la zona de recepción (RE), línea de confección (CO) y cámaras frigoríficas (CA) en centrales cítricas de Tarragona. Datos medios de dos campañas consecutivas y ocho centrales.



**Fig. 2.** Población fúngica total (A) y población de *Penicillium* (B) en el ambiente de la zona de recepción (RE), línea de confección (CO) y cámaras frigoríficas (CA) en centrales cítricas de Tarragona. Datos medios de dos campañas y ocho centrales. Para cada zona, letras distintas indican diferencias significativas entre muestreos según la prueba de la MDS Protegida de Fisher ( $p = 0,05$ ) aplicada tras el análisis de la varianza del  $\ln(\text{ufc}/\text{placa}+1)$ . Se presentan las medias no transformadas.

La micoflora total del ambiente resultó, en términos absolutos, significativamente mayor en el segundo muestreo que en el primero y el tercero en las zonas RE y CO, pero no en CA, donde resultó mayor en el tercer muestreo (Figura 2A). La población de *Penicillium* fue siempre mayor en los dos últimos muestreos que en el primero, y en CA fue significativamente mayor en el tercero que en el segundo (Figura 2B).

La presencia del género *Rhizopus* en el ambiente fue generalizada, aunque dependió tanto del muestreo como de la zona muestreada. Su presencia fue mayor en el segundo muestreo (16,8% de placas con presencia) y menor en la zona CA (7,5%) (Tabla 1). La presencia del género *Mucor* fue independiente de muestreos y zonas (Tabla 1).

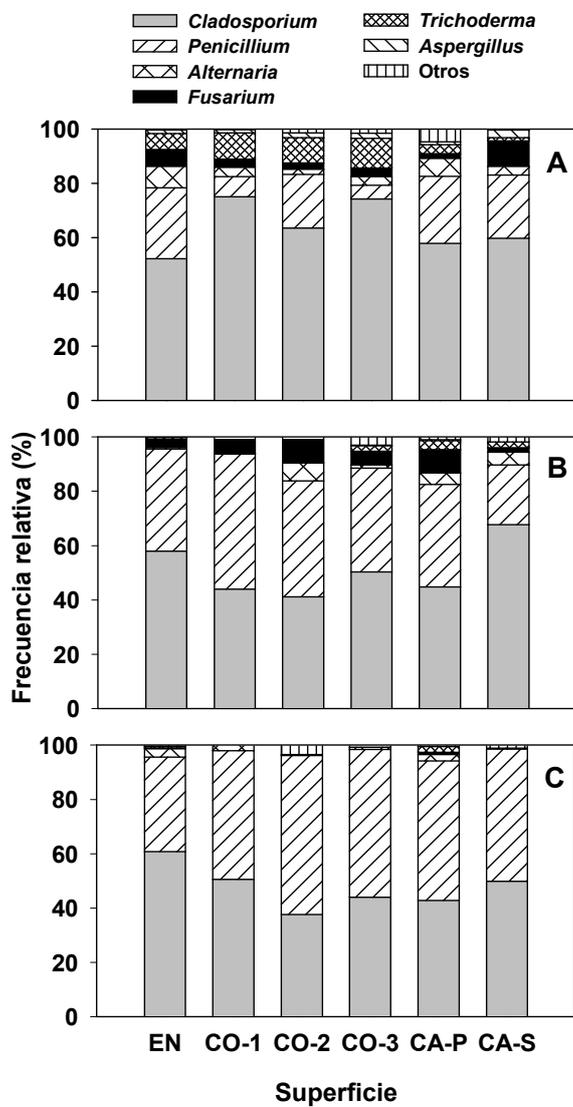
**Micoflora de las superficies.** En el muestreo de las superficies, la media del número total de colonias fúngicas por placa en el conjunto de las centrales durante las dos campañas fue de 43,9 ufc/placa en el primer muestreo, de 40,2 en el segundo y de 49,2 en el tercero. En el primer muestreo, el 61,3% de las colonias aisladas correspondieron al género *Cladosporium*, el 20,1% al género *Penicillium*, el 5,9% al género *Trichoderma*, el 5,2% al género *Alternaria*, el 3,8% al género *Fusarium*, el 1,5% al género *Aspergillus*, y el resto (2,2%) a otros géneros como *Epicoccum* y *Humicola* (datos no presentados). Por superficies, *Cladosporium* fue significativamente más abundante en CO-1 y CO-3 ( $p = 0,0036$ ) y *Penicillium* en EN, CA-P y CA-S ( $p = 0,0007$ ; Figura 3A). En el segundo muestreo (Figura 3B), *Cladosporium* siguió siendo el género más frecuente, con el 49,9% de las colonias, especialmente en CA-S y EN ( $p = 0,0044$ ), pero la frecuencia relativa de *Penicillium* aumentó en todas las superficies (37,5% de las colonias), y no se encontraron diferencias significativas entre ellas ( $p = 0,0664$ ). *Fusarium* fue el tercer género más frecuente (6,3%). En el tercer muestreo (Figura 3C), y con la excepción de EN, la frecuencia de *Penicillium* superó ligeramente a la de *Cladosporium* en todas las superficies muestreadas (medias del 48,1% y 47,6% de las colonias, respectivamente). Los niveles tanto de *Penicillium* como de *Cladosporium* no fueron significativamente diferentes en las distintas superficies muestreadas ( $p = 0,1271$  y  $0,0647$  respectivamente). La frecuencia relativa de los géneros restantes disminuyó hasta niveles inferiores al 1% de las colonias aisladas.

La micoflora total dependió fuertemente de la superficie muestreada y presentó un alto grado de variabilidad en los tres muestreos. Las frecuencias más elevadas se observaron en EN y CO-1 (Figura 4A). La frecuencia absoluta de *Penicillium* (Figura 4B) aumentó significativamente a partir del primer muestreo en todas las zonas excepto en EN y CA-S. El mayor incremento se dio en CO-1.

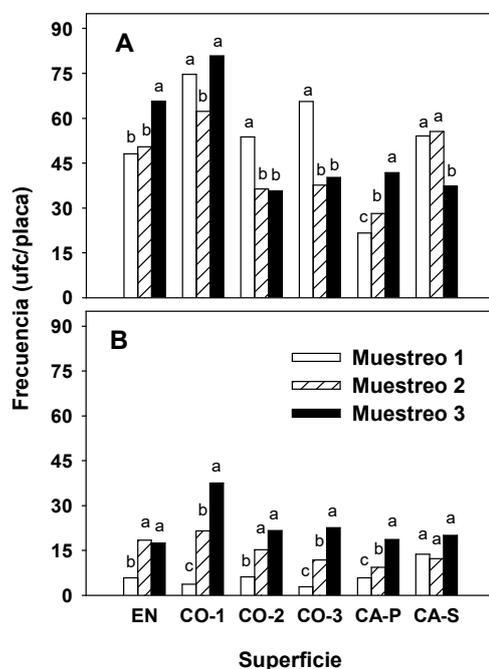
La presencia del género *Rhizopus* en las superficies no dependió del muestreo pero sí de la superficie muestreada. Se localizó con abundancia significativamente mayor en CO (50-56% de las placas) que en EN y CA (Tabla 1). La presencia de *Mucor* dependió tanto del muestreo como de la superficie muestreada. Fue más abundante en el tercer muestreo (14,4% de las placas) y en CA-S (20,2%) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Presencia de los géneros *Rhizopus* y *Mucor* en el ambiente y en la superficie de equipos e instalaciones en centrales citrícolas de Tarragona. Datos medios de dos campañas consecutivas y ocho centrales. Pruebas Chi-cuadrado de independencia entre la presencia de los hongos y las variables explicativas consideradas ( $p = 0,05$ )

Género fúngico	Variable	Nivel	Presencia (% placas)	$\chi^2$	gl	P
<b>Ambiente</b>						
<i>Rhizopus</i>	Muestreo	1	9,7	10,3654	2	0,0056
		2	16,8			
		3	8,3			
	Zona	RE	17,3	16,6365	2	0,0002
		CO	16,4			
		CA	7,5			
<i>Mucor</i>	Muestreo	1	6,8	0,4957	2	0,7805
		2	8,1			
		3	6,7			
	Zona	RE	10,3	4,2120	2	0,1217
		CO	7,7			
		CA	5,6			
<b>Superficies</b>						
<i>Rhizopus</i>	Muestreo	1	32,3	4,1916	2	0,1230
		2	29,3			
		3	38,1			
	Superficie	EN	34,7	101,6094	5	<0,0001
		CO-1	56,1			
		CO-2	54,9			
		CO-3	50,0			
	CA-P	14,6				
	CA-S	39,3				
<i>Mucor</i>	Muestreo	1	5,9	13,3284	2	0,0013
		2	6,7			
		3	14,4			
	Superficie	EN	4,1	31,4096	5	<0,0001
		CO-1	4,9			
		CO-2	13,4			
		CO-3	14,1			
	CA-P	5,4				
	CA-S	20,2				



**Fig. 3.** Frecuencia relativa de los géneros fúngicos aislados en el primer (A), segundo (B) y tercer (C) muestreos de las superficies de envases (EN), zonas inicial (CO-1), central (CO-2) y final (CO-3) de líneas de confección, y paredes (CA-P) y suelo (CA-S) de cámaras frigoríficas en centrales cítricas de Tarragona. Datos medios de dos campañas consecutivas y ocho centrales.



**Fig. 4.** Población fúngica total (A) y población de *Penicillium* (B) en las superficies de envases (EN), zonas inicial (CO-1), central (CO-2) y final (CO-3) de líneas de confección, y paredes (CA-P) y suelo (CA-S) de cámaras frigoríficas en centrales cítricas de Tarragona. Datos medios de dos campañas y ocho centrales. Para cada superficie, letras distintas indican diferencias significativas entre muestreos según la prueba de la MDS Protegida de Fisher ( $p = 0,05$ ) aplicada tras el análisis de la varianza del  $\ln(\text{ufc}/\text{placa}+1)$ . Se presentan las medias no transformadas.

**Cepas de *Penicillium* spp. resistentes.** El 33% de las cepas del género *Penicillium* aisladas del ambiente en las cinco centrales muestreadas resultaron resistentes al TBZ (Tabla 2). La frecuencia media de estas cepas fue de 4,8 ufc/placa, de las cuales 0,7 ufc/placa correspondieron a *P. digitatum* (14,6%), 1,5 ufc/placa a *P. italicum* (31,2%) y 2,6 ufc/placa a otras *Penicillium* spp. (54,2%). Las cepas resistentes al IZ fueron el 5%, con una media de 0,8 ufc/placa, de las cuales prácticamente ninguna perteneció a las especies *P. digitatum* o *P. italicum*. La frecuencia de cepas resistentes

en el ambiente de la zona de confección no fue significativamente distinta de la de las cámaras frigoríficas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Frecuencia de colonias del género *Penicillium* aisladas en placas Petri con medio PDA, PDA con 10 ppm de tiabendazol (PDA+TBZ) y PDA con 1 ppm de imazalil (PDA+IZ) del ambiente en las partes inicial (CO-1) y final (CO-2) de las líneas de confección y en cámaras frigoríficas (CA) en centrales citrícolas de Tarragona

Cepas de <i>Penicillium</i>	Tipo placa	Frecuencia	Zona			Total central
			CO-1	CO-2	CA	
<i>P. digitatum</i>	PDA	ufc/placa <sup>a</sup>	3,1 a	2,7 a	0,6 b	1,6
	PDA+TBZ	ufc/placa	1,6 a	1,2 a	0,2 a	0,7
		% <sup>b</sup>	51,6	44,4	33,3	43,7
	PDA+IZ	ufc/placa	0,0 a	0,0 a	0,1 a	≈ 0,0
		%	0,0	0,0	16,7	≈ 0,0
<i>P. italicum</i>	PDA	ufc/placa	12,4 a	4,6 a	9,2 a	8,9
	PDA+TBZ	ufc/placa	3,3 a	2,5 a	0,3 a	1,5
		%	26,6	54,3	3,3	16,8
	PDA+IZ	ufc/placa	0,0 a	0,0 a	0,1 a	≈ 0,0
		%	0,0	0,0	1,1	≈ 0,0
Otras <i>Penicillium</i> spp.	PDA	ufc/placa	2,9 a	7,2 a	3,3 a	4,1
	PDA+TBZ	ufc/placa	2,2 a	2,1 a	2,9 a	2,6
		%	75,9	29,2	87,9	63,4
	PDA+IZ	ufc/placa	1,0 a	0,6 a	0,8 a	0,8
		%	34,5	8,3	24,2	19,5
Total <i>Penicillium</i> spp.	PDA	ufc/placa	18,4 a	14,5 a	13,1 a	14,6
	PDA+TBZ	ufc/placa	7,1 a	5,8 a	3,4 a	4,8
		%	38,6	40,0	25,9	32,9
	PDA+IZ	ufc/placa	1,0 a	0,6 a	1,0 a	0,8
		%	5,4	4,1	7,6	5,5

<sup>a</sup> Dentro de cada fila, los valores seguidos por letras distintas son diferentes según la prueba de la MDS Protegida de Fisher ( $p = 0,05$ ), aplicada tras el análisis de la varianza del  $\ln(\text{ufc/placa}+1)$ . Se presentan las medias no transformadas.

<sup>b</sup> Frecuencia relativa de colonias fúngicas en las placas con fungicida respecto a las placas control (PDA).

En el muestreo de las superficies, el 35% de las cepas resultaron resistentes al TBZ y el 20% al IZ (Tabla 3). La frecuencia de los aislados de *P. digitatum* y *P. italicum* resistentes a ambos fungicidas fue baja y no se encontraron diferencias significativas

entre las distintas superficies muestreadas. La frecuencia de otras *Penicillium* spp. resistentes al TBZ y al IZ fue de 4 y 2,8 ufc/placa (75,5% y 90,3% del total, respectivamente) y resultó significativamente menor en las paredes de las cámaras frigoríficas que en el resto de superficies (Tabla 3).

**Tabla 3.** Frecuencia de colonias del género *Penicillium* aisladas en placas Rodac con medio PDA, PDA con 10 ppm de tiabendazol (PDA+TBZ) y PDA con 1 ppm de imazalil (PDA+IZ) de la superficie de las partes inicial (CO-1) y final (CO-2) de las líneas de confección y de las paredes (CA-P) y el suelo (CA-S) de cámaras frigoríficas en centrales cítrícolas de Tarragona

Cepas de <i>Penicillium</i>	Tipo placa	Frecuencia	Superficie				Total central
			CO-1	CO-2	CA-P	CA-S	
<i>P. digitatum</i>	PDA	ufc/placa <sup>a</sup>	0,2 a	0,1 a	0,7 a	0,2 a	0,4
	PDA+TBZ	ufc/placa	0,0 a	0,0 a	0,1 a	0,1 a	0,1
		% <sup>b</sup>	0,0	0,0	14,3	50,0	25,0
	PDA+IZ	ufc/placa	0,0 a	0,0 a	0,1 a	0,0 a	0,1
		%	0,0	0,0	14,3	0,0	25,0
	<i>P. italicum</i>	PDA	ufc/placa	4,8 a	5,1 a	6,3 a	6,6 a
PDA+TBZ		ufc/placa	2,4 a	0,1 a	1,1 a	1,2 a	1,2
		%	50,0	1,9	17,5	18,2	20,3
PDA+IZ		ufc/placa	0,4 a	0,0 a	0,3 a	0,0 a	0,2
		%	8,3	0,0	4,8	0,0	3,4
Otras <i>Penicillium</i> spp.		PDA	ufc/placa	11,7 b	23,7 a	3,0 c	10,6 b
PDA+TBZ	ufc/placa	6,8 ab	9,3 a	2,9 b	3,2 b	4,0	
	%	58,1	39,2	96,7	30,2	44,4	
PDA+IZ	ufc/placa	2,9 a	5,7 a	0,5 b	3,1 a	2,8	
	%	24,8	24,0	16,7	29,2	31,1	
Total <i>Penicillium</i> spp.	PDA	ufc/placa	16,7 b	28,9 a	10,0 c	17,4 b	15,3
PDA+TBZ	ufc/placa	9,2 a	9,4 a	4,1 b	4,5 b	5,3	
	%	55,1	32,5	41,0	25,9	34,6	
PDA+IZ	ufc/placa	3,3 a	5,7 a	0,9 b	3,1 a	3,1	
	%	19,8	19,7	9,0	17,8	20,3	

<sup>a</sup> Dentro de cada fila, los valores seguidos por letras distintas son diferentes según la prueba de la MDS Protegida de Fisher ( $p = 0,05$ ), aplicada tras el análisis de la varianza del  $\ln(\text{ufc/placa}+1)$ . Se presentan las medias no transformadas.

<sup>b</sup> Frecuencia relativa de colonias fúngicas en las placas con fungicida respecto a las placas control (PDA).

## Discusión

Aunque la cantidad de inóculo fúngico influye decisivamente en la incidencia de enfermedades en post-cosecha de cítricos, y de fruta fresca en general, la importancia de otros factores que también afectan a esta incidencia, como son la susceptibilidad intrínseca de los frutos a la infección o las condiciones ambientales, imposibilita el establecimiento de una relación cuantitativa entre los niveles de población fúngica en las centrales y las pérdidas por podredumbres. No existe, por tanto, un criterio general que permita discernir cuáles son los límites críticos de contaminación fúngica a partir de los cuales existe un riesgo alto de que se produzca una incidencia de enfermedades inadmisibles. No obstante, desde el punto de vista de la eficacia de los tratamientos de limpieza y desinfección de las centrales, sí han habido intentos de definir cuantitativamente, mediante medidas de los niveles fúngicos, que son zonas sucias y zonas limpias y también de establecer límites críticos que permitan diferenciar entre operaciones de higienización correctas u aceptables e incorrectas o inaceptables (Gardner *et al.*, 1986; Sus y Viñas, 1990; Orihuel *et al.*, 1996).

En el presente estudio, y desde este punto de vista, el nivel de flora fúngica presente tanto en el ambiente como en la superficie de equipos e instalaciones a lo largo de toda la campaña puede considerarse, en general, muy elevado en todas las zonas y centrales estudiadas. Por ejemplo, mientras que la frecuencia media de la población fúngica total en las superficies no fue inferior a 40 ufc/placa en ninguno de los tres muestreos (valor equivalente a 1,7 ufc cm<sup>-2</sup>, puesto que se utilizaron placas Rodac de 5,5 cm de diámetro), el valor propuesto por Orihuel *et al.* (1996) como límite crítico superior que no debe superarse para considerar aceptable la higienización de superficies es 0,7 ufc cm<sup>-2</sup>. Mientras que *Cladosporium* fue el género más abundante en el primer muestreo, especialmente en la zona de recepción, la frecuencia de *Penicillium* aumentó en el segundo y tercer muestreos hasta superar incluso a la de *Cladosporium*. En un trabajo complementario al presente (Palou *et al.*, 2001), en el que se caracterizó la micoflora en campos de mandarino 'Clemenules' de la zona de Tarragona, encontramos que a principios de campaña, en la época correspondiente al primer muestreo, *Cladosporium* era el género más frecuente en el ambiente y en la superficie de las mandarinas, pero que ya avanzado el período de recolección (época correspondiente al segundo y tercer muestreos), la población de *Penicillium* pasaba a ser la más abundante. En ello influían las condiciones meteorológicas. Estos resultados podrían sugerir que el origen de la contaminación fúngica en las centrales citrícolas radica mayoritariamente en la fruta proveniente del campo.

Contrariamente a la de *Cladosporium*, la población de *Penicillium* aumentó en cada muestreo respecto al anterior, especialmente en las superficies de las líneas de confección y de las cámaras frigoríficas, indicando una acumulación de esporas de este género. Ello supuso que la contaminación por *Penicillium* en zonas consideradas 'limpias' (final de la línea de confección o zona de envasado y cámaras frigoríficas) no fuera sustancialmente menor que en zonas consideradas 'sucias' (recepción, zona de primera selección manual y parte de la línea de confección anterior a la de lavado y tratamiento de los frutos). Por tanto, para cumplir el objetivo de reducir la incidencia de las enfermedades de post-cosecha en los almacenes de la zona, especialmente si se pretende trabajar en sistemas de producción integrada, deben considerarse medidas como el posibilitar una separación física efectiva entre la fruta que llega del campo y la ya confeccionada, el facilitar un manejo adecuado de la fruta desechada en las operaciones de selección y, sobre todo, el incrementar o mejorar las labores de higienización. Las ventajas derivadas de la realización de estas acciones en las centrales citrícolas, tanto para reducir la incidencia de enfermedades como para evitar la proliferación de cepas resistentes, han sido extensamente puestas de manifiesto (Hall y Bice, 1977; Bancroft *et al.*, 1984; Díaz y Vila, 1988a; Eckert y Eaks, 1989). Gardner *et al.* (1986) indicaron que, al margen de otras consideraciones, una correcta higienización es mucho más eficaz y eficiente económicamente que el incremento del uso de fungicidas.

Aunque la especie *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link se ha descrito como parásito ocasional que en algunos casos puede producir podredumbres en post-cosecha (Tuset, 1987), no se trata de un patógeno importante de los cítricos, ni en campo ni en post-cosecha. Es un hongo saprófito muy bien adaptado a la diseminación de las esporas en condiciones de sequedad (Dowding, 1986). Su presencia mayoritaria en las superficies fue constatada por Díaz y Vila (1987, 1988b) en sus recuentos de la microflora presente en cámaras frigoríficas y de desverdización en centrales citrícolas valencianas. No obstante, y de forma similar a lo que observamos nosotros en los muestreos segundo y tercero, estos autores constataron que *Penicillium* fue el género predominante en el ambiente y que su proporción aumentó a final de campaña respecto al principio de la misma. En estudios sobre la dinámica poblacional de microorganismos en campos de manzano de la zona de Lleida se observó que *Cladosporium* también era el género fúngico más frecuente en la superficie de la fruta (Teixidó *et al.*, 1999).

Otro resultado destacable fueron los elevados niveles poblacionales de *Rhizopus* que se detectaron en los muestreos de las superficies, particularmente en envases y en líneas de confección. *Rhizopus* también fue encontrado de forma generalizada en cámaras frigoríficas y de desverdización de almacenes valencianos donde, al igual que en nuestro estudio de superficies, sus poblaciones se mantenían más o menos constantes a

lo largo de toda la temporada (Díaz y Vila, 1987, 1988b). A diferencia de *Mucor*, *Rhizopus* es un género patógeno que puede ocasionar pérdidas económicamente importantes en post-cosecha de cítricos. Su velocidad de crecimiento, su facilidad de colonización por contacto (formación de nidos) y su tolerancia a los bencimidazoles lo convierten en un género especialmente peligroso, sobre todo si el almacenamiento de los frutos se realiza a temperaturas mayores de 5°C. Un control efectivo requiere intensas medidas profilácticas de limpieza y desinfección, especialmente de envases de campo y de las líneas de confección.

Los muestreos indicaron la presencia generalizada en los almacenes de cepas de especies de *Penicillium* resistentes al tiabendazol y al imazalil. Las cepas resistentes al imazalil se detectaron siempre con menor frecuencia que las resistentes al tiabendazol, posiblemente porque este fungicida se ha estado utilizando masivamente en la zona durante más tiempo. La gran mayoría de las cepas resistentes fueron de especies de *Penicillium* distintas de *P. digitatum* y *P. italicum*. Díaz y Vila (1989) señalaron a *P. variable*, *P. steckii*, y *P. velutinum* como especies de *Penicillium* con cepas con resistencia cruzada al imazalil y al procloraz. No obstante, también se encontraron aislados tanto de *P. digitatum* como de *P. italicum* resistentes a ambos fungicidas. A pesar de que su frecuencia relativa fue baja, la existencia de estos biotipos resistentes es preocupante puesto que podrían proliferar fácilmente y también desarrollar resistencia múltiple. Al menos en los próximos años no se prevé una disminución de la presión de selección existente ya que presumiblemente estos fungicidas van a seguir utilizándose de forma continuada. En un estudio reciente, Holmes y Eckert (1999) pusieron de manifiesto que la proporción de aislados de *P. digitatum* y *P. italicum* con triple resistencia a los fungicidas imazalil, tiabendazol y o-fenilfenol prácticamente se duplicó en seis años en centrales citrícolas californianas debido a la utilización intensiva de estos fungicidas, tanto secuencialmente como en combinación (utilización, por ejemplo, de mezclas de imazalil y tiabendazol en las ceras).

## Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación de la CIRIT (Generalitat de Catalunya) y del Grup Exportador de Cítrics del Baix Ebre i Montsià, así como la colaboración de Jesús Ferrando, Miquel Reverter, Hector Sancho y Josep Miquel Fibla.

## Referencias bibliográficas

- BANCROFT M.N., GARDNER P.D., ECKERT J.W., BARITELLE J.L., 1984. Comparison of decay strategies in California lemon packinghouses. *Plant Dis.* 68, 24-28.
- BAUDOIN A.B.A.M., ECKERT J.W., 1982. Factors influencing the susceptibility of lemons to infection by *Geotrichum candidum*. *Phytopathology* 72, 1592-1597.
- BROWN G.E., 1975. Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. *Phytopathology* 65, 404-409.
- BROWN G.E., 1980. Fruit handling and decay control techniques affecting quality. En: *Citrus Nutrition and Quality*. Nagy S., Attaway J.A. eds. Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 143, pp. 193-224.
- BROWN G.E., 1982. Resistance of decay fungi to benzimidazole fungicides used in Florida citrus packinghouses. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 95, 239-242.
- BROWN G.E., 1990. Quality control assessment methodology related to citrus decay control. Florida Department of Citrus, Citrus Research and Education Center, Lake Alfred, Florida, EE UU. 26 pp.
- BUS V.G., BONGERS A.J., RISSE L.A., 1991. Occurrence of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazalil on citrus fruit from different geographic origins. *Plant Dis.* 75, 1098-1100.
- DÍAZ M.A., VILA R., 1987. Estudio de flora fúngica presente en cámaras frigoríficas de conservación de frutos cítricos. *Alimentaria* 183, 77-82.
- DÍAZ M.A., VILA R., 1988a. El problema de la resistencia a los fungicidas: referencia a la situación en los almacenes españoles de comercialización de cítricos. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 28, 151-158.
- DÍAZ M.A., VILA R., 1988b. Evolución de la flora fúngica durante la desverdización en almacenes españoles de comercialización de cítricos. I. Flora presente en las cámaras de desverdización. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 28, 501-508.
- DÍAZ M.A., VILA R., 1989. Imazalil resistant *Penicillium* isolates from Spanish citrus packinghouses. *Microbiol. Alim. Nutr.* 7, 191-192.
- DÍAZ M.A., VILA R., HERNÁNDEZ E., 1987a. Detección de *Penicillium italicum* resistentes a OPPS, benomilo, TBZ y CGA-64251, procedentes de almacenes españoles de comercialización de frutos cítricos. *Alimentaria* 184, 59-70.
- DÍAZ M.A., VILA R., HERNÁNDEZ E., 1987b. Resistencia de *Penicillium digitatum*, aislados en centros españoles de comercialización de cítricos, frente a los fungicidas OPPS, benomilo, TBZ y CGA-64251. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 27, 439-445.
- DOWDING P., 1986. Water availability, the distribution of fungi and their adaptation to the environment. En: *Water, Fungi and Plants*. Ayres P.G., Boddy L. eds. Cambridge University Press, Cambridge, GB. pp. 305-320.
- DURAN R., NORMAN S.M., 1961. Differential sensitivity to biphenyl among strains of *Penicillium digitatum* Sacc. *Plant Dis. Repr.* 45, 475-480.

- ECKERT J.W., 1990. Impact of fungicide resistance on citrus fruit decay control. En: Managing Resistance to Agrochemicals. Green M.B., Le Baron H.M., Moberg, W.K. eds. Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 421, pp. 286-302.
- ECKERT J.W., EAKS I.L., 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. En: The Citrus Industry. Vol. 5. Reuter, W., Calavan, E.C., Carman, G.E. eds. University of California Press. Berkeley, CA, EE UU. pp. 179-260.
- ELLIS M.B., 1993a. Dematiaceous hyphomycetes. 6ª ed. CAB International. Wallingford, GB. 608 pp.
- ELLIS M.B., 1993b. More dematiaceous hyphomycetes. 4ª ed. CAB International. Wallingford, GB. 507 pp.
- GARDNER P.D., ECKERT J.W., BARITELLE J.L., BANCROFT M.N., 1986. Management strategies for control of *Penicillium* decay in lemon packinghouses: economic benefits. Crop Prot. 5, 26-32.
- HALL D.J., BICE J.R., 1977. Packinghouse strategies for the control of fungicide resistant molds. Proc. Fla. State Hort. Soc. 90, 138-141.
- HOLMES G.J., ECKERT J.W., 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. Phytopathology 89, 716-721.
- HOUCK L.G., 1977. Problems of resistance to citrus fungicides. Proc. Int. Soc. Citriculture 1, 263-269.
- ORIHUEL B., CANET J.J., BERTÓ R., 1996. Límites críticos de contaminación fúngica de superficies en una central hortofrutícola. Fruticultura Profesional 83, 114-118.
- PALOU L., USALL J., PONS J., VIÑAS I., 2001. Microflora epifita de los frutos y ambiental en campos de mandarina 'Clemenules' en Tarragona. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. 16, disponible en <ftp://www.inia.es>
- SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S., FRISVAD J.C., FILTENBORG O., eds., 1995. Introduction to food-borne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn, Holanda. 322 pp.
- SUS V., VIÑAS I., 1990. Efecto de la desinfección sobre la contaminación fúngica de cámaras frigoríficas de fruta de pepita – Evaluación de desinfectantes en el control del *Penicillium expansum*. Microbiol. Alim. Nutr. 8, 95-102.
- TEIXIDÓ N., USALL J., MAGAN N., VIÑAS I., 1999. Microbial population dynamics on Golden Delicious apples from bud to harvest and effect of fungicide applications. Ann. Appl. Biol. 134, 109-116.
- TUSET J.J., 1987. Podredumbres de los frutos cítricos. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Generalitat Valenciana. Valencia. 206 pp.
- WEBSTER J., 1980. Introduction to fungi. 2ª ed. Cambridge University Press. Cambridge, GB. 669 pp.
- WILD B.L., ECKERT J.W., 1982. Synergy between a benzimidazole-sensitive isolate and benzimidazole-resistant isolates of *Penicillium digitatum*. Phytopathology 72, 1329-1332.



# Capítol 3

---

## Control of Postharvest Blue and Green Molds of Oranges by Hot Water, Sodium Carbonate, and Sodium Bicarbonate

L. Palou<sup>1</sup>, J.L. Smilanick<sup>2</sup>, J. Usall<sup>1</sup>, I. Viñas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Àrea de Postcollita, CeRTA, Centre UdL-IRTA, Lleida*

<sup>2</sup>*Horticultural Crops Research Laboratory, USDA-ARS, Fresno, CA, USA*

**Referència:** *Plant Dis.* 85: 371-376 (2001).

---



## Abstract

Control of citrus blue mold, caused by *Penicillium italicum*, was evaluated on artificially inoculated oranges immersed in water at up to 75°C for 150 s; in 2 to 4% sodium carbonate (w/v) at 20 or 45°C for 60 or 150 s; or in 1 to 4% sodium bicarbonate at room temperature for 150 s, followed by storage at 20°C for 7 days. Hot water controlled blue mold at 50 to 55°C, temperatures near those that injured fruit, and its effectiveness declined after 14 days of storage. Sodium carbonate and sodium bicarbonate were superior to hot water. Temperature of sodium carbonate solutions influenced effectiveness more than concentration or immersion period. Sodium carbonate applied for 150 s at 45°C at 3 or 4% reduced decay more than 90%. Sodium bicarbonate applied at room temperature at 2 to 4% reduced blue mold by more than 50%, while 1% was ineffective. In another set of experiments, treatments of sodium bicarbonate at room temperature, sodium carbonate at 45°C, and hot water at 45°C reduced blue mold incidence on artificially inoculated oranges to 6, 14, and 27%, respectively, after 3 weeks of storage at 3°C. These treatments reduced green mold incidence to 6, 1, and 12%, respectively, while incidence among controls of both molds was about 100%. When re-examined 5 weeks later, the effectiveness of all, particularly hot water, declined. As a conclusion, efficacy of hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate treatments against blue mold compared to that against green mold was similar after storage at 20°C but inferior during long-term cold storage.

**Additional keywords:** baking soda, citrus, cold storage, *Penicillium digitatum*, postharvest decay, soda ash

## Introduction

Postharvest green mold, caused by *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., is the most economically important postharvest disease of citrus in Spain (34), California, and all production areas characterized by low summer rainfall (11). However, when citrus fruit such as Valencia oranges or Clementine mandarins are stored for long periods, usually at temperatures below 5°C, postharvest blue mold, caused by *Penicillium italicum* Wehmer, becomes more important because it grows faster than *P. digitatum* below 10°C (37). In Spain, several orange cultivars are often stored at about 3°C for long periods to take advantage of seasonal changes in market prices. In California, Valencia oranges are stored at very low temperature to reduce losses of fruit stored for preparation of fresh juice. Blue mold may also predominate in fruit treated with

benzimidazole fungicides, because resistance to these materials occurs more frequently in isolates of *P. italicum* than in *P. digitatum* (14). Currently, both diseases are primarily controlled by application of the fungicides imazalil, sodium ortho-phenyl phenate, and/or thiabendazole (21,30). Alternative methods are needed because the widespread use of these chemicals in commercial packinghouses has led to the proliferation of resistant strains of the pathogens (4,9). Furthermore, concerns about public health and environmental issues (8,24) have increased the need for alternatives.

Postharvest hot water treatments have been well studied for the control of postharvest decay of citrus fruits (3,19,33,35) and, in case of long-term refrigerated storage, for the improvement of fruit resistance to chilling injury (26). When combined with fungicides, hot water greatly enhances their efficacy and makes it possible to reduce their application rates (2,32,35).

Carbonic acid salts, such as sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , soda ash) and sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ , baking soda), are common food additives allowed with no restrictions for many applications by European and North American regulations (18,23). Sodium bicarbonate is classified as generally recognized as safe by the United States Food and Drug Administration and also proposed exempt from residue tolerances on all agricultural commodities by the United States Environmental Protection Agency. Both sodium carbonate and sodium bicarbonate were listed as approved ingredients on products labeled “organic” proposed by the United States Department of Agriculture. The antimicrobial activity of these compounds has been described in vitro (5), in meat (12), fish (6), and on leaves and fruit (29,38). Sodium bicarbonate to control postharvest green and blue molds of citrus was first described by Barger in 1928 (1) as an alternative to the use of borax. Sodium carbonate has been used to improve cleaning and also to reduce postharvest decay of lemons in California for more than 70 years (11). Both salts can be a useful tool to manage postharvest decay because they are inexpensive, readily available, and can be used with a minimal risk of injury to the fruit. Recent work shows that sodium carbonate and sodium bicarbonate solutions, used correctly, approach the effectiveness of common synthetic fungicides used to control *P. digitatum* on lemons (30) and oranges (29). A model to predict green mold incidence among sodium carbonate treated oranges, describing the influence of sodium carbonate concentration, temperature, and immersion period, was developed and validated under commercial conditions (29). Although somewhat less effective on oranges than on lemons, the effectiveness of sodium carbonate was high enough that its commercial use on oranges is justified for the control of green mold. Recently, the influence of commercial postharvest practices on the control of green mold by sodium carbonate and sodium bicarbonate was published to facilitate their

commercial adoption (31). However, little research has been focused on the control of blue mold by carbonate and bicarbonate salts.

Objectives of the present work were to: (i) determine the range of water temperatures able to control blue mold on oranges without rind injury; (ii) evaluate the efficacy of sodium carbonate and sodium bicarbonate at different concentrations, temperatures, and immersion periods; and (iii) evaluate their effectiveness against blue and green molds during long-term cold storage.

## Materials and methods

**Fruit.** Oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cvs. Washington Navel, Navelate, Lanelate, and Valencia, from commercial orchards in southern Tarragona (Catalonia, Spain) or California, were selected by hand from field bins after harvest and used in the experiments before any commercial postharvest treatments were applied. The fruit were used the same day, or stored up to 2 weeks at 5°C and 90% relative humidity (RH) before use. Before each experiment, fruit were randomized, washed with fresh water, disinfected superficially for 1 min in a diluted bleach dip (0.5% sodium hypochlorite), rinsed with water, and allowed to air dry at room temperature.

**Inoculum.** Several *P. italicum* isolates were obtained from decayed oranges or mandarins from Tarragona citrus packinghouses and one isolate (PIM-7) showing the highest aggressiveness in preliminary tests was used in subsequent experiments. Petri dishes of potato dextrose agar (PDA) were inoculated with this isolate and incubated at 25°C for 7 to 10 days. A conidial suspension was prepared in Tween 80 (0.05% wt/vol) in water and diluted to 10<sup>6</sup> spores per milliliter after counting spores with a hemacytometer. This density is recommended for evaluation of postharvest treatments to control blue and green molds (10). About 2 h before treatments, 25 µl of this suspension was placed, using a micropipet, in a 1-by-5-by-2-mm deep wound made with a stainless steel scalpel on the equator of each fruit. The wound penetrated the albedo tissue, but not the juice sacs, and simulated frequent infection under commercial conditions. In the experiments conducted in California, *P. italicum* isolate PIM-7 or *P. digitatum* isolate M6R (obtained from J. W. Eckert, University of California, Riverside), were cultured on PDA dishes at 25°C for 7 to 14 days. Spores were rubbed from the agar surface with a sterile glass rod after 5 ml of 0.05% (wt/vol) Triton X-100 in water were added. The spore suspension was passed through two layers of cheesecloth and diluted with water to an absorbance of 0.1 at 420 nm determined with a spectrophotometer. This density is approximately equivalent to 10<sup>6</sup> spores per milliliter (22). About 24 h before treatments, fruit were inoculated by

immersing a stainless steel rod with a probe tip 1 mm wide and 2 mm in length into the spore suspension and wounding each fruit once on the equator. The inoculated fruit were held at room temperature.

**Hot water treatments.** Three stainless steel buckets each holding 24 liters of water were heated to the test temperature in a 172-liter stainless steel water tank fitted with a 9-kW electric resistance heater and thermostat. Metallic grid baskets, containing the oranges inoculated with *P. italicum* 2 to 3 h previously, were submerged in the buckets for 150 s. Three experiments, two with Navelate and one with Valencia oranges, were conducted to determine the approximate range of effective and safe temperatures. The tested temperatures were 20 (control), 35, 45, 48, 50, 53, 55, 57, 60, 65, and 75°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Another set of control fruit were inoculated but not treated. Within each experiment, each treatment was applied to four replicates of five fruits each. Treated fruit were placed in plastic cavity trays that prevented contact infections, dried in air on wooden trays at room temperature, and stored at 20°C and 90% RH. After 7 and 14 days, the infected oranges were counted. After the first 7 days of storage, fruit were also classified into one of four categories, depending on rind appearance: (i) no rind damage, (ii) slight blemishes present, (iii) moderate blemishes present, and (iv) severe rind injury.

**Sodium carbonate treatments.** California-grown Valencia oranges were inoculated with *P. italicum* 24 h before treatment as previously described, placed into plastic baskets, and immersed in 22-liter tanks containing sodium carbonate solutions (pH 11.3 to 11.5; Sigma-Aldrich, St. Louis). The treatment equipment consisted of 12 stainless steel tanks, each one individually fitted with a computer controlled electrical heater, a temperature sensor, and a mechanical agitation system. Four sodium carbonate concentrations (0 [control, water alone], 2, 3, and 4% [wt/vol]), two temperatures (20 and 45°C), and two immersion periods (60 and 150 s) were tested. The temperature of the solutions did not change more than 0.5°C during treatment. After treatment, the fruit were rinsed with 10 ml of deionized water per fruit at low pressure (200 kPa) in a spray 30 cm above the fruit for 5 s, placed on plastic cavity trays on wooden trays, and stored at 20°C and 90% RH. After 7 days of storage, the incidence of blue mold was determined. Each treatment was applied to five replicates of 25 oranges each. The experiment was repeated twice with Valencia oranges.

**Sodium bicarbonate treatments.** Washington Navel and Navelate oranges from Tarragona were inoculated with *P. italicum* with a micropipet and, about 2 h later, immersed for 150 s in 0 (control, water alone), 1, 2, 3, or 4% (wt/vol) sodium bicarbonate (pH 8.3 to 8.6; Sigma-Aldrich) solutions at room temperature ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ), using buckets and water tank as previously described. The pH of sodium bicarbonate

solutions rises rapidly at high temperature; therefore, only room temperature was tested (31). Each treatment was applied to four replicates of 10 fruits each. Treated fruit were placed into plastic cavity trays and stored at 20°C and 90% RH for 7 days, at which time the incidence of blue mold infections was determined. Valencia oranges from California were inoculated, dipped 22 to 24 h later for 150 s in 0 (control, water alone), 1, 2, 3, or 4% (wt/vol) sodium bicarbonate solutions at 20°C ( $\pm 0.5^\circ\text{C}$ ), rinsed, stored at 20°C for 7 days, and checked for decay incidence, all as were described above for the sodium carbonate treatments. Four replicates of 25 fruits each were used within each treatment, and the experiment was repeated twice.

**Long-term cold storage.** California-grown Lanelate oranges, inoculated with *P. italicum* or *P. digitatum* 24 h before treatment, were dipped in sodium carbonate or sodium bicarbonate solutions and rinsed as previously described, then stored at 3°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) and 90% RH for 2 months. The treatments applied in the sodium carbonate experiment were: (i) water alone at 20°C, (ii) water alone at 45°C, and (iii) 3% (w/v) sodium carbonate at 45°C. Each treatment was applied to six replicates of 15 oranges each. The treatments applied in the sodium bicarbonate experiment were: (i) water alone at 20°C; and (ii) 3% (wt/vol) sodium bicarbonate at 20°C. Each treatment was applied to five replicates of 10 fruits each. Each solution was prepared twice and each pathogen was assayed separately to avoid mixing spores. The incidence of decayed fruit was determined weekly.

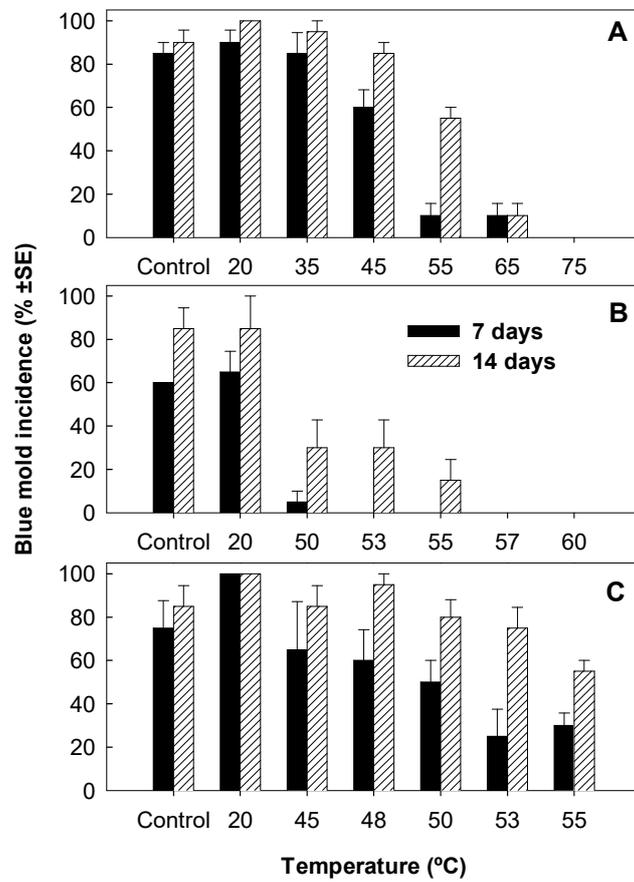
**Statistical analysis.** Analysis of variance was applied to the arcsine of the square root of the proportion of decayed fruit using SAS software (SAS Institute Inc., Cary, NC).

## Results

**Hot water treatments.** In the first experiment with Navelate oranges, a temperature range of 35 to 75°C (in increments of 10°C) was evaluated. Treatment with hot water at 65°C controlled blue mold (Fig. 1A), but severely injured the rind surface of 100% of oranges (Table 1). Fruit treated at 75°C were entirely discolored and soft. These fruit could not be sold commercially and had many secondary infections by contaminating saprophytic microorganisms. Below these temperatures, only 55°C treatment controlled *P. italicum* effectively after 7 days of storage at 20°C, but control was unsatisfactory when fruit were examined after 14 days (Fig. 1A). About 30% of the fruit treated at 55°C had slight and moderate rind blemishes (Table 1). No rind damage was observed on oranges treated at 45°C and lower temperatures. In the second experiment with Navelate oranges, temperatures from 50 to 60°C were tested.

All these temperatures consistently suppressed disease development after 7 days, with a 90 to 100% reduction in decay incidence compared to the control treatments (no treatment and treatment at 20°C; Fig. 1B). After 7 days of storage, severe rind injuries were present on 30% of the fruits treated at 57°C and on 90% of those treated at 60°C (Table 1). In the third experiment, the effect of 150 s of hot water treatment from 45 to 55°C on Valencia oranges was assessed. Blue mold incidence after 7 days was high among the controls (90 to 100%) and hot water effectiveness was low (Fig. 1C). Satisfactory control was obtained after treatment at 53 and 55°C, but not after treatment at 50°C or lower. No injuries were caused by the 53 or 55°C treatment (Table 1). A significant increase in decay incidence occurred during the second week of storage in all three experiments (Fig. 1).

**Sodium carbonate treatments.** The combined effects of sodium carbonate concentration, temperature, and immersion period were evaluated on Valencia oranges. All three factors significantly influenced the control of blue mold, although the influence of temperature was greater than those of concentration or immersion period (Table 2). Sodium carbonate improved blue mold control in comparison with water alone (Fig. 2). At room temperature, with decay incidence on the control treatment (water alone) adjusted to 100%, the incidence of blue mold at concentrations of 3 and 4% sodium carbonate was 20 to 30%. Similarly, decay incidence was 20 to 25% after treatment of the fruit for 60 s in 3 or 4% sodium carbonate at 45°C. Lower blue mold incidence (< 10%) was obtained by treatment of the fruit for 150 s in these sodium carbonate solutions at 45°C. The effect of the concentration was significantly dependent on the temperature (Table 2): differences in effectiveness among sodium carbonate concentrations, and especially between concentration 0 (water alone) and those treatments with sodium carbonate, were more important at 20°C than at 45°C (Fig. 2). The effect of the immersion period was also significantly dependent on the temperature; a treatment of 150 s enhanced the effectiveness of all the treatments compared to 60 s at 45°C, but not at 20°C. No visible rind injury occurred in any test.



**Fig. 1.** Incidence of blue mold on artificially inoculated orange cvs. **A, B**, Navelate and **C**, Valencia immersed for 150 s in water at different temperatures (control fruit were inoculated but not treated) after 7 and 14 days of storage at 20°C and 90% relative humidity.

**Table 1.** Influence of water temperature on the appearance of Navelate (N) and Valencia (V) oranges immersed for 150 s and stored at 20°C and 90% relative humidity for 7 days

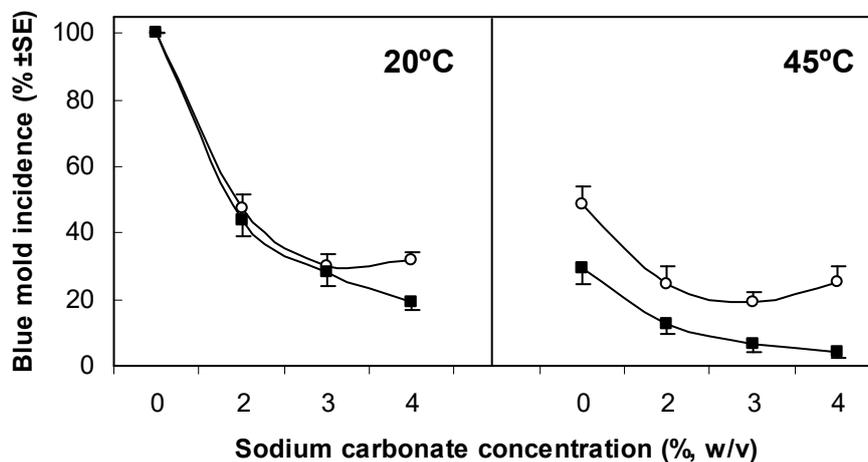
Water temp. (°C)	Rind injury frequency (%) <sup>a</sup>					
	Slight		Moderate		Severe	
	N	V	N	V	N	V
20	0	0	0	0	0	0
35	0	-	0	-	0	-
45	0	0	0	0	0	0
48	-	0	-	0	-	0
50	0	0	0	0	0	0
53	17	0	0	0	0	0
55	22	8	6	0	0	0
57	17	-	32	-	27	-
60	0	-	11	-	89	-
65	0	-	0	-	100	-
75	0	-	0	-	100	-

<sup>a</sup> - = temperature not assayed.

**Table 2.** Analysis of variance of the incidence of blue mold on artificially inoculated Valencia oranges immersed in sodium carbonate solutions and stored at 20°C and 90% relative humidity for 7 days

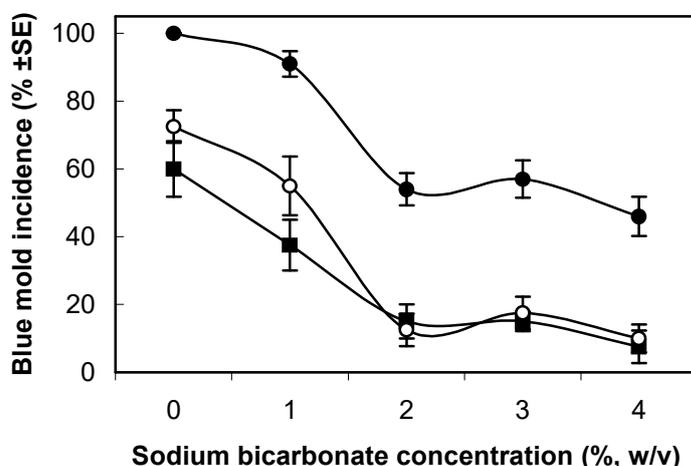
Source <sup>a</sup>	df	MS	F	P > F
Experiment (E)	1	91.08	1.40	0.2384
Temperature (T)	1	22239.78	342.30	<0.0001
Concentration (C)	3	13686.77	210.66	<0.0001
Immersion period (t)	1	2846.48	43.81	<0.0001
T x C	3	3497.75	53.83	<0.0001
T x t	1	1195.06	18.39	<0.0001
C x t	3	181.77	2.80	0.0424
T x C x t	2	15.74	0.24	0.8667
Error	143	64.97		

<sup>a</sup> Analysis was applied to the arcsine of the square root of the proportion of decayed fruit.



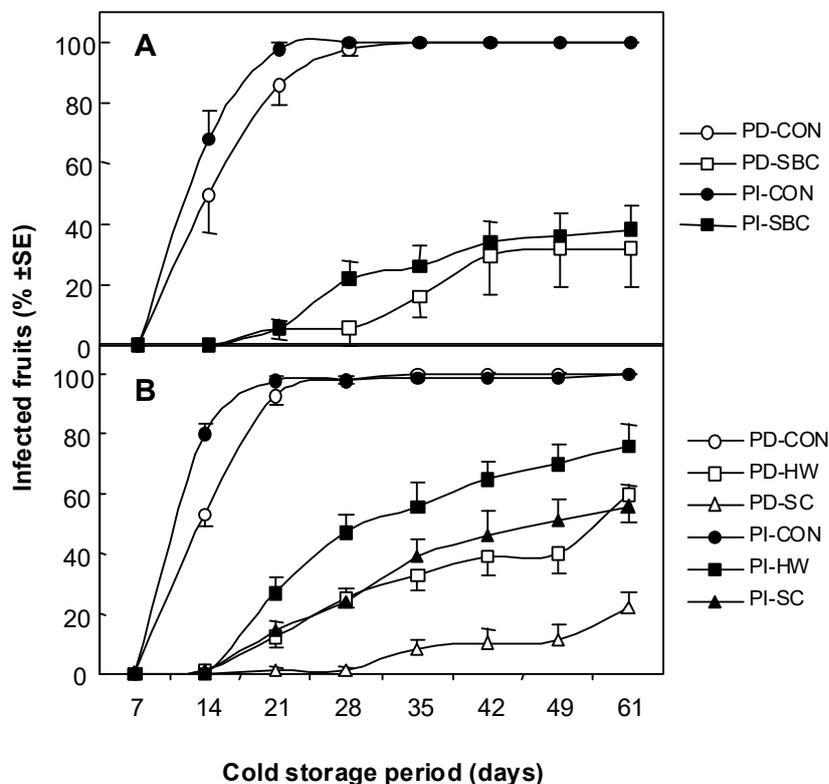
**Fig. 2.** Influence of solution temperature, sodium carbonate concentration, and immersion period (○ = 60 s , ■ = 150 s) on the incidence of blue mold on cv. Valencia oranges artificially inoculated 24 h before treatment, rinsed at low pressure, and stored at 20°C and 90% relative humidity for 7 days. Data are the means of two experiments with five replicates of 25 fruit each.

**Sodium bicarbonate treatments.** Washington Navel and Navelate oranges inoculated 2 h before treatment and immersed for 150 s in 2, 3, and 4% sodium bicarbonate solutions at room temperature reduced blue mold incidence substantially (down to 10 to 15%, Fig. 3), while the blue mold incidence after 1% sodium bicarbonate treatment was significantly inferior on both cultivars (25 to 40%). Similar results, although the decay incidence was higher, were obtained with Valencia oranges inoculated 24 h before treatment, which was followed by a low-pressure water rinse (Fig. 3).



**Fig. 3.** Influence of sodium bicarbonate concentration on the incidence of blue mold on orange cvs. Washington Navel (○), Navelate (■), and Valencia (●) treated at room temperature for 150 s and stored at 20°C and 90% relative humidity for 7 days. Washington Navel and Navelate oranges were inoculated 2 h before treatment and not rinsed; values are the means of four replicates of 10 fruit each. Valencia oranges were inoculated 24 h before treatment and rinsed at low pressure; values are the means of four replicates of 25 fruit each.

**Long-term cold storage.** Both sodium carbonate at 45°C and sodium bicarbonate applied at room temperature significantly reduced the incidence of both green and blue molds during the 2-month storage period (Fig. 4). After 3 weeks at 3°C, the incidence of blue and green molds on oranges treated with sodium bicarbonate, sodium carbonate or hot water at 45°C was 6, 14, and 27%, and 6, 1, and 12% respectively, while it was 100% among the controls. Hot water at 45°C greatly reduced decay incidence compared to treatment with water at 20°C (control), and sodium carbonate treatment at 45°C reduced decay incidence compared to treatment with hot water at this temperature. After 2 months of storage at 3°C, blue mold incidence was 38% for sodium bicarbonate, 56% for sodium carbonate, and 76% for hot water. Green mold incidence was 32, 22, and 60%, respectively (Fig. 4). The incidence of blue mold was higher than the incidence of green mold, and the magnitude of the difference was smaller in sodium bicarbonate-treated fruit than in sodium carbonate- or hot water-treated fruit.



**Fig. 4.** Incidence of green (PD) and blue (PI) molds on artificially inoculated cv. Lanelate oranges after treatment and storage at 3°C and 90% relative humidity for 2 months. **A**, Immersion in water alone (CON) or 3% sodium bicarbonate (SBC) at room temperature; **B**, immersion in water alone at room temperature (CON), water at 45°C (HW), or 3% sodium carbonate at 45°C (SC).

## Discussion

Control of blue mold was obtained by brief hot water treatment of Navelate and Valencia oranges without injury of apparent commercial impact, although the effective temperatures were close to those that caused injury. Control at 7 days of storage was observed with treatments between 50 and 55°C, but after 14 days control was significantly inferior. Satisfactory control was not achieved at lower temperatures and severe rind injury occurred above 55°C. Similarly, Barkai-Golan and Apelbaum (2)

found that hot water immersion for 3 min at 36°C did not reduced the incidence of blue mold in inoculated Shamouti oranges, and treatment at 45°C only caused a reduction of 6% after 14 days of storage at 14°C. Our results with blue mold are similar to those reported for green mold by other workers. Most of the research on the use of hot water to prevent postharvest citrus decay has focused on control of *P. digitatum*. Smoot and Melvin (33) and Tuset et al. (35) reported that immersion of oranges in water at 53°C controlled green mold of artificially inoculated oranges. In Houck's tests (16) the temperature required to control green mold on Eureka lemons was 52°C. Hot water treatment at 50 to 54°C did not injure the rind of Fortuna mandarins, but treatment at 56 to 58°C was injurious (27). In our work, when the incidence of the decay was low among the controls, significant control was obtained at lower temperatures than when the incidence among the controls was high. This may be related to the physiological condition of the fruit, which clearly influences the susceptibility of citrus fruit to decay. The susceptibility of Tarocco oranges to postharvest decay, chilling injury, and rind injury caused by hot water was greatly influenced by the harvest date (28). At the temperature range in which the satisfactory control of green mold occurred, the effectiveness of hot water was not very persistent. We found the same results with blue mold as with green mold in previous work (25); namely, the control of blue mold after 14 days of storage at 20°C was significantly inferior to that after 7 days of storage. Commercial adoption of hot water treatment must be done with caution because the difference in temperature between control and severe injury was small. In general, our work and that of others indicates hot water used alone to control green and blue molds is accompanied by considerable risk of rind injury and lack of persistent control.

Significant control of blue mold was achieved by 2, 3, and 4% sodium carbonate or sodium bicarbonate solutions at room temperature. Heating sodium carbonate solutions to 45°C improved its efficacy compared to treatment at room temperature. Heated sodium carbonate solutions were more effective than hot water alone even at lower temperatures, which is important to minimize risks of rind damage by heat. Many authors observed synergistic effects of heat and chemicals used to control postharvest decay (2,19,29,32,35). In our tests, oranges treated with carbonates were not injured. Sodium carbonate and sodium bicarbonate efficacy against blue mold was comparable to that obtained against green mold in related previous experiments (25,29-31). *P. italicum* and *P. digitatum* have similar infection processes and disease cycles; therefore, commercial application of these treatments may provide acceptable protection against both molds. Although sodium carbonate and sodium bicarbonate controlled naturally inoculated citrus fruit more effectively than artificially inoculated

fruits (1,29), the present results should be confirmed in commercial-scale tests. Efficacy of sodium carbonate and sodium bicarbonate decreased when fruit susceptibility to decay was high (indicated by higher decay levels among control fruit). A high proportion of *P. italicum* and *P. digitatum* conidia remained germinable after 5 min exposure to 10% sodium carbonate or sodium bicarbonate (20); therefore, the compounds probably are not lethal. We removed *P. italicum* spores from inoculated wounds on oranges, both just after sodium carbonate or sodium bicarbonate treatment and after a 7-day storage period at 20°C, and plated the spores on PDA dishes that were incubated at 25°C. The spores germinated and developed colonies. The increase in decay incidence that occurred during the second-week storage period at 20°C also indicated that the pathogen survived treatment. Therefore, the effect is primarily fungistatic and not very persistent, and is very likely due to the presence of carbonate or bicarbonate residues within the wound infection courts occupied by the fungus.

The impact of the concentration of the chemical, the immersion period, and the temperature of the solution, can influence the presence of residues and consequently may play an important role on the magnitude of control obtained. Smilanick et al. (29) developed a model describing the influence of these factors on the control of green mold on sodium carbonate-treated oranges, and validated it under commercial conditions. Green mold incidence was significantly influenced by all three factors. The best control of green mold was obtained after treatment for 2 min at 40.6 or 43.3°C in 4 or 6% sodium carbonate. In the present work, blue mold incidence on sodium carbonate-treated oranges was also significantly influenced by all three factors, although the influence of temperature was greater than those of concentration or immersion period. Hwang and Klotz (17) found that inhibitory activity of carbonate, bicarbonate, and other salt solutions on spores of *P. italicum* and *P. digitatum* was more dependent on temperature than on concentration. A practice that could influence the effectiveness of carbonates is the addition of emulsifiers or surfactants to their solutions. Homma et al. (15) reported that the addition of such compounds, commonly used in food and pesticide formulations, improved the sodium bicarbonate effectiveness against green mold on Satsuma mandarins. They proposed the improvement might result from less sodium bicarbonate crystallization in solution, better adhesion of sodium bicarbonate to the rind, or improved surface distribution of the sodium bicarbonate.

Sodium carbonate and sodium bicarbonate mode of action against *Penicillium* spp. on citrus fruit has not been completely elucidated. Disease development is a result of complex interactions between host, pathogen, and environment (13). Notable differences have been detected between results of in vitro and in vivo tests. In vitro

activity of several carbonate salts against germinated or ungerminated spores of *P. italicum* and *P. digitatum* was higher than that of bicarbonate salts, although their efficacy was similar in vivo (17,20,31). Hwang and Klotz (17) suggested that the original toxicity of the treating solution to the spores is altered by interactions in wounds with constituents of the rind. The relatively high pH of these solutions has been proposed to be the mode of action (7), although there is evidence that high pH alone cannot explain the inhibitory action of these salts (15,17,20). The in vitro and in vivo control of green mold by sodium carbonates and bicarbonates were superior to those by potassium or ammonium carbonates and bicarbonates (20,31), which suggests the sodium cation has some role in the control of the disease. Marloth (20) found that germinated spores of both fungi were more readily killed by sodium carbonate and sodium bicarbonate than were nongerminated spores. Hwang and Klotz (17) observed that *P. italicum* spores were more sensitive to the in vitro inhibitory effect of sodium carbonate, sodium bicarbonate, and other salts than *P. digitatum* spores.

This is the first work in which citrus *Penicillium* decay on artificially inoculated fruit treated with sodium carbonate or sodium bicarbonate was periodically assessed during long refrigerated storage. Our results, especially during the first 3 weeks of storage, indicate that the treatments complemented the inhibitory action of low temperature. Control of blue mold was inferior to that of green mold, very likely because of the better adaptation of *P. italicum* to grow at low temperature.

In contrast to *P. digitatum*, *P. italicum* is readily able to spread from fruit to fruit in packed containers and create nests of decayed fruit (11). Moreover, healthy fruit can be soiled by spores of both fungi dislodged from diseased fruit (11,37). Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate are poor eradicants that do not kill spores and their inhibitory action is not very persistent; therefore, additional complementary treatments could be needed to provide protection of the fruit from reinfection after treatment. Biological control antagonists, which can persist for long periods, may accomplish this task (31). The effectiveness of sodium carbonate and sodium bicarbonate against green mold was significantly improved when these treatments were followed by the application of *Pseudomonas syringae* strain ESC10 (31). Work in our laboratory is being conducted to test the possible complementary effect of the strain CPA-2 of the antagonistic bacterium *Pantoea agglomerans* (36) and carbonate treatments against citrus postharvest green and blue molds.

## Acknowledgements

We thank the Catalanian Government (CIRIT, Comissió Interdepartamental de Recerca i Tecnologia), the Grup Exportador de Cítrics del Baix Ebre-Montsià (Tarragona, Catalonia, Spain), Sunkist Growers (Lindsay, California), and the California Citrus Research Board for their financial support; and Sunkist Growers for useful suggestions and comments.

## Literature cited

1. Barger, W. R. 1928. Sodium bi-carbonate as a citrus fruit disinfectant. Calif. Citrograph 13:164-174.
2. Barkai-Golan, R., and Apelbaum, A. 1991. Synergistic effects of heat and sodium o-phenyl phenate treatments to inactivate *Penicillium* spores and suppress decay in citrus fruits. Trop. Sci. 31:229-233.
3. Barkai-Golan, R., and Phillips, D. J. 1991. Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. Plant Dis. 75:1085-1089.
4. Bus, V. G., Bongers, A. J., and Risse, L. A. 1991. Occurrence of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazalil on citrus fruit from different geographic origins. Plant Dis. 75:1098-1100.
5. Corral, L. G., Post, L. S., and Montville, T. J. 1988. Antimicrobial activity of sodium bicarbonate. J. Food Sci. 53:981-982.
6. Curran, D. M., Tepper, B. J., and Montville, T. J. 1990. Use of bicarbonates for microbial control and improved water-binding capacity in cod fillets. J. Food Sci. 55:1564-1566.
7. DePasquale, D. A., and Montville, T. J. 1990. Mechanism by which ammonium bicarbonate and ammonium sulfate inhibit mycotoxigenic fungi. Appl. Environ. Microbiol. 56:3711-3717.
8. Dezman, D. J., Nagy, S., and Brown, G. E. 1986. Postharvest fungal decay control chemicals: treatments and residues in citrus fruits. Residue Rev. 97:37-92.
9. Díaz, M. A., and Vila, R. 1988. El problema de la resistencia a los fungicidas: referencia a la situación en los almacenes españoles de comercialización de cítricos. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 28:151-158.
10. Eckert, J. W., and Brown, G. E. 1986. Evaluation of postharvest treatments for citrus fruits. Pages 92-97 in: Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens. K. D. Hickey, ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
11. Eckert, J. W., and Eaks, I. L. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. Pages 179-260 in: The Citrus Industry. Vol. 5. W. Reuter, E. C. Calavan, and G. E. Carman, eds. Univ. Calif. Press, Berkeley.
12. Fletcher, D. L., Russell, S. M., Walker, J. M., and Bailey, J. S. 1993. An evaluation of a rinse procedure using sodium bicarbonate and hydrogen peroxide on the recovery of bacteria from broiler carcasses. Poultry Sci. 72:2152-2156.

13. Green, F. M. 1932. The infection of oranges by *Penicillium*. J. Pomol. Hort. Sci. 10:184-215.
14. Gutter, Y. 1975. Interrelationship of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* in thiabendazole-treated oranges. Phytopathology 65:498-499.
15. Homma, Y., Arimoto, Y., and Misato, T. 1981. Effects of emulsifiers and surfactants on the protective values of sodium bicarbonate. J. Pestic. Sci. 6:145-153.
16. Houck, L. G. 1967. Hot water treatments for control of *Penicillium* green mold of Eureka lemons. (Abstr.) Phytopathology 57:99.
17. Hwang, L., and Klotz, L. J. 1938. The toxic effect of certain chemical solutions on spores of *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. Hilgardia 12:1-38.
18. Lindsay, R. C. 1985. Food additives. Chapter 10 in: Food Chemistry. O. R. Fennema, ed. Marcel Decker, Inc., New York, NY.
19. Lurie, S. 1998. Postharvest heat treatments. Postharvest Biol. Technol. 14: 257-269.
20. Marloth, R. H. 1931. The influence of hydrogen-ion concentration and of sodium bicarbonate and related substances on *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. Phytopathology 21:169-198.
21. Martínez-Jávega, J. M., Cuquerella, J., and Navarro, P. 1995. Perspectiva actual de la tecnología postcosecha de frutos cítricos. Levante Agrícola 332:220-225.
22. Morris, S. C., and Nicholls, P. J. 1978. An evaluation of optical density to estimate fungal spore concentrations in water suspensions. Phytopathology 68:1240-1242.
23. Multon, J. L. 1988. Aditivos y Auxiliares de Fabricación en las Industrias Agroalimentarias. Editorial Acribia, Zaragoza, Spain.
24. National Research Council. 1993. Pesticides in the Diets of Infants and Children. National Academy Press, Washington, DC.
25. Palou, L., Usall, J., Aguilar, M.J., Pons, J., and Viñas, I. 1999. Control de la podredumbre verde de los cítricos mediante baños con agua caliente y carbonatos sódicos. Levante Agrícola 348:412-421.
26. Rodov, V., Ben-Yehoshua, S., Albagli, R., and Fang, D. Q. 1995. Reducing chilling injury and decay of stored citrus fruit by hot water dips. Postharvest Biol. Technol. 5:119-127.
27. Schirra, M., and D'hallewin, G. 1997. Storage performance of 'Fortune' mandarins following hot water dips. Postharvest Biol. Technol. 10:229-238.
28. Schirra, M., D'hallewin, G., Cabras, P., Angioni, A., and Garau, V. L. 1998. Seasonal susceptibility of Tarocco oranges to chilling injury as affected by hot water and thiabendazole postharvest dip treatments. J. Agric. Food Chem. 46:1177-1180.
29. Smilanick, J. L., Mackey, B. E., Reese, R., Usall, J., and Margosan, D. A. 1997. Influence of concentration of soda ash, temperature, and immersion period on the control of postharvest green mold of oranges. Plant Dis. 81:379-382.
30. Smilanick, J. L., Margosan, D. A., and Henson, D. J. 1995. Evaluation of heated solutions of sulfur dioxide, ethanol, and hydrogen peroxide to control postharvest green mold of lemons. Plant Dis. 79:742-747.

31. Smilanick, J. L., Margosan, D. A., Mlikota, F., Usall, J., and Michael, I. F. 1999. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Dis.* 83:139-145.
32. Smilanick, J. L., Michael, I. F., Mansour, M. F., Mackey, B. E., Margosan, D. A., Flores, D., and Weist, C. F. 1997. Improved control of green mold of citrus with imazalil in warm water compared with its use in wax. *Plant Dis.* 81:1299-1304.
33. Smoot, J. J., and Melvin, C. F. 1963. Hot water as a control for decay of oranges. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 76:322-327.
34. Tuset, J. J. 1987. Podredumbres de los Frutos Cítricos. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Generalitat Valenciana, Valencia, Spain.
35. Tuset, J. J., Hinarejos, C., Mira, J. L., and Martínez-Jávega, J. M. 1996. Tratamientos térmicos a los frutos cítricos para el control de las enfermedades de la post-recolección. *Levante Agrícola* 337:342-347.
36. Viñas, I., Usall, J., Nunes, C., and Teixidó, N. 1999. Nueva cepa de la bacteria *Pantoea agglomerans* (Beijerinck, 1998) Gavini, Mergaert, Beji, Mielcareck, Izard, Kerstersy De Ley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de frutas. Solicitud P9900612. Oficina Española de Patentes y Marcas, Madrid, Spain.
37. Whiteside, J. O., Garnsey, S. M., and Timmer, L. W., eds. 1988. *Compendium of Citrus Diseases*. 2nd ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
38. Ziv, O., and Zitter, T. A. 1992. Effects of bicarbonate and film-forming polymers on cucurbit foliar diseases. *Plant Dis.* 76:513-517.

# Capítol 4

---

## Hot Water, Sodium Carbonate, and Sodium Bicarbonate for the Control of Postharvest Green and Blue Molds of Clementine Mandarins

L. Palou<sup>1</sup>, J. Usall<sup>1</sup>, J.A. Muñoz<sup>1</sup>, J.L. Smilanick<sup>2</sup>, I. Viñas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Àrea de Postcollita, CeRTA, Centre UdL-IRTA, Lleida*

<sup>2</sup>*Horticultural Crops Research Laboratory, USDA-ARS, Fresno, CA, USA*

**Referència:** *Postharvest Biol. Technol.* 24: 93-96 (2002) (Research Note).

---



## Abstract

Clementine mandarins cv. ‘Clemenules’, artificially inoculated with *Penicillium digitatum* or *P. italicum*, were immersed in 0, 2, or 3% (w/v) sodium carbonate (SC) solutions at 20, 45 or 50°C for 60 or 150 s. Decay incidence was determined after 7 days of storage at 20°C and 90% relative humidity (RH). Hot water (HW) at 45 or 50°C did not satisfactorily control both diseases. With decay incidence for the control treatment (water alone at 20°C) adjusted to 100%, the incidence of both green and blue molds on fruit treated with HW at 45 and 50°C was about 80 and 60%, respectively. SC significantly enhanced decay control compared to water alone at all temperatures and for all immersion periods. Heated SC solutions were more effective than solutions at 20°C. A 150 s dip in 3% SC at 50°C totally controlled both green and blue molds without noticeably injuring the fruit. A low-pressure rinse of the treated fruit did not affect effectiveness of HW and SC treatments at 50°C and avoid depositions of salt on the fruit rind. Decay incidence was in general higher on treated fruit inoculated 24 h before treatment than on fruit inoculated 2 h before treatment. SC at 50°C significantly reduced the incidence of both green and blue molds on mandarins stored at 3.5°C for 60 days. Both diseases were reduced by 40 to 60% on mandarins dipped for 60 or 150 s in 2 or 3% sodium bicarbonate (SBC) solutions at room temperature. The effectiveness of all HW, SC, and SBC treatments on clementines was inferior to that obtained on oranges or lemons in related previous work.

**Keywords:** clementine mandarin, *Citrus reticulata*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, hot water, sodium carbonate, sodium bicarbonate, postharvest decay

## Introduction

Worldwide fresh consumption and planted surface of mandarins have been increasing during the past years. Clementine mandarin is the most economically important citrus crop in Catalonia (Spain). The most widely grown cultivar is ‘Clemenules’ (syn.: ‘Clementina de Nules’), which is primarily exported to European markets. Postharvest diseases are among the major economic concerns related to clementine production, not only due to produce losses in the packinghouses but also to price discounts that could be applied by destiny export markets. Postharvest green mold, caused by *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., and postharvest blue mold, caused by *P. italicum* Wehmer, are the most economically important postharvest

diseases of citrus in Spain (Tuset, 1987) and all production areas characterized by low summer rainfall (Eckert and Eaks, 1989). Blue mold is especially important on citrus fruit kept under cold storage (Whiteside et al., 1993). Currently, both diseases are primarily controlled by application of synthetic fungicides. Alternative methods are needed because of concerns about environmental contamination and human health risks associated with fungicide residues (National Research Council, 1993). Furthermore, the widespread use of these chemicals in commercial packinghouses has led to the proliferation of resistant strains of the pathogens (Eckert, 1990). In Spain, *Penicillium* strains resistant to thiabendazole and imazalil have been detected in packinghouses in Catalonia (Palou et al., unpublished) and Valencia (Díaz and Vila, 1988).

Hot water (HW) treatments have been well studied for the control of postharvest decay of citrus fruits (Smoot and Melvin, 1963; Barkai-Golan and Phillips, 1991) and, in case of long-term refrigerated storage, for the improvement of the resistance of the fruit, including mandarins, to chilling injury (Schirra and D'hallewin, 1997; González-Aguilar et al., 1997). When combined with fungicides, HW greatly enhances their efficacy and makes it possible to reduce their application rates (Barkai-Golan and Apelbaum, 1991; Schirra and Mulas, 1995). Recently, postharvest heat treatments (Lurie, 1998; Ferguson et al., 2000) and host-pathogen interactions modulated by heat treatments (Schirra et al., 2000) have been reviewed.

Sodium carbonate (SC,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , soda ash) and sodium bicarbonate (SBC,  $\text{NaHCO}_3$ , baking soda) are common food additives allowed with no restrictions for many applications by European and North American regulations (Lindsay, 1985; Multon, 1988). Their antimicrobial activity has been described for a variety of fruits and vegetables. SBC to control postharvest green and blue molds of citrus was first described by Barger (1928) as an alternative to the use of borax. Heated SC solutions have been used to improve cleaning and also to reduce postharvest decay of lemons in California for more than 70 years (Eckert and Eaks, 1989), a synergistic effect between SC and HW being showed. Solutions of both salts provided satisfactory control of green mold on lemons (Smilanick et al., 1995, 1999) and oranges (Smilanick et al., 1997, 1999; Palou et al., 1999) and blue mold on oranges (Palou et al., 2001). However, their efficacy against both diseases has not been evaluated on clementine mandarins. The aim of this work was to evaluate HW, SC, SBC, and combinations of HW and SC for the control of green and blue molds on artificially inoculated 'Clemenules' mandarins.

## Materials and methods

**Fruit inoculation.** Clementine mandarins (*Citrus reticulata* Blanco) cv. ‘Clemenules’, from commercial orchards in Baix Ebre and Montsià areas (Tarragona, Catalonia, Spain), were selected from field bins and used in the experiments before any commercial postharvest treatments were applied. The fruit were used the same day, or stored up to 2 weeks at 5°C and 90% relative humidity (RH) before use. Before each experiment, fruit were randomized, washed with fresh water, disinfected superficially for 1 min in a diluted bleach dip (0.5% sodium hypochlorite), rinsed with water, and allowed to air-dry at room temperature.

Petri dishes of potato dextrose agar (PDA) were inoculated with *P. digitatum* isolate PDM-1 or *P. italicum* isolate PIM-7 and incubated at 25°C for 7 to 10 days. A conidial suspension was prepared in Tween 80 (0.05% w/v) in water and diluted to 10<sup>6</sup> spores ml<sup>-1</sup> after counting spores with a hemacytometer. This concentration is recommended for evaluation of postharvest treatments to control green and blue molds of citrus fruit (Eckert and Brown, 1986). Using a micropipet, 25 µl of this suspension were placed in a 1 mm x 5 mm x 2 mm deep wound made with a stainless steel scalpel on the equator of each mandarin. The wound penetrated the albedo tissue, but not the juice sacs, and simulated frequent infection under commercial conditions.

**Hot water and sodium carbonate treatments.** Three stainless steel buckets each holding 24 l of water or SC solutions (Sigma Chemical Co.) were heated to the test temperature in a 172-liter stainless steel water tank fitted with a 9 kW electric resistance heater and thermostat. Metallic grid baskets containing the mandarins previously inoculated with *P. digitatum* or *P. italicum* were submerged in the buckets. Fruit inoculated with each pathogen were assayed in different solutions. Treated fruit were placed in plastic cavity trays that prevented contact infections and allowed to air-dry at room temperature.

(i) *Influence of SC concentration, temperature, and immersion period.* Three SC concentrations (0, 2, and 3%, w/v), three temperatures (20, 45, and 50°C, ±1°C), and two immersion periods (60 and 150 s) were tested on mandarins inoculated about 2 h before with *P. digitatum* or *P. italicum*. Within each experiment, each treatment was applied to four replicates of 10 fruits each. Treated fruit were stored at 20°C and 90% RH. The number of infected mandarins was counted after 7 days of storage. The experiment was conducted twice.

(ii) *Influence of rinsing at low pressure the treated fruit.* Mandarins inoculated about 2 h before with *P. digitatum* or *P. italicum* were immersed for 150 s in water alone at 20±1°C (control), water alone at 50±1°C (HW), or 2% SC (w/v) at 50±1°C.

After treatment, half of the fruit were rinsed with about 30 ml of fresh water per fruit at low pressure in a spray 50 cm above the fruit for 5 s. Once dried, both rinsed and non-rinsed fruit were held at 20°C and 90% RH for 7 days, at which time the incidence of green or blue mold was determined. Within each treatment, both rinse and non-rinse procedures were applied to four replicates of 10 fruits each. The experiment was conducted twice.

(iii) *Influence of the period of time between fruit inoculation and treatment.* Randomized mandarins were separated into two groups. Fruit in the first group were inoculated with *P. digitatum* or *P. italicum* as previously described about 24 h before treatments were applied and kept at the environmental conditions of the laboratory. Fruit in the second group were inoculated about 2 h before treatment. Mandarins from both groups were dipped for 150 s in water alone at 20±1°C (control), water alone at 50±1°C (HW), or 2% SC (w/v) at 50±1°C. Each treatment was applied to four replicates of 10 fruits each. Decay incidence was determined after 7 days of storage at 20°C and 90% RH (7 days after the fruit were treated, not inoculated). The test was conducted twice.

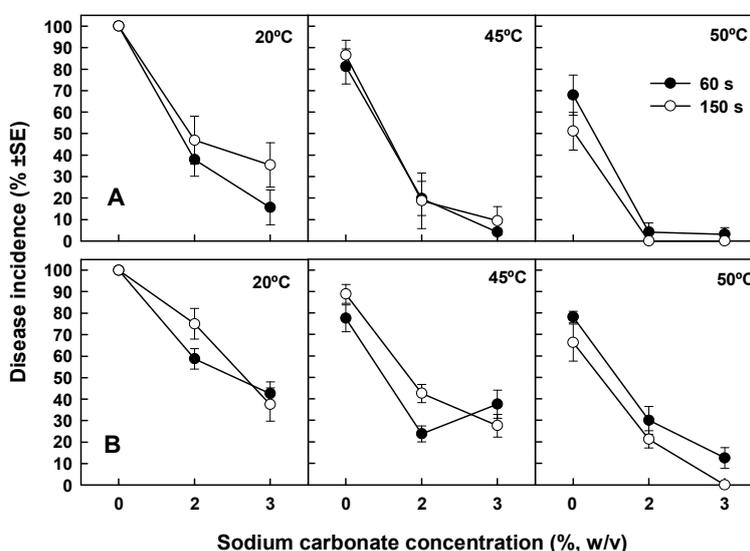
(iv) *Efficacy under long-term cold storage.* Mandarins inoculated about 2 h before with *P. digitatum* or *P. italicum*, were dipped for 150 s in water alone at 20±1°C (control), water alone at 50±1°C (HW), or 2% SC (w/v) at 50±1°C, let to dry, and then stored at 3.5±1°C and 98% RH for 2 months. Each treatment was applied to four replicates of 10 fruits each. The number of decayed fruit was determined after 30 and 60 days of storage.

**Sodium bicarbonate treatments.** Mandarins were inoculated with *P. digitatum* or *P. italicum* as described above and, about 2 h later, immersed for 60 or 150 s in 0 (control, water alone), 2, or 3% (w/v) SBC solutions (Sigma Chemical Co.) at room temperature (20±1°C), using the buckets and the water tank previously described. The pH of SBC solutions rises rapidly at high temperature so only room temperature was tested (Smilanick et al., 1999). Each treatment was applied to four replicates of 10 fruits each. Once dried, treated fruit were placed into plastic cavity trays and stored at 20°C and 90% RH for 7 days, at which time decay incidence was examined. The experiment was conducted twice.

**Statistical analysis.** Decay incidence data were analyzed by analyses of variance of the arcsine of the square root of the proportion of decayed fruit (SAS v. 8.00; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Fisher's Protected Least Significant Difference (LSD) test ( $P = 0.05$ ) was used for means separation.

## Results

**Hot water and sodium carbonate treatments.** (i) *SC concentration, temperature, and immersion period.* HW dips at 45 or 50°C for 60 or 150 s did not effectively control either green or blue mold. With decay incidence on the control treatments (water alone at 20°C, SC concentration = 0) adjusted to 100%, the incidence of both green and blue molds on fruit treated with HW at 45°C was greater than 75%, whereas at 50°C it was about 50 and 70% for green mold and 65 and 80% for blue mold after 150- and 60-s dips, respectively (Fig. 1). No heat damage was observed after 7 days of storage at 20°C on mandarins treated at 45 or 50°C.



**Fig. 1.** Influence of solution temperature (20, 45, or 50°C), sodium carbonate concentration (0, 2, or 3%), and immersion period (60 or 150 s) on the incidence of green (A) and blue (B) molds on artificially inoculated 'Clemenules' mandarins stored at 20°C and 90% RH for 7 days.

**Table 1.** Analysis of variance of the incidence of green and blue molds on artificially inoculated ‘Clemenules’ mandarins immersed in sodium carbonate solutions and stored at 20°C and 90% RH for 7 days

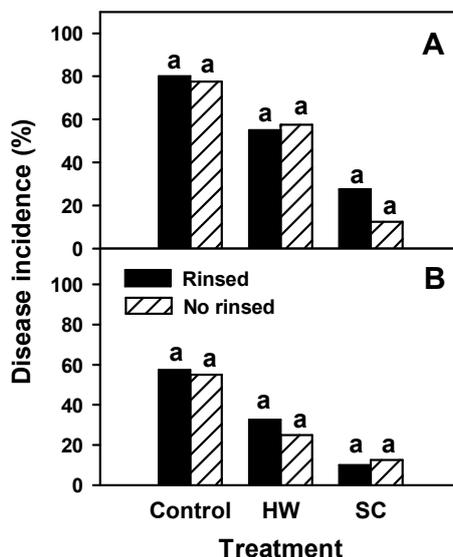
Source <sup>a</sup>	df	MS	F	P > F
<b>Green mold</b>				
Experiment (E)	1	79.71	0.15	0.7015
Concentration (C)	2	52065.94	96.41	<0.0001
Temperature (T)	2	12490.79	23.13	<0.0001
Immersion period (t)	1	13.23	0.02	0.8759
C x T	4	482.22	0.89	0.4704
C x t	2	314.51	0.58	0.5601
T x t	2	653.16	1.21	0.3018
C x T x t	4	80.85	0.15	0.9628
Error	125	540.04		
<b>Blue mold</b>				
Experiment (E)	1	1.94	0.02	0.9004
Concentration (C)	2	29884.20	241.46	<0.0001
Temperature (T)	2	6981.04	56.41	<0.0001
Immersion period (t)	1	434.75	3.51	0.0632
C x T	4	592.29	4.79	0.0013
C x t	2	937.22	7.57	0.0008
T x t	2	1903.87	15.38	<0.0001
C x T x t	4	81.69	0.66	0.6210
Error	125	123.76		

<sup>a</sup> Analysis was applied to the arcsine of the square root of the proportion of decayed fruit.

Concentration and temperature of SC solutions, but not immersion period, influenced significantly the control of both green and blue molds. The influence of concentration was greater than that of temperature (Table 1). In every test, SC treatment improved the control of both green and blue molds compared to the treatments with water alone (SC concentration = 0) (Fig. 1). With decay incidence for the control treatment (water alone at room temperature, 20±1°C) adjusted to 100%, the incidence of green mold at concentrations of 2 or 3% SC was 5 to 20% at 45°C

and 0 to 5% at 50°C. The incidence of blue mold was 20 to 40% and 0 to 30%, respectively (Fig. 1). While no significant interactions were observed for green mold, the effects of concentration and immersion period were significantly dependent on the temperature for blue mold (Table 1; Fig. 1B): differences in effectiveness between the control with water alone and those treatments with sodium carbonate were greater at 45 and 50°C than at 20°C; differences in effectiveness between concentrations of 2 and 3% SC were greater at 20 and 50°C than at 45°C. A treatment of 150 s enhanced the effectiveness of all concentrations compared to 60 s at 50°C, but not at 20 or 45°C. Likewise, for blue mold, the effect of the immersion period was dependent on the concentration (Table 1): a treatment of 150 s enhanced the effectiveness of the treatments at a concentration of 3% SC but not at concentrations of 0 or 2% SC (Fig. 1B).

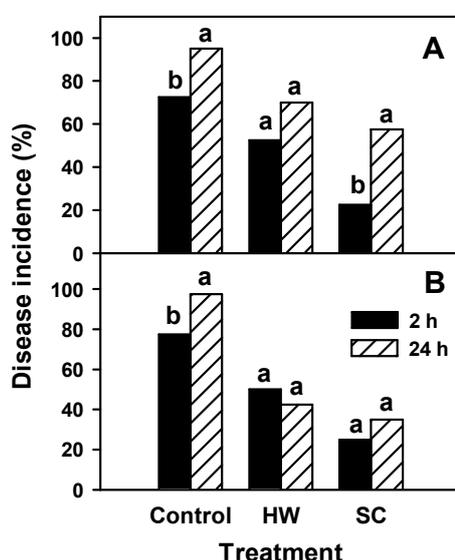
No visible rind injury occurred in every test.



**Fig. 2.** Influence of rinsing at low pressure the treated fruit on the incidence of green (A) and blue (B) molds on artificially inoculated ‘Clemenules’ mandarins immersed for 150 s in water at 20°C (control), water at 50°C (HW), or 2% sodium carbonate at 50°C (SC) and stored at 20°C and 90% RH for 7 days. Within each treatment, columns with the same letter are not significantly different by Fisher’s Protected LSD test ( $P < 0.05$ ). Analysis of variance was performed on the arcsine-transformed data. Non-transformed means are shown.

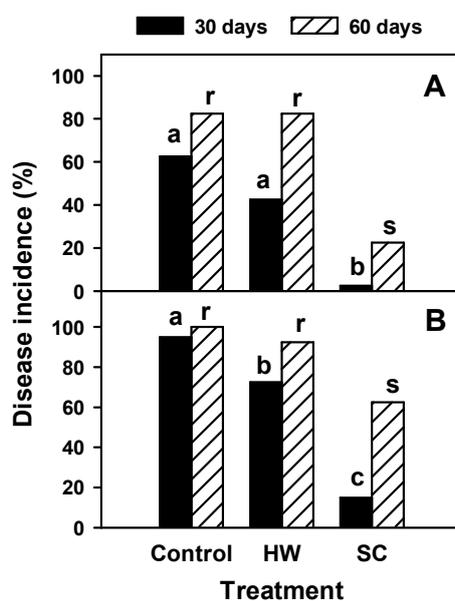
(ii) *Low pressure rinse*. No significant differences in incidence of both green and blue molds were found between rinsed and non-rinsed mandarins treated with either HW at 50°C or 2% SC at 50°C and held for 7 days at 20°C (Fig. 2). Slight deposition of SC on the skin of non-rinsed fruit (diffuse white stains) was noticed after the storage period.

(iii) *Time period between fruit inoculation and treatment*. In general, the incidence of both green and blue molds after 7 days of storage at 20°C was higher on mandarins inoculated 24 h before treatment than on mandarins inoculated 2 h before treatment. However, the differences were only significant for control fruit (immersed in water at 20°C) and for green mold on fruit treated with 2% SC at 50°C (Fig. 3).



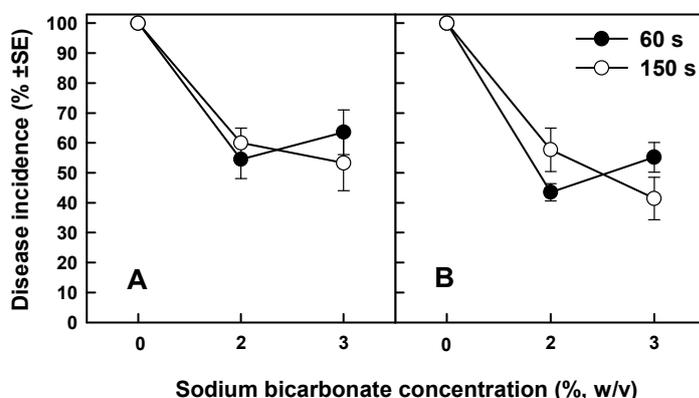
**Fig. 3.** Influence of the time period from inoculation of the pathogen to treatment (2 or 24 h) on the incidence of green (A) and blue (B) molds on artificially inoculated 'Clemenules' mandarins immersed for 150 s in water at 20°C (control), water at 50°C (HW), or 2% sodium carbonate at 50°C (SC) and stored at 20°C and 90% RH for 7 days. Within each treatment, columns with the same letter are not significantly different by Fisher's Protected LSD test ( $P < 0.05$ ). Analysis of variance was performed on the arcsine-transformed data. Non-transformed means are shown.

(iv) *Long-term cold storage.* The incidence of both green and blue molds was significantly reduced by SC at 50°C on mandarins stored at 3.5°C for either 30 or 60 days. SC at 50°C was more effective than HW at 50°C in controlling both diseases. While the incidence of green and blue molds on HW-treated fruit after 30 days of storage was 42.5 and 72.5%, respectively, it was 2.5 and 15%, respectively, on SC-treated fruit (Fig. 4). No green mold reduction was observed on HW-treated fruit compared to control fruit. A significant increase in disease incidence occurred during the second month of cold storage. The incidence of blue mold (Fig. 4B) was higher than the incidence of green mold (Fig. 4A). No apparent chilling injury symptoms were observed on the fruit rind after the 60-day cold storage period.



**Fig. 4.** Incidence of green (A) and blue (B) molds on artificially inoculated ‘Clemenules’ mandarins immersed for 150 s in water at 20°C (control), water at 50°C (HW), or 2% sodium carbonate at 50°C (SC) after 30 and 60 days of storage at 3.5°C and 98% RH. Within each cold storage period, columns with the same letter are not significantly different by Fisher’s Protected LSD test ( $P < 0.05$ ). Analysis of variance was performed on the arcsine-transformed data. Non-transformed means are shown.

**Sodium bicarbonate treatments.** While decay incidence on the control treatment (SBC concentration = 0, water alone) was 100%, the incidence of both green and blue molds after 7 days of storage at 20°C was 40 to 60% on mandarins dipped in 2 or 3% SBC solutions at room temperature (Fig. 5). No significant differences in decay incidence were found between immersion periods of 60 and 150 s ( $P = 0.3528$  and  $P = 0.7083$  for green and blue molds, respectively); the effect of the immersion period was not dependent on the SBC concentration ( $P = 0.1427$  and  $P = 0.3969$  for green and blue molds, respectively).



**Fig. 5.** Influence of sodium bicarbonate concentration (0, 2, or 3% w/v) and immersion period (60 or 150 s) on the incidence of green (A) and blue (B) molds on artificially inoculated ‘Clemenules’ mandarins treated at room temperature ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ) and stored at  $20^\circ\text{C}$  and 90% RH for 7 days.

## Discussion

Effective control of green and blue molds of clementine mandarins was not obtained by brief HW treatments at 45 or 50°C. Similar poor effectiveness for HW at 45°C, but considerable better effectiveness for HW at 50 to 53°C were reported against green mold of oranges (Smoot and Melvin, 1963; Tuset et al., 1996; Usall et al., 1998), blue mold of oranges (Palou et al., 2001), green mold of lemons (Houck, 1967; Smilanick et al., 1995; Nafussi et al., 2000), or blue mold of grapefruits (Dettori et al., 1996). No heat injury to the mandarins treated at 50°C was observed after the 7-day

storage period. Schirra and D'hallewin (1997) reported that HW at 50 or 52°C did not injure the rind of 'Fortune' mandarins whereas higher water temperatures induced rind browning.

SC significantly enhanced decay control compared to water alone at all temperatures and for all immersion periods. While moderate control of both green and blue molds was achieved by 2 or 3% SC at room temperature, heating SC solutions to 45°C, and especially to 50°C, improved SC effectiveness significantly. Many authors observed synergistic effects of heat and chemicals to control *Penicillium* decay on citrus fruit (Barkai-Golan and Apelbaum, 1991; Schirra and Mulas, 1995; Smilanick et al., 1995; Tuset et al., 1996). We also observed such effects for heated SC solutions in previous research (Smilanick et al., 1997, 1999; Palou et al., 1999, 2001). Hot SC solutions were more effective than HW at lower temperatures, which is important to minimize the risks of rind damage by heat. In general, commercial adoption of HW dips should be done with caution because the difference in temperature between control and severe injury is too small. In the present work, a 150 s dip in 3% SC at 50°C controlled totally both green and blue molds of mandarins without noticeably injuring the fruit. However, these temperature and SC concentration were higher than those needed to reach effective control on oranges with a dip of 150 s, namely 2% SC and 40-45°C (Smilanick et al., 1997; Palou et al., 2001). Although rind injuries on oranges were only associated with SC treatments at 56°C or higher (Smilanick et al., 1999), a commercial treatment of mandarins with SC at 50°C could probably be too risky.

In previous work with oranges, effectiveness of HW, SC, and SBC treatments in controlling blue mold was similar to effectiveness in controlling green mold (Usall et al., 1998; Palou et al., 1999, 2001). In this work, contrastingly, more severe HW or SC treatments were needed to control effectively blue mold of mandarins than to control green mold. By contrast, Hwang and Klotz (1938) observed that *P. italicum* spores were more sensitive to the in vitro inhibitory effect of SC, SBC, and other salts than *P. digitatum* spores.

SC and SBC solutions must be rinsed off the fruit surface to prevent the deposition of salt residues on brushes and belts of packing and sorting equipment, and to prevent staining and desiccation of the fruit rind. In our tests, water rinsing by low-pressure sprays did not influence SC effectiveness significantly. Neither did it on oranges or lemons (Smilanick et al., 1999). In contrast, high-pressure water washing (about 1500 kPa) reduced the effectiveness of SC dips (Smilanick et al., 1999), presumably by removing SC residues from the fruit skin.

When fruit inoculation was performed about 24 h before treatment, decay incidence among control or treated fruit was in general higher as compared to fruit inoculated about 2 h before treatment, although the differences were not always significant. Dettori et al. (1996) reported that earlier HW treatments effectively controlled blue mold of grapefruit, whereas treatments 48-72 h after inoculation did not. The mycelium of *P. italicum* became thinner, with reduced branching, and unable to spread into the albedo when fruit were treated with HW at 50°C 1 h after inoculation. Marloth (1931) observed, however, that germinated spores of either *P. italicum* or *P. digitatum* were more readily killed in vitro by SC and SBC solutions than non-germinated spores.

SC treatments controlled green and blue molds significantly better than HW treatments on long-term cold-stored mandarins. Control of blue mold was inferior to that of green mold, very likely because of the better adaptation of *P. italicum* to grow at temperatures below 10°C (Whiteside et al., 1993). Similar results were obtained in artificially inoculated oranges stored at 3°C for 2 months (Palou et al., 2001).

Solutions of 2 or 3% SBC at room temperature failed in controlling effectively both of the molds. Similarly to what was observed in the case of HW and SC treatments, the effectiveness of SBC against both diseases was lower on mandarins than on oranges or lemons (Smilanick et al., 1999; Palou et al., 1999, 2001). Since the same fungal strains and experimental procedures were used in most of these tests, induction of some defense mechanisms by the treatments in the wound-inoculated fruit would explain decay control better than a direct action against the pathogens. All HW, SC and SBC dips are non-curative treatments which effects in vivo are primarily fungistatic and not very persistent. These effects cannot be predicted by their activity in vitro. Induction of lignin-like polymers, synthesis of phytoalexins, and biogenesis of pathogen-related proteins are mechanisms associated with postharvest heat treatments (Ferguson et al., 2000). SC or SBC mode of action has not been completely elucidated. Their inhibitory ability depends on the presence of salt residues within the wound infection courts occupied by the fungus and on interactions between this residue and constituents of the rind. These interactions presumably alter the original in vitro toxicity of the salts to the spores (Marloth, 1931; Hwang and Klotz, 1938). Likewise, the combined effect of the pathogen and HW treatment induced the build up of resistance mechanisms in the peel of wound-inoculated lemons (Nafussi et al., 2000). Apparently, the particular response of clementine mandarins to such interactions compared to the response of other citrus species resulted, as shown by our results with 'Clemenules', in not so effective defense mechanisms. Mandarins are the most fragile among citrus fruit. Harvest, transportation and handling must be extremely cautious

and especial precautions are required in the packinghouses to guarantee fruit quality, extend its commercial life, and minimize postharvest losses (Grierson and Ben-Yehoshua, 1986). Within each specie, moreover, the physiological condition of the fruit can also influence the effectiveness of the treatments. Orange susceptibility to postharvest decay, chilling injury, and rind injury caused by HW dips was greatly influenced by the harvest date (Schirra et al., 1998).

The protection levels against citrus postharvest diseases provided by synthetic fungicides are, in general, difficult to achieve with most of the alternative control methods that have been evaluated to date. Therefore, considerable research is currently focused on the combination of complementary physical, chemical, and biological treatments. Hot water and sodium carbonates are, in general, unable to provide the persistence or the antispore action against *Penicillium* actually provided by synthetic fungicides (Smilanick et al., 1999). In previous work, we observed that control of both citrus green and blue molds of oranges was significantly improved by combining SBC treatments with the application of the antagonistic biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 (Usall et al., 2000; Teixidó et al., 2001). Similar approach is also being evaluated on clementine mandarins.

## Acknowledgements

This work was partially supported by the European Commission Project No. 2FD97-0492, the Catalanian Government (CIRIT, Comissió Interdepartamental de Recerca i Tecnologia), the Spanish Government (CICYT, Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología), and the Grup Exportador de Cítrics del Baix Ebre-Montsià (Tarragona, Catalonia, Spain).

## References

- Barger, W.R., 1928. Sodium bi-carbonate as a citrus fruit disinfectant. Calif. Citrograph 13, 164-174.
- Barkai-Golan, R., Apelbaum, A., 1991. Synergistic effects of heat and sodium o-phenyl phenate treatments to inactivate *Penicillium* spores and suppress decay in citrus fruits. Trop. Sci. 31, 229-233.
- Barkai-Golan, R., Phillips, D.J., 1991. Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. Plant Dis. 75, 1085-1089.
- Dettori, A., D'hallewin, G., Aggabio, M., Marceddu, S., Schirra, M., 1996. SEM studies on *Penicillium italicum* – ‘Star Ruby’ grapefruit interactions as affected by fruit hot water dipping. Proc. Int. Soc. Citriculture 2, 1158-1163.

- Díaz, M.A., Vila, R., 1988. El problema de la resistencia a los fungicidas: referencia a la situación en los almacenes españoles de comercialización de cítricos. Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment. 28, 151-158 (in Spanish).
- Eckert, J.W., 1990. Impact of fungicide resistance on citrus fruit decay control. In: Managing Resistance to Agrochemicals. Green, M.B., Le Baron, H.M., Moberg, W. K. (Eds.). Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 421, 286-302.
- Eckert, J.W., Brown, G.E., 1986. Evaluation of postharvest treatments for citrus fruits. In: Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens. Hickey, K.D. (Ed.), Amer. Phytopathol. Soc. Press, St. Paul, MN, USA. pp. 92-97.
- Eckert, J.W., Eaks, I.L., 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. In: The Citrus Industry. Vol. 5. Reuter, W., Calavan, E.C., Carman, G.E. (Eds.), University of California Press, Berkeley, CA, USA. pp. 179-260.
- Ferguson, I.B., Ben-Yehoshua, S., Mitcham E.J., McDonald, R.E., Lurie, S., 2000. Postharvest heat treatments: introduction and workshop summary. Postharvest Biol Technol. 21, 1-6.
- González-Aguilar, G.A., Zacarias, L., Mulas, M., Lafuente, M.T., 1997. Temperature and duration of water dips influence chilling injury, decay and polyamine content in "Fortune" mandarins. Postharvest Biol. Technol. 12, 61-69.
- Grierson, W., Ben-Yehoshua, S., 1986. Storage of citrus fruits. In: Fresh Citrus Fruits. Wardowski, W.F., Nagy, S., Grierson, W. (Eds.), AVI Publishing Co., Inc. Westport, CT, USA. pp. 479-507.
- Houck, L.G., 1967. Hot water treatments for control of *Penicillium* green mold of Eureka lemons. Phytopathology 57, 99 (Abstract).
- Hwang, L., Klotz, L.J., 1938. The toxic effect of certain chemical solutions on spores of *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. Hilgardia 12, 1-38.
- Lindsay, R.C., 1985. Food additives. In: Food Chemistry. Fennema, O.R. (Ed.), Marcel Decker, Inc., New York, NY, USA.
- Lurie, S., 1998. Postharvest heat treatments. Postharvest Biol. Technol. 14, 257-269.
- Marloth, R.H., 1931. The influence of hydrogen-ion concentration and of sodium bicarbonate and related substances on *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. Phytopathology 21, 169-198.
- Multon, J.L., 1988. Aditivos y Auxiliares de Fabricación en las Industrias Agroalimentarias. Ed. Acribia, Zaragoza, Spain (in Spanish).
- Nafussi, B., Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Peretz, J., Ozer, B.K., D'hallewin, G., 2000. Mode of action of hot water dip in reducing decay of lemon fruit. Proc. Int. Symp. Postharvest 2000, March 26-31, Jerusalem, Israel. In press.
- National Research Council, 1993. Pesticides in the Diets of Infants and Children. National Academy Press, Washington, D.C., USA.
- Palou, L., Smilanick, J.L., Usall, J., Viñas, I., 2001. Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. Plant Dis. 85, 371-376.

- Palou, L., Usall, J., Aguilar, M.J., Pons, J., and Viñas, I., 1999. Control de la podredumbre verde de los cítricos mediante baños con agua caliente y carbonatos sódicos. *Levante Agrícola* 348, 412-421 (in Spanish with English abstract).
- Schirra, M., D'hallewin, G., 1997. Storage performance of 'Fortune' mandarins following hot water dips. *Postharvest Biol. Technol.* 10, 229-238.
- Schirra, M., D'Hallewin, G., Ben-Yehoshua, S., Fallik, E., 2000. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. *Postharvest Biol Technol.* 21, 71-85.
- Schirra, M., D'hallewin, G., Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L., 1998. Seasonal susceptibility of Tarocco oranges to chilling injury as affected by hot water and thiabendazole postharvest dip treatments. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1177-1180.
- Schirra, M., Mulas, M., 1995. Improving storability of "Tarocco" oranges by postharvest hot-dip fungicide treatments. *Postharvest Biol. Technol.* 6, 129-138.
- Smilanick, J.L., Mackey, B.E., Reese, R., Usall, J., Margosan, D.A., 1997. Influence of concentration of soda ash, temperature, and immersion period on the control of postharvest green mold of oranges. *Plant Dis.* 81, 379-382.
- Smilanick, J.L., Margosan, D.A., Henson, D.J., 1995. Evaluation of heated solutions of sulfur dioxide, ethanol, and hydrogen peroxide to control postharvest green mold of lemons. *Plant Dis.* 79, 742-747.
- Smilanick, J.L., Margosan, D.A., Mlikota, F., Usall, J., Michael, I.F., 1999. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Dis.* 83, 139-145.
- Smoot, J.J., Melvin, C.F., 1963. Hot water as a control for decay of oranges. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 76, 322-327.
- Teixidó, N., Usall, J., Palou, L., Asensio, A., Nunes, C., Viñas, I., 2001. Improving biocontrol of green and blue molds of oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. *Eur. J. Plant Pathol.* In press.
- Tuset, J.J., 1987. Podredumbres de los Frutos Cítricos. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Generalitat Valenciana, Valencia, Spain (in Spanish).
- Tuset, J.J., Hinarejos, C., Mira, J.L., Martínez-Jávega, J.M., 1996. Tratamientos térmicos a los frutos cítricos para el control de las enfermedades de la post-recolección. *Levante Agrícola* 337, 342-347 (in Spanish).
- Usall, J., Palou, L., Aguilar, M.J., Viñas, I., 1998. Hot water treatments for the control of postharvest green and blue molds in oranges. *Proc. COST 98*, Madrid, Spain. In press.
- Usall, J., Teixidó, N., Smilanick, J.L., Viñas, I., 2000. Biological control of *Penicillium digitatum* on citrus fruits with antagonistic bacterium *Pantoea agglomerans*. *Proc. Int. Symp. Postharvest 2000*, March 26-31, Jerusalem, Israel. In press.
- Whiteside, J.O., Garnsey, S.M., Timmer, L.W. (Eds.), 1993. *Compendium of Citrus Diseases*. 2nd ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA.

# Capítol 5

---

## Evaluation of Food Additives and Low-toxicity Compounds as Alternative Chemicals for the Control of *Penicillium* *digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. and *Penicillium italicum* Wehmer on Citrus Fruit

L. Palou<sup>1</sup>, J. Usall<sup>1</sup>, J.L. Smilanick<sup>2</sup>, M.J. Aguilar<sup>1</sup>, I. Viñas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Àrea de Postcollita, CeRTA, Centre UdL-IRTA, Lleida*

<sup>2</sup>*Horticultural Crops Research Laboratory, USDA-ARS, Fresno, CA, USA*

**Referència:** *Pest Manag. Sci.* En premsa.

---



## Abstract

The effectiveness of low-toxicity chemicals as possible alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest citrus green and blue moulds was evaluated. Chemicals, mostly common food additives, were preliminarily selected through *in vivo* primary screenings with oranges artificially inoculated with *Penicillium digitatum* or *Penicillium italicum*. Selected compounds and mixtures were tested as heated solutions in small-scale trials. Immersion of artificially inoculated oranges or lemons for 120 s in solutions at 40.6°C and natural pH of 0.2 M potassium sorbate, 0.2 M sodium benzoate or 0.1+0.1 M mixtures of potassium sorbate with sodium benzoate, sodium propionate or sodium acetate were the most effective organic acid salts tested and reduced green mould by 70 to 80% after 7 days of storage at 20°C. The mixtures did not significantly enhance the effectiveness of potassium sorbate or sodium benzoate alone. These solutions were as effective as sodium carbonate or calcium polysulphide treatments and, in general, they were more effective on lemons than on oranges. Satisfactory control of green and blue moulds was obtained by dipping oranges for 150 s in 24.2 mM solutions of sodium molybdate or 1.0 mM solutions of ammonium molybdate at 48 or 53°C, but not at 20°C. At 53°C, however, the effectiveness of hot water was not enhanced by both molybdates. Molybdenum salts at higher concentrations were phytotoxic and stained the fruit. At nonphytotoxic concentrations, the effectiveness of these solutions was more influenced by temperature than by concentration. In general, the inhibitory effects of all compounds tested were not fungicidal but fungistatic and not very persistent. In conclusion, potassium sorbate, sodium benzoate, and ammonium molybdate, among the wide range of chemicals tested, were superior for the control of postharvest *Penicillium* decay of citrus fruit. Future investigations should focus on their compatibility with other alternative physical or biological methods.

**Key words:** citrus, postharvest decay, *Penicillium*, green mould, blue mould, alternative chemical control

## Introduction

Postharvest green mould, caused by *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., and postharvest blue mould, caused by *Penicillium italicum* Wehmer, are the most economically important postharvest diseases of citrus in all production areas characterized by low summer rainfall.<sup>1</sup> Blue mould is especially important on citrus fruit kept under cold storage.<sup>2</sup> Currently, both diseases are primarily controlled by application

of synthetic fungicides such as imazalil, thiabendazole, or sodium ortho-phenyl-phenate (SOPP).<sup>1</sup> Alternative methods are needed because of concerns about environmental contamination and human health risks associated with fungicide residues.<sup>3</sup> Furthermore, the widespread use of these compounds in commercial packinghouses has led to the proliferation of resistant strains of the pathogens.<sup>4,5</sup>

At present, some alternative measures to manage citrus postharvest decay have been commercially adopted or are commercially available. These measures include immersion of fruit in tanks containing sodium bicarbonate, sodium carbonate, or lime sulphur solution<sup>6,7</sup> and application of the registered biological control formulations Aspire (*Candida oleophila* Montrocher; Ecogen, Langhorne, PA, USA), Biosave-100, and Biosave-110 (*Pseudomonas syringae* Van Hall; EcoScience, Worcester, MA, USA). These treatments, however, cannot completely replace the application of synthetic fungicides that is required for successful export market of citrus fruit. Carbonates and lime sulphur eradicate *Penicillium* incipient infections effectively, but they are often inferior to synthetic fungicides in efficacy, particularly with late season fruit,<sup>6,7</sup> and they lack antispore activity, which is important for sanitation and cosmetic purposes.<sup>1</sup> Biocontrol agents have shown great variability in their efficacy and usually cannot eradicate incipient infections or prevent *Penicillium* sporulation.<sup>8</sup> Physical treatments such as heat treatments (curing, hot water, or hot water brushing),<sup>9</sup> ultraviolet light treatments,<sup>10</sup> cold storage, or controlled atmosphere storage have shown direct and/or indirect activity against pathogens. Extensive research is currently focused on the induction of resistance to postharvest pathogens in citrus peel tissue by several mechanisms (induction of lignin-like polymers, synthesis of phytoalexins, biogenesis of pathogen-related proteins) in response to the presence of the pathogen combined with the application of postharvest treatments like heat<sup>11</sup> or biocontrol agents.<sup>12</sup>

In recent years, many chemicals have been evaluated as alternative control methods for citrus postharvest diseases, either alone or in combination with physical or biological treatments. Some promising ones include: potassium sorbate,<sup>13</sup> sodium benzoate and sodium propionate,<sup>14</sup> sulphur dioxide,<sup>15</sup> ethanol,<sup>15,16</sup> several essential oils and plant extracts,<sup>17</sup> natural terpenic compounds,<sup>18</sup> calcium chloride,<sup>19</sup> acetic, formic and propionic acids,<sup>20</sup> nordihydroguaiaretic acid, poly-D-lysine and poly-D-arginine,<sup>21</sup> jasmonate,<sup>22</sup> chitosan and derivatives,<sup>23</sup> 2-deoxy-D-glucose,<sup>24</sup> calcium polysulphide,<sup>7</sup> sodium carbonate and sodium bicarbonate.<sup>6,25</sup>

Unfortunately, all the alternative methods that have been evaluated to date cannot provide by themselves the protection levels that synthetic fungicides typically provide. Therefore, it is important to integrate these alternative control technologies together to develop a treatment strategy able to reach those levels without compromising the quality

or cost of citrus fruit to the consumer. The objective of the present work was to evaluate the effectiveness of a range of low-toxicity chemicals, mostly common food preservatives or additives, for the control of citrus green and blue moulds of oranges and lemons. A preliminary selection of chemicals was performed by testing their effectiveness at different concentrations in primary *in vivo* screenings. Selected compounds and mixtures were tested as heated solutions in small-scale trials.

## Experimental methods

**Fruit.** Oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), cvs. Washington Navel, Navelate, and Valencia, from commercial orchards in southern Tarragona (Catalonia, Spain) or the San Joaquin Valley (California, USA), and lemons (*Citrus limon* (L.) Burm.) cv. Eureka, from the San Joaquin Valley, were selected from field bins after harvest and used in the experiments before any commercial postharvest treatments were applied. The fruit were used the same day, or stored up to 2 weeks at 5°C and 90% relative humidity (RH) before use. Before each experiment, fruit were randomised, washed with fresh water, disinfected superficially for 1 min in a diluted bleach dip (5 g litre<sup>-1</sup> sodium hypochlorite), rinsed with water, and allowed to air-dry at room temperature.

***In vivo* primary screenings.** Forty chemicals, mostly common food preservatives or additives allowed by European and North American regulations,<sup>26,27</sup> were tested at least at three concentrations of active ingredient (a.i.) (Table 1). All were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MA, USA). A sterile mother solution of each chemical was prepared by filtering the solution through a 0.22 µm membrane filter. Sterile solutions at the desired concentrations were prepared by diluting with sterile water.

Petri dishes of potato dextrose agar (PDA) were inoculated with *P. digitatum* isolate PDM-1 or *P. italicum* isolate PIM-7 and incubated at 25°C for 7 to 10 days. Conidial suspensions were prepared in Tween 80 (0.5 g litre<sup>-1</sup>) in water and diluted to 10<sup>6</sup> conidia per millilitre after counting spores with a hemacytometer. This density is recommended for evaluation of postharvest treatments to control green and blue moulds.<sup>28</sup> Twenty-five microlitres of conidial suspension of *P. digitatum* or *P. italicum* were placed, using a micropipet, in a 1 mm wide, 5 mm long, 2 mm deep wound made with a stainless steel scalpel on the equator of Tarragona-grown Washington Navel, Navelate, or Valencia oranges. The wound penetrated the albedo tissue, but not the juice sacs, and simulated frequent infection under commercial conditions.

About 2 h later, oranges were inoculated in the pathogen inoculation site with 50 µl of the chemical solution at the desired concentration. Control fruit were inoculated with

50 µl of sterile distilled water. Treated fruit were stored at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $90 \pm 5\%$  RH for 7 days, at which time decayed fruit were counted. For each combination of chemical, concentration, and pathogen, four replicates of two oranges each were used. Each test was repeated at least once.

**Table 1.** Chemicals and concentrations tested against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* in *in vivo* laboratory screenings with Washington Navel, Navelate, or Valencia oranges.

Chemical	Formula	pH <sup>a</sup>	Tested concentrations (g litre <sup>-1</sup> a.i.) <sup>b</sup>
<i>Mineral salts</i>			
Sodium chloride	NaCl	6.6	0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 8.0, 10.0, 12.0, 15.0, 20.0
Potassium chloride	KCl	6.7	0.5, 2.5, 5.0
Calcium chloride	CaCl <sub>2</sub>	6.9	0.5, 2.5, 5.0, 10.0
Magnesium chloride	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	6.6	0.5, 1.0, 2.5, 5.0
Ammonium chloride	NH <sub>4</sub> Cl	6.3	0.5, 2.5, 5.0
Sodium phosphate, dibasic	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.1	0.5, 2.5, 5.0, 25.0, 50.0
Sodium phosphate, monobasic	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4.4	5.0, 25.0, 50.0
Potassium phosphate, dibasic	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.0	5.0, 25.0, 50.0
Potassium phosphate, monobasic	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.5	5.0, 25.0, 50.0
Potassium phosphate, dibasic	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.2	5.0, 25.0, 50.0
Ammonium phosphate, monobasic	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.4	5.0, 25.0, 50.0

**Table 1.** Continued

Chemical	Formula	pH <sup>a</sup>	Tested concentrations (g litre <sup>-1</sup> a.i.) <sup>b</sup>
<i>Mineral salts</i>			
Sodium molybdate	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	8.1	0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 50.0
Ammonium molybdate <sup>c</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4.9 <sup>d</sup>	0.058, 0.116, 0.291, 0.582, 0.873, 1.164, 1.746, 2.328, 2.910,

5.820

*Organic acids and salts*

Sodium formate	HCOONa	7.1	0.5, 1.0, 2.5, 5.0
Potassium formate	HCOOK	7.1	0.5, 1.0, 2.5, 5.0
Calcium formate	(HCOO) <sub>2</sub> Ca	6.9	0.5, 1.0, 2.5, 5.0
Sodium acetate	CH <sub>3</sub> COONa·4H <sub>2</sub> O	8.1	0.5, 0.8, 1.0, 2.5, 5.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, 16.0, 18.0, 20.0, 22.0, 25.0, 50.0
Sodium diacetate	(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> HNa	5.2	0.5, 2.5, 5.0
Potassium acetate	CH <sub>3</sub> COOK	7.7	0.5, 0.8, 1.0, 2.5, 5.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, 16.0, 18.0, 20.0, 22.0, 25.0, 50.0
Calcium acetate	(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Ca·H <sub>2</sub> O	7.5	0.5, 1.0, 2.5, 5.0
Sodium propionate	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> Na	7.8	0.5, 2.5, 5.0
Calcium propionate	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> Ca	7.9	0.5, 2.5, 5.0
Sorbic acid	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	3.3	0.5, 2.5, 5.0
Potassium sorbate	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> K	7.8	0.5, 1.0, 2.5, 5.0
Sodium benzoate	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> Na	7.6	0.5, 2.5, 5.0
Potassium benzoate	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> K	7.7	0.5, 2.5, 5.0
Citric acid	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	2.6	0.5, 2.5, 5.0
Sodium citrate	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>3</sub> ·2H <sub>2</sub> O	8.0	0.5, 2.5, 5.0
Potassium citrate	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> K <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O	8.2	0.5, 2.5, 5.0

**Table 1.** Continued

Chemical	Formula	pH <sup>a</sup>	Tested concentrations (g litre <sup>-1</sup> a.i.) <sup>b</sup>
<i>Organic acids and salts</i>			
Calcium citrate	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> Ca <sub>3</sub> ·4H <sub>2</sub> O	6.1	0.5, 2.5, 5.0
Sodium lactate	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>3</sub>	7.2	0.5, 2.5, 5.0
Calcium lactate	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> Ca·5H <sub>2</sub> O	7.1	0.5, 2.5, 5.0
L-Tartaric acid	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	2.7	0.5, 2.5, 5.0

Potassium L-tartrate	$C_4H_4O_6K_2 \cdot 1/2H_2O$	7.2	0.5, 2.5, 5.0
L-ascorbic acid	$C_6H_8O_6$	3.1	0.5, 2.5, 5.0
Sodium L-ascorbate	$C_6H_7O_6Na$	7.3	0.5, 2.5, 5.0
<i>Other compounds</i>			
Sodium hydroxide	NaOH	12.8	0.5, 2.5, 5.0
Calcium hydroxide	$Ca(OH)_2$	12.2	0.5, 2.5, 5.0
L-glutamic acid	$C_5H_9NO_4$	3.5	0.5, 2.5, 5.0
Sodium L-glutamate	$C_5H_8NNaO_4 \cdot H_2O$	6.8	0.5, 2.5, 5.0

<sup>a</sup> pH at 20°C for a concentration of 2.5 g litre<sup>-1</sup> a.i.

<sup>b</sup> Each concentration of each chemical was tested against each fungus at least in two screenings of four replicates of 2 fruit each.

<sup>c</sup> Ammonium molybdate solutions were prepared in mM a.i. Tested concentrations were: 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, and 5.00 mM.

<sup>d</sup> pH for a concentration of 0.291 g litre<sup>-1</sup> a.i. ammonium molybdate.

**Small-scale trials.** Compounds selected according to the results of the *in vivo* primary screenings were assayed in small-scale trials.

(i) *Equimolar solutions of organic acid salts and mixtures.* *P. digitatum* isolate M6R (obtained from J. W. Eckert, University of California, Riverside) was cultured on PDA at 25°C for 7 to 14 days. Spores were rubbed from the agar surface with a sterile glass rod after 5 ml of 0.5 g litre<sup>-1</sup> Triton X-100 in water were added. The spore suspension was passed through two layers of cheesecloth and diluted with water to an absorbance of 0.1 at 420 nm determined with a spectrophotometer. This density is approximately equivalent to 10<sup>6</sup> spores per millilitre.<sup>29</sup> California-grown Valencia oranges or Eureka lemons were inoculated by immersing a stainless steel rod with a probe tip 1 mm wide and 2 mm in length into the spore suspension and wounding each fruit once on the equator.

The inoculated fruit were held at room temperature (20 ± 2°C) for about 24 h, at which time were placed into plastic baskets and immersed for 120 s in warm solutions (40.6 ± 0.5°C) at the natural pH of 0.2 M organic acid salt solutions or 0.1+0.1 M mixtures of two organic acid salts. Immersion in 30 g litre<sup>-1</sup> sodium carbonate or 8.5 g litre<sup>-1</sup> calcium polysulphide (30 g litre<sup>-1</sup> lime sulphur) solutions at 40.6°C were also performed; the efficacy of these compounds against *P. digitatum* or *P. italicum* has been established.<sup>6,7,25</sup> The treatment equipment consisted of twelve 22-litre stainless steel tanks, each one individually fitted with a computer-controlled electrical heater, a

temperature sensor, and a mechanical agitation system. Control fruit were inoculated but untreated. After treatment, fruit were rinsed with 10 ml of deionized water per fruit at low pressure (200 kPa) in a spray 30 cm above the fruit for 5 s, placed in plastic cavity trays in wooden trays, and stored at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $90 \pm 5\%$  RH. After 7 days of storage, the incidence of green mould was recorded. Two different tests were performed. In the first test, twelve previously selected organic acid salts or mixtures were assayed on oranges (each treatment was applied to four replicates of 30 fruit each) and lemons (five replicates of 25 fruit each). Based on the results of this test, six compounds or mixtures were selected and tested again in a second test (five replicates of 25 fruit each) on both oranges and lemons.

(ii) *Sodium and ammonium molybdates*. Sodium molybdate at 0, 12.1, and 24.2 mM ( $= 0, 2.5, \text{ and } 5.0 \text{ g litre}^{-1}$ ) and ammonium molybdate at 0, 0.5, and 1.0 mM were tested at 20, 48, and  $53^\circ\text{C}$  ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) for the control of green and blue moulds. These concentrations were selected based on results from the primary screenings. Three stainless steel buckets each holding 24 litres of sodium or ammonium molybdate solutions at the desired concentration were heated to the test temperature in a 172-litre stainless steel water tank fitted with a 9-kW electric resistance heater and thermostat. Tarragona-grown Valencia oranges were inoculated with *P. digitatum* or *P. italicum* with a micropipet as described for the primary screenings and, 2 to 3 h later, were placed in metallic grid baskets and submerged in the buckets for 150 s. Fruit inoculated with each pathogen was treated separately. Treated fruit were placed in plastic holders on corrugated cartons, allowed to air-dry at room temperature, and stored at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $90 \pm 5\%$  RH. Decay incidence was recorded after 7 and 14 days of storage. Each treatment was applied to four replicates of 10 fruits each. Each combination of pathogen, salt, concentration, and temperature was assayed twice.

**Statistical analysis.** Depending on the experiment, one-, two-, or three-way analyses of variance were applied to the arcsine of the square root of the proportion of decayed fruit using SAS software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). When appropriate, means were separated by Fischer's Protected Least Significant Difference test (LSD,  $P = 0.05$ ).

## Results

*In vivo* primary screenings. Among the chemicals tested in this set of experiments (Table 1), only the following compounds reduced green or blue mould by more than 50% compared to the control treatments: calcium lactate, sodium lactate, sodium propionate, sodium acetate, potassium acetate, sodium benzoate, potassium

benzoate, potassium sorbate, sodium molybdate, and ammonium molybdate (data not shown).

With the exception of dibasic sodium phosphate, phosphates at concentrations from 5.0 to 50.0 g litre<sup>-1</sup> favoured the development of the pathogens. Decay incidence on oranges treated with dibasic sodium phosphate was not different than on control fruit. In order to determine the more suitable concentrations to be tested in the small-scale trials, most of these compounds were repeatedly assayed at different concentrations. Phytotoxicity (dark greenish blemishes on the rind area surrounding the inoculation site) was noticed on fruit treated with concentrations of sodium molybdate higher than 24.2 mM (5.0 g litre<sup>-1</sup>). Ammonium molybdate was phytotoxic at very low concentrations (1.5 mM or higher). The highest nonphytotoxic concentrations of these compounds were assayed in the small-scale trials.

**Small-scale trials.** (i) *Equimolar solutions of organic acid salts and mixtures.* In the first test with selected organic acid salts and mixtures, the incidence of green mould (means of the tests with oranges and lemons) was significantly lower on fruit treated with potassium benzoate, sodium benzoate, potassium sorbate, potassium sorbate + sodium propionate, potassium sorbate + sodium acetate, and potassium sorbate + sodium benzoate. These compounds or mixtures reduced green mould incidence by more than 75% and their effectiveness was similar to that of sodium carbonate or calcium polysulphide (data not shown). A second test with these selected salts and mixtures was performed with both oranges and lemons. In a three-way analysis of variance of data from both tests, significant differences in decay incidence were found among treatments; the effect of the treatment was dependent on the fruit specie (Table 2). Joint results from both tests (Table 3) showed that, in general, organic acid salts and mixtures controlled green mould more effectively on lemons than on oranges. While no significant differences among treatments were observed on lemons (about 15 to 25% decay incidence), sodium benzoate, potassium sorbate, and the mixtures (20 to 30% decay incidence) were superior to potassium benzoate (about 46% decay incidence) on oranges. On oranges, further, the mixtures potassium sorbate + sodium propionate and potassium sorbate + sodium acetate were as effective as sodium carbonate and superior to calcium polysulphide (Table 3). No visible rind injury occurred in any test.

(ii) *Sodium and ammonium molybdates.* The combined effect of concentration and temperature of solutions of sodium molybdate or ammonium molybdate were evaluated on Valencia oranges. For both compounds, the influence of temperature was greater than that of concentration. When compared to the control treatment (water alone, concentration = 0), solutions at 20°C of sodium molybdate at nonphytotoxic concentrations effectively controlled blue mould, but not green mould, after 7 days of

storage at 20°C (Fig. 1). Both diseases were significantly controlled by sodium molybdate applied at 48°C. At 53°C, water alone was as effective as sodium molybdate solutions. After 7 days of storage at 20°C, no significant differences were observed between sodium molybdate concentrations of 12.1 and 24.2 mM at every temperature (Fig. 1).

**Table 2.** Analysis of variance of the incidence of green mould on artificially inoculated Valencia oranges and Eureka lemons

Source <sup>a</sup>	df	MS	F	P > F
Experiment (E)	1	157.756	3.91	0.0500
Fruit (F)	1	929.172	23.05	<0.0001
Treatment (T)	8	7609.930	188.80	<0.0001
E x F	1	14.681	0.36	0.5472
E x T	8	65.660	1.63	0.1223
F x T	8	202.142	5.02	<0.0001
E x F x T	7	235.233	5.84	<0.0001
Error	143	40.307		

<sup>a</sup> Analysis was applied to the arcsine of the square root of the proportion of decayed fruit.

**Table 3.** Green mould incidence on artificially inoculated Valencia oranges and Eureka lemons immersed for 120 s in solutions of equimolar organic acids or mixtures at 40.6°C and at natural pH, rinsed with 10 ml of deionized water per fruit, and stored for 7 days at 20°C

Treatment	a.i. conc. (M)	PH (at 20°C )	Green mould incidence (%) <sup>a</sup>	
			Oranges	Lemons
Control	NA <sup>b</sup>	NA	99.1 a	100.0 a
K benzoate	0.2	7.6	45.7 b	17.2 b
Na benzoate	0.2	7.7	29.1 cd	18.4 b
K sorbate	0.2	7.9	28.6 cde	22.0 b
K sorbate+Na benzoate	0.1+0.1	8.3	27.2 cde	19.2 b
K sorbate+Na propionate	0.1+0.1	8.3	22.0 de	24.8 b
K sorbate+Na acetate	0.1+0.1	7.0	20.9 de	16.4 b
Na carbonate	0.28	11.3	19.8 e	22.4 b
Ca polysulphide	8.5 <sup>c</sup>	10.6	33.8 c	19.6 b

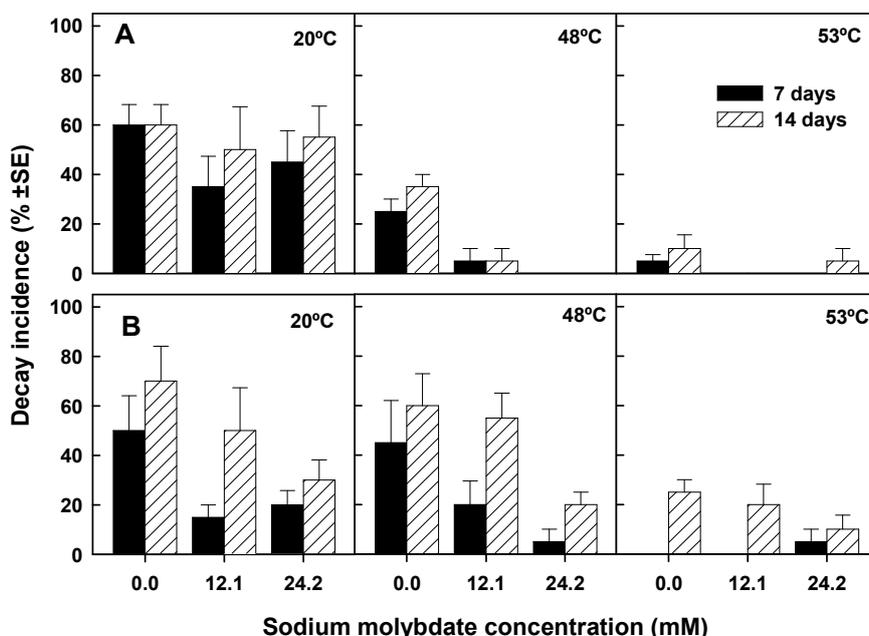
<sup>a</sup> Values within columns followed by unlike letters are different by Fisher's Protected LSD test ( $P = 0.05$ ) applied after an analysis of variance of the arcsine of the square root of the proportion of decayed fruit. Non-transformed data are shown. For oranges, values are the means of two experiments, one with four replicates of 30 fruit each and the other with five replicates of 25 fruit each; for lemons, values are the means of two experiments with five replicates of 25 fruits each.

<sup>b</sup> NA = not applicable.

<sup>c</sup> Active ingredient concentration (g litre<sup>-1</sup>) in a 30 g litre<sup>-1</sup> lime sulphur solution.

When compared to the control treatment (water alone, concentration = 0), nonphytotoxic concentrations of ammonium molybdate significantly controlled green mould only at 48°C (with concentrations of 0.5 and 1.0 mM ammonium molybdate, green mould incidence was 10 and 0%, respectively, after 7 days of storage at 20°C; Fig. 2A). Blue mould was significantly controlled only by a 1.0 mM solution of ammonium molybdate at 48°C (Fig. 2B). At 53°C, sodium molybdate did not enhance the effectiveness of hot water. Water alone at 53°C reduced the incidence of both green and blue moulds by more than 95% (Fig. 2).

In every test, decay incidence after 14 days of storage was higher than after 7 days (Fig. 1, 2). No visible rind injuries were caused by any treatment.

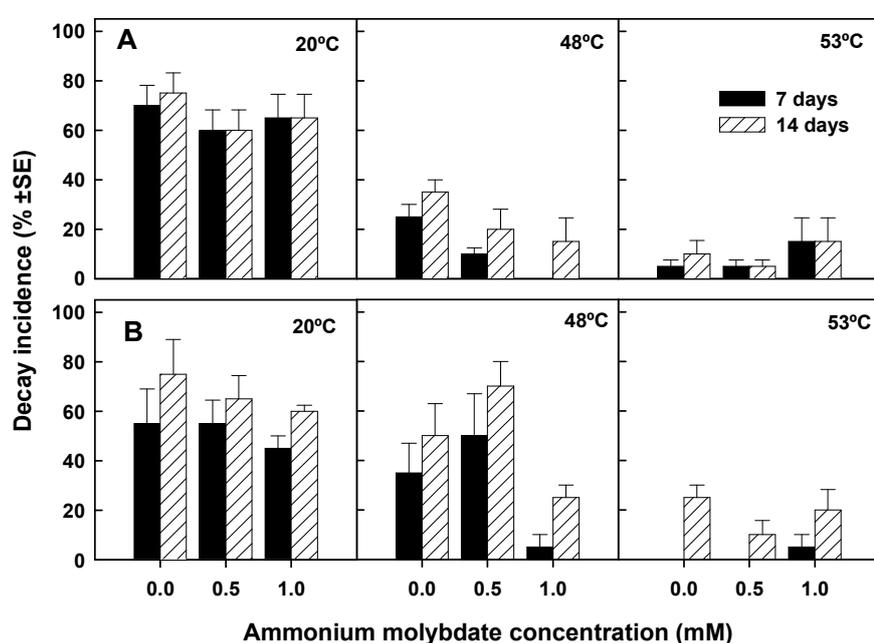


**Fig. 1.** Incidence of green (A) and blue (B) moulds on artificially inoculated Valencia oranges immersed for 150 s in sodium molybdate solutions at 20, 48, or 53°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) and stored at 20°C and 90% RH for 7 or 14 days. Values are the means of two experiments. Each treatment was applied to four replicates of 10 oranges each.

## Discussion and conclusions

Most of the chemicals tested during the selection process showed no *in vivo* inhibitory activity against either green or blue mould. Some compounds, such as most of the phosphates, even increased decay incidence among artificially inoculated oranges. Presumably, these chemicals provided additional nutrients and/or enhanced environmental conditions for the development of the pathogens. The most effective treatments in reducing both green and blue moulds were organic acid salts and their mixtures and sodium and ammonium molybdates. Improved effectiveness of chemical treatments to control citrus postharvest decay (synthetic fungicides as well as alternative

chemicals) by heating the solutions as compared to solutions at room temperature has been repeatedly reported.<sup>7,15,25,30,31</sup> We chose temperatures ranging from 40 to 53°C because synergistic effects between these temperatures and alternative chemicals such as sodium carbonate or lime sulphur had been previously observed; lower temperatures did not contribute to control ability and heat was phytotoxic at higher temperatures.<sup>1,6,7,25</sup>



**Fig. 2.** Incidence of green (A) and blue (B) moulds on artificially inoculated Valencia oranges immersed for 150 s in ammonium molybdate solutions at 20, 48, or 53°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) and stored at 20°C and 90% RH for 7 or 14 days. Values are the means of two experiments. Each treatment was applied to four replicates of 10 oranges each.

In this work, the treatments with organic acid salts and mixtures were, in general, comparatively more effective in controlling green mould on lemons than on oranges. The reason was not a difference in fruit susceptibility to green mould because decay incidence among untreated control fruit was, in every test, high and similar among

oranges and lemons. Disease development is a result of complex interactions between host, pathogen, and environment. The inhibitory ability of the salts depends on the presence of residues within the wound infection courts occupied by the fungus and on interactions between this residue and constituents of the rind. Apparently, the nature of such interactions would be different in oranges and lemons as a consequence of different albedo characteristics or presence of different constituents in the rind (for instance, the pH of the albedo is lower in lemons than in oranges). We observed in other work that the effectiveness of hot water, sodium carbonate and sodium bicarbonate against green and blue moulds was lower on mandarins than on oranges (Palou L, unpublished). Furthermore, these interactions presumably alter the original toxicity of the salts to the pathogen and, therefore, their control ability cannot be predicted by their activity *in vitro*. In experiments with carbonates, notable differences were detected between results of *in vitro* and *in vivo* tests.<sup>6,32</sup> Wisniewski *et al.*<sup>21</sup> found no correlation between the inhibitory activities *in vitro* and *in vivo* of different compounds tested against *P. digitatum* and *Botrytis cinerea*. For these reasons, our primary screenings were performed *in vivo* and we did not preliminarily assess the toxicity *in vitro* of the substances.

Sodium benzoate, potassium sorbate, and its mixtures were the most effective of the tested organic acid salts. These compounds are common processed food preservatives with a broad-spectrum activity against moulds and yeasts that are generally considered safe and accepted worldwide for use in foods. The use of potassium sorbate to control citrus postharvest decay was first described by Smoot and McCornack in 1978.<sup>13</sup> Solutions at 20 g litre<sup>-1</sup> were claimed to be effective in controlling benzimidazole-resistant strains of *P. digitatum* when used alone<sup>13</sup> or in combination with the synthetic fungicide thiabendazole.<sup>33</sup> However, Wild<sup>34</sup> reported no benefit from the use of such mixture and observed that potassium sorbate was only 20% as effective as the fungicide sodium ortho-phenyl-phenate in reducing green mould. This author observed that the control ability of potassium sorbate was increased by heating the solution to temperatures higher than 40°C. Hall<sup>14</sup> reported similar effectiveness for potassium sorbate, sodium benzoate and sodium propionate in controlling green mould of oranges. In our tests, sodium propionate was inferior to the other two salts. Potassium sorbate at 0.15 and 0.20 g litre<sup>-1</sup> prevented the growth in PDA medium of *P. digitatum* and *P. italicum*, respectively.<sup>35</sup> Potassium sorbate at 20 g litre<sup>-1</sup> heated to 50°C effectively controlled sour rot, caused by *Geotrichum citri-aurantii*, on lemons.<sup>36</sup> In general, although potassium sorbate treatments have not been widely adopted for use by the citrus industry because more effective postharvest treatments are still available, their value to control benzimidazole-resistant strains of *Penicillium* has been

demonstrated.<sup>1,37</sup> In our experiments, although their effectiveness was usually slightly higher, the mixtures did not provide a significant benefit compared to potassium sorbate or sodium benzoate alone. When the incubation period of treated fruit was prolonged to 14 days at 20°C, we recorded an increase of decay incidence compared to 7 days (data not shown). Therefore, the effects *in vivo* of potassium sorbate, sodium benzoate, mixtures and, in general, all organic acid salts were not fungicide but primarily fungistatic and not very persistent. This response is similar to the hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate treatment.<sup>6,25</sup> The effectiveness of organic acids is pH dependent because the undissociated form of the acid is primarily responsible for the antimicrobial activity.<sup>38</sup> Therefore, the pK<sub>a</sub> of the acid and the pH of the environment where it resides are important. The pH of albedo tissue, where infections by *P. digitatum* and *P. italicum* begin, is 5 to 5.5 on oranges and lemons, and most organic acid salts are effectively inhibitory at this pH and lower. The pK<sub>a</sub> of potassium sorbate and sodium benzoate are 4.8 and 4.2, respectively. We presume, once the near neutral pH solutions of the salts were applied, they became more active within the relatively low pH of the wounds in the albedo tissue.

Among the inorganic salts we tested, only sodium and ammonium molybdates controlled green and blue moulds effectively. Both chemicals are fertilizers that have been used as sources of molybdenum for foliar or soil applications.<sup>39</sup> Moreover, sodium molybdate has a role on the microbial fixation of nitrogen and its application improved the yield of leguminous crops.<sup>40</sup> In contrast to sodium molybdate, some inhibitory activity of ammonium molybdate against pathogenic fungi has been reported.<sup>41</sup> Ammonium molybdate was effective at considerably lower concentrations than sodium molybdate, although it was also phytotoxic at lower concentrations. In other work,<sup>42</sup> our group found that 5 mM solutions of ammonium molybdate at room temperature were effective in controlling postharvest decay caused on apple by the pathogens *Penicillium expansum*, *B. cinerea*, and *Rhizopus stolonifer*. When combined, this compound improved the efficacy of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 against these fungi.<sup>43</sup> Furthermore, it also inhibited the *in vitro* spore germination of *P. expansum* and *B. cinerea* more effectively than sodium molybdate or other molybdenum salts. An interference with the metabolic processes of phosphorylation/dephosphorylation by inhibiting the enzymatic activity of acid phosphatases has been suggested as a possible mechanism of action.<sup>42</sup> In our primary screenings, such concentration of 5 mM ammonium molybdate completely controlled both green or blue moulds on all cultivars of oranges tested, but this concentration injured and stained the rind. In the small-scale trials, we did not obtain satisfactory control of green or blue moulds with 1 mM solutions of ammonium molybdate at room temperature but we did with solutions

heated to 48°C. The feasibility of ammonium molybdate as a preservative for fresh fruit was supported by studies quantifying its acute oral toxicity performed by the Centre d'Investigació i Desenvolupament Aplicat (Barcelona, Catalonia, Spain). Its LD<sub>50</sub> is 1,714.3 mg per kg of live weight of Sprague Dawley rat; at this concentration no mortality or alterations in tested animals were observed (data not shown).

In conclusion, potassium sorbate, sodium benzoate, and ammonium molybdate were, among the wide range of chemicals tested, the most promising compounds to control postharvest *Penicillium* decay of citrus fruit. Thus, they are two more alternatives to be included in a decay control program when synthetic fungicides will be definitively prohibited. Future investigations should focus on their compatibility with other alternative physical or biological methods.

## Acknowledgements

We thank the Catalan Government (CIRIT, Comissió Interdepartamental de Recerca i Tecnologia), the Grup Exportador de Cítrics del Baix Ebre-Montsià (Tarragona, Catalonia, Spain), and the California Citrus Research Board for their financial support.

## References

- 1 Eckert JW and Eaks IL, Postharvest disorders and diseases of citrus fruits, in The Citrus Industry Vol 5, ed by Reuter W, Calavan EC and Carman GE, Univ. of California Press, Berkeley, CA, USA, pp 179-260 (1989).
- 2 Whiteside JO, Garnsey SM and Timmer LW, Eds, Compendium of Citrus Diseases, 2nd ed, APS Press, St Paul, MN, USA (1993).
- 3 National Research Council, Pesticides in the Diets of Infants and Children, National Academy Press, Washington DC, USA (1993).
- 4 Eckert JW, Impact of fungicide resistance on citrus fruit decay control, in Managing Resistance to Agrochemicals, ed by Green MB, Le Baron HM and Moberg WK, ACS Symp Ser 421:286-302 (1990).
- 5 Holmes GJ and Eckert JW, Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* 89:716-721 (1999).
- 6 Smilanick JL, Margosan DA, Mlikota F, Usall J and Michael IF, Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Dis* 83:139-145 (1999).
- 7 Smilanick JL and Sorenson D, Control of postharvest decay of citrus fruit with calcium polysulphide. *Postharvest Biol Technol* 21:157-168 (2001).

- 8 Eckert JW, Past and present in the post-harvest treatment of citrus fruits to control decay during storage and marketing, in Proc Int Symp Post-harvest Treatment of Citrus Fruits to Control Decay during Storage and Marketing, October 13, Acireale, Italy, pp 129-135 (1997).
- 9 Ferguson IB, Ben-Yehoshua S, Mitcham EJ, McDonald RE and Lurie S, Postharvest heat treatments: introduction and workshop summary. Postharvest Biol Technol 21:1-6 (2000).
- 10 Chalutz E, Droby S, Wilson CL and Wisniewski ME, UV-induced resistance to postharvest diseases of citrus fruit. J Phytochem Photobiol 15:367-374 (1992).
- 11 Schirra M, D'Hallewin G, Ben-Yehoshua S and Fallik E, Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. Postharvest Biol Technol 21:71-85 (2000).
- 12 Droby S, Porat R, Vinocur V, Cohen L, Weiss B and Daus A, Induction of resistance to *Penicillium* decay in citrus fruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. Proc Int Symp Postharvest 2000, March 26-31, Jerusalem, Israel (In press).
- 13 Smoot JJ and McCornack AA, The use of potassium sorbate for citrus decay control. Proc Fla State Hort Soc 91:119-122 (1978).
- 14 Hall DJ, Comparative activity of selected food preservatives as citrus postharvest fungicides. Proc Fla State Hort Soc 101:184-187 (1988).
- 15 Smilanick JL, Margosan DA and Henson DJ, Evaluation of heated solutions of sulphur dioxide, ethanol, and hydrogen peroxide to control postharvest green mold of lemons. Plant Dis 79:742-747 (1995).
- 16 Brown GE and Baraka MA, Effect of washing sequence and heated solutions to degreened Hamlin oranges on *Diplodia* stem-end rot, fruit colour and phytotoxicity. Proc Int Soc Citriculture 2:1164-1170 (1996).
- 17 Wilson CL, Solar JM, El-Ghaouth A and Wisniewski ME, Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Dis 81:204-210 (1997).
- 18 Bompeix G and Cholodowski-Faivre D, Fungicides and natural plant products combined with hot dip treatments in water, in Proc Int Symp Post-harvest Treatment of Citrus Fruits to Control Decay during Storage and Marketing, October 13, Acireale, Italy, pp 153-164 (1997).
- 19 Droby S, Wisniewski ME, Cohen L, Weiss B, Touitou D, Eilam Y, Chalutz E, Influence of CaCl<sub>2</sub> on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. Phytopathology 87:310-315 (1997).
- 20 Sholberg PL, Fumigation of fruit with short-chain organic acids to reduce the potential of postharvest decay. Plant Dis 82:689-693 (1998).
- 21 Wisniewski ME, Droby S, El-Ghaouth A and Wilson CL, The use of food additives to control postharvest decay and enhance biocontrol activity of yeast antagonists, in Proc Int Congress Plant Pathol, August 9-16, Edinburgh, Scotland, Abstract 5.2.61 (1998).
- 22 Droby S, Porat R, Cohen L, Weiss B, Shapiro B, Philosoph-Hadas S and Meir S, Suppressing green mold decay in grapefruit with postharvest jasmonate application. J Amer Soc Hort Sci 124:184-188 (1999).

- 23 El-Ghaouth A, Smilanick JL and Wilson CL, Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. *Postharvest Biol Technol* 19:103-110 (2000).
- 24 El-Ghaouth A, Smilanick JL and Wilson CL, Wisniewski M and Wilson CL, Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. *Plant Dis* 84:249-253 (2000).
- 25 Palou L, Smilanick JL, Usall J and Viñas I, Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. *Plant Dis* 85:371-376 (2001).
- 26 EPCD, European Parliament and Council Directive (95/2/EC), Food Additives other than Colours and Sweeteners, 20 February 1995, OJ L61, 18.03.1995, pp 1 (1995).
- 27 EAFUS, "Everything" Added to Food in the United States: a Food Additive Database, On-line, US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/eafus.html> (2001).
- 28 Eckert JW and Brown GE, Evaluation of postharvest treatments for citrus fruits, in *Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens*, ed by Hickey KD, APS Press, St Paul, MN, USA, pp 92-97 (1986).
- 29 Morris SC and Nicholls PJ, An evaluation of optical density to estimate fungal spore concentrations in water suspensions. *Phytopathology* 68:1240-1242 (1978).
- 30 Barkai-Golan R and Apelbaum A, Synergistic effects of heat and sodium o-phenyl phenate treatments to inactivate *Penicillium* spores and suppress decay in citrus fruits. *Trop Sci* 31:229-233 (1991).
- 31 Schirra M and Mulas M, Improving storability of "Tarocco" oranges by postharvest hot-dip fungicide treatments. *Postharvest Biol Technol* 6: 129-138 (1995).
- 32 Hwang L, Klotz LJ, The toxic effect of certain chemical solutions on spores of *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. *Hilgardia* 12:1-38 (1938).
- 33 Nelson PM, Wheeler RW and McDonald PD, Potassium sorbate in combination with benzimidazoles reduces resistant *Penicillium digitatum* decay in citrus. *Proc Int Soc Citriculture* 2:820-823 (1983).
- 34 Wild BL, Fungicidal activity of potassium sorbate against *Penicillium digitatum* as affected by thiabendazole and dip temperature. *Scientia Hort* 32:41-47 (1987).
- 35 Matamoros-León B, Argañiz A and López-Malo A, Individual and combined effects of vanillin and potassium sorbate on *Penicillium digitatum*, *Penicillium glabrum*, and *Penicillium italicum* growth. *J Food Prot* 62:540-542 (1999).
- 36 Kitagawa H and Kawada K, Effect of sorbic acid and potassium sorbate on the control of sour rot of citrus fruits. *Proc Fla State Hort Soc* 97:133-135 (1984).
- 37 Bancroft MN, Gardner PD, Eckert JW and Baritelle JL, Comparison of decay strategies in California lemon packinghouses. *Plant Dis* 68:24-28 (1984).
- 38 Davidson PM, Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds, in *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, ed by Doyle MP, Beuchat LR and Montville TJ, ASM Press, Washington DC, USA, pp 520-556 (1997).

- 39 Mondy NI and Munshi CB, Effect of soil and foliar application of molybdenum on the lycoalkaloid and nitrate concentration of potatoes. J Agric Food Chem 41:256-258 (1993).
- 40 Ranganayaki S and Mohan C, Effect of sodium molybdate on microbial fixation of nitrogen by *Azotobacter chroococcum*. Z Allg Mikrobiol 21:607-610 (1981).
- 41 Singh RS and Khanna RN, Effect of certain inorganic chemicals on growth and spore germination of *Alternaria tenuis* Auct., the fungus causing core rot of mandarin oranges in India. Mycopath Mycol Appl 37:89-96 (1969).
- 42 Nunes C, Usall J, Teixidó N, Ochoa de Eribe X and Viñas I, Control of postharvest decay of apples by preharvest and postharvest application of ammonium molybdate. Pest Manag Sci (In press).
- 43 Nunes C, Usall J, Teixidó N and Viñas I, Improvement of *Candida sake* biocontrol activity against postharvest decay by the addition of ammonium molybdate. J Appl Microbiol (In press).

# Capítol 6

---

## Effect of Gaseous Ozone Exposure on the Development of Green and Blue Molds on Cold Stored Citrus Fruit

L. Palou<sup>1</sup>, J.L. Smilanick<sup>2</sup>, C.H. Crisosto<sup>1</sup>, M. Mansour<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Dept. of Pomology, University of California, Davis. Kearney Agricultural Center, Parlier, CA*

<sup>2</sup>*Horticultural Crops Research Laboratory, USDA-ARS, Fresno, CA*

<sup>3</sup>*College of Agriculture, Menofiya University, Shebin El-Kom, Egypt*

**Referència:** *Plant Dis.* 85: 632-638 (2001).

---



## Abstract

The effects of gaseous ozone exposure on in vitro growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* and development of postharvest green and blue molds on artificially inoculated citrus fruit were evaluated. Valencia oranges were continuously exposed to  $0.3 \pm 0.05$  ppm (vol/vol) ozone at 5°C for 4 weeks. Eureka lemons were exposed to an intermittent day-night ozone cycle ( $0.3 \pm 0.01$  ppm ozone only at night) in a commercial cold storage room at 4.5°C for 9 weeks. Both oranges and lemons were continuously exposed to  $1.0 \pm 0.05$  ppm ozone at 10°C in an export container for 2 weeks. Exposure to ozone did not reduce final incidence of green or blue mold, although incidence of both diseases was delayed about 1 week and infections developed more slowly under ozone. Sporulation was prevented or reduced by gaseous ozone without noticeable ozone phytotoxicity to the fruit. A synergistic effect between ozone exposure and low temperature was observed for prevention of sporulation. The proliferation of spores of fungicide-resistant strains of these pathogens, which often develop during storage, may be delayed, presumably prolonging the useful life of postharvest fungicides. In vitro radial growth of *P. italicum*, but not of *P. digitatum*, during a 5-day incubation period at 20°C was significantly reduced by a previous  $0.3 \pm 0.05$  ppm ozone exposure at 5°C for 4 days. Inoculum density did not influence the effect of gaseous ozone on decay incidence or severity on oranges exposed to  $0.3 \pm 0.05$  ppm ozone at 20°C for 1 week. Susceptibility of oranges to decay was not affected by a previous continuous exposure to  $0.3 \pm 0.05$  ppm ozone at 20°C for 1 week. A corona discharge ozone generator was effective in abating ethylene in an empty export container.

**Additional keyword:** postharvest decay

## Introduction

Postharvest green mold, caused by *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., and postharvest blue mold, caused by *Penicillium italicum* Wehmer, are among the most economically important postharvest diseases of citrus worldwide (8). Blue mold is especially important on citrus fruit kept under cold storage for long time periods (30). In California, Valencia oranges for preparation of fresh juice are held at temperatures from 3 to 5°C. Currently, both diseases are mainly controlled by application of the fungicides imazalil, sodium ortho-phenyl phenate or thiabendazole (8). Alternative methods are needed because the widespread use of these chemicals in commercial

packinghouses has led to the proliferation of resistant strains of the pathogens (4,7). Furthermore, concerns about human health risks and the protection of the environment associated with fungicide residues (5,18) have increased the need for alternatives to fungicide usage.

In 1997, ozone, the triatomic form of oxygen ( $O_3$ ), was recognized as being generally safe (GRAS) for food contact applications in the United States (10,29). Since that time, interest in developing ozone applications in the food industry has increased, although some regulatory issues about ozone use for this purpose have not been resolved. Currently, a Food Additive Petition has been submitted to the US Food and Drug Administration (US-FDA) that would allow ozone to be used in food contact applications. The current Threshold Limit Value-Short Term Exposure Limit (TLV-STEL) established by the US Occupational Safety and Health Administration (US-OSHA) for ozone is 0.3 ppm. This is the level to which healthy individuals can be exposed for 15 min without suffering from irritation or other acute effects. Exposures at this level should not be repeated more than four times per day. Once citrus fruit are stored at low temperature, only a few brief tasks are needed to be done within the storage rooms so that workers do not exceed the US-OSHA TLV-STEL. However, concentrations could be higher in export containers, which can stay closed for longer periods of time. Other exposure designs include generation of ozone in day-night cycles to minimize workers' exposure to ozone (23).

Currently, ozone can be readily and economically generated on site. For the postharvest treatment of fresh fruit and vegetables, ozone can be used as a relatively brief prestorage or storage treatment in air or water, or as a continuous or intermittent atmosphere throughout the storage period. Both procedures have recently attracted considerable commercial interest, especially because of the lack of residues on the produce and the possibilities opened by the new regulations.

Effects of ozone in the air of storage rooms on fungal decay, and/or commodity storage potential and quality, have been examined for a variety of fruits and vegetables. There are numerous reports on both the benefits (3,16,17,23) and the lack of benefits (2,20,22,25,26) of ozone. However, early studies involving continuous ozone exposure as a storage treatment were probably conducted before efficient ozone generators and reliable means to control and measure ozone concentrations were available. In 1936, Klotz (15) reported that ozone was unsatisfactory for control of green and blue molds on artificially inoculated navel oranges. Hopkins and Loucks (13) reported in 1949 an increase in stem-end rot, green mold, and some fruit pitting on oranges subjected to high ozone concentrations for several minutes to 4 h. In 1968, Harding (11) concluded that storage of lemons and oranges under 1.0 ppm ozone effectively prevented

sporulation of green mold on infected fruit, and moderately reduced the incidence of green mold. Jin et al. (14) reported in 1989 that storage of Wenzhou mandarins under discharge products greatly delayed the process of senescence of fruit without damaging the fruit. Recently, García et al. (9) reported no differences in quality parameters between oranges stored at 5°C for 1 month in air or 0.1 ppm ozone.

The objectives of this work were to evaluate the effect of continuous gaseous ozone exposure at 0.3 or 1.0 ppm, or an intermittent exposure at 0.3 ppm (day-night cycle), on the development of *P. digitatum* and *P. italicum* in vitro and on artificially inoculated citrus fruit stored at low temperature. The ability of an ozone generator to abate ethylene levels (6) was also investigated.

## Materials and methods

**Fruit.** Oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), cv. Valencia, or lemons (*Citrus limon* (L.) Burm.) cv. Eureka, from commercial orchards in the San Joaquin Valley (California), were selected from field bins after harvest, randomized, and used in the experiments before any commercial postharvest treatments were applied.

**Inoculum.** *P. digitatum* isolate PDM-1 and *P. italicum* isolate PIM-7, were grown on PDA in petri dishes at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  for 7 to 10 days. Five milliliters of 0.05% (wt/vol) Triton X-100 in sterile water were added to each dish and spores were rubbed from the agar surface with a sterile glass rod. This high-density spore suspension was passed through two layers of cheesecloth, measured with a hemacytometer, and diluted with sterile water to achieve the desired inoculum density.

**Continuous exposure to 0.3 ppm ozone.** A 90-W corona discharge ozone generator (AgroCare™, Model Oxtomcav XEE-245, Agroquality International, LLC, Bridgewater, NJ) was installed in a 66.6 m<sup>3</sup> cold storage room and set to maintain  $0.3 \pm 0.05$  ppm (vol/vol) ozone at  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $90 \pm 5\%$  relative humidity (RH). The unit released ozone through a perforated 38.1-mm diameter polyvinyl chloride (PVC) tube anchored to the ceiling of the room. The ozone concentration in the room was controlled and continuously monitored by a UV absorption ozone analyzer (Model IN-2000-1, INUSA Inc., Needham, MA) with a minimum detection limit of 0.01 ppm. Air from the ozonated cold storage room was pumped through a Teflon tube to the analyzer, which was located in an adjacent room. As a control, similar environmental conditions of temperature and RH were set in an ambient air atmosphere cold storage room. Ozone levels in this control room were periodically assessed with either a heated metal oxide ozone sensor (Model 21-Z, Eco Sensors Inc., Santa Fe, NM), with a minimum detection limit of 0.02 ppm, or a gas sampling pump (Sensidyne Model 800,

Clearwater, FL) with detection tube no. 18L and a minimum detection limit of 0.025 ppm. No measurable ozone was detected by either method during the entire storage period. Temperature and RH were continuously monitored in both rooms during the experiments. The desired RH was maintained in both rooms by an air-assisted low-pressure RH system, equipped with a computer-controlled humidity transmitter (Model HMD20VB, Vaisala Inc., Helsinki, Finland).

(i) *In vitro mycelial growth.* High-density spore suspensions of *P. digitatum* and *P. italicum* were prepared as described above and poured into sterile Erlenmeyer flasks with 50 ml of PDA at 45°C. The agar medium containing spores was quickly poured into empty sterile petri dishes and allowed to solidify. Cylinders of medium (4.2 mm diameter) were cut with a sterile cork borer and each one placed on the agar surface in the center of a PDA petri dish. Six petri dishes per pathogen were prepared. Three partially open plates per pathogen (replicates) were held in both the ozone and the control rooms. After 4 days of exposure, the petri dishes from both rooms were covered with the lids and placed in an incubation chamber at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $90 \pm 5\%$  RH for an additional 5-day period. Colony diameter and presence of spores were recorded daily. The experiment was conducted twice. In the second experiment, five replicates per pathogen were used.

(ii) *Disease development.* Valencia oranges were inoculated with  $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$  of *P. digitatum* or *P. italicum* by briefly immersing a stainless steel rod with a probe tip (1 mm wide by 2 mm in length) into the spore suspension and wounding each fruit once on the equator. The wound penetrated the albedo tissue but not the juice sacs, simulating natural inoculation. Inoculated fruit were placed on plastic cavity trays on open wooden trays that assured adequate gas contact. About 24 h after inoculation, five trays (replicates) of 18 oranges each were stored for 4 weeks in the ozone room, and five trays in the control room. Disease incidence and severity (lesion diameter), as well as external disease appearance, were recorded weekly. The experiment was conducted twice.

(iii) *Inoculum density and fruit susceptibility.* Environmental conditions in both the ozone and the control rooms were maintained at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $90 \pm 5\%$  RH. Selected and randomized Valencia oranges were separated into two groups. Fruit in the first group were inoculated with  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$  of *P. digitatum* or *P. italicum*, as previously described. Fruit in the second group were not inoculated. For each treatment (combination of pathogen and inoculum density), half of fruit in each group were held for 7 days in the ozone room and half in the control room. Each treatment was applied to four trays (replicates) of 18 oranges each. Decay incidence and severity of inoculated fruit were recorded after 4 and 7 days of storage. After 7

days of storage, all fruit from both rooms were removed. In order to evaluate the possible effect of ozone exposure on the susceptibility of fruit to decay, fruit in the second group were then inoculated with  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$  of *P. digitatum* or *P. italicum* and incubated for 7 days in the control room. Green and blue molds incidence and severity were determined after 4 and 7 incubation days. The experiment was conducted twice.

**Intermittent exposure to 0.3 ppm ozone in a day-night cycle.** A concentration of  $0.3 \pm 0.01$  ppm ozone was generated at night in a  $226 \text{ m}^3$  commercial storage room. No ozone was generated during the day. The gas was generated with a water-cooled, corona discharge generator (Model CD-7, Del Industries, San Luis Obispo, CA) that produced  $7 \text{ g h}^{-1}$  of ozone at its maximum setting. The unit incorporated an oxygen concentration and air drier so the  $3.5\text{-liter min}^{-1}$  output was composed of about 2% ozone with the balance being oxygen. The generator, located in an adjacent nonozonated room, was operated with a timer on a 12 h cycle. Ozone concentration in the ozone room was continuously monitored with an UV ozone analyzer (Model LC-400, PCI Wedeco Environmental Technologies Inc., New York, NY) with a minimum detection limit of 0.001 ppm. This monitor was located in the same room as the generator. Air from the ozonated cold storage room was pumped through a Teflon™ tube to the analyzer. The ozonated commercial storage room was maintained at  $4.5 \pm 1^\circ\text{C}$  and high RH. Temperature was monitored with thermocouples connected to a data-logger. Control fruit were stored in a room of  $30 \text{ m}^3$  maintained at a similar temperature and high humidity. Ozone levels in this control room were periodically measured with the ozone sensor previously described. No ozone was detected during the storage period.

Eureka lemons were inoculated by injection of 100 fruit with  $10^5$  spores of *P. italicum* 1.5 cm deep into the juice sacs. The fruit were randomly placed into four open boxes of 25 fruit each. Two of the boxes were placed in the ozonated storage room and two boxes were placed in the control room. The fruit were examined weekly. Sporulation was recorded for each fruit at each observation with an index from 0 to 5. Numbers 1, 2, 3, 4, and 5, respectively, indicated 1 to 20%, 21 to 40%, 41 to 60%, 61 to 80%, and  $>80\%$  of the fruit surface covered with spores. The experiment was conducted twice; the fruit were stored for 8 and 9 weeks in the first and second experiments, respectively.

**Continuous exposure to 1.0 ppm ozone.** An ozone generator (Oxtomcav XEE-245) was installed in a  $59.78 \text{ m}^3$  refrigerated export container (Hyundai, Seoul, Korea, ID No. DFIU-320472-1). Ozone was released through 19-mm diameter perforated distribution PVC tubes placed in the T-channels of the container floor.

Ozone concentration in the container was maintained to  $1.0 \pm 0.05$  ppm at  $10 \pm 1^\circ\text{C}$  and continuously monitored with an UV ozone analyzer (IN-2000-1) located outside the container. Eureka lemons, inoculated 24 h before with  $10^5$  and  $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$ , and Valencia oranges, inoculated with  $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$  of *P. digitatum* and *P. italicum*, were placed in plastic cavity trays on open wooden trays and stored in the container for 2 weeks. For each pathogen and inoculum density, four trays (replicates) with 25 lemons each and four trays with 20 oranges each were used. As a control treatment, inoculated fruit were stored in a standard cold room at the same temperature. Ozone levels in this control room were periodically measured with the ozone sensor previously described. No ozone was detected during the storage period. Decay incidence and fruit sporulation were evaluated after 7 and 14 days of storage.

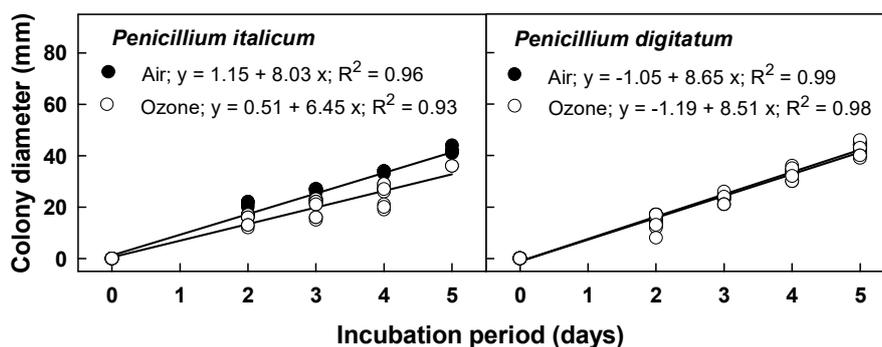
**Ability to abate ethylene in an export container.** The 59.78  $\text{m}^3$  export container and the ozone equipment described above were used in these trials. The temperature in the container was set to  $0 \pm 1^\circ\text{C}$  and the drain holes and air exchange vents were closed. The empty container was then vented and closed, and the initial ozone and ethylene levels determined. Ethylene from a gas cylinder was then introduced into the container. A pressure regulator and a rotometer (Model FM-1000, Matheson, Montgomeryville, PA) were used for controlling the flow of ethylene. When the ethylene concentration reached approximately 3.8 ppm, the ozone generator was turned on. Ethylene and ozone concentrations were measured hourly for a period of 5 h, and again after 24 h. Five relative ozone levels, designated as control (generator switched off), and levels 1, 2, 3, and 4, were generated by different generator settings. Ethylene was measured by removing air from the ozone sample loop and then injecting the samples into a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (Carle AGC-211, EG&G Chandler Engineering, Tulsa, OK).

**Statistical analysis.** For the *in vitro* tests, linear regression lines were fit to the radial growth values during the 5-day incubation period at  $20^\circ\text{C}$ . Slopes of the lines were compared with a two-tailed Student's *t* test ( $P = 0.05$ ). Severity data (lesion diameter), the sporulation index, and the arcsine of the square root of the proportion of decayed fruit were analyzed with analyses of variance (SAS Institute Inc., Cary, NC). Mean comparisons were performed by Fisher's protected least significant difference (LSD) test ( $P = 0.05$ ).

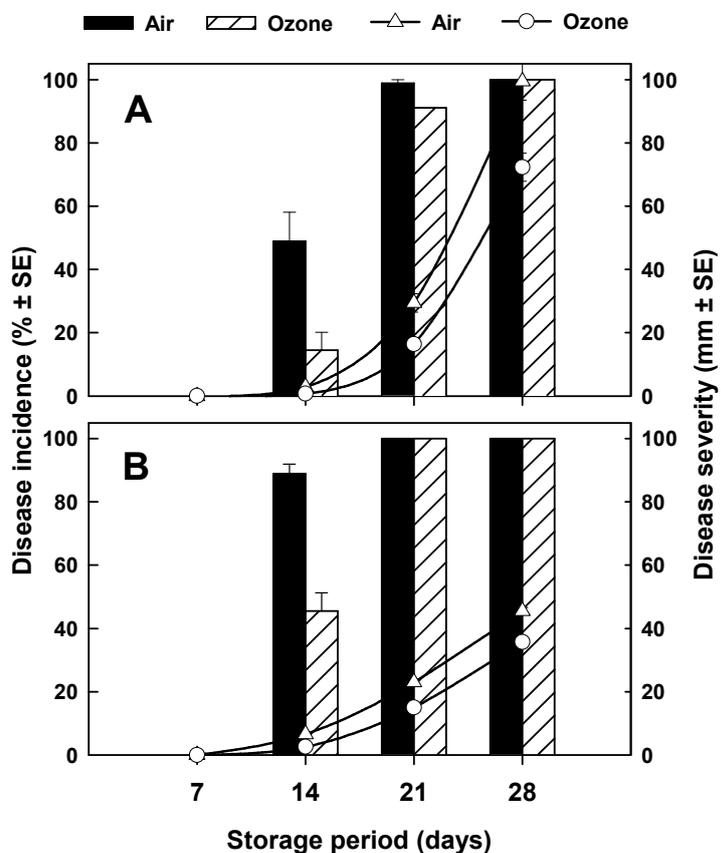
## Results

**Continuous exposure to 0.3 ppm ozone.** (i) *In vitro* mycelial growth. None of the pathogen cultures exposed to 0.3 ppm ozone or to ambient air exhibited visible

growth during the 4-day exposure period at 5°C. Radial growth of *P. italicum* during the 5-day incubation period at 20°C was significantly reduced by the previous 0.3 ppm ozone exposure at 5°C for 4 days (Fig. 1). In contrast, no differences in colony diameter were found for *P. digitatum* previously exposed to 0.3 ppm ozone. Pathogen sporulation was not affected by the previous 0.3 ppm ozone exposure. Spores of both *P. digitatum* and *P. italicum* were observed after a 2-day incubation period at 20°C in plates previously exposed to either ozonated or ambient air atmospheres.



**Fig. 1.** Regression lines for the in vitro growth of *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum* during a 5-day incubation period at 20°C after 4 days of continuous exposure at 5°C to ambient air or 0.3 ppm ozone.

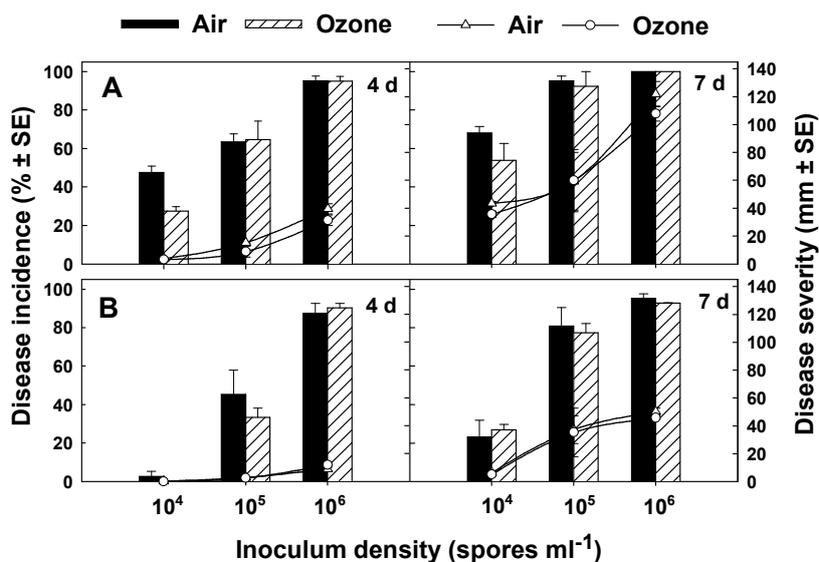


**Fig. 2.** Green (A) and blue (B) molds incidence (bars) and severity (lines) on artificially inoculated Valencia oranges continuously exposed for 4 weeks at 5°C and 90% RH to ambient air or 0.3 ppm ozone.

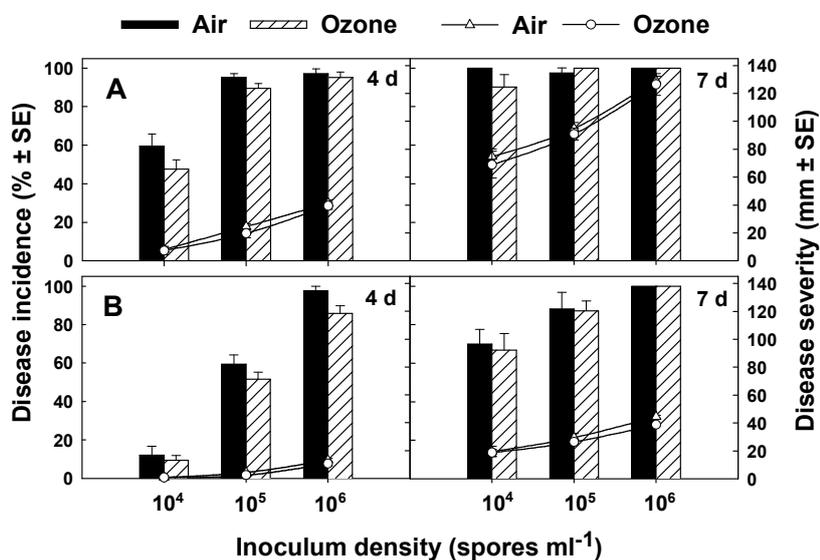
(ii) *Disease development.* The incidence of both green and blue molds was significantly lower after 14 storage days at 5°C, but not after 21 or 28 days, on inoculated oranges exposed to 0.3 ppm ozone than on fruit exposed to ambient air (Fig. 2). Disease severity was also significantly lower under ozone after 21 days storage at 5°C. The differences in lesion diameter after 28 days reached about 30 mm for green mold and 10 mm for blue mold (Fig. 2). Continuous exposure to 0.3 ppm ozone affected external mycelial growth and sporulation of both pathogens. While powdery

masses of olive green or blue spores were observed on decayed fruit exposed to ambient air, irregularly distributed masses of white mycelia that did not develop conidia were observed under 0.3 ppm ozone. Both species resumed normal surface growth and sporulated on samples of decayed fruit from the ozone room that were incubated at 20°C and 90% RH for 2 days. Ozone exposure did not noticeably injure the fruit.

(iii) *Inoculum density and fruit susceptibility.* For both green and blue molds, and at all three inoculum densities tested, there were no significant differences in incidence or severity between oranges exposed to 0.3 ppm ozone or to ambient air (Fig. 3). Both pathogens developed normal disease symptomatology and sporulated after 1 week storage under 0.3 ppm ozone at 20°C. Ozone exposure for 1 week at 20°C before inoculation did not affect susceptibility of oranges to either green or blue mold (Fig. 4). Even at the lowest spore concentration of  $10^4$  spores  $\text{ml}^{-1}$ , disease incidence and severity were not significantly different on fruit previously exposed to 0.3 ppm ozone.

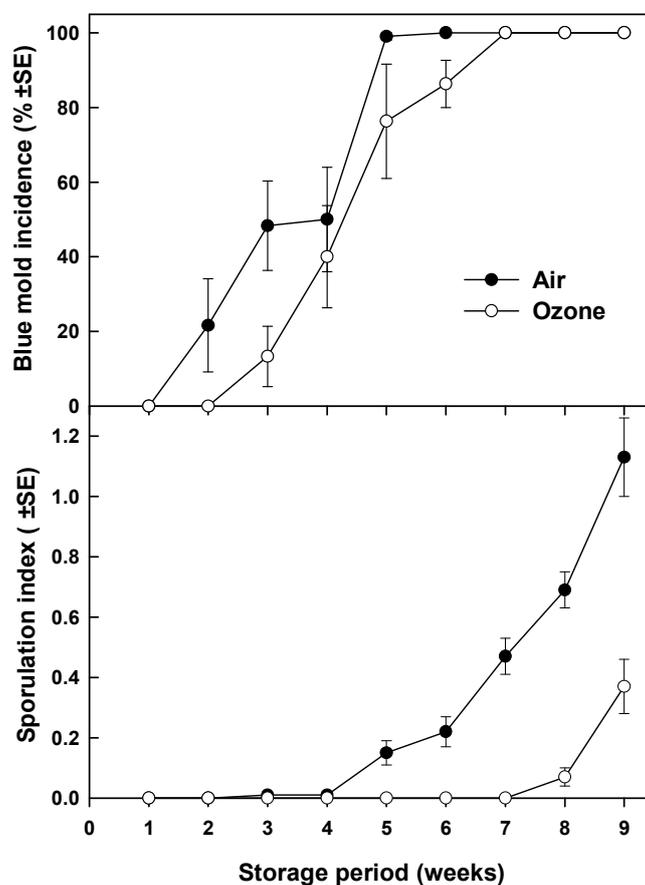


**Fig. 3.** Influence of inoculum density on the incidence (bars) and severity (lines) of green (A) and blue (B) molds on Valencia oranges exposed for 4 or 7 days at 20°C and 90% RH to ambient air or 0.3 ppm ozone.



**Fig. 4.** Influence of continuous ozone exposure on the susceptibility of oranges to infection. Shown are green (A) and blue (B) molds incidence (bars) and severity (lines) on Valencia oranges exposed for 7 days at 20°C and 90% RH to ambient air or 0.3 ppm ozone, then artificially inoculated with different inoculum densities and incubated for 4 or 7 days at 20°C and 90% RH in an ambient air atmosphere.

**Intermittent exposure to 0.3 ppm ozone in a day-night cycle.** In a commercial citrus storage, the incidence of blue mold on artificially inoculated lemons was delayed, but not reduced, by a day-night ozone cycle. After 3 weeks of storage at 4.5°C, it was about 15% and 50% on ozone-exposed and control fruit, respectively. However, it was 100% for both treatments after 7 weeks of storage (Fig. 5A). In contrast, the sporulation of blue mold-infected lemons was greatly reduced by a day-night ozone cycle. A mean sporulation rating of about 0.5 and 1.1 was observed among control fruit after 7 and 9 weeks of storage, respectively, while the rating among ozone-exposed lemons was 0.0 and 0.4, respectively (Fig. 5B). None of the fruit appeared injured by the ozone treatment.



**Fig. 5.** Incidence of blue mold and sporulation among Eureka lemons artificially inoculated with *Penicillium italicum* and stored in a commercial storage room for 9 weeks at 4.5°C in an ambient air atmosphere or in a day-night ozone cycle (intermittent exposure to 0.3 ppm ozone for 12 h).

**Continuous exposure to 1.0 ppm ozone.** Decay incidence on lemons and oranges inoculated with  $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$  of *P. digitatum* or *P. italicum* was significantly lower among fruit exposed to 1.0 ppm ozone than among control fruit after 1 week of storage at 10°C, but not after 2 weeks of storage (Table 1). Green mold incidence on lemons inoculated with  $10^5$  spores  $\text{ml}^{-1}$  was significantly lower among fruit exposed to 1.0 ppm ozone than among control fruit after either 1 or 2 weeks of storage. No

significant differences were found for blue mold incidence on lemons inoculated with  $10^5$  spores  $\text{ml}^{-1}$  (Table 1). Sporulation of both fungi at both inoculum densities was suppressed by ozone exposure. In every test, no surface injuries were observed on the fruit skin.

**Table 1.** Influence of continuous exposure to ambient air or to 1.0 ppm ozone on decay incidence on artificially inoculated Eureka lemons and Valencia oranges stored at  $10^\circ\text{C}$  in a  $59.78 \text{ m}^3$  export container

Fruit	Pathogen	Treatment	Decay incidence (%) <sup>x</sup>			
			$1 \times 10^5$ <sup>y</sup>		$1 \times 10^6$	
			7 d <sup>z</sup>	14 d	7 d	14 d
Eureka lemons	<i>P. digitatum</i>	Air	21 a	99 a	96 a	100 a
		Ozone	2 b	71 b	26 b	95 a
	<i>P. italicum</i>	Air	17 a	95 a	91 a	100 a
		Ozone	12 a	89 a	33 b	92 a
Valencia oranges	<i>P. digitatum</i>	Air	-	-	95 a	100 a
		Ozone	-	-	32 b	94 a
	<i>P. italicum</i>	Air	-	-	94 a	100 a
		Ozone	-	-	28 b	99 a

<sup>x</sup> For each pathogen, values within columns followed by unlike letters are different according to a Fisher's Protected LSD test ( $P = 0.05$ ) applied after an analysis of variance of the arcsine of the square root of the proportion of infected fruits. Non-transformed data are shown.

<sup>y</sup> Inoculum density (spores  $\text{ml}^{-1}$ ).

<sup>z</sup> Storage period (days).

**Ability to abate ethylene in an export container.** Ethylene concentration within the container decreased only slightly over the test period ( $0.035 \text{ ppm h}^{-1}$ ) when the ozone generator was off (control, Table 2). The ozone generator reduced the ethylene level within the container, with the rate of reduction increasing as the generator setting was increased. At its highest settings (levels 3 and 4), the ozone generator reduced the ethylene level in the container at a rate of  $0.145 \text{ ppm h}^{-1}$ , compared to  $0.035 \text{ ppm h}^{-1}$  for the control (Table 2). Ozone concentrations in the

container increased from the 0.0 ppm ambient level (control) to 0.2, 0.5, 1.3 and 2.1 ppm for settings 1, 2, 3 and 4, respectively after 5 h (Fig. 6). After 24 h, the ozone concentration in the container reached levels of 0.3, 1.0, and 3.9 ppm for settings 1, 2, and 3, respectively (Table 2). The ozone concentration exceeded the range of the analyzer (10.0 ppm) after 24 h with level 4.

**Table 2.** Rate of ethylene reduction and concentration of ozone and ethylene resulting from the use of an ozone generator (Oxtomcav XEE-245) in an empty 59.78 m<sup>3</sup> export container over a 24 h period after introducing an initial concentration of 3.8 ppm of ethylene

Treatment	Ethylene reduction (ppm h <sup>-1</sup> )	Concentration after 24 h	
		Ozone (ppm)	Ethylene (ppm)
Control <sup>x</sup>	0.035	0.0	3.0
Generator Level 1	0.073	0.3	2.0
Generator Level 2	0.109	1.0	0.8
Generator Level 3	0.145	3.9	0.2
Generator Level 4	0.145	>10.0 <sup>y</sup>	0.0

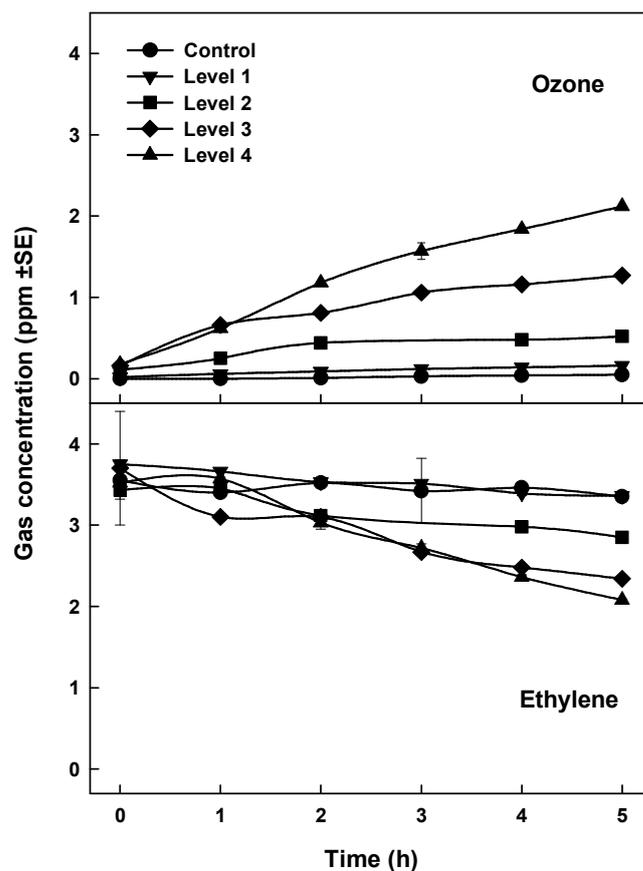
<sup>x</sup> Generator off.

<sup>y</sup> Concentration exceeded the range of the analyzer.

## Discussion

In the *in vitro* tests, ozone neither killed all the spores nor adversely affected germination ability. Since the spores were located not only on the surface but also inside the agar cylinder, direct gas contact with all spores was probably not achieved. Similarly, Klotz (15) observed that ozone gas only partially inhibited the germination and growth of *P. digitatum* and *P. italicum* on agar, and that the cultures resumed their usual rapid rate of growth when they were removed from the ozone chamber, even after 3 weeks exposure. Hibben and Stotzky (12) concluded that spore sensitivity to the oxidizing action of ozone depended on the fungal species, spore morphology, substrate, moisture, and ozone dosage. Spore morphology could play some role on the differential activity of ozone against *P. digitatum* and *P. italicum* that was observed in our tests. No growth was noticed on the culture plates held in ambient air. Therefore, the lack of radial growth during exposure to 0.3 ppm ozone at 5°C was due primarily to the low temperature and not to the presence of ozone. A longer exposure period

was not used because in preliminary tests the PDA medium in the open culture dishes dried extensively.



**Fig. 6.** Ozone and ethylene concentrations during a 5-h period resulting from the use of an ozone generator (Oxtomcav XEE-245) in an empty 59.78 m<sup>3</sup> export container having an initial concentration of 3.8 ppm of ethylene.

In all experiments, exposure to gaseous ozone delayed the incidence of both green and blue molds on wound-inoculated oranges or lemons about 1 week. However, ozone was unable to control decay. Infections developed more slowly under ozone,

but disease incidence at the end of the storage period was not reduced. Furthermore, we found no influence of inoculum density on the effect of ozone on both decay incidence and severity. The inability of ozone to control pathogens in wounds has been observed on naturally inoculated Valencia oranges (13) and artificially inoculated navel oranges (15) stored in an ozone atmosphere, and on artificially inoculated Valencia oranges treated with ozonated water (24).

Likewise, ozone treatment did not control postharvest wound-infections on apples (22), pears (27), peaches (25,26), or other commodities (19,25,26). Apparently, fungal structures within wounds remain protected from the oxidizing effect of ozone because of limited ozone penetration, reduced ozone concentration as it reacts with fruit tissue or extracellular biochemicals, and/or the presence of antioxidants in the fruit. Some of these factors could also explain the failure of other strong oxidants, such as chlorine and chlorine dioxide, in controlling infections within inoculated wounds (1,8,28). Since *Penicillium* molds are initiated by infections in wounds on the fruit surface, the efficacy of ozone in controlling green and blue molds cannot be predicted by the toxicity of ozone against free spores and hyphae. Therefore, ozone could not be a substitute for the synthetic fungicides that are currently applied on citrus fruit packinglines.

In our tests, despite the inability to control decay, ozone gas inhibited the normal aerial growth of the mycelia and greatly reduced sporulation from lesions among infected fruit once lesions developed. This was accomplished either with a continuous 0.3 or 1.0 ppm ozone exposure or with a 0.3 ppm day-night cycle. Harding (11) similarly observed control of sporulation and some control of decay by *Penicillium* molds on citrus fruit with continuous exposure to ozone at 1.0 ppm for 15 days. We and Harding (11) observed that sporulation was only suppressed as long as ozone was present; lesions sporulated quickly when infected fruit were removed from the ozone atmosphere. The reduction of spore production has commercial value because stored fruit are usually treated with fungicides; if resistance develops among these pathogens, the ozone would reduce proliferation of resistant spores and presumably would prolong the useful life of postharvest fungicides. Furthermore, *Penicillium* spores that are produced from stored fruit are a significant source of contamination for healthy adjacent fruit, and for packages, walls, and floors of rooms. Storage under ozone could greatly reduce the load of airborne pathogenic spores. Schomer and McCulloch (22) reported a strong reduction in spore load when apple storage rooms were ozonated. The contamination that can occur on packingline brushes and belts when citrus fruit are re-processed and packaged would also be reduced if infected fruit did not present

sporulating lesions. The lack of sporulation, however, may make it more difficult for culling crews to see and remove infected fruit.

To be an effective anti-sporulant, ozone must penetrate into bins or boxes where fruit are stored. Harding (11) obtained good results with open boxes, whereas ozone penetration into cartons with small vents was unsatisfactory. We noticed that ozone was barely able to go through the plastic cavity trays used in some experiments. In tests not reported here, we obtained good suppression of sporulation on oranges stored in large plastic field bins that had large vents. The small storage boxes used for lemons are similarly well vented.

The susceptibility of Valencia oranges to decay was not affected by continuous exposure to 0.3 ppm ozone. Since the fruit were exposed to ozone and then wounded and inoculated, this result suggests that the gas did not produce any mechanical damage to the albedo cells. Jin et al. (14) concluded that fruit senescence was delayed on Wenzhou mandarins exposed to ozone and negative ions, the respiratory intensity was lowered and the ethylene release rate decreased. Removal of ethylene in storage rooms or containers could delay fruit senescence and extend its postharvest life. We and other workers (6,21) found corona discharge ozone generators to be effective in reducing ethylene.

Ozone concentration in a storage room is dependent on the environmental conditions and on the fruit load. Ozone concentration rapidly decreases when temperature, humidity, or fruit load increases. Our results showed a synergistic effect between ozone and low temperature. While sporulation was effectively inhibited by a concentration of 0.3 ppm ozone at 5°C, it was not when the temperature was set at 20°C. Ozone-generating technology today is accurate and reliable enough to provide and hold the desired ozone concentration in any storage room with use of correct equipment. Once the produce are stored at low temperature, only a few tasks taking a short time are required inside the storage rooms. The 0.3 ppm US-OSHA TLV-STEL concentration should minimize safety concerns of workers and regulators about ozone use, and minimize the risk of injury to stored products. Exposure in a day-night cycle, in which no workers would be normally exposed to ozone, although brief entry would remain feasible and safe, may also be an alternative.

## Acknowledgements

We thank the Electric Power Research Institute (EPRI; Palo Alto, CA) for financial support. We also thank Agroquality International, LLC (Bridgewater, NJ) and Del Industries (San Luis Obispo, CA) for providing ozone equipment and technical

assistance; Advanced Packinghouse Systems (Fresno, CA) for allowing us to use their citrus storage facilities, and Dole Inc. (Bakersfield, CA) for providing the export container.

## Literature cited

1. Adaskaveg, J. E. 1995. Postharvest sanitation to reduce decay of perishable commodities. *Perishables Handling* 82:21-25.
2. Baker, C. E. 1933. The effect of ozone upon apples in cold storage. *Ice Refrig.* 84:402-404.
3. Barth, M. M., Zhou, C., Mercier, J., and Payne, F. A. 1995. Ozone storage effects on anthocyanin content and fungal growth in blackberries. *J. Food Sci.* 60:1286-1288.
4. Bus, V. G., Bongers, A. J., and Risse, L. A. 1991. Occurrence of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazalil on citrus fruit from different geographic origins. *Plant Dis.* 75:1098-1100.
5. Dezman, D. J., Nagy, S., and Brown, G. E. 1986. Postharvest fungal decay control chemicals: treatments and residues in citrus fruits. *Residue Rev.* 97:37-92.
6. Dickson, R. G., Law, S. E., Kays, S. J., and Eiteman, M. A. 1992. Abatement of ethylene by ozone treatment in controlled atmosphere storage of fruits and vegetables. Pages 1-9 in: *Proc. Int. Winter Meet. Amer. Soc. Agric. Engin.* December 15-18, Nashville, TN.
7. Eckert, J. W. 1990. Impact of fungicide resistance on citrus fruit decay control. Pages 286-302 in: *Managing Resistance to Agrochemicals. From Fundamental Research to Practical Strategies.* M. B. Green, H. M. Le Baron, and W. K. Moberg, eds. Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 421, Washington, D.C.
8. Eckert, J. W., and Eaks, I. L. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. Pages 179-260 in: *The Citrus Industry. Vol. 5.* W. Reuter, E. C. Calavan, and G. E. Carman, eds. University of California Press, Berkeley, CA.
9. García, J. M., Castellano, J. M., Nadas, A., and Olías, J. M. 1998. Effect of ozone on citrus storage. Pages 237-241 in: *Proc. COST 914-COST 915. Workshop: Non Conventional Methods for the Control of Postharvest Disease and Microbial Spoilage.* October 9-11, Bologna, Italy.
10. Graham, D. M., Pariza, M., Glaze, W. H., Newell, G. W., Erdman, J. W., and Borzelleca, J. F. 1997. Use of ozone for food processing. *Food Technol.* 51:72-76.
11. Harding, P. R., Jr. 1968. Effect of ozone on *Penicillium* mold decay and sporulation. *Plant Dis. Rep.* 52:245-247.
12. Hibben, C. R., and Stotzky, G. 1969. Effects of ozone on the germination of fungus spores. *Can. J. Microbiol.* 15:1187-1196.
13. Hopkins, E. F., and Loucks, K. W. 1949. Has ozone any value in the treatment of citrus fruit for decay? *Citrus Ind.* 30:5-7, 22.

14. Jin, L., Xiaoyu, W., Honglin, Y., Zonggan, Y., Jiayun, W., and Yaguang, L. 1989. Influence of discharge products on post-harvest physiology of fruit. Pages 1-4 in: Proc. Int. Symp. High Voltage Engin., 6th.
15. Klotz, L. J. 1936. Nitrogen trichloride and other gases as fungicides. *Hilgardia* 10:27-52.
16. Krause, C. R., and Weidensaul, T. C. 1977. Effects of ozone on the sporulation, germination and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 68:195-198.
17. Liew, C. L., and Prange, R. K. 1994. Effect of ozone and storage temperature on postharvest diseases and physiology of carrots (*Daucus carota* L.). *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 119:563-567.
18. National Research Council. 1993. Pesticides in the Diets of Infants and Children. National Academy Press, Washington, D.C.
19. Ogawa, J. M., Feliciano, A. J., and Manji, B. T. 1990. Evaluation of ozone as a disinfectant in postharvest dump tank treatments for tomato. (Abst.) *Phytopathology* 80:1020.
20. Pérez, A. G., Sanz, C., Ríos, J. J., Olías, R., and Olías, J. M. 1999. Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. *J. Agric. Food Chem.* 47:1652-1656.
21. Rice, R. G., Farquhar, W., and Bollyky, L. J. 1982. Review of the application of ozone for increasing storage time for perishable foods. *Ozone Sci. Eng.* 4:147-163.
22. Schomer, H. A., and McColloch, L. P. 1948. Ozone in relation to storage of apples. *USDA Circular* 765:1-23.
23. Shimizu, Y., Makino, H., Sato, J., and Iwamoto, S. 1982. Prevention of the rotting of grapes (Kyoho) in cold storage with the use of ozone. *Res. Bull. Aichi-ken Agric. Res. Cent.* 14:225-238.
24. Smilanick, J. L., Crisosto, C. H., and Mlikota, F. 1999. Postharvest use of ozone on fresh fruit. *Perishables Handling* 99:10-14.
25. Spalding, D. H. 1966. Appearance and decay of strawberries, peaches, and lettuce treated with ozone. *ARS-USDA Marketing Res. Rep.* 756.
26. Spalding, D. H. 1968. Effects of ozone atmospheres on spoilage of fruits and vegetables after harvest. *ARS-USDA Marketing Res. Rep.* 801.
27. Spotts, R. A., and Cervantes, L. A. 1992. Effect of ozonated water on postharvest pathogens of pear in laboratory and packinghouse tests. *Plant Dis.* 76:256-259.
28. Spotts, R. A., and Peters, B. B. 1980. Chlorine and chlorine dioxide for control of d'Anjou pear decay. *Plant Dis.* 64:1095-1097.
29. U.S. Food and Drug Administration. 1997. Substances generally recognized as safe, proposed rule. *Federal Register* 62:18937-18964.
30. Whiteside, J. O., Garnsey, S. M., and Timmer, L. W., eds. 1988. *Compendium of Citrus Diseases*. 2nd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

# Capítol 7

---

## Evaluación de Microorganismos Antagónicos para el Control Biológico de las Podredumbres Verde y Azul en Post-cosecha de Cítricos

L. Palou, J. Usall, N. Teixidó, I. Viñas

*Àrea de Postcollita, CeRTA, Centre UdL-IRTA, Lleida*

**Referència:** *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* Enviat per a publicació.

---



## Resumen

Se evaluó mediante pruebas de efectividad *in vivo* en naranjas y mandarinas clementinas la capacidad antagonista de 212 bacterias y levaduras contra el hongo *Penicillium digitatum*, causante de la podredumbre verde de los cítricos. Solamente con tres de los microorganismos ensayados (1,4%) se alcanzó un porcentaje de reducción del número de frutos podridos respecto al control igual o superior al 50% tras 7 días de almacenamiento a 20°C. En pruebas de efectividad a nivel secundario, la cepa CPA-2 de la bacteria *Pantoea agglomerans*, aplicada por pulverización a las concentraciones de  $4 \times 10^7$  ufc ml<sup>-1</sup> y  $2 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> unas 2 h después de la inoculación del patógeno, se mostró altamente eficaz en el control de las podredumbres verde y azul en mandarinas Clementines almacenadas a 20°C durante 7 días. La bacteria se multiplicó y mantuvo sus poblaciones en la superficie de las mandarinas, tanto en frutos incubados a 20°C durante 14 días como en frutos almacenados a 3,5°C durante 60 días.

**Palabras clave adicionales:** biocontrol, mandarina clementina, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Pantoea agglomerans*

## Summary

*In vivo* primary screenings on oranges and clementine mandarins were conducted to test the antagonistic activity of 212 bacteria and yeasts against *Penicillium digitatum*, causal fungus of postharvest citrus green mold. Only three of the potential antagonists tested (1.4%) inhibited green mold by 50% or more compared to the control fruit after 7 days of incubation at 20°C. In secondary screenings, the strain CPA-2 of the bacterium *Pantoea agglomerans*, sprayed onto the fruit at  $4 \times 10^7$  cfu ml<sup>-1</sup> or  $2 \times 10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> about 2h after the inoculation of the pathogen, effectively controlled both green and blue molds on Clementines mandarins stored at 20°C for 7 days. The bacterium was able to grow and keep its populations on the surface of mandarins, either in fruits incubated at 20°C for 14 days or in fruits hold at 3,5°C for 60 days.

**Additional key words:** biocontrol, clementine mandarin, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Pantoea agglomerans*

## Introducción

Entre los posibles sistemas alternativos al uso de los fungicidas sintéticos para el control de enfermedades en post-cosecha de cítricos, el control biológico, y concretamente la utilización de microorganismos antagónicos, se presenta como uno de los más interesantes para ser implementado a nivel comercial en España en un futuro más o menos próximo. Algunas de las ventajas de este sistema, en comparación con otros sistemas alternativos físicos o químicos, son su seguridad, su persistencia, su insignificante efecto en el balance ecológico y su compatibilidad con otros métodos de control (Viñas, 1997). Por otro lado, el almacenamiento en frío de los frutos cítricos, ya sea en cámaras frigoríficas o en contenedores de exportación, favorece las posibilidades de aplicación de agentes antagónicos, puesto que la fruta se encuentra en condiciones ambientales controladas (Wisniewski y Wilson, 1992; Usall *et al.*, 1996). La capacidad de control de distintas bacterias, levaduras y hongos filamentosos se ha constatado repetidamente durante los últimos años en pruebas de laboratorio y en ensayos a menor o mayor escala llevados a cabo en la mayoría de los principales países productores de cítricos, como son EE UU (Wilson y Chalutz, 1989; Smilanick y Denis-Arrue, 1992; Bull *et al.*, 1997), Israel (Chalutz y Wilson, 1991; Droby *et al.*, 1993; Droby *et al.*, 1998), Suráfrica (McGuire, 1994; McGuire y Hagenmaier, 1996), Australia (Huang *et al.*, 1992, 1995) o Italia (Arras, 1993, 1996). Actualmente sólo existen dos productos disponibles comercialmente para su utilización en post-cosecha de cítricos y ambos han sido registrados en EE UU por la Environmental Protection Agency (EPA): el Bio-Save® 1000, formulado con la cepa ESC-10 de la bacteria *Pseudomonas syringae* Van Hall por la empresa EcoScience (Longwood, FL, EE UU), y el Aspire®, formulado con la cepa I-182 de la levadura *Candida oleophila* Montrocher por la empresa Ecogen (Langhorne, PA, EE UU). No obstante, otros antagonistas han sido ya patentados, aunque no registrados, y otros ya se han ensayado a nivel semicomercial o comercial, por lo que se esperan más formulados disponibles en el mercado en un futuro próximo (Droby, 2000). En España, a principios de los 90, trabajos realizados en el IATA (CSIC) de Valencia demostraron la capacidad antagónica del hongo filamentoso *Trichoderma viride* contra diversos patógenos importantes en post-recolección de cítricos (Díaz y Vila, 1990; Díaz *et al.*, 1993). El presente trabajo se inició en Lleida en 1995, cuando nuestro grupo, especializado en el control biológico de las enfermedades de post-cosecha de la fruta de pepita, se integró en un programa de investigación concertada para el establecimiento y el impulso de la producción integrada de cítricos en Catalunya. La extraordinaria importancia económica de las enfermedades de post-recolección obliga a utilizar métodos de control altamente

eficaces. Por desgracia, tal eficacia sólo se consigue actualmente con la aplicación en las centrales cítricas de fungicidas sintéticos. En el contexto de la producción integrada, esto choca frontalmente con su objetivo básico que es la obtención de fruta de calidad con sistemas de cultivo que preserven al máximo el medio ambiente y la salud humana. ¿Qué sentido tiene minimizar las aplicaciones de pesticidas en campo si en post-cosecha, que es cuando más próxima está la fruta al consumidor, se siguen aplicando productos químicos sintéticos de forma indiscriminada? Por ello, y por otros motivos importantes como la aparición de patógenos resistentes a los fungicidas (Holmes y Eckert, 1999) y la de enfermedades iatrogénicas (Griffiths, 1981), resulta prioritaria la búsqueda y la implementación de métodos de control de enfermedades sustitutivos que permitan al sector cítrico ofrecer al consumidor productos de alta calidad, calidad no entendida solamente como un requisito comercial u organoléptico sino también como un requisito ecológico.

Los objetivos de este trabajo fueron la evaluación *in vivo* de la capacidad antagonista de bacterias y levaduras contra los patógenos *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., y *Penicillium italicum* Wehmer, causantes respectivamente de las podredumbres verde y azul, que son las enfermedades de post-cosecha de cítricos de mayor importancia económica tanto en España (Tuset, 1987) como en el resto del mundo (Eckert y Eaks, 1989). Se presentan resultados obtenidos con la cepa CPA-2 de la bacteria antagonista *Pantoea agglomerans* (Beijerinck) Gavini *et al.*

## Material y métodos

### **Aislamiento, purificación y conservación de los posibles antagonistas.**

Durante tres campañas consecutivas se aislaron bacterias y levaduras de varias fuentes mediante distintas técnicas. La más sencilla fue el aislamiento directo de microorganismos crecidos en placas Petri con medio Patata Dextrosa Agar (PDA) utilizadas para muestrear la contaminación fúngica en campos de mandarina y en centrales cítricas. Éstos se seleccionaron en base a varios criterios (Smilanick, 1994): los que presentaban cierto poder inhibitorio del crecimiento de hongos *in vitro* (halos de inhibición en las propias placas), los que se diferenciaban morfológicamente y presentaban un crecimiento vigoroso y, finalmente, otros se seleccionaban también al azar.

Otros microorganismos epifíticos se aislaron de la superficie de mandarinas no tratadas en post-cosecha mediante el siguiente procedimiento (adaptado de Janisiewicz (1987)): cada fruto se colocaba en un recipiente con solución tampón fosfato (pH 6,5) y se sometía a 10 min de agitación rotatoria a 150 rpm; seguidamente se separaba la

corteza en condiciones de esterilidad, se colocaba en un erlenmeyer con 200 ml de agua estéril y se sometía a un baño de ultrasonidos durante otros 10 min. Esta operación permitía el desprendimiento de los microorganismos adheridos a la superficie. Finalmente, 0,1 ml de la suspensión resultante se colocaban en una placa Petri con medio “Nutrient Yeast Dextrose Agar” (NYDA) y se repartían homogéneamente con una asa de Drigalsky.

Dado que se ha demostrado la actividad antagónica de microorganismos endofíticos (Mari y Guizzardi, 1998), se aislaron también microorganismos presentes en el albedo del fruto. Para ello, porciones de corteza se machacaban en morteros estériles añadiendo pequeñas cantidades de solución tampón fosfato estéril. Del extracto obtenido se añadían 0,5 ml a un tubo con 4,5 ml de tampón y 0,1 ml de esta suspensión se repartían en placas con medio NYDA. Se realizó un banco de diluciones y cada una de las diluciones se sembraba también en placas con NYDA.

Todos los microorganismos aislados se incubaban en placas Petri con medio NYDA a 25°C durante 2 o 3 días y se purificaban mediante resiembras sucesivas por agotamiento. Los aislados puros se sembraban en dos tubos con NYDA y tras 2 o 3 días de incubación, uno se conservaba en frigorífico a 4°C para su preservación y el otro se resembraba periódicamente para disponer de cultivo joven para su utilización en los ensayos.

También se evaluó la capacidad antagónica contra *P. digitatum* y *P. italicum* de levaduras y bacterias pertenecientes a la Colección de Cultivos de la Unitat de Patologia del Àrea de Postcollita del Centre UdL-IRTA que habían sido previamente seleccionadas para el control biológico de *P. expansum* en fruta de pepita.

**Frutos.** Se utilizaron naranjas (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), cvs. Washington Navel, Navelate y Valencia Late, y mandarinas clementinas (*Citrus reticulata* Blanco), cv. Clemenules (sinónimo: Clementina de Nules), cosechadas maduras y enviadas directamente al laboratorio antes de recibir cualquier tipo de tratamiento en post-cosecha. Su procedencia eran plantaciones comerciales ubicadas en la zona citrícola del sur de Tarragona (comarcas del Baix Ebre y Montsià). Hasta su utilización en los ensayos, los frutos se mantuvieron en cámara frigorífica a 5°C y 90% de humedad relativa (HR), en ningún caso durante un periodo de tiempo superior a los 15 días. El día anterior al del ensayo eran seleccionados, lavados con agua corriente, desinfectados superficialmente durante 1 min en un baño al 0,5% de hipoclorito sódico, aclarados con agua y dejados secar en las condiciones ambientales del laboratorio hasta el día siguiente.

**Selección, preparación e inoculación de los patógenos.** Una serie de cepas de *P. digitatum* y *P. italicum*, aisladas de frutos podridos recogidos en centrales

citricolas de la zona de Tarragona y convenientemente purificadas, identificadas y clasificadas, fueron sometidas a pruebas previas de patogenidad *in vivo*, seleccionándose aquellas con mayor capacidad para producir podredumbre. Estas cepas se incubaban en PDA a 25°C durante un periodo de 7 a 10 días. Mediante una cámara Thoma® se titulaba una suspensión de esporas en agua estéril con “tween 80” y se diluía hasta obtener la concentración deseada. Con una micropipeta se inoculaban 25 µl de esta suspensión en una incisión de aproximadamente 5 mm de longitud, 1 mm de anchura y 2 mm de profundidad, practicada previamente en la zona ecuatorial de cada fruto. Esta incisión profundizaba en el albedo sin llegar a la pulpa y se aseguraban así las condiciones óptimas de infección (Green, 1932).

**Pruebas de efectividad a nivel primario.** Esta metodología se empleó para identificar rápidamente y de forma sencilla entre las bacterias y levaduras aisladas aquellas con capacidad antagonica contra *P. digitatum*. Los microorganismos a evaluar se sembraron en placas con medio NYDA y se incubaron a 25°C durante 48 h. Se preparó una solución muy concentrada de cada posible antagonista introduciendo en un tubo de ensayo con 4,5 ml de solución tampón fosfato estéril tres asas de Kolle de microorganismo y mezclando el contenido en un agitador. Los microorganismos con los que no se obtenía una suspensión homogénea se desechaban. Los microorganismos se ensayaron sobre mandarinas Clemenules o sobre naranjas Washington Navel, Navelate o Valencia Late (según el tipo de fruta disponible en cada momento de la temporada citrícola). A los frutos, colocados en alveolos plásticos e inoculados unas 2 h antes con  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{ml}^{-1}$  de *P. digitatum* tal como se ha descrito anteriormente, se les aplicaban en la misma incisión 50 µl de la suspensión concentrada del antagonista potencial. La unidad de muestra era de un fruto y cada tratamiento se aplicaba a cinco repeticiones. Tras 7 días de incubación a 20°C y 90% HR se determinaba la incidencia de la podredumbre verde comparándola con la incidencia en los frutos del tratamiento control, en los cuales se habían inoculado 50 µl de agua destilada estéril. Los microorganismos con los cuales se obtenía un porcentaje de reducción del número de frutos podridos respecto al control superior al 50% eran evaluados de nuevo y, si se repetían estos resultados, eran seleccionados para ser evaluados en ensayos de efectividad a nivel secundario. Un total de 212 bacterias y levaduras fueron ensayadas durante tres campañas consecutivas.

**Pruebas de efectividad a nivel secundario.** Estas pruebas se realizaron para determinar las concentraciones de los antagonistas eficaces en el control de distintas concentraciones de los patógenos. Se describe la metodología utilizada para la evaluación de la efectividad de la cepa CPA-2 de la bacteria antagonista *P. agglomerans* en mandarinas Clemenules. La bacteria se cultivó a 30°C en un fermentador con 6 l de

medio “Nutrient Yeast Dextrose Broth” (NYDB, medio NYDA sin agar) durante 24 h y se centrifugó a 6.981 g durante 10 min. Se eliminó la fracción líquida y la sedimentada se disolvió en una solución 0,05 M de tampón fosfato estéril. A partir de esta suspensión se obtuvieron las de las concentraciones deseadas,  $4 \times 10^7$  unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc ml<sup>-1</sup>) y  $2 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>, ajustando el volumen según una curva estándar obtenida midiendo transmitancias a 420 nm con un espectrofotómetro. Las mandarinas, colocadas en alveolos plásticos e inoculadas unas 2 h antes con 25 µl de una suspensión de  $1 \times 10^5$  o  $1 \times 10^6$  esporas ml<sup>-1</sup> de *P. digitatum* o de *P. italicum*, se pulverizaron uniformemente durante 5 s con una suspensión del antagonista a la concentración deseada. Los frutos de los tratamientos de control se pulverizaron con agua destilada estéril. La unidad de muestra fue de cinco frutos y cada tratamiento se aplicó a cuatro repeticiones. Una vez secos, los frutos se incubaron a 20°C y 90% HR durante 7 días, transcurridos los cuales se contabilizó el número de frutos podridos. El ensayo se repitió dos veces.

**Dinámica poblacional.** Se determinaron las poblaciones de *P. agglomerans* CPA-2 a lo largo del tiempo en mandarinas Clemenules sumergidas durante 1 min a temperatura ambiente ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) en una solución acuosa que contenía  $2 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> de la bacteria. En la corteza de las mandarinas tratadas se había previamente practicado una incisión de 5 mm de longitud, 1 mm de anchura y 2 mm de profundidad, pero no se habían inoculado con ningún patógeno. Las poblaciones bacterianas se determinaron a los 0, 1, 2, 3, 7, 10 y 14 días de incubación a 20°C y a los 0, 7, 14, 30 y 60 días de conservación frigorífica a 3,5°C. En cada una de las evaluaciones se tomaron cuatro repeticiones de cinco mandarinas cada una. De cada fruto se cortaron con un sacabocados estéril 16 porciones de corteza de 1,45 cm<sup>2</sup> de diámetro, una de las porciones incluyendo la incisión realizada antes del tratamiento. Las porciones se colocaron en un frasco con 100 ml de tampón fosfato, se agitaron a 150 rpm durante 20 min en un agitador orbital y se sometieron a un baño de ultrasonidos durante otros 10 min. Con la suspensión resultante se realizó un banco de diluciones (cada suspensión 10 veces más diluida que la anterior) y cada suspensión se sembró en placas Petri con medio NYDA. Transcurridas 24 h de incubación en la oscuridad a 25°C, se contó el número de colonias bacterianas en cada placa y se calculó el número de colonias por cm<sup>2</sup> de superficie del fruto.

**Análisis estadístico.** A los datos transformados al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción de frutos podridos se les aplicó el análisis de la varianza utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE UU). La separación de medias se realizó mediante la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (MDS)

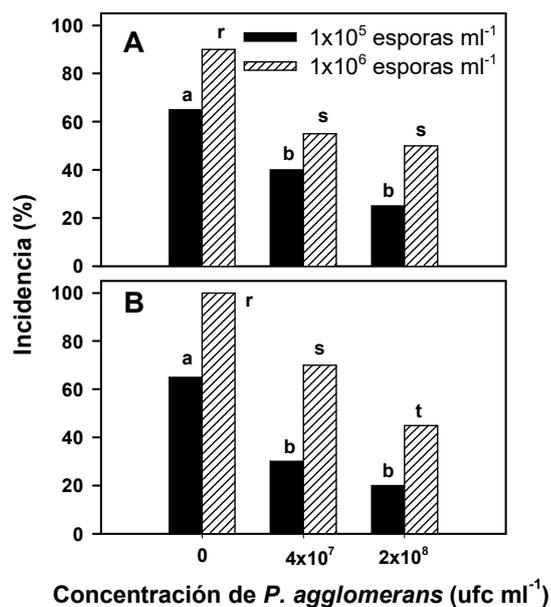
protegida de Fisher ( $p = 0,05$ ). A las poblaciones de *P. agglomerans* CPA-2 en la superficie de las mandarinas se les aplicó la transformación logarítmica.

## Resultados

**Pruebas de efectividad a nivel primario.** Únicamente tres de los 212 aislados ensayados (1,4%) superó el umbral impuesto de reducir en más de un 50% el número de frutos podridos respecto al control en dos ensayos primarios diferentes. En este artículo se presentan resultados obtenidos con la cepa CPA-2 de la bacteria *P. agglomerans*. Con los otros dos antagonistas continúan los trabajos de laboratorio.

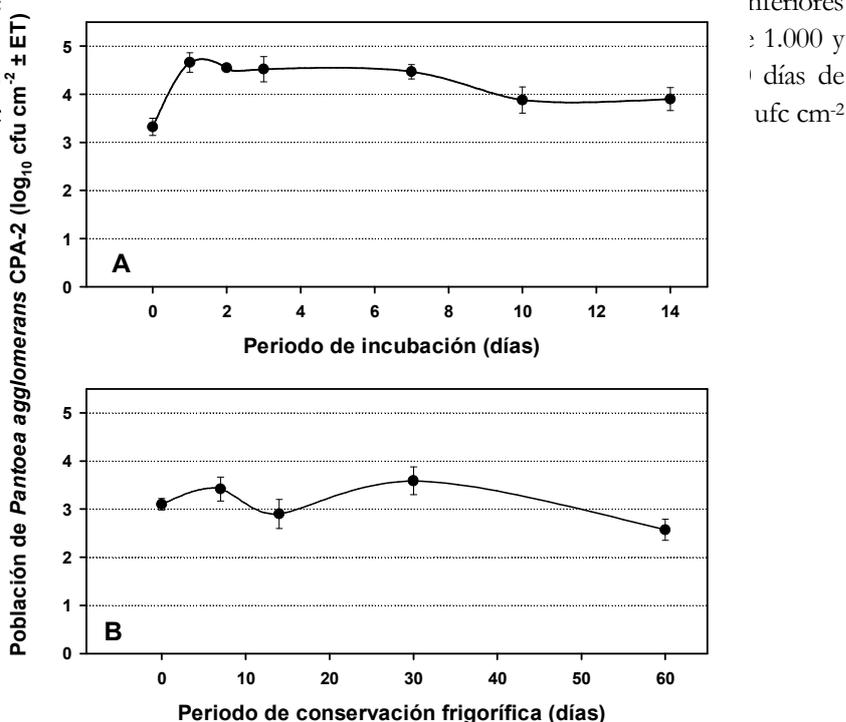
**Pruebas de efectividad a nivel secundario.** *P. agglomerans* CPA-2 (previamente clasificada como *Erwinia herbicola* (Lohnis) Dye), había sido aislada de la superficie de una manzana Golden Delicious en nuestro laboratorio y sobre ella se ha tramitado una solicitud de patente en España (Viñas *et al.*, 1999).

*P. agglomerans* CPA-2, aplicada por pulverización a las concentraciones de  $4 \times 10^7$  y  $2 \times 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ , controló significativamente las podredumbres verde y azul en mandarinas Clemenules previamente inoculadas con  $1 \times 10^5$  o  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{ml}^{-1}$  de *P. digitatum* o de *P. italicum* e incubadas a  $20^\circ\text{C}$  durante 7 días (Fig. 1). La concentración de antagonista de  $2 \times 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  fue significativamente superior a la de  $4 \times 10^7$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  únicamente en el caso de las mandarinas inoculadas con la densidad alta de *P. italicum*. A la densidad de patógeno baja, el antagonista controló la podredumbre azul (55% de reducción respecto al control con  $4 \times 10^7$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  de antagonista y 70% de reducción con  $2 \times 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ ) de forma más eficaz que la podredumbre verde (40 y 60 % de reducción respectivamente) (Fig. 1).



**Fig. 1.** Incidencia de las podredumbres verde (A) y azul (B) en mandarinas Clemenules inoculadas con  $1 \times 10^5$  o  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{ml}^{-1}$  de *Penicillium digitatum* o *P. italicum* respectivamente, pulverizadas con el antagonista *Pantoea agglomerans* CPA-2 a diferentes concentraciones e incubadas durante 7 días a 20°C y 90% HR. Para cada densidad de inóculo, las columnas con letras distintas son significativamente diferentes según la prueba de la Mínima Diferencia Significativa protegida de Fisher aplicada después de un análisis de la varianza al arco seno de la raíz cuadrada de la proporción de frutos podridos ( $p = 0,05$ ). Se presentan las medias no transformadas.

**Dinámica poblacional.** La población de *P. agglomerans* CPA-2 en la superficie de las mandarinas aumentó aproximadamente 10 veces durante las primeras 24 h de incubación a 20°C. Luego disminuyó lentamente de las aproximadamente 60.000 ufc  $\text{cm}^{-2}$  que se contabilizaron en frutos conservados durante los primeros 10 días de conservación (Fig. 2B).



**Fig. 2.** Dinámica poblacional de *Pantoea agglomerans* CPA-2 en mandarinas Clemenules heridas artificialmente en la corteza, sumergidas por 1 min en una suspensión a temperatura ambiente ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) de  $2 \times 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  de *P. agglomerans* CPA-2 e incubadas a  $20^\circ\text{C}$  y 90% HR durante 14 días (A) o almacenadas en frío normal a  $3,5^\circ\text{C}$  y 98% HR durante 60 días (B).

## Discusión

Tan sólo con el 1,4% de los microorganismos ensayados en las pruebas de efectividad *in vivo* a nivel primario se obtuvo un porcentaje de reducción del número de frutos podridos con respecto a los controles superior al 50%. Se utilizaron pruebas *in vivo* por las ventajas que presentan respecto a las pruebas *in vitro*. Según Smilanick (1994), las más importantes son por un lado que, a parte de la capacidad de control, también permiten ensayar la capacidad de supervivencia del antagonista potencial sobre

el huésped y, por otro lado, que se ensayan modos de acción distintos de la antibiosis. En este trabajo, las condiciones de experimentación se establecieron en base a un criterio muy conservador; se empleó una concentración de patógeno alta ( $1 \times 10^6$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ ) y la aplicación de los antagonistas potenciales se realizó siempre con posterioridad a la del patógeno. Con ello se simularon las condiciones reales en las que la mayor parte de las infecciones de *Penicillium* spp. en frutos cítricos tienen lugar antes de que se realicen los tratamientos post-cosecha en las centrales. Este procedimiento aseguró la selección únicamente de aquellos microorganismos capaces de controlar la enfermedad en las condiciones más desfavorables. Bajo condiciones de experimentación considerablemente menos restrictivas (concentración de patógeno de  $1 \times 10^4$  esporas  $\text{ml}^{-1}$  y aplicación de éste con posterioridad a la de los antagonistas), Wilson y Chalutz (1989) seleccionaron únicamente dos levaduras y dos bacterias entre los 122 microorganismos que testaron (3,3%) *in vivo* contra *P. digitatum* y *P. italicum*. Esto demuestra que la gran mayoría de las bacterias y levaduras presentes de forma natural en los cítricos tienen, aplicados como tratamiento de post-cosecha, una nula o escasa capacidad para controlar las podredumbres verde y azul. Por este motivo, cuando se pretende encontrar antagonistas efectivos es necesario ensayar un gran número de antagonistas potenciales.

La cepa CPA-2 de *P. agglomerans* es un aislado patentado con capacidad antagonica contra los principales patógenos de la fruta de pepita (Viñas *et al.*, 1999). El presente trabajo demuestra que también resulta eficaz en el control biológico de las podredumbres verde y azul de los cítricos. Este es un resultado importante porque posibilita la ampliación del espectro de acción del antagonista a otros sistemas huésped-patógeno de importancia económica. Además, se demuestra la capacidad de la bacteria para crecer y mantener sus poblaciones incluso en condiciones de conservación frigorífica, aspecto esencial a tener en cuenta de cara a las posibilidades de implementación comercial del tratamiento de biocontrol. A partir de los resultados satisfactorios obtenidos en los ensayos de efectividad a nivel secundario con mandarinas es necesario generalizar las investigaciones a otras especies de cítricos y contrastar la eficacia en ensayos a una escala mayor y en unas condiciones cada vez más próximas a las comerciales. Otras pruebas adicionales resultan necesarias para comparar la eficacia del antagonista con la de los principales fungicidas de post-cosecha, comprobar su compatibilidad con otros tratamientos de post-cosecha, sean o no fungicidas, y determinar la forma y el momento de aplicación óptimos (Usall *et al.*, 1996). Paralelamente deben realizarse estudios sobre los riesgos de su aplicación, tanto para el hombre como para el medio ambiente. También es importante, aunque complejo, llegar a establecer el mecanismo de acción del antagonista, pues ello

contribuirá a la optimización de los métodos y los momentos de aplicación y al desarrollo de formulaciones apropiadas (Droby y Chalutz, 1994). La comercialización final del producto biológico requiere otra serie de investigaciones imprescindibles como son (Bowers, 1982): el estudio de la estabilidad genética del agente antagonista; la evaluación de su potencial para una producción masiva y económica; la determinación de la formulación más adecuada, con los adyuvantes que optimizen la eficacia, estabilidad, longevidad, seguridad y manejo del producto; y los estudios de mercado potencial y de costes de implementación. Todo este largo y costoso proceso requiere de una estrecha colaboración entre los centros de investigación y la industria dedicada a la protección de vegetales en post-cosecha que, hoy en día, ante las exigencias del mercado y la creciente presión legislativa, ya ha asumido la necesidad económica de involucrarse fuertemente en la obtención y distribución de productos biológicos.

Actualmente, tras la comercialización de la llamada primera generación de fungicidas biológicos de post-cosecha y la constatación de que difícilmente pueden alcanzar por sí solos los niveles de control de los fungicidas sintéticos se ha entrado en una fase que va más allá de la obtención de antagonistas efectivos (Droby, 2000). Distintas vías de investigación están abiertas con el objetivo de aumentar la eficacia de los antagonistas e incrementar los beneficios derivados de su utilización. Las más importantes son la evaluación de la capacidad antagónica de mezclas de distintos microorganismos (Janisiewicz, 1988), la mejora de la efectividad de los antagonistas mediante la adición de determinados nutrientes (El-Ghaouth *et al.*, 2000a; El-Ghaouth *et al.*, 2000b), la combinación en post-cosecha del control biológico con otros sistemas físicos y/o químicos (McGuire, 1994; Huang *et al.*, 1995; Stevens *et al.*, 1997; Usall *et al.*, 1999; Teixidó *et al.*, 2001), la aplicación de antagonistas en campo para el control biológico de enfermedades de post-cosecha (Teixidó *et al.*, 1998; Benbow y Sugar, 1999), y la manipulación genética de los antagonistas (Schena *et al.*, 1999).

## Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación de la CIRIT (Generalitat de Catalunya) y del Grup Exportador de Cítrics del Baix Ebre i Montsià, así como la colaboración de M. Carme Cerdà.

## Referencias bibliográficas

ARRAS G., 1993. Inhibition of postharvest fungal pathogens by *Bacillus subtilis* strains isolated from citrus fruit. Adv. Hort. Sci. 7, 123-127.

- ARRAS G., 1996. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. Postharvest Biol. Technol. 8, 191-198.
- BENBOW J.M., SUGAR D., 1999. Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. Plant. Dis. 83, 839-844.
- BOWERS R.C., 1982. Commercialization of microbial biological control agents. En: Biological Control of Weeds with Plant Pathogens. Charudattan R., Walker H.L. eds. John Wiley & Sons, New York, EE UU.
- BULL C.T., STACK J.P., SMILANICK J.L., 1997. *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue molds of citrus. Biol. Control 8, 81-88.
- CHALUTZ E., WILSON C.L., 1991. Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. Plant Dis. 74, 134-137.
- DÍAZ M.A., VILA R., 1990. Biological control of *Penicillium digitatum* by *Trichoderma viride* on postharvest citrus fruits. Int. J. Food Microbiol. 11, 179-184.
- DÍAZ M.A., CERVERA V., LUIS G., VILA R., 1993. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Geotrichum candidum* through action of *Trichoderma viride* and commercial fungicides. Microbiol. Alim. Nutr. 11, 425-428.
- DROBY S., COHEN L., WEISS B., WISNIEWSKI M., 2001. Microbial control of postharvest diseases of fruits and vegetables - current status and future outlook. Acta Hort. 553: 371-376.
- DROBY S., CHALUTZ E., 1994. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. En: Biological Control of Postharvest Diseases: Theory and Practice. Wilson, C.L., Wisniewski M.E. eds. CRC Press, Boca Raton, FL, EE UU. pp. 63-75.
- DROBY S., COHEN L., DAUS A., WEISS B., HOREV B., CHALUTZ E., KATZ H., KEREN-TZUR M., SACHNAI A., 1998. Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. Biol. Control. 12, 97-101.
- DROBY S., HOFSTEIN R., WILSON C.L., WISNIEWSKI M., FRIDLINDER B., COHEN L., WEISS B., DAUS A., TIMAR D., CHALUTZ E., 1993. Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruits. Biol. Control 3, 47-52.
- ECKERT J.W., EAKS I.L., 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. En: The Citrus Industry. Vol. 5. Reuter W., Calavan E.C., Carman G.E. eds. University of California Press, Berkeley, CA, EE UU. pp. 179-260.
- EL-GHAOUTH A., SMILANICK J.L., WILSON C.L., 2000a. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. Postharvest Biol. Technol. 19, 103-110.
- EL-GHAOUTH A., SMILANICK J.L., WISNIEWSKI M., WILSON C.L., 2000b. Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. Plant. Dis. 84, 249-253.
- GREEN F.M., 1932. The infection of oranges by *Penicillium*. J. Pomol. Hort. Sci. 10, 184-215.
- GRIFFITHS E., 1981. Iatrogenic plant diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 19, 69-82.

- HOLMES G.J., ECKERT J.W., 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* 89, 716-721.
- HUANG Y., DEVERALL B.J., MORRIS S.C., 1995. Postharvest control of green mould on oranges by a strain of *Pseudomonas glathei* and enhancement of its biocontrol by a heat treatment. *Postharvest Biol. Technol.* 5, 129-137.
- HUANG Y., WILD B.L., MORRIS S.C., 1992. Postharvest biological control of *Penicillium digitatum* decay on citrus fruit by *Bacillus pumilus*. *Ann. Appl. Biol.* 120, 367-372.
- JANISIEWICZ W.J., 1987. Postharvest biological control of blue-mold on apples. *Phytopathology* 77, 481-485.
- JANISIEWICZ W.J., 1988. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonistic mixtures. *Phytopathology* 78, 194-198.
- MARI M., GUIZZARDI M., 1998. The postharvest phase: emerging technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica* 26, 59-66.
- McGUIRE R.G., 1994. Application of *Candida guilliermondii* in commercial citrus coatings for biocontrol of *Penicillium digitatum* on grapefruits. *Biol. Control* 4, 1-7.
- McGUIRE R.G., HAGENMAIER R.D., 1996. Shellac coatings for grapefruits that favor biological control of *Penicillium digitatum* by *Candida oleophila*. *Biol. Control* 7, 100-106.
- SCHENA L., IPPOLITO A., ZAHAVI T., COHEN L., NIGRO F., DROBY S., 1999. Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biol. Technol.* 17, 189-199.
- SMILANICK J.L., 1994. Strategies for the isolation and testing of biocontrol agents. En: *Biological Control of Postharvest Diseases: Theory and Practice*. Wilson C.L., Wisniewski M.E. eds. CRC Press, Boca Raton, FL, EE UU. pp. 25-42.
- SMILANICK J.L., DENIS-ARRUE R., 1992. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Dis.* 76, 481-485.
- STEVENS C., KHAN V.A., LU J.Y., WILSON C.L., PUSEY P.L., IGWEBBE E.C.K., KABWE K., MAFOLO Y., LIU J., CHALUTZ E., DROBY S., 1997. Integration of ultraviolet (UV-C) light with yeast treatment for control of postharvest storage rots of fruits and vegetables. *Biol. Control* 10, 98-103.
- TEIXIDÓ N., USALL J., PALOU L., ASENSIO A., NUNES C., VIÑAS I., 2001. Improving biocontrol of green and blue molds of oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. *Eur. J. Plant Pathol.* En prensa.
- TEIXIDÓ N., VIÑAS I., USALL J., MAGAN N., 1998. Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopathology* 88, 960-964.
- TUSET J.J., 1987. Podredumbres de los frutos cítricos. *Conselleria d'Agricultura i Pesca*. Generalitat Valenciana. Valencia. 206 pp.
- USALL J., PONS J., PALOU L., VIÑAS I., SMILANICK J.L., 1999. Alternativas a los productos químicos de síntesis en post-cosecha de cítricos en España y EE UU. *Phytoma-España* 110, 58-64.

- USALL J., TEIXIDÓ N., NUNES C., VIÑAS I., 1996. Los tratamientos de biocontrol. Una alternativa real. *Fruticultura Profesional* 82, 39-53.
- VIÑAS I., 1997. Control biológico de las principales enfermedades fúngicas post-cosecha. *Phytoma-España* 90, 78-81.
- VIÑAS I., USALL J., NUNES C., TEIXIDÓ N., 1999. Nueva cepa de la bacteria *Pantoea agglomerans* (Beijerinck, 1998) Gavini, Mergaert, Beji, Mielcareck, Izard, Kerstersy De Ley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de frutas. Solicitud P9900612. Oficina Española de Patentes y Marcas. Madrid.
- WILSON C.L., CHALUTZ E., 1989. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Sci. Hortic.* 40, 105-112.
- WISNIEWSKI M., WILSON C.L., 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *HortScience* 27, 94-98.

# Capítol 8

---

## Improving Control of Green and Blue Molds of Oranges by Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and Sodium Bicarbonate

N. Teixidó, J. Usall, L. Palou, A. Asensio, C. Nunes, I. Viñas

*Àrea de Postcollita, CeRTA, Centre UdL-IRTA, Lleida*

**Referència:** *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 685-694 (2001).

---



## Abstract

The potential of using *Pantoea agglomerans* (strain CPA-2) alone, or in combination with sodium bicarbonate or carbonate solutions for control of *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold) on oranges was investigated under ambient (20°C) and cold storage (3°C) conditions. *P. agglomerans* effectively controlled both pathogens on oranges at  $2 \times 10^8$  cfu ml<sup>-1</sup>. The biocontrol agent was found to be at room temperature, completely tolerant to 2% sodium bicarbonate, although its Culturability was reduced by >1000-fold after 30 minutes in 2% sodium carbonate. The efficacy of *P. agglomerans* for control of green mold was improved significantly when combined with sodium bicarbonate treatment, resulting in complete and 97.6% reduction of decay incidence at 3°C and 20°C, respectively when compared to untreated controls. Satisfactory results were also obtained with the combined treatment for control of blue mold when compared to untreated controls. This antagonist grew well inside wounds on oranges at both 20°C and 3°C. In contrast, it showed a reduced growth on the surface of intact fruit. Sodium bicarbonate at 2% concentration did not noticeably affect antagonist population development. Thus, use of bicarbonate treatment at 2% followed by the antagonist *P. agglomerans* CPA-2 could be an alternative to chemicals for control of postharvest diseases on oranges.

**Keywords:** Biological control, citrus, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, postharvest diseases, sodium carbonate

## Introduction

Post-harvest green and blue molds of citrus, caused by *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. and *Penicillium italicum* Wehmer, respectively, are responsible for severe economic losses worldwide (Bancroft et al., 1984; Eckert and Eaks, 1989). Currently these post-harvest diseases are controlled by chemical treatments such as ortho-phenil phenate, imazalil and thiabendazol. However, the use of chemicals is becoming increasingly restricted because of concerns about environment and health as well as the development of resistance to these fungicides among fungal pathogens (Díaz and Vila, 1988; Eckert, 1990; Bus et al., 1991; Eckert et al., 1994). Therefore, there is a need to develop new and effective methods to control post-harvest diseases that pose no harm to human health and the environment, and accepted as safe by the general public.

Biological control using microbial antagonists has received a great deal of attention as a promising alternative to chemicals. Many organisms, such as *Pseudomonas* spp. (Huang, et al., 1991; 1993; 1995; Smilanick and Denis-Arrue, 1992), *Bacillus* spp., (Singh and Deverall, 1984; Arras and D'hallewin, 1994), *Debaryomyces hansenii* (Chalutz and Wilson, 1990), *Pichia guilliermondii* (Droby et al., 1993) and *Trichoderma viride* (De Matos, 1983) have been isolated to protect wounds from post-harvest pathogens on citrus fruits. One yeast and two bacterial products are currently commercially available in USA. *Candida oleophila* strain I-182 was registered during 1995 (US-EPA registration no 55638-29) as ASPIRE™ by Ecogen Inc. (Langhorne, PA) for the biological control of post-harvest diseases of pome and citrus fruits (Chand-Goyal et al., 1998). At the same time *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 were registered (US-EPA registration no 64296-7) as BIOSAVE-10™ and BIOSAVE-11™ by EcoScience Corp., (Orlando), FL (Bull et al., 1997) for the same purpose.

Recent studies at the University of Lleida, Catalonia, Spain have demonstrated that the strain CPA-2 of *Pantoea agglomerans*, previously classified as *Erwinia herbicola*, isolated from the apple surface, is an effective antagonist to the major fungal pathogens of apples and pears (Viñas et al. 1999). Generally, biological control agents have a relatively narrow spectrum of activity compared to fungicides (Janisiewicz and Bors, 1995). It is thus particularly important to find antagonists with a broader spectrum in terms of both hosts and pathogen control range. Recently, interest has been given to potential of combining microbial biocontrol agents with other chemical components for enhancing control of post-harvest diseases of pome, stone and citrus fruits.

Carbonic acid salts are common food additives allowed with no restrictions for many applications by European and North American regulations (Lindsay, 1985; Multon, 1988). The antimicrobial activity of these chemicals has been described *in vitro* (Marloth, 1931; Corral et al. 1988) and in a wide range of substrates as well. Sodium Bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ) and Sodium Carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) have been demonstrated to reduce the incidence of postharvest decay on citrus fruits (Barger, 1928; Fawcett, 1936; Houck, 1965; Klotz, 1973; and Smilanick et al., 1997). The inhibitory activity of carbonate and bicarbonate solutions against *Penicillium* spp. is however low, and generally only fungistatic (Marloth, 1931; Hwang and Klotz, 1938).

Sodium Carbonate and Bicarbonate have disposal issues that have to be tacking into account due to the large amount of sodium and the high pH of these solutions. Depending on the kind of soil and the pH of water, some problems could appear. However, Sodium Bicarbonate offers a real advantage to Sodium Carbonate. An equivalent-weight solution of Sodium Bicarbonate has a lower pH and less sodium

than a similar solution of Sodium Carbonate. Equimolar amounts of Sodium Bicarbonate contain 27.4% sodium compared to 43.4% sodium in Sodium Carbonate (Smilanick et al., 1999).

In the near future, the preferred alternative to chemical treatments will be probably a combination of different methods. In fact, Smilanick et al. (1999) found that the effectiveness of sodium bicarbonate and carbonate was significantly improved when these treatments were followed by the fungicide imazalil or *P. syringae* ESC-10. The combination of bicarbonate or carbonate with *P. syringae* overcame significant shortcomings of either of these treatments alone.

This study reports: (a) the efficacy of *P. agglomerans* (strain CPA-2) for the control of *P. digitatum* and *P. italicum* rots on oranges; (b) the potential for improving the efficacy by combination with Sodium bicarbonate or carbonate treatments when stored under ambient conditions (20°C) or in cold storage (3°C), and (c) determination of the population dynamics of the biocontrol agent in wounded and non-wounded fruits.

## Materials and methods

**Fruits.** Valencia oranges used in all experiments were grown in Baix Ebre and Montsià areas in Tarragona (Catalonia, Spain) following standard cultural practices. Fruits were selected from field bins after harvest before any commercial post-harvest treatments were applied. Oranges were used following harvest or after a short storage period at 3°C (no longer than 2 weeks). Before each experiment the oranges were dipped in a NaOCl 0.5% solution for 1 minute, rinsed with water, allowed to air-dry at room temperature and randomised.

**Pathogens.** *P. digitatum* PDM-1 and *P. italicum* PIM-1 were isolated from decayed oranges and maintained on potato dextrose agar medium (PDA; 200 ml of extract from boiled potatoes, 20 g of dextrose, 20 g of agar and 800 ml of water). These are the most virulent isolates of the University of Lleida-IRTA culture collection and to maintain virulence, they were periodically grown on wounded citrus fruits and reisolated. A conidial suspension was prepared by adding 10 ml of sterile water with 0.01% of tween 80 over the surface of 10-day-old cultures grown on PDA and rubbing the surface with a sterile glass rod. The cells were counted in a haemocytometer and diluted to a concentration of  $10^5$  or  $10^6$  spores ml<sup>-1</sup>. This is a recommended concentration for the evaluation of postharvest treatments to control green and blue molds (Eckert and Brown, 1986a). In all the experiments each pathogen was tested separately.

**Antagonist.** *P. agglomerans* strain CPA-2 was obtained from the UdL-IRTA Centre, Catalonia, Spain. It was originally isolated from apple surface (cv. Golden Delicious). Stock cultures were stored at 5°C and were subcultured on nutrient yeast dextrose agar (NYDA; 8 g of nutrient broth, 5 g of yeast extract, 10 g of dextrose, 20 g of agar and 1000 ml of water). For long-term storage CRIO-BILLES AEB 400100 (AES Laboratory, Combourg, France) at -80°C were used. Bacterial suspensions for efficacy and population assays were prepared from bacteria grown in a 6-liter bench-top fermenter at 30°C in NYDB medium (NYDA medium without agar). Cells were harvested at the beginning of the stationary phase (24h) by centrifugation at 6981 g for 10 min. The cell paste was resuspended in 0.05 M phosphate buffer to the desired concentration.

**Biocontrol of blue-mold and green-mold with *P. agglomerans*.** Surface-sterilized oranges were wounded with a steel scalpel by making an injury 2 mm deep by 1 mm wide by 5 mm long on the equator of each fruit. The shallow wounds penetrated the albedo tissue but not the juice sacs to simulate natural infection. A 25 µl aqueous suspension of *P. digitatum* or *P. italicum* at  $1 \times 10^5$  or  $1 \times 10^6$  spores ml<sup>-1</sup>, was applied to each wound, followed by inoculation with 20 µl of the appropriate concentration of a suspension of *P. agglomerans* CPA-2. The antagonist concentrations were adjusted to  $4 \times 10^7$  and  $2 \times 10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> according to a standard curve obtained spectrophotometrically by measuring transmittance at 420 nm (CECIL CE 1020). Five oranges constituted a single replicate, each treatment was repeated four times and the experiment was carried out twice. Treated oranges were incubated at 20°C and 90% relative humidity (RH). Data were recorded as the percentage of decayed fruits after 7 days incubation.

**Compatibility of *P. agglomerans* with sodium bicarbonate and carbonate solutions.** One millilitre of sodium bicarbonate or sodium carbonate solutions at concentrations ten times the required, was transferred to glass test tubes with 9 ml of *P. agglomerans* at a known concentration ( $10^7$  cfu ml<sup>-1</sup>). The final required concentration for the sodium salts was 2%. After incubation for 30 minutes at 25 °C, suspensions ten-fold were few times diluted in 0.05 M phosphate buffer (pH 7) and plated on Petri dishes with NYDA medium. A control with bacterial cells in water was also tested. The plates were incubated at 25 °C in the dark for 24 h and colonies were counted. The test was repeated twice.

**Combining *P. agglomerans* and sodium bicarbonate.** Four treatments and two different storage conditions were tested in this set of experiments. The treatments applied to pathogen inoculated fruits were: (1) control (water); (2) *P. agglomerans* CPA-2; (3) sodium bicarbonate; and (4) sodium bicarbonate + *P. agglomerans* CPA-2.

Treated fruits were stored for 14 days at 20°C and 90% RH or 60 days at 3°C and 98% RH (long-term cold storage).

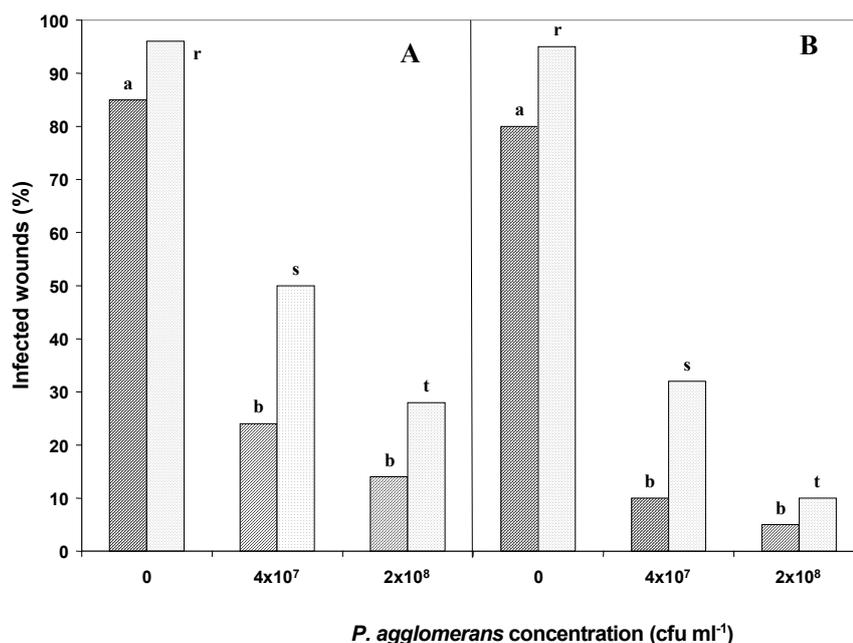
Valencia oranges were wounded and inoculated with *P. digitatum* or *P. italicum* at  $10^6$  spores ml<sup>-1</sup>, as described above about 2 h before treatments were applied. Control treatment consisted of dipping pathogen inoculated oranges in water for 1 minute. Antagonist treatment was applied by dipping oranges for 1 minute in an aqueous solution containing  $2 \times 10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> of *P. agglomerans*. Based on the results of previous research with sodium bicarbonate against green (Smilanick et al., 1999; Palou et al., 1999) and blue (Palou et al., 2000) molds, a concentration of 2% sodium bicarbonate and a 150-seconds immersion period were chosen for the sodium bicarbonate treatment. Finally, bicarbonate and antagonist treatment were combined by first dipping fruits in 2% sodium bicarbonate for 150 s and, after allowing to air-dry at room temperature, by dipping fruit in  $2 \times 10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> *P. agglomerans* suspension for 1 minute. For each storage condition, each treatment was applied to three replicates of 20 oranges each. Fruits were stored in trays. Decayed fruits were recorded after 7 and 14 days storage at 20°C and after 30 and 60 days of cold storage.

**Population dynamics on the orange surface.** The populations of *P. agglomerans* CPA-2 were monitored on wounded and unwounded oranges. Wounded and unwounded fruits were treated with *P. agglomerans* or sodium bicarbonate followed by *P. agglomerans*, respectively, as described in efficacy trials. Fruits were incubated at 20°C and 90% RH, and in long-term cold storage at 3°C and 98% RH. Bacterial populations were monitored after 0, 1, 2, 3, 7, 10 and 15 days on fruits stored at 20°C, and after 3, 7, 15, 30, 45 and 60 days on fruit in cold storage. Four oranges constituted each replicate and twenty-five pieces of peel surface of 2.5 cm<sup>2</sup> from each orange were removed with a cork borer (100 pieces of peel per replicate). In the case of wounded fruits, wounds were included in one of the removed segments of peel. Peel surface segments were shaken in 100 ml sterile phosphate buffer (pH 7) on a rotatory shaker for 20 minutes at 150 rpm and then sonicated for 10 minutes in an ultrasound bath. This final step was used to improve detachment of the antagonist from the orange surface.

Serial 10-fold dilutions of the washings were made with 0.05M phosphate buffer and plated on NYDA medium. After incubation at 25°C in the dark for 24 h, the colonies were counted and their number per cm<sup>2</sup> of fruit surface were calculated for each sample. There were four replicates per treatment.

**Statistical analysis.** Effects of treatments on the incidence of green and blue molds were analysed using an analysis of variance on data transformed to the arcsine of the square root of the proportion of infected fruits. This transformation was used to

improve homogeneity of variances. Statistical significance was judged at the level  $P < 0.05$  and least significant difference (LSD) procedure used for means separation. No statistical differences were found between experimental replications; therefore the results from both different experiments were pooled.



**Fig. 1.** Incidence of green mold (A) and blue mold (B) on wounded Valencia late oranges inoculated with  $10^5$  ( ) and  $10^6$  ( ) spores  $\text{ml}^{-1}$  of *P. digitatum* or *P. italicum* respectively, followed by treatment with different concentrations of *P. agglomerans* after 7 days incubation at 20°C and 90% RH. Within pathogen concentrations, columns with the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ) according to the least significant difference test (LSD).

## Results

**Biocontrol with *P. agglomerans*.** The antagonistic bacteria, *P. agglomerans* CPA-2 strongly inhibited development of *P. italicum* and *P. digitatum* on wounded oranges artificially inoculated at both concentrations tested (Figure 1). The efficacy of  $4 \times 10^7$  and  $2 \times 10^8$   $\text{cfu ml}^{-1}$  of *P. agglomerans* was not statistically different when the

concentration of pathogens used was  $10^5$  cfu ml<sup>-1</sup>, with percentages of infected wound reductions >70% and >85% for green and blue mold respectively.

When antagonistic biocontrol concentrations were increased from  $4 \times 10^7$  to  $2 \times 10^8$  cfu ml<sup>-1</sup>, the efficacy against both pathogens at  $10^6$  cfu ml<sup>-1</sup> was significantly increased achieving reductions in incidences of *P. digitatum* and *P. italicum* of about 71% and 89% respectively.

**Compatibility of *P. agglomerans* with sodium bicarbonate and carbonate solutions.** Culturability of *P. agglomerans* was not reduced after 30 minutes immersion in a 2% sodium bicarbonate solution compared to the control (water) (Table 1). However, bacterial Culturability was reduced more than 1000-fold by 2% sodium carbonate solution.

**Table 1.** Effect of the immersion in sodium bicarbonate and carbonate solutions for 30 minutes on the microbial Culturability of *P. agglomerans* CPA-2.

SOLUTION	CFU ml <sup>-1</sup>	Standard error
Water	$9.15 \times 10^6$	$1.7 \times 10^5$
Sodium bicarbonate 2%	$9.9 \times 10^6$	$5.7 \times 10^5$
Sodium carbonate 2%	$< 1 \times 10^4$	-

CFU; Colony Forming Units

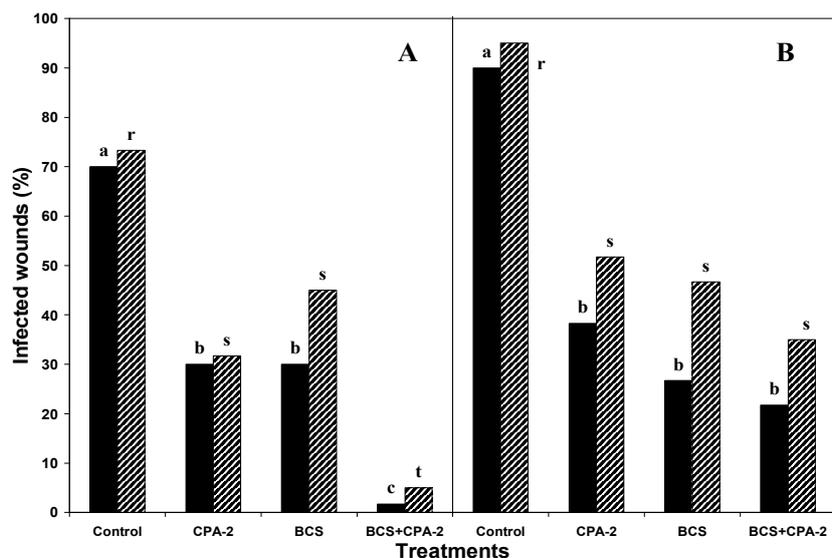
Limit of detection=  $1 \times 10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>

(-); Not possible to calculate Standard Error

**Enhancement of biocontrol by *P. agglomerans* with Sodium Bicarbonate.**

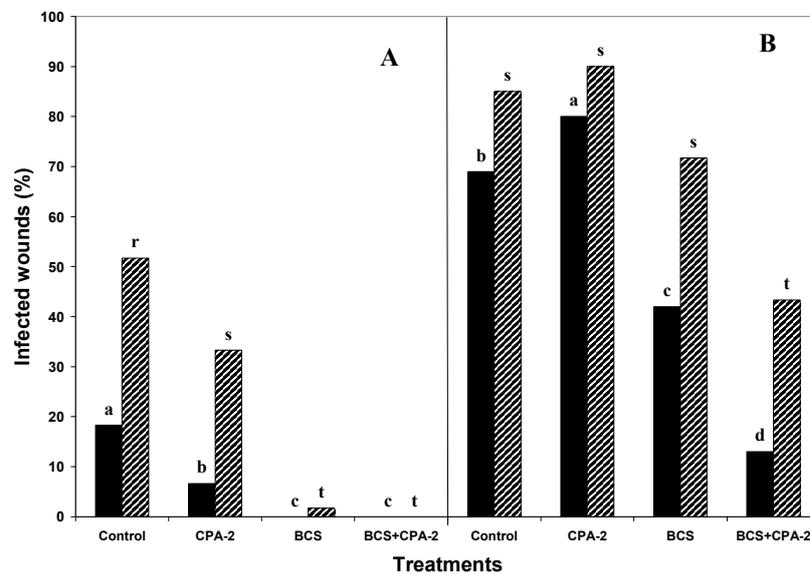
At 20°C, all the assayed treatments (antagonist CPA-2, sodium bicarbonate solution and the combination) significantly decreased decay incidence either on fruits inoculated with *P. digitatum* or *P. italicum*, after 7 or 14 days incubation (Figure 2). After 7 days at 20°C no significant differences were found on green mold incidence on oranges treated with *P. agglomerans* and Sodium Bicarbonate separately (30% of rotted fruits) This incidence represents a decay reduction of 57%. Efficacy was significantly improved when the treatments were combined resulting in 97.6% of decay reduction (1.7% decayed fruits). Similar results were obtained after 14 days incubation. No significant differences among treatments were found for the incidence of blue mold

after 7 days incubation and all treatments reduced decay by more than 57% (38.3%, 26.7% and 21.7% decay incidence for the antagonist, Sodium Bicarbonate and the combination treatments, respectively).



**Fig. 2.** Incidence of green mold (A) and blue mold (B) on wounded Valencia late oranges inoculated with  $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$  of *P. digitatum* or *P. italicum* respectively, followed by treatment with water (control prove), *P. agglomerans* (CPA-2), sodium bicarbonate (BCS) and the combination of sodium bicarbonate and *P. agglomerans* (BCS+CPA-2), after 7 (■) and 14 (▨) days incubation at 20°C and 90% RH. Within times of incubation, columns with the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ) according to the least significant difference test (LSD).

Under cold storage conditions (3°C) the incidence of *P. digitatum* was lower than that of *P. italicum*, with rot incidences of 18% and 52% after 30 and 60 days, (Figure 3). All treatments significantly inhibited *P. digitatum* decay. However, the best treatments were sodium bicarbonate alone, and in combination with the antagonist, where complete (100%) control was achieved after 30 days in cold storage. *P. agglomerans* CPA-2 did not control *P. italicum* under cold storage conditions. The best results were obtained with the combination of sodium bicarbonate and *P. agglomerans*, that controlled blue mold significantly better than each treatment alone, after 30 and 60 days at 3°C. This combined treatment showed a decay incidence of 13% after 30 days in cold storage conditions, that represents a reduction of 81% of blue mold when compared with untreated control.



**Fig. 3.** Incidence of green mold (A) and blue mold (B) on wounded Valencia late oranges inoculated with  $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$  of *P. digitatum* or *P. italicum* respectively, followed by treatment with water (control prove), *P. agglomerans* (CPA-2), sodium bicarbonate (BCS) and the combination of sodium bicarbonate and *P. agglomerans* (BCS+CPA-2), after 30 (■) and 60 (▨) days incubation at 3°C and 98% RH. Within times of incubation, columns with the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ) according to the least significant difference test (LSD).

**Population dynamics on the orange surface.** Initial populations of *P. agglomerans* CPA-2 on wounded oranges were larger than on unwounded ones in 20°C and 3°C storage conditions (Figure 4). The patterns of growth of *P. agglomerans* were similar, whether applied alone or in combination with sodium bicarbonate.

*P. agglomerans* populations increased approximately 18-fold on the surface of wounded oranges stored at 20°C during the first 24 hours. After this the population remained stable until the end of the assay (15 days). These results were identical for the antagonist treatment alone, or when combined with sodium bicarbonate. The pattern on unwounded fruits at 20°C was very similar, but the population levels were lower.

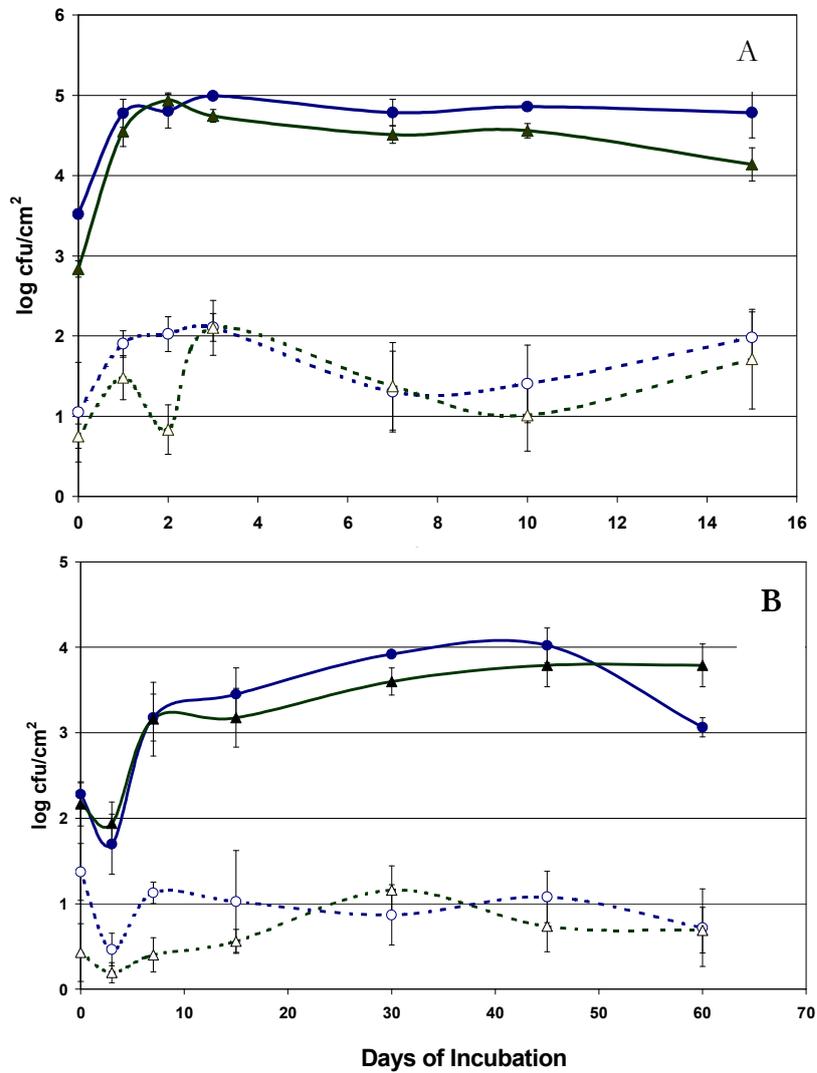
On wounded and unwounded fruits stored at 3°C, populations decreased approximately 4-fold during the first three days. Then, *P. agglomerans* populations strongly increased on wounded fruits and reached a maximum after 45 days of storage. In contrast, on unwounded oranges population increased slower than wounded ones after the first three days and remained stable until the end of the experiment.

## Discussion

This study has demonstrated that *P. agglomerans* CPA-2 which is an effective antagonist to the major postharvest pathogens of pome fruits (Viñas et al. 1999) could also be used on oranges to control *P. digitatum* and *P. italicum*.

Efficacy trials with *P. agglomerans* CPA-2 on artificially wounded and inoculated oranges showed good biocontrol potential against both green and blue molds. The concentration of the antagonist needed to obtain satisfactory disease control ( $2 \times 10^8$  cfu ml<sup>-1</sup>) was lower than the recommended for the commercial available product BIOSAVE, and consequently low enough to be considered viable for commercial use.

The exact mechanism by which *P. agglomerans* CPA-2 reduces decay is not clear. It has been reported that *E. herbicola*, at present classified as *P. agglomerans*, inhibits other plant pathogens by producing acid conditions (Riggle and Klos, 1972; Beer et al., 1984), preemptive colonisation (Wilson et al., 1992; Kearns and Hale, 1996), inducing plant defence (Slade and Tiffin, 1984), parasitism (Brik et al., 1998), competition by nutrients (Goodman, 1967), production of herbicolin (Ishimaru et al., 1988) or antibiotics (Vanneste et al., 1992; Kearns and Hale, 1996).



**Fig. 4.** Population dynamics of *P. agglomerans* CPA-2 on wounded (closed symbols) and unwounded (open symbols) oranges treated with *P. agglomerans* CPA-2 (●, ○) or the combination of sodium bicarbonate and *P. agglomerans* CPA-2 (▲, △) and incubated at 20°C and 90% RH (A) and 3°C and 98% RH (B). Points represent the means of four replications and vertical bars indicate standard errors of the means. Limit of detection: 4 CFU x cm<sup>-2</sup>.

In precedent studies (C. Nunes unpubl.), we found that killed cells of *P. agglomerans* CPA-2 and its culture filtrate had no antagonistic activity against artificially inoculated pathogens. This would suggest that antibiosis is not a mechanism of biocontrol of this strain, but further research needs to be conducted to clarify this point.

Biocontrol agents are poor eradicants of pathogens on citrus and are usually incapable of controlling green mold when fruits are inoculated at least 24 h before treatment (Smilanick and Denis-Arrue, 1992). Control of green and blue molds after inoculation is important because most infections occur through wounds inflicted during or just after harvest (Powell, 1908; Green, 1932; Fawcett, 1936).

Recent work showed that sodium carbonate and sodium bicarbonate solutions, used in a correct way, are as effective as common synthetic fungicides to control green mold on lemons (Smilanick et al., 1995) and oranges (Smilanick et al., 1997; Smilanick et al., 1999). Similar effectiveness was reported against blue mold on oranges (Palou et al., 2000). However, carbonates are poor eradicants and not kill spores (Marloth, 1931). Their inhibitory action is not very persistent, and they do not provide protection of the fruit from re-infection after treatment. Biocontrol antagonists, which residues can persist for long periods, may accomplish this task (Smilanick et al., 1999). A combination between our antagonist and these mentioned carbonate treatments could be a reliable solution to control postharvest diseases on citrus.

*P. agglomerans* CPA-2 is totally tolerant and compatible with sodium bicarbonate solution at 2% on the contrary that with sodium carbonate solution. Differences of pH (pH 8.3 to 8.6 for sodium bicarbonate and 11.3 to 11.5 for sodium carbonate) could explain the different effect of these solutions on the antagonist. Our studies continued with this first combination and results were really promising.

Excellent control of green mold after storage at 3°C and 20°C, was obtained with the combination of treatments. Furthermore, at 20°C, the combination of antagonist with sodium bicarbonate provided significantly better green mold control than these treatments applied separately.

Blue mold incidence after long-term cold storage (3°C and 98% RH) was higher than green mold incidence. These results are in agreement with earlier studies indicating that *P. digitatum* is the most economically important postharvest disease of citrus around the world (Eckert and Brown, 1986b), however, on citrus kept in cold storage for long periods, frequently blue mold prevails because it grows better than green mold below 10°C (Whiteside et al., 1988).

*P. agglomerans* grew well in wounds on oranges, while it had a limited growth on the surface of the fruit. In fact, the Culturability of the biocontrol agent just after treatment is lower on unwounded fruits than on wounded ones. Bull et al. (1997)

found that *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survived poorly on the surface of lemons and oranges but were able to effectively colonize wounds and significantly control green and blue molds. Similar results have been found on apples with yeasts as antagonists by Lima et al. (1998) and Usall et al. (in press). These results suggest that our antagonist grows effectively only in wound sites, which are the point of entry of both studied pathogens. This aspect may be advantageous because, once applied, the biocontrol agent could survive in the microenvironment where it is necessary to prevent disease and decrease to non-detectable or very low concentrations on fruit surface.

The antagonist grew well at 20°C and 3°C. This indicates excellent adaptation of the strain CPA-2 to cold storage temperatures, which is an important feature for postharvest biocontrol agents (Wisniewski and Wilson, 1992). The antagonist only was tolerant to sodium bicarbonate, but was not affected by salt residues inside rind wounds.

Although our experiments showed that *P. agglomerans* was effective to control blue and green mold under laboratory conditions and that its efficacy could be really improved by a combined treatment with sodium bicarbonate, full-scale commercial evaluation is needed as the next step to demonstrate the value of these treatments to the citrus industry. Strain CPA-2 of *P. agglomerans* could be used as effectively on citrus fruits as on pome fruits and the spectrum of activity may be broadened with future research.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Naresh Magan from Cranfield University for his valuable discussion and advice, and the Grup Exportador de Cítrics del Baix Ebre-Montsià (Tarragona, Catalonia, Spain) and Spanish government FEDER funds (2FD97-0492) for their financial support.

## References

- Arras G and D'hallewin G (1994) *In vitro* and *in vivo* control of *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea* in citrus fruit by *Bacillus subtilis* strains. *Agriculture Mediterranean* 124: 56-61.
- Bancroft MC, Gardner PD, Eckert JW and Baritelle JL (1984) Comparison of decay control strategies in California lemon packinghouses. *Plant Disease* 68: 24-28.
- Barger WR (1928) Sodium bi-carbonate as a citrus fruit disinfectant. *California Citrograph* 13: 164-174.
- Beer S, Rundle JR and Wodzinski RS (1984) Interaction between *Erwinia amylovora* and *Erwinia herbicola* *in vitro* in immature pear fruits and in apple blossoms. *Acta Horticulturae* 151: 203-204.
- Brik H, Dyki B and Sobiczewski P (1998) Antagonistic effect of *Erwinia herbicola* on *in vitro* spore germination and germ tube elongation of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Biocontrol* 43: 97-106.
- Bull CT, Stack JP and Smilanick JL (1997) *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue molds of citrus. *Biological Control* 8: 81-88.
- Bus VG, Bongers AJ and Risse LA (1991) Occurrence of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazalil on citrus fruit from different geographic origins. *Plant Disease* 75: 1098-1100.
- Chalutz E and Wilson CL (1990) Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Disease* 74: 134-137.
- Chand-Goyal T, Eckert JW, Droby S and Atkinson K (1998) A method for studying the population dynamics of *Candida oleophila* on oranges in the grove, using a selective isolation medium and PCR technique. *Microbiological Research* 153: 265-270.
- Corral LG., Post LS, and Montville TJ 1988. Antimicrobial activity of sodium bicarbonate. *Journal of Food Science* 53: 981-982.
- De Matos AP (1983) Chemical and microbiological factors influencing the infection of lemons by *Geotrichum candidum* and *Penicillium digitatum*. PhD dissertation. University of California, Riverside, CA.
- Díaz MA and Vila R (1988) El problema de la resistencia a los fungicidas: referencia a la situación en los almacenes españoles de comercialización de cítricos. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 28: 151-158.
- Droby S, Hofstein R, Wilson CL, Wisniewski M, Fridlender B, Cohen L, Weiss B, Daus A, Timar D and Chalutz E (1993) Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agent of postharvest disease of citrus fruit. *Biological Control* 3: 47-52.
- Eckert JW (1990) Impact of fungicide resistance on citrus fruit decay control. In: *Managing resistance to agrochemicals*. (pp 286) American Chemical Society. Washington DC.
- Eckert JW and Brown GE (1986a) Evaluation of postharvest treatments for citrus fruits. In: Hickey KD (ed.) *Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens*. (pp. 92-97) American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN.

- Eckert JW, and Brown GE (1986b). Postharvest citrus diseases and their control. In: Wardowski WF; Nagy S and Grierson W (ed.). Fresh Citrus Fruits. Van Nostrand Reinhold Company Inc. New York, USA.(pp. 315-360).
- Eckert JW and Eaks IL (1989) Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. In: Calavan EC and Carman GE (ed.) The citrus industry. Vol.4 (pp. 179-269) University of California Press. Berkeley.
- Eckert JW, Sievert JR and Ratnayake M (1994) Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. Plant Disease 78: 971-974.
- Fawcett HS (1936) Citrus diseases and their control. Second Edition. McGraw Hill, New York.
- Goodman RN (1967) Protection of apple stem tissue against *Erwinia amylovora* by avirulent strains and three other bacterial species. Phytopathology 57: 22-24.
- Green FM (1932) The infection of oranges by *Penicillium*. Journal of Pomology and Horticultural Sciences 10: 184-215.
- Houck LG (1965) *Penicillium* development in lemons treated with 2,6-dichloro-4-nitroaniline. Plant Disease Report 49: 715-719.
- Huang Y, Deverall BJ and Morris SC (1991) Promotion of infection of orange fruit by *Penicillium digitatum* with strain of *Pseudomonas cepacia*. Phytopathology 81: 615-618.
- Huang Y, Deverall BJ, Morris SC and Wild BL (1993) Biocontrol of postharvest orange diseases by a strain of *Pseudomonas cepacia* under semi-commercial conditions. Postharvest Biology and Technology 3: 293-304.
- Huang Y, Deverall BJ and Morris SC (1995) Postharvest control of green mould on oranges by a strain of *Pseudomonas glathei* and enhancement of its biocontrol by heat treatment. Postharvest Biology and Technology 5: 129-137.
- Hwang L and Klotz LJ (1938) The toxic effect of certain chemical solutions on spores of *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. Hilgardia 12: 1-38.
- Ishimaru CA, Klos EJ and Brubaker RR (1988) Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. Phytopathology 78: 746-750.
- Janisiewicz WJ and Bors B (1995) Development of microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. Applied Environmental Microbiology 61: 3261-3267.
- Kearns LP and Hale CN (1996) Partial characterization of an inhibitory strain of *Erwinia herbicola* with potential as biocontrol agent to *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. Journal of Applied Bacteriology 81: 369-374.
- Klotz LJ (1973) Color Handbook of citrus diseases. University of California, Berkeley.
- Lima G, De Curtis F, Castoria R and De Cicco V (1998) Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. Biocontrol Science and Technology 8: 257-267.
- Lindsay RC (1985) Food additives. In: Fennema OR (ed.) Food Chemistry. Marcel Decker Inc. New York, USA (632 pp.).

- Marloth RH (1931) The influence of hydrogen-ion concentration and of sodium bicarbonate and related substances on *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. *Phytopathology* 21: 169-198.
- Multon JL (1988) Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias. Editorial Acribia. Zaragoza, Spain (680 pp.).
- Palou L, Usall J, Aguilar MJ, Pons J and Viñas I (1999) Control de la podredumbre verde de los cítricos mediante baños con agua caliente y carbonatos sódicos. *Levante Agrícola* 348: 412-421.
- Palou L, Smilanick JL, Usall J and Viñas I (2000) Control of postharvest blue mold of oranges by sodium carbonate and sodium bicarbonate. *Phytopathology* 90: S58 (abstract).
- Parbery IH, Brown VJ and Bofinger VJ (1981) Statistical methods in the analysis of phylloplane populations. In: Blakeman JP (ed.) *Microbial ecology of the phylloplane*. Academic Press Inc., London.
- Powell GH (1908) The decay of oranges while in transit from California. *Bur Plant Ind U S Dep Agric Bull* 123.
- Riggle JH and Klos EJ (1972) Relationship of *Erwinia herbicola* to *Erwinia amylovora*. *Canadian Journal of Botany* 50: 1077-1083.
- Singh V and Deverall BJ (1984) *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Transactions of British Mycological Society* 83: 487-490.
- Slade MB and Tiffin AI (1984) Biochemical and serological characterization of *Erwinia*. *Methods in Microbiology* 15: 227-293.
- Smilanick JL and Denis-Arrue R (1992) Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Disease* 76: 481-485.
- Smilanick JL, Mackey BE, Reese R, Usall J and Margosan DA (1997) Influence of concentration of soda ash, temperature, and immersion period on the control of postharvest green mold of oranges. *Plant Disease* 81: 379-382.
- Smilanick JL, Margosan DA and Henson DJ (1995) Evaluation of heated solutions of sulfur dioxide, ethanol, and hydrogen peroxide to control postharvest green mold of lemons. *Plant Disease*. 79: 742-747.
- Smilanick JL, Margosan DA., Mlikota F, Usall J and Michael IF (1999) Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Disease* 83: 139-145.
- Usall, J, Teixidó N, Torres R, Ochoa de Eribe, X and Viñas I (in press) Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*.
- Vanneste JL, Yu J and Beer SV (1992). Role of antibiotic production by *Erwinia herbicola*-eh252 in biological control of *Erwinia amylovora*. *Journal of Bacteriology* 174: 2785-2796.
- Viñas I, Usall J, Nunes C and Teixidó N (1999) Nueva cepa de la bacteria *Pantoea agglomerans* (Beijerinck, 1998) Gavini, Mergaert, Beji, Mielcareck, Izard, Kerstersy De Ley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de frutas. Solicitud P9900612. Oficina Española de Patentes y Marcas.

- Whiteside JO, Garnsey SM and Timmer LW (ed.) (1988) Compendium of citrus diseases. 2<sup>nd</sup> ed. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN.
- Wilson M, Epton H and Sigeo DC (1992). Interaction between *Erwinia herbicola* and *Erwinia amylovora* on the stigma of Hawthorn blossoms. *Phytopathology* 82: 914-918.
- Wisniewski ME and Wilson CL (1992) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *Hortscience* 27: 94-98.

# Discussió General

---



## 1. Micoflora en camps i centrals cítrícoles

L'objectiu principal d'aquest treball de tesi doctoral era contribuir a fer possible la substitució dels fungicides sintètics emprats per al control de les malalties de postcollita dels fruits cítrics per mètodes de control menys perillosos per a la salut humana i més respectuosos amb el medi ambient. Per assolir aquest objectiu feia falta conèixer prèviament quines són les malalties de major impacte econòmic i calia caracteritzar els aspectes epidemiològics que determinen la seva incidència. A nivell global, el macroclima és el factor bàsic que influeix en aquests aspectes, essent a les zones amb estius molt plujosos on es presenta una major incidència de malalties de postcollita. Així mateix, les malalties predominants no són les mateixes en les zones més humides que en les més seques (Eckert i Eaks, 1989). No obstant això, a nivell local, l'espectre de malalties importants i el nivell de pèrdues que poden ocasionar venen determinats en darrera instància per les condicions climatològiques específiques de cada zona productora concreta i per altres condicionants locals que, com les característiques de les plantacions, el maneig dels fruits o les característiques de la tecnologia de postcollita, influeixen en la qualitat final dels fruits (Arpaia, 1994). Així doncs, la recerca va endegar-se amb la caracterització de les poblacions fúngiques presents als camps i a les centrals de la zona cítrica de Tarragona, on la mandarina clementina, i concretament la varietat "Clemenules", és el conreu cítric de major importància econòmica.

Per a l'estudi de camps es van mostrejar durant dues campanyes consecutives la flora fúngica de l'ambient i de la superfície dels fruits en camps comercials de mandariner "Clemenules" representatius de tota la zona productora. Van diferenciar-se tres zones, Benifallet, Amposta i Alcanar (de nord a sud), i cada campanya van realitzar-se dues determinacions a cada camp, la primera de setembre a desembre i la segona de gener a març. També va mostrejar-se un camp de producció biològica. Pel que fa a les centrals, va mostrejar-se durant dues campanyes consecutives la micoflora de l'ambient i de la superfície d'equips, instal·lacions i infraestructures en vuit magatzems distribuïts per tota la zona. Cada campanya van dur-se a terme tres mostres durant el període de processament de les clementines. Addicionalment, va estudiar-se la presència en cinc centrals de la zona de soques de *Penicillium* spp. resistents als fungicides tiabendazol i imazalil. Per aquest estudi van mostrejar-se l'ambient i les superfícies amb plaques amb medi PDA al qual s'havia afegit la dosi de resistència del fungicida corresponent.

L'estudi de camps va posar de manifest una forta dependència entre la població fúngica total i les condicions microclimatològiques. D'una banda, la

població fúngica total, tant l'ambiental com l'epífita dels fruits, va presentar una gran variabilitat en funció de la campanya, l'època de mostreig i el camp, però, d'altra banda, el nombre total de colònies fúngiques comptabilitzat en cada mostreig de cada camp va correlacionar-se positiva i fortament amb els valors de temperatura, precipitació i humitat relativa mitjos que s'havien donat localment en l'època d'aquell mostreig (valors obtinguts, en cada cas, de l'observatori meteorològic més proper al camp considerat). L'anàlisi de les interaccions significatives entre els factors campanya, mostreig i camp va indicar que, només amb l'excepció de la primera campanya a la zona d'Alcanar, la micoflora epífita total va disminuir significativament en el segon mostreig respecte al primer en tots els camps les dues campanyes. El mateix va observar-se la primera campanya respecte a la micoflora ambiental total. El nombre mig de colònies fúngiques per placa aïllades el primer i segon mostrejors de la superfície dels fruits va ser de 157 i 99 respectivament. Aquesta diferència encara va ser més gran en el cas de la micoflora ambiental: 90 i 16 ufc/placa el primer i segon mostrejors respectivament. No obstant, l'anàlisi no va indicar l'existència de condicions que predisposessin de manera especial alguna de les tres zones considerades a presentar nivells de població fúngica més alts que les altres. Les diferències entre camps van resultar significatives, però sempre van variar en funció de la campanya i el mostreig. Els nivells de micoflora ambiental, però no els de micoflora epífita, van resultar superiors al camp de producció biològica que als camps comercials.

L'evolució de les condicions meteorològiques al llarg del període de recollecció va influir no només en la quantitat sinó també en la composició de la flora fúngica. Tot i que amb independència de la campanya, el mostreig i el camp, el gènere *Cladosporium* va ser l'aïllat més freqüentment tant a l'ambient com a la superfície dels fruits, la seva freqüència, positiva i fortament correlacionada amb la micoflora total ( $r > 0,9$ ), va disminuir en el segon mostreig respecte al primer: la seva freqüència relativa va passar del 90 al 80% en el cas de la micoflora epífita de les mandarines i del 72 al 33% en el cas de la micoflora ambiental. No obstant, malgrat la seva gran abundància i que l'espècie *Cladosporium herbarum* és l'agent causal de la podridura verd-grisosa dels fruits cítrics, aquesta és una malaltia de molt poca incidència (Tuset, 1987) i *Cladosporium* no és un gènere patògen dels cítrics econòmicament important. Altres treballs també assenyalen a *Cladosporium* com un dels gèneres més freqüents en magatzems de cítrics (Díaz i Vila, 1987, 1988) o en camps de fruita dolça (Usall i Viñas, 1989; Teixidó *et al.*, 1999).

Entre els patògens de postcollita amb importància econòmica que van aïllar-se als camps destaquen *Penicillium* i *Rhizopus*. Altres gèneres aïllats foren

*Alternaria*, *Fusarium*, *Epicoccum* o *Humicola*. *Rhizopus* no va trobar-se a l'ambient, però sí de forma generalitzada a la superfície dels fruits. La seva freqüència, no molt elevada, va augmentar en el segon mostreig del 2,0 al 4,7% de plaques amb presència i va ser significativament més alta en fruits de la part baixa dels arbres que de la part alta. Amb l'excepció de *Mucor*, que també va aïllar-se més freqüentment en fruits de la part baixa dels arbres que de la part alta, la freqüència de la resta de gèneres aïllats no va variar significativament entre altures i cares de l'arbre. Contràriament a la de *Cladosporium* i similarment a la de la resta de gèneres fúngics aïllats, la freqüència del gènere *Penicillium* va ser a tots els camps comparativament més alta quan el període de recol·lecció de "Clemenules" ja estava avançat (freqüències relatives mitges de 25,9 i 8,4% a l'ambient i a la superfície dels fruits respectivament) que a principis de campanya (0,6 i 1,2% respectivament). Les poblacions de *Penicillium*, tant a l'ambient com a la superfície dels fruits, van correlacionar-se negativament amb la temperatura. La presència al camp de patògens de postcollita com *P. digitatum* i *P. italicum* contrasta amb el que s'ha observat en altres casos importants com per exemple el de *P. expansum*, causant de la podridura blava de la fruita dolça, el qual pràcticament no es troba al camp durant el període previ a la recol·lecció i infecta els fruits només a les centrals (Usall i Viñas, 1989). En el cas de *P. digitatum* alguns autors han constatat que pot causar podridura al camp mateix (Roth, 1967).

A les centrals, la flora fúngica també va variar en funció de la campanya, el mostreig i la central, donant idea, d'una banda, de la influència que sobre la micoflora present a les centrals van tenir les condicions meteorològiques i les poblacions fúngiques de camp, i, d'una altra, de la influència del disseny dels magatzems i dels distints sistemes de processament dels fruits. Malgrat l'heterogeneïtat, l'elevat nombre de centrals i cambres frigorífiques mostrejades durant l'estudi va permetre treure conclusions estadístiques relatives al conjunt de la zona productora. A l'igual que als camps, *Cladosporium* va ésser, tant a l'ambient com a les superfícies d'equips, instal·lacions i infraestructures, el gènere fúngic més freqüent a l'inici del període d'activitat a les centrals (freqüència relativa mitja del 50-60% en el primer mostreig), però la seva freqüència va anar disminuint al llarg de la campanya. En el segon mostreig, *Penicillium* va esdevenir el gènere més freqüent a l'ambient de totes les zones de les centrals (mitja del 51% de les colònies aïllades), i en el tercer mostreig va ser el gènere més freqüent tant a l'ambient (mitja del 65% de les colònies aïllades) com a les superfícies de les centrals (mitja del 48%). Aquesta acumulació d'espores de *Penicillium* van ser especialment important a les superfícies de les línies de confecció i a l'ambient i a

les superfícies de les cambres frigorífiques. Així doncs, i tenint en compte la manca de patogenicitat del gènere *Cladosporium*, es pot concloure que, entre les possibles malalties de postcollita, les que presenten una major incidència potencial i, en conseqüència, poden causar les pèrdues econòmiques més importants al sector cítricol de l'àrea de Tarragona són les podridures verda i blava, causades respectivament per *P. digitatum* i *P. italicum*. D'altra banda va resultar important, per la seva perillositat quan la fruita no es conserva en fred, la presència generalitzada de *Rhizopus*, especialment a l'ambient de les zones de recepció i confecció de la fruita (16-17% de plaques amb presència) i a les superfícies dels envasos i de les línies de confecció (35-55% de plaques amb presència). En general, la població de *Rhizopus* a les superfícies va mantenir-se més o menys constant al llarg de la campanya de processament de les mandarines.

La distribució dels principals gèneres fúngics aïllats i la seva evolució quantitativa va resultar similar a l'observada per Díaz i Vila (1987, 1988) en cambres frigorífiques i de desverdiment de centrals cítrícoles valencianes. Els resultats suggereixen que l'origen de la contaminació fúngica de les centrals, i particularment la de *P. digitatum* i *P. italicum*, es troba, en les nostres condicions, majoritàriament a la fruita procedent del camp. Els elevats nivells de micoflora en general i de *Penicillium* en particular que van trobar-se als magatzems i l'increment d'aquests nivells que va detectar-se a la majoria de zones a mesura que avançava la campanya, van constituir un clar indicador de què, en general, les tasques de neteja i desinfecció portades a terme a les centrals eren insuficients i/o inadequades. També va constatar-se la manca d'una separació efectiva entre zones "brutes", o zones de rebuda i tractament de la fruita arribada del camp, i zones "netes", o zones de tractament i emmagatzematge de la fruita ja confeccionada. Per exemple, en el tercer mostreig, la freqüència absoluta de *Penicillium* a l'ambient de les zones de recepció, confecció i cambres frigorífiques va ser de 23, 14 i 23 ufc/placa respectivament.

L'estudi de la presència i quantificació de soques de *Penicillium* spp. resistents va indicar que el 33% de les soques del gènere *Penicillium* aïllades de l'ambient de les cinc centrals mostrejades eren resistents al fungicida tiabendazol i el 5% a l'imazalil; de les aïllades de les superfícies van resultar resistents el 35 i el 20% respectivament. Mentre que la quantitat d'espores resistents de *Penicillium* spp. present a l'ambient no va ser significativament diferent entre zones de la central, a les parets de les cambres frigorífiques se'n van localitzar menys que a la resta de superfícies. Van trobar-se soques tant de *P. digitatum* com de *P. italicum* resistents a ambdós fungicides, però la seva freqüència va ser baixa en comparació

amb la d'altres espècies de *Penicillium* resistents. No obstant, aquesta freqüència podria fàcilment incrementar-se els pròxims anys ja que, degut a la manca d'alternatives contrastades, no es preveu una disminució de la pressió de selecció que suposa la utilització comercial continuada d'aquestes matèries actives. Diversos treballs, majoritàriament realitzats a Califòrnia, han posat de manifest l'extraordinària importància econòmica de l'establiment de programes destinats a combatre la proliferació de soques resistents de *Penicillium* spp. a les centrals cítriques (Bancroft *et al.*, 1984; Gardner *et al.*, 1986). En aquest contexte, encara cobra més importància el desenvolupament de sistemes alternatius per al control de les podridures verda i blava.

## 2. Control de les podridures verda i blava amb aigua calenta i carbonats

Un cop establerta la preponderància de les poblacions de *P. digitatum* i *P. italicum* entre la micoflora patogènica present als camps i a les centrals de la zona, i confirmada l'existència a les centrals de soques d'aquestes espècies resistents als fungicides imazalil i tiabendazol, el treball de tesi va enfocar-se cap a la recerca de sistemes alternatius per al control de les podridures verda i blava. A més a més, aquestes podridures són les principals malalties causants de pèrdues econòmiques en postcollita de cítrics a tota l'àrea mediterrània (Pratella *et al.*, 1969; Gutter, 1977; Tuset, 1987).

Entre els possibles sistemes alternatius físics i químics, va posar-se especial èmfasi en l'estudi de l'aigua calenta, de les solucions de carbonat i bicarbonat sòdic i de la integració dels dos tipus de mètodes per tractar-se de tractaments de tecnologia simple, de fàcil disponibilitat i de baix cost. De fet, la utilització dels carbonats havia estat general a Califòrnia des dels anys 30 fins que van ésser desplaçats pels fungicides sintètics (Eckert i Eaks, 1989). No era d'estranyar, doncs, que en els darrers anys, davant la necessitat d'implementar nous sistemes de control, fos d'interès revisar el paper d'aquests tractaments com a sistemes alternatius i aprofundir en el seu estudi. Aquestes investigacions van ésser endegades recentment pel Dr. Smilanick i el seu grup a Califòrnia, amb la determinació de l'efectivitat d'immersions de curta durada en solucions de carbonat sòdic i bicarbonat sòdic per al control de la podridura verda en llimones i taronges (Smilanick *et al.*, 1995, 1997a, 1999). En el present treball es va seguir aquesta línia de recerca avaluant l'impacte dels tractaments contra la podridura blava en taronges i mandarines clementines. A més, per primera vegada van

estudiar-se els efectes combinats d'aquests tractaments i la conservació frigorífica prolongada en el control de les podridures verda i blava en taronges i clementines. Algunes de les experiències van realitzar-se en col.laboració amb el Dr. Smilanick a les instal.lacions de l'Horticultural Crops Research Laboratory (ARS-USDA) de Fresno (Califòrnia).

Banys de 150 s en aigua calenta van resultar efectius per al control de la podridura blava a temperatures massa properes a les que resulten fitotòxiques per excés de calor (50-55°C). Banys de 150 s a 50°C no van controlar satisfactòriament ni la podridura verda ni la podridura blava en mandarines clementines. Aquests resultats, similars als obtinguts per altres investigadors (Smoot i Melvin, 1963; Barkai-Golan i Apelbaum, 1991; Tuset *et al.*, 1996; Smilanick *et al.*, 1997a), i altres aspectes com la poca persistència, impedeixen que, tot i els seus clars avantatges, els tractaments amb aigua calenta puguin implementar-se exitosament a nivell comercial.

Banys de 150 s en solucions al 2 o 3% de carbonat o bicarbonat sòdic a temperatura ambient van controlar satisfactòriament la podridura blava en taronges. La capacitat de control d'aquests tractaments, amb una reducció de la incidència de la malaltia respecte als controls sempre superior al 60%, va ser similar a la que van mostrar contra la podridura verda en anteriors treballs (Smilanick *et al.*, 1995, 1997a, 1999). L'escalfament de les solucions de carbonat sòdic a temperatures moderades (45°C) va incrementar la seva efectivitat fins a superar el 90% de reducció de la malaltia, observant-se un sinergisme entre els efectes del control físic (calor) i del control químic (carbonat sòdic). Aquest sinergisme, observat també a l'escalfar solucions de fungicides sintètics (Barkai-Golan i Apelbaum, 1991; Schirra i Mulas, 1995; Smilanick *et al.*, 1997b), possibilita el control a temperatures més baixes que les necessàries per controlar amb aigua calenta sola, la qual cosa és important per minimitzar els riscos de danys a la pell deguts a un excés de calor. L'efectivitat de les solucions de bicarbonat sòdic a temperatura ambient i de les solucions de carbonat sòdic escalfades a 45°C va resultar, a l'igual que en el cas de l'aigua calenta, inferior en mandarines clementines que en taronges (el percentatge de reducció respecte als controls va ser entre un 10 i un 20% inferior). Els tractaments amb aigua calenta i carbonats sòdics també van controlar de forma efectiva la podridura verda en taronges i mandarines clementines conservades a 3°C durant 2 mesos. L'efectivitat va ser molt elevada durant els primers 21 dies d'emmagatzemament en fred, però a partir d'aquí va anar declinant. En aquests assajos, el control de la podridura blava no va resultar tant efectiu, presumiblement perquè *P. italicum* està millor adaptat que *P.*

*digitatum* al creixement a temperatures baixes (Whiteside *et al.*, 1993). En taronges, al cap de 60 dies de conservació frigorífica i quan la incidència als controls era del 100%, mentre que la incidència de la podridura verda en fruits tractats amb aigua calenta a 45°C, carbonat sòdic a 45°C i bicarbonat sòdic a 20°C era del 60, 22 i 32% respectivament, la de la podridura blava era del 76, 56 i 38% respectivament.

En el conjunt de les experiències va constatar-se que l'acció antifúngica dels tractaments amb aigua calenta, carbonat sòdic i bicarbonat sòdic no era fungicida sinó fungistàtica i no molt persistent. Això va quedar evidenciat pel fet que la incidència de les malalties va augmentar quan el període d'incubació a 20°C de la fruita tractada es va allargar de 7 a 14 dies o, com s'ha indicat, a mesura que transcorria el període de conservació frigorífica. A més, espores de *P. italicum* recuperades del punt d'inoculació de fruits tractats, justament després dels tractaments o bé al cap de 7 dies d'incubació a 20°C, van sembrar-se en plaques Petri amb medi PDA i van desenvolupar colònies. Altres investigacions també il·lustren aquest punt: els banys de curta durada en aigua calenta (Dettori *et al.*, 1996) o en carbonats (Hwang i Klotz, 1938) no van matar les espores de *P. digitatum* que s'hi van exposar directament.

Els assajos amb carbonats contra *P. italicum* van posar de manifest que l'efectivitat dels tractaments depenia de factors tecnològics que, com la concentració de les sals, la temperatura de les solucions o el temps d'immersió, determinen la major o menor presència de residus dels productes sobre els fruits. El mode d'acció és complexe i diferent *in vitro* i *in vivo*; hi juguen un paper la toxicitat de les espècies iòniques implicades, el pH de les solucions i sobretot les interaccions amb olis essencials i/o constituents de l'albedo que es produeixen als punts d'infecció i que fan variar la toxicitat inicial de les sals. Estudis anteriors indicaven que el pH per ell mateix no podia ser responsable de l'activitat tòxica (Hwang i Klotz, 1938; Homma *et al.*, 1981) i que l'espècie catiònica implicada jugava un paper important en la major o menor capacitat de control. Es va treballar amb sals sòdiques perquè ja s'havia demostrat que en assajos *in vivo* contra les podridures dels cítrics causades per *Penicillium*, les sals sòdiques són més efectives que les sals potàssiques o amòniques (Marloth, 1931; Smilanick *et al.*, 1999). No obstant, això no és així en el cas d'altres patògens vegetals o altres sistemes hoste-patogen. Per exemple, el bicarbonat amònic va resultar més tòxic *in vitro* contra *B. cinerea* que els bicarbonats sòdic i potàssic (Palmer *et al.*, 1997) i el bicarbonat potàssic va controlar millor les podridures grisa i negra dels pebrots que els bicarbonats sòdic i amònic (Fallik *et al.*, 1997). Per un altre costat, altres treballs

atribueixen l'acció inhibidora principal de les solucions de carbonats a l'espècie aniònica. Marloth (1931) indica que l'ió bicarbonat podria interferir amb enzims extracel·lulars necessaris per a l'expansió de la membrana i de la paret cel·lular. Corral *et al.* (1988) també assenyalen a l'ió bicarbonat com a responsable de la inhibició *in vitro* de diversos microorganismes; indiquen que podria alterar la permeabilitat de la membrana cel·lular i/o desacoplar la fosforilació oxidativa. Altres mecanismes d'acció que s'han proposat a l'estudiar l'efecte dels carbonats contra distints patògens vegetals són canvis de potencial osmòtic i reducció de la turgència cel·lular que comportarien l'enfonsament de les hifes i l'encongment de les espores (Ziv i Zitter, 1992; Fallik *et al.*, 1997), alliberament de diòxid de carboni, el qual directament pot exercir una acció inhibidora del creixement microbià (Daniels *et al.*, 1985), o canvis en el pH intracel·lular (DePasquale i Montville, 1990). La calor, per la seva banda, podria induir en fruits tractats la producció de substàncies conferidores de resistència al desenvolupament de les malalties, com polímers amb estructura similar a la lignina, fitoalexines com l'escoparona o l'escopoletina, o proteïnes com la quitinasa o la  $\beta$ -1,3 glucanasa (Schirra *et al.*, 2000; Ferguson *et al.*, 2000).

La resposta diferent de cada tipus de fruit cítric a les complexes interaccions que es produeixen en el punt d'infecció degudes a la presència del patogen i a l'acció del calor i dels carbonats podria explicar per què l'efectivitat dels tractaments va resultar inferior en mandarines clementines que en taronges o llimones. Un aspecte que de ben segur condiciona aquesta resposta és la susceptibilitat del fruit a la infecció i aquesta no només depèn de l'espècie de fruit cítric sinó també del cultivar (Eckert i Brown, 1986). Aparentment, la constitució de les mandarines "Clemenules" o característiques morfològiques, bioquímiques o fisiològiques diferencials de la seva pell (es tracta d'un fruit molt fràgil, amb la pell tova i sovint bufada) podrien ser motiu d'una major susceptibilitat dels fruits d'aquest cultivar a les podridures causades per *Penicillium*. D'altra banda, en diverses experiències realitzades tant amb aigua calenta com amb carbonats va observar-se que, dintre de la mateixa espècie i cultivar, l'efectivitat dels tractaments també depenia directament de la susceptibilitat a la infecció de cada partida de fruits. En general, quan aquesta era més gran (indicat per una proporció més alta de fruits podrits als controls), l'efectivitat dels tractaments era més baixa. Això podria relacionar-se amb la condició fisiològica dels fruits, la qual influeix clarament la susceptibilitat. En aquest sentit, Schirra *et al.*, (1998) van demostrar que, en taronges, l'efecte dels tractaments amb aigua calenta sobre les malalties de

postcollita, els danys per fred i les fitotoxicitats per excés de calor, variava significativament amb la data de collita.

Solucions a temperatura ambient de carbonat i de bicarbonat sòdic d'igual concentració van presentar una efectivitat similar, tant en taronges com en mandarines. No obstant, a diferència del que succeeix amb les solucions de carbonat, amb les solucions de bicarbonat no es pot aprofitar el sinergisme amb la calor perquè, en una hipotètica aplicació comercial, l'escalfament dels tancs que contenen la solució provocaria un increment brusc de l'alliberament a l'atmosfera de diòxid de carboni, amb la conseqüent evolució de l'anió bicarbonat cap a àcid carbònic i l'increment del pH de la solució. La disminució de la concentració d'ió bicarbonat comportaria la pèrdua d'efectivitat de la solució, la qual s'hauria de renovar massa sovint. Malgrat això, els tractaments amb bicarbonat presenten altres avantatges respecte als tractaments amb carbonat. D'una banda, les solucions de bicarbonat contenen menys sodi, aspecte important des del punt de vista del tractament de residus i, d'altra banda, degut al seu pH inferior, les solucions de bicarbonat poden higienitzar-se mitjançant l'addició d'hipoclorit sòdic (Smilanick *et al.*, 1999). Un altre aspecte tecnològic important fa referència a que la fruita tractada amb carbonats o altres sals requereix un esbandit superficial amb aigua corrent per evitar taques i dessecacions de la pell, així com deposicions dels productes sobre els raspalls i corretjes de les línies de confecció. Els nostres resultats van indicar que quan aquest esbandit es realitza amb aigua a baixa pressió no influeix negativament sobre la capacitat de control. Una dificultat afegida a la possible implementació comercial dels tractaments amb carbonats és que a les nostres centrals els tractaments fungicides es realitzen amb drénxer o amb dutxa a la línia de confecció i, en general, no es disposa dels tancs adequats per a l'aplicació per immersió.

Tot i la bona capacitat de l'aigua calenta i del carbonat i bicarbonat sòdics per controlar infeccions incipients de *Penicillium*, va constatar-se que degut a la seva manca de persistència i d'activitat antiesporulant, aquests tractaments no podien igualar els nivells de protecció proporcionats pels fungicides de síntesi. Per intentar assolir aquests nivells caldria la integració d'aquests tractaments amb altres sistemes físics, químics i biològics complementaris de la seva acció. L'avaluació d'aquestes combinacions es presenta com un camp de recerca força interessant per a futures investigacions. A la part final d'aquest treball de tesi es va considerar la combinació de banys de curta durada en solucions de carbonats sòdics amb l'aplicació posterior d'agents de control biològic. Presumiblement, la llarga persistència que pot

proporcionar el control biològic mitjançant microorganismes antagònics podria complementar satisfactòriament l'acció dels carbonats.

### 3. Control de les podridures verda i blava amb altres substàncies de baixa toxicitat

Paral·lelament a l'estudi amb els carbonats sòdics, es va intentar identificar altres additius alimentaris o substàncies de baixa toxicitat efectives en el control de les podridures verda i blava. Van assajar-se en proves d'efectivitat *in vivo* sencilles i ràpides distintes concentracions d'unes quaranta substàncies de famílies químiques molt diverses, majoritàriament sals sòdiques, potàssiques, càlciques i amòniques d'àcids inorgànics (clorurs, fosfats, molibdats, etc.) i orgànics (formats, acetats, propionats, sorbats, benzoats, citrats, lactats, tartrats, ascorbats, etc.). Les proves van realitzar-se *in vivo* (amb taronges) perquè s'ha demostrat que la toxicitat *in vitro* dels productes antifúngics pot variar substancialment quan són assajats sobre fruita inoculada artificialment (Hwang i Klotz, 1938; Wisniewski *et al.*, 1998; Smilanick *et al.*, 1999). A partir d'una solució mare esterilitzada per filtració, es preparaven solucions estèrils de cada substància a les concentracions que es volien assajar. A continuació s'aplicaven 50 µl de la solució a la mateixa incisió de la pell de les taronges en la que prèviament s'havia inoculat el patogen.

Van seleccionar-se aquelles substàncies i concentracions capaces de reduir la incidència de les malalties en un 50% o més respecte als controls. Aquestes van ser les següents: lactat càlcic, lactat sòdic, propionat sòdic, acetat sòdic, acetat potàssic, benzoat sòdic, benzoat potàssic, sorbat potàssic, molibdat sòdic i molibdat amònic. Amb aquestes substàncies van realitzar-se assajos a petita escala (s'utilitzaren de 40 a 125 fruits per tractament) que van consistir en banyar en solucions calentes durant un període curt de temps (120 o 150 s) fruita prèviament inoculada amb *P. digitatum* o *P. italicum*. Les solucions van escalfar-se a temperatures no fitotòxiques (40-53°C) per tal d'aprofitar el sinergisme amb el calor demostrat en els assajos amb carbonats i també posat de manifest per altres autors (Barkai-Golan i Apelbaum, 1991; Schirra i Mulas, 1995).

En aquests assajos, el sorbat potàssic, el benzoat sòdic i els molibdats amònic i sòdic van ser els compostos d'efectivitat més elevada. Banys de 120 s en solucions 0,2 M de sorbat potàssic o benzoat sòdic a pH natural van reduir en més del 75% la incidència de la podridura verda en taronges i llimones. Barrejes d'aquestes sals entre elles o amb altres sals orgàniques no van millorar significativament l'efectivitat, la qual va resultar més alta en llimones que en taronges. La capacitat de

control del sorbat potàssic ja havia estat observada per altres investigadors (Smoot i McCornack, 1978; Hall, 1988), així com la major efectivitat de les solucions calentes en comparació amb les solucions a temperatura ambient (Kitagawa i Kawada, 1984; Wild, 1987). Hall (1988) va trobar que l'efectivitat del benzoat sòdic en el control de la podridura verda era similar a la del sorbat potàssic. A part de la temperatura i la concentració, el pH també influeix sobre l'efectivitat de les solucions de sals orgàniques, ja que la seva activitat antimicrobiana és deguda primàriament a la forma no dissociada de l'àcid (Davidson, 1997). Trobant-se el pH natural de les solucions de sorbat potàssic i benzoat sòdic al voltant de 7,5 o 8, podria ser que un cop dintre de les microferides de la pell, on s'inicien les infeccions de *Penicillium*, la seva activitat inhibidora es veïés afavorida pel pH més baix de l'albedo del fruit (al voltant de 5 o 5,5 en el cas de taronges i llimones).

Les solucions calentes de molibdat amònic i de molibdat sòdic van resultar efectives en taronges contra les podridures verda i blava a concentracions molt baixes (1,0 i 24,2 mM, respectivament); concentracions superiors podien resultar fitotòxiques i tacar la pell dels fruits. En aquests assajos, la temperatura de les solucions va influir més sobre la capacitat de control que la concentració de les sals. A 48°C va observar-se un sinergisme entre els efectes de la temperatura i la concentració, però a 53°C les solucions de molibdat, tant sòdic com amònic, no van millorar significativament el control de les malalties respecte a l'aigua calenta sola. Ambdós molibdats poden utilitzar-se com a adobs, tant d'aplicació al sòl com foliar. En el cas del molibdat amònic, a diferència del molibdat sòdic, alguns treballs ja havien indicat que presentava certa activitat antifúngica contra patògens vegetals (Singh i Khanna, 1969). En les nostres experiències, l'avantatge del molibdat amònic respecte al molibdat sòdic va ser que va resultar efectiu a concentracions considerablement més baixes. Altres investigacions en el nostre laboratori (Nunes *et al.*, 2001a) van demostrar que el molibdat amònic controla satisfactòriament les podridures causades per *P. expansum*, *B. cinerea* i *R. stolonifer* en pomes, probablement a l'interferir en el procés metabòlic de fosforilació/desfosforilació. D'altra banda, el molibdat amònic usat com a tractament complementari va millorar l'efectivitat de l'antagonista *Candida sake* CPA-1 en el biocontrol d'aquestes malalties de la fruita dolça (Nunes *et al.*, 2001b).

Malgrat la bona efectivitat dels tractaments amb sorbat potàssic, benzoat sòdic, molibdat amònic i molibdat sòdic, va comprovar-se que, a l'igual que els banys amb carbonats, no es tractava de tractaments fungicides, sinó fungistàtics i no massa persistents. En tots els casos, la incidència de les malalties en fruits tractats va ser més alta quan va avaluar-se al cap de 14 dies d'incubació a 20°C que quan va

avaluar-se al cap de 7 dies. Així doncs, per aprofitar el potencial d'aquestes substàncies com a possibles components d'un programa de control de malalties lliure de fungicides sintètics, caldria continuar aquesta línia de recerca investigant la compatibilitat d'aquests tractaments amb altres mètodes que, com per exemple el control biològic, poguessin complementar la seva acció.

#### **4. Efecte de la conservació frigorífica en atmosferes ozonitzades sobre el desenvolupament de les podridures verda i blava**

Aquestes experiències van realitzar-se a l'UC Kearney Agricultural Center de Parlier (Califòrnia) i a les instal·lacions d'una central citrícola comercial de Fresno (Califòrnia). Els objectius principals eren avaluar l'efecte d'una exposició continuada o intermitent a concentracions de 0,3 o 1,0 ppm (v/v) d'ozó gasós sobre el desenvolupament de *P. digitatum* i *P. italicum* en fruits cítrics inoculats artificialment i conservats en fred durant 1 o 2 mesos. El nivell de 0,3 ppm correspon a la concentració màxima, establerta per l'administració dels EUA, a la qual un individu pot estar exposat al gas durant 15 min sense patir irritacions ni altres efectes nocius. Un nivell d'1,0 ppm podria resultar adequat per al tractament de fruits en contenidors d'exportació, els quals romanen tancats tot el temps que dura l'enviament al país de destinació. La idea d'una exposició intermitent en cicles nit-dia va ser proposada per Shimizu *et al.* (1982) amb la intenció de minimitzar l'exposició al gas d'operaris i treballadors.

L'exposició continuada de taronges "Valencia Late" inoculades amb  $1 \times 10^6$  espores  $\text{ml}^{-1}$  de *P. digitatum* o *P. italicum* a 0,3 ppm d'ozó durant 1 mes de conservació frigorífica a 5°C no va reduir la incidència final de les podridures verda i blava respecte a l'observada en fruits control emmagatzemats a la mateixa temperatura en una cambra sense ozó. No obstant, va retardar el desenvolupament de les malalties al voltant d'una setmana i va reduir el diàmetre de les lesions aproximadament en un 30%. A més, va inhibir el creixement aeri normal del miceli i l' esporulació dels patògens sense produir danys visibles a la pell dels fruits. Transcorreguts 28 dies d'emmagatzemament a 3°C, les taronges tractades amb ozó presentaven masses de miceli blanquinós sense conidis, distribuïdes irregularment per l'àrea de la lesió. Resultats similars van obtenir-se en experiències realitzades en una central comercial amb llimones. Llimones "Eureka" inoculades amb *P. italicum* i conservades durant 2 mesos a 4,5°C sota un cicle d'aplicació de 0,3 ppm d'ozó durant 12 h a la nit i no aplicació durant el dia, van desenvolupar la

podridura però el patogen va créixer més lentament i la seva taxa d' esporulació es va veure significativament reduïda. El mateix va constatar-se amb taronges i llimones inoculades amb *P. digitatum* o *P. italicum* i exposades de forma contínua a 1,0 ppm d'ozó durant una conservació frigorífica de 15 dies a 10°C en un contenidor d'exportació.

És important destacar que el control de l' esporulació va ser conseqüència dels efectes combinats de l'ozó i de les baixes temperatures de conservació, ja que quan mostres de fruita inoculada es van emmagatzemar sota 0,3 ppm d'ozó a 20°C, van observar-se tant el creixement miceliar aeri com l' esporulació. A més a més, l'efecte va ser transitori i produït pel contacte directe amb el gas, com va demostrar el fet que el patogen va esporular normalment en fruita que va retirar-se de la cambra ozonitzada i va incubar-se 2 dies a 20°C. Harding (1968) també va observar un bon control de l' esporulació de *Penicillium* en fruits exposats continuament a 1 ppm d'ozó gasós durant 15 dies. Els resultats obtinguts coincideixen amb les observacions de Klotz (1936) i Hopkins i Loucks (1949) pel que fa a la incapacitat de l'ozó de controlar infeccions establertes en ferides superficials de la pell dels fruits cítrics. Igualment, altres investigadors han comprovat aquesta incapacitat treballant amb altres patògens de ferida i altres fruits com pomes, préssecs o raïm (Schomer i McColloch, 1948; Spalding, 1966, 1968). Per tant, els tractaments amb ozó no poden considerar-se en cap cas possibles substituïts dels tractaments amb fungicides sintètics que s'utilitzen avui dia a les centrals cítriques. Aparentment, les estructures fúngiques situades a l'interior de microferides de la pell romanen protegides de l'acció oxidant de l'ozó degut a l'escassa capacitat de penetració del gas, a la disminució de la seva concentració provocada per la seva reacció amb el teixit vegetal o amb substàncies químiques extracel·lulars, o a la presència al teixit del fruit de substàncies antioxidants. Alguns d'aquests factors també podrien explicar la incapacitat d'altres compostos antioxidants, com per exemple l'hipoclorit sòdic o el diòxid de clor, per controlar patògens de ferida (Spotts i Peters, 1980; Adaskaveg, 1995).

El control o la reducció de l' esporulació és un resultat important ja que pràcticament la totalitat de la fruita que es conserva en fred ha estat prèviament tractada amb fungicides i una proporció variable de les espores que es produeixen poden ser espores resistents. A nivell comercial, evitar la proliferació d'aquestes espores podria contribuir a allargar la vida útil dels fungicides sintètics encara disponibles. A més a més, la reducció de la càrrega d'espores present a l'ambient i a les superfícies de les centrals podria disminuir el grau de recontaminació dels fruits i contribuir a limitar la incidència de malalties. Assajos addicionals amb taronges

van demostrar que l'exposició a 0,3 ppm d'ozó durant 7 dies a 20°C no va afectar la susceptibilitat dels fruits a la infecció per part de *P. digitatum* o *P. italicum*. D'altra banda, l'ozó va mostrar-se molt efectiu en la reducció dels nivells d'etilè presents en un contenidor frigorífic d'exportació.

Com a perspectiva de futur resultaria interessant avaluar l'aplicació d'ozó gasós durant la conservació frigorífica en combinació amb tractaments alternatius realitzats prèviament a la conservació, com per exemple tractaments físics amb calor o banys amb carbonat o bicarbonat sòdic, sorbat potàssic o altres substàncies de baixa toxicitat. Presumiblement, la conservació en una atmosfera ozonitzada podria complementar de manera efectiva la manca d'activitat antiesporulant d'aquests tractaments, la qual cosa podria ésser particularment útil en centrals amb problemes greus de proliferació de soques de *Penicillium* spp. resistents.

## 5. Control biològic de les podridures verda i blava

En el treball de tesi va posar-se especial èmfasi en el control biològic de les podridures verda i blava mitjançant l'aplicació en postcollita de microorganismes antagonics, concretament llevats i bacteris.

Per a la selecció dels possibles antagonistes van dissenyar-se proves *in vivo* d'efectivitat a nivell primari que permetessin identificar de manera ràpida i sencilla els candidats més efectius entre el gran nombre de microorganismes aïllats. La font principal de microorganismes va ser la flora epifita i endofita de taronges i mandarines recol·lectades en camps de la zona de Tarragona. Van realitzar-se proves *in vivo*, amb taronges i mandarines clementines, pels avantatges que presenten respecte a les proves *in vitro* (Smilanick, 1994). Només 3 dels 212 microorganismes assajats en aquestes proves (1,4%) van superar el llindar d'un 50% de reducció de la incidència de la malaltia respecte als controls, la qual cosa va confirmar que molt pocs dels microorganismes presents de forma natural als fruits cítrics tenen, aplicats com a tractament de postcollita, una certa capacitat antagonica. En els treballs de Wilson i Chalutz (1989) només el 3,3% dels llevats i bacteris avaluats *in vivo* contra *P. digitatum* i *P. italicum* van ésser seleccionats com a antagonistes potencials.

L'antagonista més efectiu va ser la soca CPA-2 del bacteri *Pantoea agglomerans* (prèviament classificat com *Erwinia herbicola*), que havia estat aïllada de la superfície de pomes "Golden Delicious" i que era efectiva en el control biològic de malalties importants de postcollita de la fruita dolça, com les podridures blava i grisa, causades respectivament per *P. expansum* i *B. cinerea*

(Viñas *et al.*, 1999). Aquesta soca va assajar-se contra *P. digitatum* i *P. italicum* en taronges i mandarines clementines per determinar les concentracions d'antagonista efectives en el control de distintes concentracions dels patògens. Posteriorment van realitzar-se proves d'efectivitat en distintes condicions d'emmagatzemament dels fruits tractats, incloent la conservació frigorífica. A més, també va determinar-se la dinàmica poblacional del bacteri en fruits tractats i emmagatzemats tant a temperatura ambient com en condicions de fred.

En taronges i a la concentració de  $2 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>, l'antagonista va mostrar una efectivitat força elevada inclús contra la densitat més alta dels patògens ( $1 \times 10^6$  espores ml<sup>-1</sup>). Amb aquesta densitat d'inòcul fúngic, la reducció de la incidència de les podridures verda i blava transcorreguts 7 dies d'incubació a 20°C va ser concretament del 70 i 90% respectivament. L'únic cas en què el bacteri va mostrar-se inefectiu va ser en el control de la podridura blava en condicions de conservació frigorífica (3°C durant 1 o 2 mesos). En mandarines "Clemenules", la capacitat de control de la soca CPA-2 va resultar inferior que en taronges. Així, quan l'antagonista es va aplicar a la concentració de  $2 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> en mandarines prèviament inoculades amb  $1 \times 10^6$  espores ml<sup>-1</sup> de *P. digitatum* o *P. italicum*, la reducció de la incidència de les podridures verda i blava al cap de 7 dies d'incubació a 20°C va ser del 60 i 70% respectivament. Aquesta efectivitat més baixa dels tractaments en el cas de les mandarines "Clemenules" també es va fer palesa en els treballs amb aigua calenta i carbonats sòdics i ja s'ha discutit anteriorment. En assajos de biocontrol preliminaris, tant amb taronges com amb mandarines, també es va observar que l'efectivitat de l'antagonista depenia de l'estat fisiològic dels fruits: la capacitat antagonica era inferior en fruits vells, en un estat de maduresa més avançat o prèviament sotmesos a un període llarg de conservació frigorífica.

Un cop aplicat, el bacteri es multiplicava i mantenia les seves poblacions en ferides de la pell, tant en fruits incubats a 20°C durant 14 dies com en fruits conservats a 3°C durant 60 dies. En canvi, les poblacions en fruits sense ferides van ser sensiblement inferiors, indicant una escassa capacitat de creixement a la superfície dels fruits. Aquesta característica, ja observada en altres agents de biocontrol (Bull *et al.*, 1997; Usall *et al.*, 2001), és una característica desitjable perquè així l'antagonista només prolifera allà on és realment requerit per exercir la seva activitat inhibidora. El mecanisme d'acció de la soca *P. agglomerans* CPA-2 és, de moment, desconegut, però la modificació de l'ambient en el punt d'infecció (Riggle i Klos, 1972), la competició pels nutrients (Goodman, 1967), el parasitisme (Brik *et al.*, 1998) o la producció d'antibiòtics (Kearns i Hale, 1996), són

mecanismes que s'han proposat per explicar l'activitat de *P. agglomerans* com a agent de biocontrol contra diversos patògens vegetals.

Per tal de millorar el nivell d'efectivitat de l'antagonista, es va plantejar la seva combinació amb l'aplicació de carbonats. Recentment s'han encetat a tot el món nombroses línies de recerca amb l'objectiu d'integrar el control biològic amb altres mètodes de control i algunes d'aquestes línies contemplen la utilització dels carbonats (Wisniewski *et al.*, 1998; Smilanick *et al.*, 1999; Daus *et al.*, 2000). En assajos *in vitro*, *P. agglomerans* CPA-2 va resultar totalment compatible amb el bicarbonat sòdic, però no amb el carbonat sòdic. En taronges inoculades artificialment, la incidència tant de la podridura verda com de la blava es va veure significativament reduïda quan el tractament de biocontrol va complementar-se amb un tractament previ amb bicarbonat sòdic al 2%. El tractament combinat va resultar especialment efectiu contra *P. digitatum* en taronges incubades a 20°C durant 7 dies (98% de reducció de la incidència de la malaltia respecte als controls) i contra *P. italicum* en fruits conservats a 3°C durant 1 mes (al voltant del 80% de reducció). El tractament amb bicarbonat sòdic no va afectar en cap cas la viabilitat de l'antagonista en les ferides de la pell i les dinàmiques poblacionals en fruits prèviament tractats amb bicarbonat no van diferir significativament de les observades en fruits tractats només amb l'antagonista.

A la vista dels resultats positius obtinguts fins ara al laboratori, pot considerar-se a la soca CPA-2 de *P. agglomerans* com un agent de control biològic força prometedor per al control de les malalties causades per *Penicillium* en postcollita de cítrics. Cal tenir present, a més, que també resulta efectiu contra patògens importants en postcollita de fruita dolça (Viñas *et al.*, 1999). La seva elevada capacitat antagònica, la seva tolerància a les baixes temperatures, la seva compatibilitat amb altres mètodes de control i el seu ampli espectre d'acció són característiques desitjables molt importants, que obren la porta a una possible implementació comercial de tractaments basats en l'aplicació d'aquest microorganisme antagònic. Els següents són estudis que es podrien realitzar en un futur per seguir valorant la seva idoneïtat com a tractament de postcollita: assajar la seva efectivitat en cítrics i fruita dolça a una escala més gran i en condicions comercials, avaluar noves possibilitats de combinació amb altres sistemes alternatius de control físics i/o químics, avaluar la seva efectivitat en altres sistemes hoste-patogen per ampliar el seu espectre d'activitat, estudiar més profundament el seu mecanisme d'acció i determinar la seva formulació comercial òptima.

## 6. Referències bibliogràfiques

- Adaskaveg, J.E. 1995. Postharvest sanitation to reduce decay of perishable commodities. *Perishables Handling Newslett.* 82:21-25.
- Arpaia, M.L. 1994. Preharvest factors influencing postharvest quality of tropical and subtropical fruit. *HortScience* 29: 982-985.
- Bancroft, M.N., Gardner, P.D., Eckert, J.W., Baritelle, J.L. 1984. Comparison of decay strategies in California lemon packinghouses. *Plant Dis.* 68: 24-28.
- Barkai-Golan, R., Apelbaum, A. 1991. Synergistic effects of heat and sodium o-phenyl phenate treatments to inactivate *Penicillium* spores and suppress decay in citrus fruits. *Trop. Sci.* 31: 229-233.
- Brik, H., Dyki, B., Sobiczewski, P. 1998. Antagonistic effect of *Erwinia herbicola* on in vitro spore germination and germ tube elongation of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Biocontrol* 43: 97-106.
- Bull, C.T., Stack, J.P., Smilanick, J.L. 1997. *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue molds of citrus. *Biol. Control* 8: 81-88.
- Corral, L.G., Post, L.S., Montville, T.J. 1988. Antimicrobial activity of sodium bicarbonate. *J. Food Sci.* 53: 981-982.
- Daniels, J.A., Krishnamurthi, R., Rizvi, S.H. 1985. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *J. Food Protect.* 48: 532-537.
- Daus, A., Weiss, B., Cohen, L., Shachnai, A., Porat, R., Droby, S. 2000. Integration of yeast biocontrol agents, hot water, and food additives for the control of postharvest diseases of citrus fruit. *Proc. Int. Soc. Citriculture Congress 2000*, 3-7 desembre, Orlando, FL, EUA . p. 165 (resum).
- Davidson, P.M. 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. A: *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.). American Society Microbiology Press, Washington D.C., EUA. pp. 520-556.
- DePasquale, D.A., Montville, T.J. 1990. Mechanism by which ammonium bicarbonate and ammonium sulfate inhibit mycotoxigenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3711-3717.
- Dettori, A., D'hallewin, G., Aggabio, M., Marceddu, S., Schirra, M. 1996. SEM studies on *Penicillium italicum* – 'Star Ruby' grapefruit interactions as affected by fruit hot water dipping. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 2: 1158-1163.
- Díaz, M.A., Vila, R. 1987. Estudio de flora fúngica presente en cámaras frigoríficas de conservación de frutos cítricos. *Alimentaria* 183: 77-82.
- Díaz, M.A., Vila, R. 1988. Evolución de la flora fúngica durante la desverdización en almacenes españoles de comercialización de cítricos. I. Flora presente en las cámaras de desverdización. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 28: 501-508.
- Eckert, J.W., Brown, G.E. 1986. Postharvest citrus diseases and their control. A: *Fresh Citrus Fruits*. Wardowski, W.F., Nagy, S., Grierson, W. (Eds.). AVI Publishing Co. Inc., Westport, CT, EUA. pp. 315-360.

- Eckert, J.W., Eaks, I.L. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. A: The Citrus Industry. Vol. 5. Reuter, W., Calavan, E.C., Carman, G.E. (Eds.). Pub. 3326, University of California Press, Berkeley, CA, EUA . pp. 179-260.
- El Ghaouth, A., Smilanick, J.L., Wilson, C.L. 2000. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. Postharvest Biol. Technol. 19: 103-110.
- Fallik, E., Grinberg, S., Ziv, O. 1997. Potassium bicarbonate reduces postharvest decay development on bell pepper fruits. J. Hort. Sci. 72: 35-41.
- Ferguson, I.B., Ben-Yehoshua, S., Mitcham E.J., McDonald, R.E., Lurie, S. 2000. Postharvest heat treatments: introduction and workshop summary. Postharvest Biol Technol. 21: 1-6.
- Gardner, P.D., Eckert, J.W., Baritelle, J.L., Bancroft, M.N. 1986. Management strategies for control of *Penicillium* decay in lemon packinghouses: economic benefits. Crop Prot. 5: 26-32.
- Goodman, R.N. 1967. Protection of apple stem tissue against *Erwinia amylovora* by avirulent strains and three other bacterial species. Phytopathology 57: 22-24.
- Gutter, Y. 1977. Problems of decay in marketing citrus fruits: strategy and solutions around the world. Proc. Int. Soc. Citriculture 1: 242-244.
- Hall, D.J. 1988. Comparative activity of selected food preservatives as citrus postharvest fungicides. Proc. Fla. State Hort. Soc. 101: 184-187
- Harding, P.R. Jr. 1968. Effect of ozone on *Penicillium* mold decay and sporulation. Plant Dis. Rep. 52: 245-247.
- Homma, Y., Arimoto, Y., Misato, T. 1981. Effects of emulsifiers and surfactants on the protective values of sodium bicarbonate. J. Pestic. Sci. 6: 145-153.
- Hopkins, E.F., Loucks, K.W. 1949. Has ozone any value in the treatment of citrus fruit for decay? Citrus Ind. 30: 5-7, 22.
- Hwang, L., Klotz, L.J. 1938. The toxic effect of certain chemical solutions on spores of *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. Hilgardia 12: 1-38.
- Kearns, L.P., Hale, C.N. 1996. Partial characterization of an inhibitory strain of *Erwinia herbicola* with potential as biocontrol agent to *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. J. Appl. Bacteriol. 81: 369-374.
- Kitagawa, H., Kawada, K. 1984. Effect of sorbic acid and potassium sorbate on the control of sour rot of citrus fruits. Proc. Fla. State Hort. Soc. 97: 133-135.
- Klotz, L.J. 1936. Nitrogen trichloride and other gases as fungicides. Hilgardia 10: 27-52.
- Marloth, R.H. 1931. The influence of hydrogen-ion concentration and of sodium bicarbonate and related substances on *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. Phytopathology 21: 169-198.
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Ochoa de Eribe, X., Viñas, I. 2001a. Control of postharvest decay of apples by preharvest and postharvest application of ammonium molybdate. Pest. Manag. Sci. En premsa.
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Viñas, I. 2001b. Improvement of *Candida sake* biocontrol activity against postharvest decay by the addition of ammonium molybdate. J. Appl. Microbiol. En premsa.

- Palmer, C.L., Horst, R.K., Langhans, R.W. 1997. Use of bicarbonates to inhibit in vitro colony growth of *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 81: 1432-1438.
- Pratella, G.C., Tonini, G., Cessari, A. 1969. Postharvest disease problems of Italian citrus fruit. Proc. First Int. Citrus Symp. 3: 1317-1323.
- Riggle, J.H., Klos, E.J. 1972. Relationship of *Erwinia herbicola* to *Erwinia amylovora*. Can. J. Bot. 50: 1077-1083.
- Roth, G. 1967. Citrus fruit decay in South Africa caused by *Penicillium digitatum* Sacc. Phytopathol. Z. 58: 383-396.
- Schirra, M., D'Hallewin, G., Ben-Yehoshua, S., Fallik, E. 2000. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. Postharvest Biol. Technol. 21: 71-85.
- Schirra, M., D'hallewin, G., Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L. 1998. Seasonal susceptibility of Tarocco oranges to chilling injury as affected by hot water and thiabendazole postharvest dip treatments. J. Agric. Food Chem. 46: 1177-1180.
- Schirra, M., Mulas, M. 1995. Improving storability of "Tarocco" oranges by postharvest hot-dip fungicide treatments. Postharvest Biol. Technol. 6: 129-138.
- Schomer, H.A., McColloch, L.P. 1948. Ozone in relation to storage of apples. USDA Circular 765.
- Shimizu, Y., Makinott, J., Sato, J., Iwamoto, S. 1982. Preventing rot of Kyoho grapes in cold storage with ozone. Res. Bull. Aichi Agric. Res. Cent. 14: 225-238.
- Singh, R.S., Khanna, R.N. 1969. Effect of certain inorganic chemicals on growth and spore germination of *Alternaria tenuis* Auct., the fungus causing core rot of mandarin oranges in India. Mycopath. Mycol. Appl. 37: 89-96.
- Smilanick, J.L. 1994. Strategies for the isolation and testing of biocontrol agents. A: Biological Control of Postharvest Diseases: Theory and Practice. Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL, EUA. pp. 25-42.
- Smilanick, J.L., Mackey, B.E., Reese, R., Usall, J., Margosan, D.A. 1997a. Influence of concentration of soda ash, temperature, and immersion period on the control of postharvest green mold of oranges. Plant Dis. 81: 379-382.
- Smilanick, J.L., Margosan, D.A., Henson, D.J. 1995. Evaluation of heated solutions of sulfur dioxide, ethanol, and hydrogen peroxide to control postharvest green mold of lemons. Plant Dis. 79: 742-747.
- Smilanick, J.L., Margosan, D.A., Mlikota, F., Usall, J., Michael, I.F. 1999. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. Plant Dis. 83: 139-145.
- Smilanick, J.L., Michael, I.F., Mansour, M.F., Mackey, B.E., Margosan, D.A., Flores, D., Weist, C.F. 1997b. Improved control of green mold of citrus with imazalil in warm water compared with its use in wax. Plant Dis. 81: 1299-1304.
- Smoot, J.J., McCornack, A.A. 1978. The use of potassium sorbate for citrus decay control. Proc. Fla. State Hort. Soc. 91: 119-122.
- Smoot, J.J., Melvin, C.F. 1963. Hot water as a control for decay of oranges. Proc. Fla. State Hort. Soc. 76: 322-327.
- Spalding, D.H. 1966. Appearance and decay of strawberries, peaches, and lettuce treated with ozone. ARS-USDA, Marketing Research Report 756.

- Spalding, D.H. 1968. Effects of ozone atmospheres on spoilage of fruits and vegetables after harvest. ARS-USDA, Marketing Research Report 801.
- Spotts, R.A., Peters, B.B. 1980. Chlorine and chlorine dioxide for control of d'Anjou pear decay. *Plant Dis.* 64:1095-1097.
- Teixidó, N., Usall, J., Magan, N., Viñas, I. 1999. Microbial population dynamics on Golden Delicious apples from bud to harvest and effect of fungicide applications. *Ann. Appl. Biol.* 134: 109-116.
- Tuset, J.J. 1987. Podredumbres de los Frutos Cítricos. Conselleria d'Agricultura i Pesca, Generalitat Valenciana, València, Espanya.
- Tuset, J.J., Hinarejos, C., Mira, J.L., Martínez-Jávega, J.M. 1996. Tratamientos térmicos a los frutos cítricos para el control de las enfermedades de la post-recolección. *Levante Agrícola* 337: 342-347.
- Usall, J., Teixidó, N., Torres, R., Ochoa de Eribe, X., Viñas, I. 2001. Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 21: 147-156.
- Usall, J., Viñas, I. 1989. Contaminació fúngica en pre-recol·lecció en pomes destinades a frigoconservació de la comarca del Segrià. *Frut* 4: 250-253.
- Viñas, I., Usall, J., Nunes, C., Teixidó, N. 1999. Nueva cepa de la bacteria *Pantoea agglomerans* (Beijerinck, 1998) Gavini, Mergaert, Beji, Mielcareck, Izard, Kersters y De Ley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de frutas. Solicitud P9900612. Oficina Española de Patentes y Marcas, Madrid, Espanya.
- Whiteside, J.O., Garnsey, S.M., Timmer, L.W. (Eds.). 1993. Compendium of Citrus Diseases. 2a ed. APS Press, St. Paul, MN, EUA .
- Wild, B.L. 1987. Fungicidal activity of potassium sorbate against *Penicillium digitatum* as affected by thiabendazole and dip temperature. *Sci. Hortic.* 32: 41-47.
- Wilson, C.L., Chalutz, E. 1989. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Sci. Hortic.* 40: 105-112.
- Wisniewski, M.E., Droby, S., El Ghaouth, A., Wilson, C.L. 1998. The use of food additives to control postharvest decay and enhance biocontrol activity of yeast antagonists. *Proc. Int. Congress Plant Pathol.* 9-16 agost, Edinburg, Escòcia. Abstract 5.2.61 (resum).
- Ziv, O., Zitter, T.A. 1992. Effects of bicarbonate and film-forming polymers on cucurbit foliar diseases. *Plant Dis.* 76: 513-517.

## Conclusions

---



## Conclusions

1. *Cladosporium* és el gènere fúngic més abundant en camps de mandariner “Clemenules” de la zona citrícola de Tarragona durant tot el període de recol·lecció. La seva freqüència, correlacionada positivament amb la temperatura, la precipitació i la humitat relativa ambiental, va disminuir del 90 al 80% a la superfície dels fruits i del 72 al 33% a l'ambient en el període de desembre a febrer (segon mostreig) respecte al període de setembre a desembre (primer mostreig).
2. *Penicillium*, el gènere patogènic més important en postcollita, es troba present al camp durant tot el període de recol·lecció. La seva freqüència relativa va incrementar-se de l'1 al 8% a la superfície dels fruits i de l'1 al 26% a l'ambient al segon mostreig respecte al primer.
3. El gènere *Rhizopus*, patogen potencialment important en postcollita, no es troba present a l'ambient dels camps però sí sobre la pell dels fruits. El percentatge de plaques amb presència va ser del 2% al primer mostreig i del 5% al segon.
4. La micoflora epífita de les mandarines no és significativament diferent entre fruits situats a distintes altures o cares de l'arbre, amb l'excepció dels gèneres *Rhizopus* i *Mucor*, que són més abundants a la part baixa dels arbres que a l'alta.
5. La contaminació fúngica present a les centrals citrícoles de la zona de Tarragona té majoritàriament el seu origen en la micoflora epífita dels fruits que arriben del camp.
6. *Cladosporium*, amb una freqüència relativa del 48% a l'ambient i del 61% a la superfície d'equips i instal·lacions, va ser el gènere fúngic més abundant a les centrals durant els mesos d'octubre i novembre (primer mostreig). *Penicillium*, amb freqüències relatives mitges del 65 i 48% respectivament, va ser el gènere més abundant en el període de desembre a febrer (segon i tercer mostrejos). La seva població va anar augmentant al llarg de la campanya, particularment a les superfícies de les línies de confecció i a l'ambient i superfícies de les cambres frigorífiques.

7. La presència de *Rhizopus* a les centrals és generalitzada i es manté més o menys constant durant la campanya. La seva freqüència és especialment important als envasos i a les superfícies de les línies de confecció (35 i 55% de plaques amb presència respectivament).
8. Les tasques de neteja i desinfecció que es realitzen a les centrals són, en general, insuficients i/o inefectives per reduir satisfactòriament els nivells de contaminació fúngica.
9. El 33% de les soques de *Penicillium* spp. aïllades de l'ambient de les centrals i el 35% de les aïllades de les superfícies van ser resistents al fungicida tiabendazol. El 5 i el 20% respectivament van ser resistents a l'imazalil. Del total de soques de *Penicillium* spp. resistents al tiabendazol, el 15% van ser de *P. digitatum* i el 31% de *P. italicum*. De les resistents a l'imazalil, el 2% van ser de *P. digitatum* i el 6% de *P. italicum*.
10. Banys de 150 s en aigua calenta a 50-55°C són efectius en el control de la podridura blava, causada per *P. italicum*, en taronges inoculades artificialment i incubades a 20°C durant 7 dies. No obstant, en alguns casos aquestes temperatures resulten fitotòxiques per excés de calor.
11. Banys de 150 s en solucions a temperatura ambient de carbonat sòdic o de bicarbonat sòdic al 2 o 3% redueixen en un 50-70% la incidència de la podridura blava en taronges inoculades artificialment i incubades a 20°C durant 7 dies.
12. L'escalfament de les solucions de carbonat sòdic a 45°C incrementa la seva capacitat de reducció de la podridura blava en un 20-30% respecte a les solucions a temperatura ambient o a 35°C sense causar danys per calor a la pell de les taronges.
13. Banys de 150 s en aigua calenta a 45°C, carbonat sòdic al 3% a 45°C i bicarbonat sòdic al 3% a 20°C redueixen en un 88, 99 i 94% respectivament la incidència de la podridura verda i en un 73, 86 i 94% respectivament la de la podridura blava en taronges inoculades artificialment i emmagatzemades a 3°C durant 21 dies. No obstant, l'efectivitat de tots tres tractaments va declinant a mesura que s'allarga el període de conservació en fred.

14. L'efectivitat dels tractaments amb aigua calenta, carbonat sòdic i bicarbonat sòdic en taronges i mandarines clementines inoculades artificialment i emmagatzemades a 3°C durant 2 mesos resulta entre un 10 i un 35% inferior contra la podridura blava que contra la podridura verda.
15. L'esbandit amb aigua a baixa pressió dels fruits cítrics tractats amb carbonat o bicarbonat sòdic no influeix negativament en la capacitat de control d'aquests tractaments.
16. L'efectivitat dels tractaments amb aigua calenta, carbonat sòdic i bicarbonat sòdic contra les podridures verda i blava resulta entre un 10 i un 20% inferior en mandarines clementines que en taronges.
17. Banys de 120 s en solucions aquoses calentes (40,6°C) de sorbat potàssic o benzoat sòdic 0,2 M a pH natural redueixen al voltant del 70% la incidència de la podridura verda en taronges inoculades artificialment i incubades a 20°C durant 7 dies. La reducció en llimones és superior al 80%. Barrejes d'aquestes sals entre elles o amb altres sals orgàniques no milloren significativament la capacitat de control.
18. Banys de 150 s en solucions 1,0 mM de molibdat amònic o 24,2 mM de molibdat sòdic escalfades a 48°C són efectius en el control de les podridures verda i blava en taronges inoculades artificialment i incubades a 20°C durant 7 dies. La immersió en solucions més concentrades resulta fitotòxica i taca la superfície de la fruita.
19. L'acció antifúngica dels tractaments amb aigua calenta, carbonat sòdic, bicarbonat sòdic, sorbat potàssic, benzoat sòdic, molibdat amònic i molibdat sòdic no és fungicida sinó fungistàtica i no molt persistent.
20. L'exposició continuada o intermitent a 0,3 o 1,0 ppm (v/v) d'ozó gasós de taronges i llimones inoculades artificialment durant la seva conservació frigorífica a 5°C inhibeix l' esporulació de *P. digitatum* i *P. italicum* sense produir fitotoxicitats visibles a la pell dels fruits. L'exposició al gas retarda el desenvolupament de les malalties però no redueix la seva incidència.
21. Només 3 dels 212 microorganismes assajats en proves d'efectivitat *in vivo* per al control biològic de la podridura verda en taronges i mandarines clementines van reduir la incidència de la malaltia respecte al control en un percentatge igual o superior al 50%.

22. La soca CPA-2 del bacteri *Pantoea agglomerans*, aplicada a la concentració de  $2 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>, redueix la incidència de les podridures verda i blava en un 70 i 90% respectivament en taronges inoculades artificialment i incubades a 20°C durant 7 dies. No obstant, l'antagonista no controla la podridura blava en condicions de conservació frigorífica a 3°C.
23. L'efectivitat del biocontrol de *P. agglomerans* CPA-2 en mandarines clementines resulta entre un 10 i un 20% inferior a l'efectivitat en taronges.
24. *P. agglomerans* CPA-2 es multiplica i manté les seves poblacions en ferides de la pell, tant en fruits incubats a 20°C durant 14 dies com en fruits conservats a 3°C durant 60 dies. Per contra, el seu creixement sobre la superfície de fruits intactes és molt limitat.
25. La viabilitat, tant *in vitro* com *in vivo*, de *P. agglomerans* CPA-2 no es veu afectada pel contacte de les cèl·lules amb una solució al 2% de bicarbonat sòdic. En canvi, la viabilitat *in vitro* es veu reduïda més de 1000 vegades després del contacte amb una solució al 2% de carbonat sòdic.
26. La immersió en una solució a temperatura ambient de bicarbonat sòdic al 2% combinada amb l'aplicació de *P. agglomerans* CPA-2 a una concentració de  $2 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> incrementa en un 25-30%, respecte a cada un dels tractaments per separat, la capacitat de control de la podridura verda en taronges inoculades artificialment i incubades a 20°C durant 7 dies i en un 30-60% la de la podridura blava en taronges conservades a 3°C durant 1 mes.

## Conclusiones

1. *Cladosporium* es el género fúngico más abundante en campos de mandarino “Clemenules” de la zona citrícola de Tarragona durante todo el periodo de recolección. Su frecuencia, correlacionada positivamente con la temperatura, la precipitación y la humedad relativa ambiental, disminuyó del 90 al 80% en la superficie de los frutos y del 72 al 33% en el ambiente en el periodo de diciembre a febrero (segundo muestreo) respecto al periodo de septiembre a diciembre (primer muestreo).
2. *Penicillium*, el género patogénico más importante en post-cosecha, se encuentra presente en el campo durante todo el periodo de recolección. Su frecuencia relativa se incrementó del 1 al 8% en la superficie de los frutos y del 1 al 26% en el ambiente en el segundo muestreo respecto al primero.
3. El género *Rhizopus*, patógeno potencialmente importante en post-cosecha, no se localiza en el ambiente de los campos pero sí sobre la piel de los frutos. El porcentaje de placas con presencia fue del 2% en el primer muestreo y del 5% en el segundo.
4. La micoflora epífita de las mandarinas no es significativamente diferente entre frutos situados en distintas alturas o caras del árbol, con la excepción de los géneros *Rhizopus* y *Mucor*, que abundan más en la parte baja de los árboles que en la alta.
5. La contaminación fúngica presente en las centrales citrícolas de la zona de Tarragona tiene mayoritariamente su origen en la micoflora epífita de los frutos llegados del campo.
6. *Cladosporium*, con una frecuencia relativa del 48% en el ambiente y del 61% en la superficie de equipos e instalaciones, fue el género fúngico más abundante en las centrales durante los meses de octubre y noviembre (primer muestreo). *Penicillium*, con frecuencias relativas medias del 65 y 48% respectivamente, fue el género más abundante en el periodo de diciembre a febrero (segundo y tercer muestreos). Su población fue aumentando a lo largo de la campaña, particularmente en las superficies de las líneas de confección y en el ambiente y las superficies de las cámaras frigoríficas.

7. La presencia de *Rhizopus* en las centrales es generalizada y se mantiene más o menos constante durante toda la campaña. Su frecuencia es especialmente importante en los envases y en las superficies de las líneas de confección (35 y 55% de placas con presencia respectivamente).
8. Las tareas de limpieza y desinfección que se realizan en las centrales son, en general, insuficientes y/o inefectivas para reducir satisfactoriamente los niveles de contaminación fúngica.
9. El 33% de las cepas de *Penicillium* spp. aisladas del ambiente de las centrales y el 35% de las aisladas de las superficies fueron resistentes al fungicida tiabendazol. El 5 y el 20% respectivamente fueron resistentes al imazalil. Del total de cepas de *Penicillium* spp. resistentes al tiabendazol, el 15% fueron de *P. digitatum* y el 31% de *P. italicum*. De las resistentes al imazalil, el 2% fueron de *P. digitatum* y el 6% de *P. italicum*.
10. Baños de 150 s en agua caliente a 50-55°C son efectivos en el control de la podredumbre azul, causada por *P. italicum*, en naranjas inoculadas artificialmente e incubadas a 20°C durante 7 días. No obstante, en algunos casos estas temperaturas resultan fitotóxicas por exceso de calor.
11. Baños de 150 s en soluciones a temperatura ambiente de carbonato sódico o de bicarbonato sódico al 2 o 3% reducen en un 50-70% la incidencia de la podredumbre azul en naranjas inoculadas artificialmente e incubadas a 20°C durante 7 días.
12. El calentamiento de las soluciones de carbonato sódico a 45°C incrementa su capacidad de reducción de la podredumbre azul en un 20-30% respecto a las soluciones a temperatura ambiente o a 35°C sin causar daños por calor en la piel de las naranjas.
13. Baños de 150 s en agua caliente a 45°C, carbonato sódico al 3% a 45°C y bicarbonato sódico al 3% a 20°C reducen en un 88, 99 y 94% respectivamente la incidencia de la podredumbre verde y en un 73, 86 y 94% respectivamente la de la podredumbre azul en naranjas inoculadas artificialmente y almacenadas a 3°C durante 21 días. No obstante, la efectividad de los tres tratamientos va disminuyendo a medida que se prolonga el periodo de conservación en frío.

14. La efectividad de los tratamientos con agua caliente, carbonato sódico y bicarbonato sódico en naranjas y mandarinas clementinas inoculadas artificialmente y almacenadas a 3°C durante 2 meses resulta entre un 10 y un 35% inferior contra la podredumbre azul que contra la podredumbre verde.
15. El aclarado con agua a baja presión de los frutos cítricos tratados con carbonato o bicarbonato sódico no influye negativamente en la capacidad de control de estos tratamientos.
16. La efectividad de los tratamientos con agua caliente, carbonato sódico y bicarbonato sódico contra las podredumbres verde y azul resulta entre un 10 y un 20% inferior en mandarinas clementinas que en naranjas.
17. Baños de 120 s en soluciones acuosas calientes (40,6°C) de sorbato potásico o benzoato sódico 0,2 M a pH natural reducen en un 70% la incidencia de la podredumbre verde en naranjas inoculadas artificialmente e incubadas a 20°C durante 7 días. La reducción en limones es superior al 80%. Mezclas de estas sales entre ellas o con otras sales orgánicas no mejoran significativamente la capacidad de control.
18. Baños de 150 s en soluciones 1,0 mM de molibdato amónico o 24,2 mM de molibdato sódico calentadas a 48°C son efectivos en el control de las podredumbres verde y azul en naranjas inoculadas artificialmente e incubadas a 20°C durante 7 días. La inmersión en soluciones más concentradas resulta fitotóxica y mancha la superficie de la fruta.
19. La acción antifúngica de los tratamientos con agua caliente, carbonato sódico, bicarbonato sódico, sorbato potásico, benzoato sódico, molibdato amónico y molibdato sódico no es fungicida sino fungistática y no muy persistente.
20. La exposición continuada o intermitente a 0,3 o 1,0 ppm (v/v) de ozono gaseoso de naranjas y limones inoculados artificialmente durante su conservación frigorífica a 5°C inhibe la esporulación de *P. digitatum* y *P. italicum* sin causar fitotoxicidades visibles en la piel de los frutos. La exposición al gas retrasa el desarrollo de las enfermedades pero no reduce su incidencia.

21. Únicamente 3 de los 212 microorganismos ensayados en pruebas de efectividad *in vivo* para el control biológico de la podredumbre verde en naranjas y mandarinas clementinas redujeron la incidencia de la enfermedad respecto al control en un porcentaje igual o superior al 50%.
22. La cepa CPA-2 de la bacteria *Pantoea agglomerans*, aplicada a la concentración de  $2 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>, reduce la incidencia de las podredumbres verde y azul en un 70 y 90% respectivamente en naranjas inoculadas artificialmente e incubadas a 20°C durante 7 días. No obstante, el antagonista no controla la podredumbre azul en condiciones de conservación frigorífica a 3°C.
23. La efectividad del biocontrol de *P. agglomerans* CPA-2 en mandarinas clementinas resulta entre un 10 y un 20% inferior a su efectividad en naranjas.
24. *P. agglomerans* CPA-2 se multiplica y mantiene sus poblaciones en heridas de la piel, tanto en frutos incubados a 20°C durante 14 días como en frutos conservados a 3°C durante 60 días. Por contra, su crecimiento sobre la superficie de frutos intactos es muy limitado.
25. La viabilidad, tanto *in vitro* como *in vivo*, de *P. agglomerans* CPA-2 no se ve afectada por el contacto de las células con una solución al 2% de bicarbonato sódico. Por contra, su viabilidad *in vitro* se ve reducida más de 1000 veces después del contacto con una solución al 2% de carbonato sódico.
26. La inmersión en una solución a temperatura ambiente de bicarbonato sódico al 2% combinada con la aplicación de *P. agglomerans* CPA-2 a una concentración de  $2 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> incrementa en un 25-30%, respecto a cada uno de los tratamientos aplicados por separado, la capacidad de control de la podredumbre verde en naranjas inoculadas artificialmente e incubadas a 20°C durante 7 días y en un 30-60% la de la podredumbre azul en naranjas conservadas a 3°C durante 60 días.

---

## Conclusions

1. *Cladosporium* is the fungal genus more frequently found in “Clemenules” mandarin orchards in Tarragona during the entire harvesting period. Its frequency, correlated positively with the temperature, rainfall and relative humidity, decreased from 90 to 80% in the environment and from 72 to 33% on the fruit surface in the period from December to February (second sampling) compared to the period from September to December (first sampling).
2. *Penicillium*, the most important postharvest pathogenic genus, is found in the orchards during the entire harvesting period. In the second sampling its frequency increased from 1 to 8% in the environment and from 1 to 26% on the fruit surface.
3. *Rhizopus*, a potentially important postharvest pathogen, is not found in the orchard environment but is found on the fruit surface. It was found in 2 and 5% of the plates in the first and the second samplings, respectively.
4. With the exception of *Rhizopus* and *Mucor*, which are more frequent on fruits located in the lower area in the tree canopy, mandarin epiphyte populations are not significantly different on fruits located at different heights and sides in the tree canopy.
5. Fungal contamination in Tarragona citrus packinghouses mainly originates in the epiphyte fungal populations present on the fruit arriving from the orchards.
6. *Cladosporium* was the fungal genus more frequently present in both the ambient (48%) and surfaces of equipment and facilities (61%) in citrus packinghouses in the period of October and November (first sampling). *Penicillium* was the most frequent genus in the period from December to February (second and third samplings). Its relative frequency was 65 and 48% in the ambient and on surfaces, respectively. Its population increased over the commercial season, particularly on the surfaces of packinglines and in the ambient and surfaces of cold storage rooms.
7. *Rhizopus* is commonly present in the packinghouses. Its population does not vary significantly during the season. Its frequency is especially high on the surfaces of bins and packinglines (presence in 35 and 55% of the plates, respectively).

8. In general, cleaning and disinfection tasks are insufficient and/or ineffective to reduce fungal contamination in the packinghouses.
9. Thirty-three percent of the strains of *Penicillium* spp. isolated from the ambient in the packinghouses and 35% of the strains isolated from the surfaces were thiabendazole-resistant strains. Five percent and 20% were imazalil-resistant strains, respectively. Fifteen percent of the thiabendazole-resistant *Penicillium* biotypes were identified as *P. digitatum* and 31% as *P. italicum*. Two percent of the imazalil-resistant *Penicillium* biotypes were identified as *P. digitatum* and 6% as *P. italicum*.
10. Immersion in water at 50-55°C for 150 s effectively controls citrus postharvest blue mold on artificially inoculated oranges incubated at 20°C for 7 days. However, these temperatures could cause heat damage to the fruit.
11. Immersion in 2 or 3% sodium carbonate or sodium bicarbonate solutions at room temperature for 150 s reduces from 50 to 70% the incidence of blue mold on artificially inoculated oranges incubated at 20°C for 7 days.
12. Heating sodium carbonate solutions to 45°C improves their effectiveness against blue mold from 20 to 30% compared to treatments at room temperature or 35°C. Heated solutions do not cause rind heat injury.
13. Immersion for 150 s in hot water at 45°C, 3% sodium carbonate at 45°C and 3% sodium bicarbonate at room temperature reduces the incidence of green mold by 88, 99 and 94%, respectively, and the incidence of blue mold by 73, 86 and 94%, respectively, on artificially inoculated oranges stored at 3°C for 21 days. The effectiveness of all three treatments, however, decreases when the cold storage period increases.
14. The effectiveness of hot water, sodium carbonate and sodium bicarbonate treatments on artificially inoculated oranges and clementine mandarins after storage at 3°C for 2 months is from 10 to 35% lower against green mold than against blue mold.
15. Rinsing sodium carbonate- or sodium bicarbonate-treated fruit with fresh water at low pressure does not negatively influence the effectiveness of the treatment.

16. The effectiveness of hot water, sodium carbonate and sodium bicarbonate treatments against green and blue molds is from 10 to 20% lower on clementine mandarins than on oranges.
17. Immersion in 0.2 M potassium sorbate or sodium benzoate aqueous solutions at 40.6°C and natural pH for 120 s reduces by 70% the incidence of green mold on artificially inoculated oranges incubated at 20°C for 7 days. On lemons, disease reduction is higher than 80%. Mixtures of these salts by themselves or with other organic salts do not significantly improve the effectiveness of the treatment.
18. Immersion in 1.0 mM ammonium molybdate or 24.2 mM sodium molybdate aqueous solutions at 48°C for 150 s effectively controls both green and blue molds on artificially inoculated oranges incubated at 20°C for 7 days. Treatments at higher concentrations can be phytotoxic and stain the surface of the fruit.
19. The antifungal activity of the treatments with hot water, sodium carbonate, sodium bicarbonate, potassium sorbate, sodium benzoate, ammonium molybdate and sodium molybdate is not fungicidal but fungistatic and not very persistent.
20. Continuous or intermittent exposure of artificially inoculated oranges and lemons to 0.3 or 1.0 ppm (v/v) ozone during cold storage at 5°C inhibits the sporulation of *P. digitatum* and *P. italicum* without causing noticeable ozone phytotoxicity to the fruit. Ozone exposure delays disease development but it does not reduce disease incidence.
21. Only 3 out of 212 microorganisms tested in *in vivo* effectiveness screenings for the biological control of green mold reduced decay incidence by 50% or more compared to the control fruit.
22. The strain CPA-2 of the bacterium *Pantoea agglomerans*, applied at a concentration of  $2 \times 10^8$  cfu ml<sup>-1</sup>, reduces the incidence of green and blue molds on artificially inoculated oranges incubated at 20°C for 7 days by 70 and 90%, respectively. The antagonist, however, does not control blue mold on fruit stored at 3°C.
23. The biocontrol effectiveness of *P. agglomerans* CPA-2 is from 10 to 20% lower on clementine mandarins than on oranges.

24. *P. agglomerans* CPA-2 is able to grow and maintain its populations inside rind wounds either on fruits incubated at 20°C for 14 days or on fruits held at 3°C for 60 days. The bacterium, on the contrary, shows a very limited growth on the surface of intact fruit.
25. The viability both *in vitro* and *in vivo* of *P. agglomerans* CPA-2 is not affected by the contact of cells with a 2% sodium bicarbonate solution. In contrast, its viability *in vitro* is reduced about 1000-fold by the contact of cells with a 2% sodium carbonate solution.
26. The immersion for 60 s in a 2% sodium bicarbonate solution combined with the application of *P. agglomerans* CPA-2 at a concentration of  $2 \times 10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> increases the control of green mold by each treatment from 25 to 30% on artificially inoculated oranges incubated at 20°C for 7 days, and the control of blue mold from 30 to 60% on oranges stored at 3°C for 30 days.

## Altres publicacions derivades



Les següents són altres publicacions o comunicacions a congressos o simposis derivades totalment o en part dels treballs d'aquesta tesi doctoral:

- Palou, L., Crisosto, C.H., Smilanick, J.L., Adaskaveg, J.E., and Zoffoli, J.P. 2001. Evaluation of the effect of ozone exposure on decay development and fruit physiological behaviour. *Acta Hort.* 553: 429-430.
- Palou, L., Smilanick, J.L., Usall, J., and Viñas, I. 2001. Hot water and sodium carbonate to control postharvest green and blue molds of clementine mandarins. *Phytopathology* 91: S69 (Resum).
- Palou, L., Smilanick, J.L., Usall, J., and Viñas, I. 2000. Control of postharvest blue mold of oranges by sodium carbonate and sodium bicarbonate. *Phytopathology* 90: S58 (Resum).
- Teixidó, N., Usall, J., Nunes, C., Smilanick, J.L., Palou, L., and Viñas, I. 2000. Biological control of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on citrus fruits with *Pantoea agglomerans*. Proc. 9th Int. Soc. Citriculture Congress 2000: P405 (Resum).
- Usall, J., Teixidó, N., Palou, L., Pons, J., Muñoz, J.A., and Viñas, I. 2000. Combination of hot water and sodium carbonate treatments to control green and blue moulds on mandarins. Proc. 9th Int. Soc. Citriculture Congress 2000: P440 (Resum).
- Lamarca, N., Asensio, A., Palou, L., Muñoz, J.A., Usall, J., Teixidó, N., Viñas, I. 2000. Combinación de los tratamientos de agua caliente y bicarbonato sódico para el control de *P. digitatum* y *P. italicum* en cítricos. V Simposio Nacional y II Ibérico de Post-recolección de Frutos y Hortalizas. 21-23 septiembre, Puerto de la Cruz, Tenerife, Islas Canarias, España. Sección 3, póster 4 (Resum).
- Palou, L., Usall, J., Aguilar, M.J., Pons, J., Viñas, I. 1999. Control de la podredumbre verde de los cítricos mediante baños con agua caliente y carbonatos sódicos. *Levante Agrícola* 348: 412-421.
- Usall, J., Pons, J., Palou, L., Viñas, I., Smilanick, J.L. 1999. Alternativas a los productos químicos de síntesis en post-cosecha de cítricos en España y EE UU. *Phytoma España* 110: 58-64.
- Palou, L. 1999. Doenças de pós-colheita dos citrinos. *Frutas Legumes e Flores* 46: 50-51 (en portuguès).

Usall, J., Palou, L., Aguilar, M. J., and Viñas, I. 1998. Hot water treatments for the control of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* in oranges. Proc. MADRID98-COST915: Physiological and Technological Aspects of Gaseous and Thermal-Treatments of Fresh Fruit and Vegetables. Madrid, Spain. En premsa.

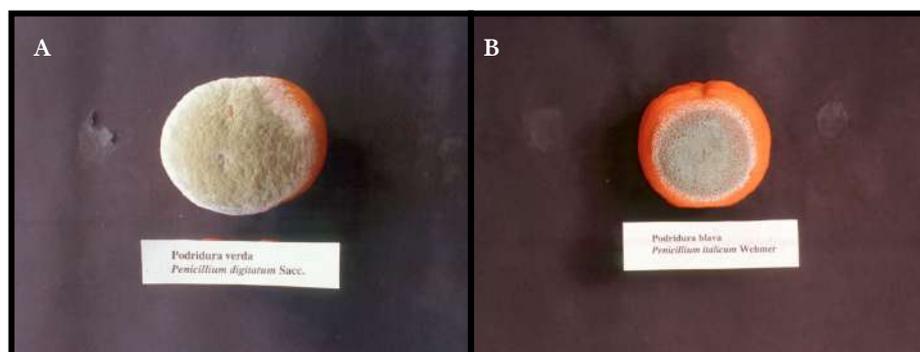
Palou, L., Usall, J., Cerdà, M.C., Viñas, I. 1997. Control de *Penicillium digitatum* Sacc. en post-recolecció de cítrics mediante baños de bicarbonato sódico. Phytoma España 90: 195-196.

Cerdà, M.C., Palou, L., Fons, E., Usall, J., Viñas, I. 1997. Determinación de la contaminación fúngica en líneas de cítrics para el establecimiento de puntos críticos de control. Phytoma España 90: 197-198.

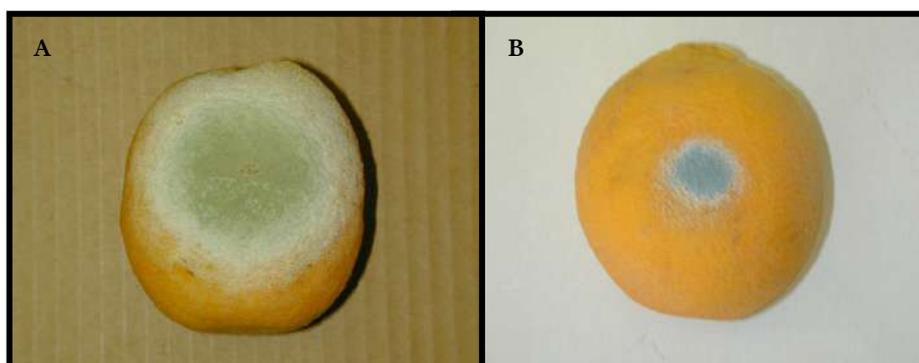
## Annex Fotogràfic

---





**Fotografia 1.** **A.** Podridura verda causada per *Penicillium digitatum* en mandarina clementina. **B.** Podridura blava causada per *Penicillium italicum* en mandarina clementina.



**Fotografia 2.** **A.** Podridura verda causada per *Penicillium digitatum* en taronja. **B.** Podridura blava causada per *Penicillium italicum* en taronja.





**Fotografia 3.** Inoculació de taronges amb una suspensió de  $1 \times 10^6$  espores  $\text{ml}^{-1}$  de *Penicillium digitatum*.



**Fotografia 4.** Banyadora d'acer inoxidable de 172 l de capacitat, amb resistència elèctrica de 9 kW i termostat, utilitzada per als assajos amb aigua calenta i solucions de carbonat o bicarbonat sòdic realitzats al Centre UdL-IRTA de Lleida.



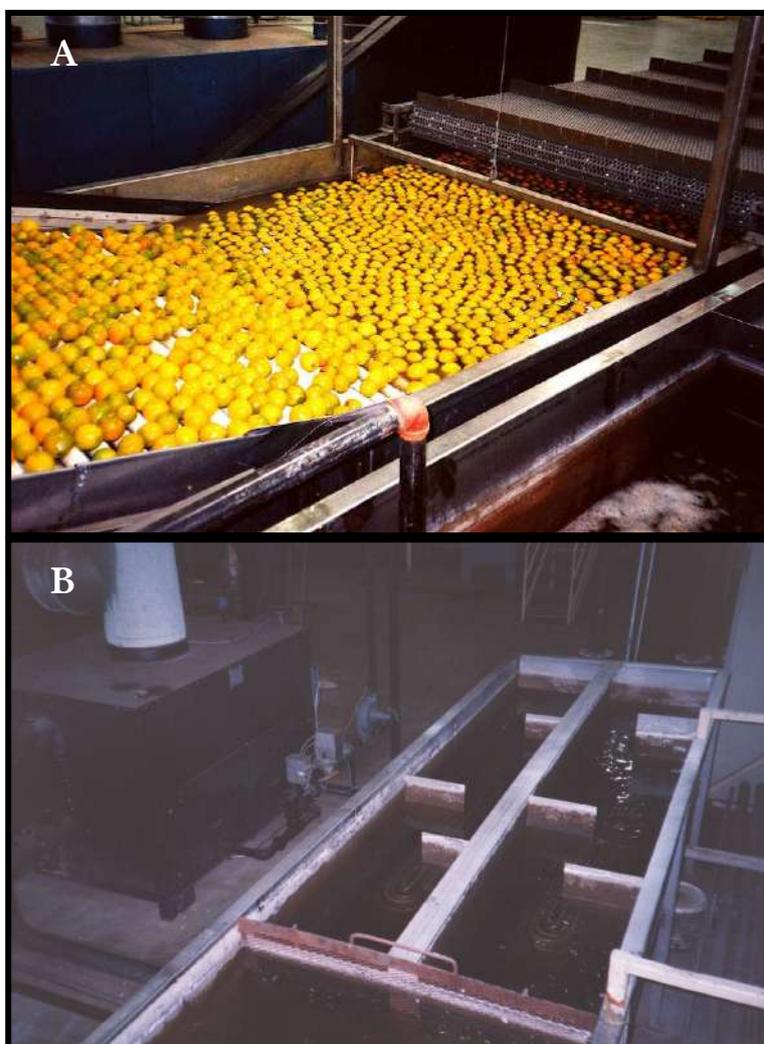


**Fotografia 5.** Sistema de dotze tancs d'acer inoxidable de 22 l de capacitat utilitzat per als assajos amb aigua calenta i solucions de carbonats sòdics o altres additius alimentaris realitzats a l'Horticultural Crops Research Laboratory de Fresno (Califòrnia). Cada tanc està equipat amb un escalfador elèctric controlat per ordinador, un sensor de temperatura i un agitador mecànic accionat amb un motor elèctric.



**Fotografia 6.** Tractament comercial de taronges amb una solució calenta de carbonat sòdic en una central cítrica de Califòrnia.



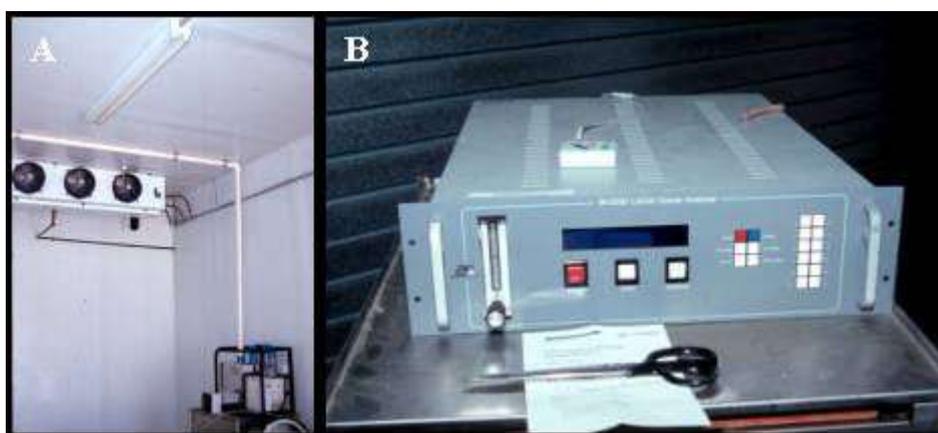


**Fotografia 7.** Tractament comercial de taronges amb una solució calenta de carbonat sòdic en una central citrícola de Califòrnia. **A.** Els fruits tractats arriben per flotació a la línia de confecció. **B.** Sistema de resistències elèctriques utilitzat per escalfar la solució.



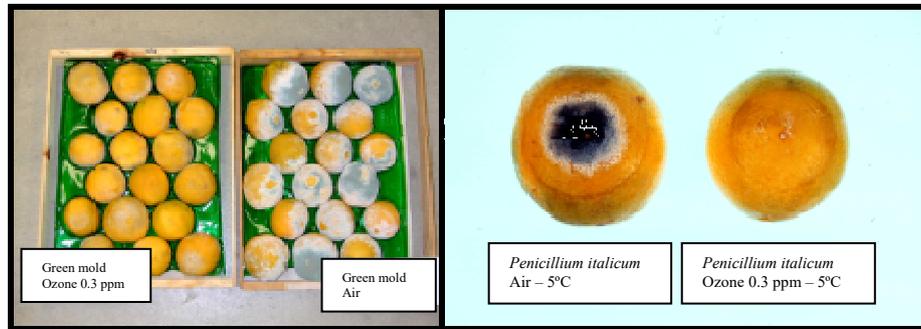


**Fotografia 8.** Fitotoxicitat en mandarina clementina per excés de calor. Danys severs a la pell deguts a la immersió dels fruits en aigua a 65°C.



**Fotografia 9. A.** Generador d'ozó de 90 W instal·lat en una cambra frigorífica experimental de 66,6 m<sup>3</sup> de capacitat. **B.** Analitzador d'ozó d'absorció ultraviolada.





**Fotografia 10.** Efecte de l'exposició contínua a 0,3 ppm d'ozó gasós sobre l' esporulació de *Penicillium digitatum* i *Penicillium italicum* en taronges inoculades artificialment i conservades a 5°C durant 1 mes.



**Fotografia 11. A.** Assaig a mitjana escala de la combinació de tractaments de control biològic amb bicarbonat sòdic. **B.** Detall del bany de taronges prèviament inoculades amb *Penicillium digitatum* en una suspensió de l'antagonista *Pantoea agglomerans* CPA-2.



