

Baños de 60 s en soluciones acuosas de 200 mM SMP o 3% SB a 20 o 50 °C presentan un importante efecto curativo contra la podredumbre amarga de los cítricos

TRATAMIENTOS POSCOSECHA CON ADITIVOS ALIMENTARIOS PARA CONTROLAR LA PODREDUMBRE AMARGA DE LOS CÍTRICOS

Lourdes Soto-Muñoz^{1,2}, Verònica Taberner¹, Lluís Palou¹

¹Laboratori de Patologia, Centre de Tecnologia Postcollita (CTP), Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA)

²Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro (México)

La actividad curativa de baños en soluciones acuosas de los aditivos alimentarios sorbato de potasio (PS), benzoato de sodio (SB), etilparabeno de sodio (SEP) y metilparabeno de sodio (SMP) para el control de la podredumbre amarga, causada por *Geotrichum citri-aurantii*, fue evaluada en diferentes cultivares de naranjas y mandarinas. Los mejores resultados se obtuvieron con baños de 60 s en soluciones a 20 °C de 3% SB o 200 mM SMP, que redujeron hasta en un 90% la incidencia y la severidad de la podredumbre amarga en frutos inoculados artificialmente, bañados 24 h después e incubados a 28 °C durante 8 días. En general, la eficacia de estos tratamientos fue superior en naranjas que en mandarinas y se potenció al calentar las soluciones a 50 °C. Estos baños mostraron una eficacia similar a la del fungicida sintético propiconazol y también fueron efectivos en naranjas 'Valencia Late' almacenadas a 5 °C y 90% HR hasta 8 semanas.



Fotografía 1. Sintomatología de la podredumbre amarga causada por *Geotrichum citri-aurantii* en mandarina.

INTRODUCCIÓN

La podredumbre amarga o ácida de los cítricos (Fotografía 1), causada por el hongo *Geotrichum citri-aurantii* (Fotografía 2), es, después de las podredumbres verde y azul causadas por *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* respectivamente, la enfermedad de poscosecha más importante en zonas de clima mediterráneo, especialmente en campañas lluviosas (Smilanick et al., 2020). Tras la retirada definitiva de la guazatina en 2011 y del propiconazol (PCZ) en 2019, no se dispone en la Unión Europea (UE) de fungicidas de poscosecha eficaces para el control de esta enfermedad. Como

consecuencia de esta restricción, se necesitan con urgencia estrategias de control de la podredumbre amarga de los cítricos que sean seguras, eficaces y comercialmente viables.

Entre las distintas estrategias, el uso de productos químicos de bajo riesgo clasificados como aditivos alimentarios (identificados por el correspondiente número E en la UE) o como sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS, según la legislación norteamericana) es una alternativa prometedora al uso de los fungicidas convencionales (D'Aquino y Palma, 2020). En general, los aditivos alimentarios con actividad antimicrobiana forman parte de los conservantes, entre los que destacan los sorbatos, benzoatos, parabenos, carbonatos, etc., que son sales inorgánicas u orgánicas que presentan ventajas importantes como son su disponibilidad, bajo coste, alta solubilidad en agua y su idoneidad para la aplicación comercial como soluciones acuosas utilizando las instalaciones actualmente existentes en las centrales hortofrutícolas (Palou et al., 2016).

Hoy en día, la aplicación poscosecha de algunos aditivos alimentarios, como el sorbato de potasio (PS, por sus siglas en inglés) o el bicarbonato de sodio (SBC), se realiza comercialmente como alternativa al uso de fungicidas convencionales para el manejo comercial de las podredumbres causadas por *Penicillium* spp. en cítricos, luego de



Fotografía 2. Aspecto del hongo *Geotrichum citri-aurantii* cultivado 'in vitro' en una placa de medio patata dextrosa agar (PDA).

un largo período de evaluaciones exhaustivas en trabajos de investigación (Montesinos-Herrero et al., 2009, Palou et al., 2001, Smilanick et al., 2008) y en ensayos en centrales empacadoras de cítricos que permitieron el registro de estas sustancias por parte de empresas del sector. En estos trabajos se evaluó la actividad curativa de soluciones acuosas de estas sales, es decir su capacidad de controlar infecciones fúngicas ya existentes en la fruta en el momento del tratamiento, en contraposición con la actividad preventiva, que se refiere a la capacidad de proteger al fruto de infecciones futuras. Sin embargo, poco se ha investigado sobre la aplicación de aditivos alimentarios para el control de la podredumbre amarga de los cítricos.



Fotografía 3. Inoculación artificial de mandarinas en una herida de la piel con una suspensión de artrosporas de *Geotrichum citri-aurantii*.

En general, el potencial del uso de aditivos alimentarios para el control de podredumbres de poscosecha se determina primero en ensayos de laboratorio 'in vitro' y/o 'in vivo' (con fruta inoculada artificialmente con los patógenos diana) en condiciones controladas que simulan las condiciones reales. Posteriormente, se pueden realizar ensayos 'in vivo' semi-comerciales o comerciales en centrales cítricas para determinar la capacidad de control de concentraciones seleccionadas de las sales y evaluar el valor comercial de la posible implementación de estos tratamientos de poscosecha (Palou, 2018). En cualquier caso, debido a la epidemiología de *G. citri-aurantii*, que normalmente infecta la fruta antes de su llegada a la central, un control adecuado de la podredumbre amarga requiere de tratamientos de poscosecha con una buena actividad curativa.

El objetivo de este estudio se ha centrado en evaluar en ensayos de laboratorio la actividad curativa de soluciones acuosas de diferentes sales clasificadas como aditivos alimentarios para el control de la podredumbre amarga de los cítricos causada por *G. citri-aurantii* en diferentes especies y cultivares de cítricos de importancia económica. Este artículo divulgativo es un resumen de los resultados publicados recientemente en una revista científica internacional (Soto-Muñoz et al., 2020).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aditivos alimentarios

En este estudio se utilizaron los siguientes aditivos alimentarios: sorbato de potasio (PS, $C_6H_7KO_2$, E-202), benzoato de sodio (SB, $C_7H_5NaO_2$, E-211), etil-parabeno de sodio (SEP, $C_9H_9NaO_3$, E-215) y metil-parabeno de sodio (SMP, $C_8H_7NaO_3$, E-219).

Fruta e inoculación fúngica

Dependiendo del ensayo, se utilizaron mandarinas cvs. 'Clemenules', 'Oronules' y 'Ortanique' y naranjas cvs. 'Barnfield', 'Navelina' y 'Valencia

Late', todas provenientes de la zona de Valencia. Los frutos fueron seleccionados, lavados y desinfectados con una solución de 0,5% de hipoclorito de sodio. Una vez desinfectados, se enjuagaron con agua del grifo y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente, la fruta fue inoculada con una suspensión de 1×10^7 artrosporas/mL de *G. citri-aurantii* NAV 1, cepa de la colección de cultivos fúngicos del CTP del IVIA. La inoculación de la fruta se realizó sumergiendo la punta de un punzón de acero inoxidable, de 1 mm de ancho y 2 mm de largo, en la suspensión de artrosporas y haciendo una única punción en el ecuador de cada fruto (Fotografía 3). Los frutos inoculados se sometieron a los distintos tratamientos transcurridos 24 h desde el momento de la inoculación (determinación de la actividad curativa).

Actividad curativa de baños en soluciones acuosas de aditivos alimentarios

Efectividad en diferentes cultivares de cítricos

Para estos ensayos, se utilizaron todos los cultivares de naranja y mandarina mencionados anteriormente. En cubos de acero inoxidable se prepararon 10 L de la solución acuosa correspondiente a los distintos tratamientos (Fotografía 4), los cuales se seleccionaron en función de ensayos preliminares: (i) agua (control negativo), (ii) 200 mM SMP, (iii) 200 mM SEP, (iv) 3% PS, (v) 3% SB y (vi) 0,6% PCZ (fungicida, control positivo, Melanite 10% i.a.). Posteriormente, los frutos fueron bañados sumergiéndolos completamente en la solución del tratamiento durante 60 s a 20 °C. Los tratamientos estuvieron conformados por 4 réplicas de 10 frutos cada una. Los frutos tratados se incubaron a 28 °C y 90% de humedad relativa (HR) durante 8 días (Fotografía 5), tras los cuales se determinó el porcentaje de heridas infectadas (incidencia de la enfermedad) y el diámetro de las lesiones (severidad de la enfermedad) causadas por *G. citri-aurantii*.



Fotografía 4. Bañadora, cubos y cestos metálicos utilizados para los tratamientos por inmersión de frutos cítricos en soluciones acuosas de aditivos alimentarios.



Fotografía 5. Frutos control inoculados con *Geotrichum citri-aurantii*, bañados en agua 24 h después e incubados a 28 °C durante 8 días.

Efecto de la temperatura del baño

Para este ensayo se utilizaron naranjas cv. 'Barnfield'. Los frutos inoculados 24 h antes fueron bañados en una solución acuosa de 200 mM SMP, 200 mM SEP, 3% PS o 3% SB a 20 o 50 °C durante 60 s. Los frutos control fueron bañados en agua a 20 °C durante 60 s. Los tratamientos estuvieron conformados por 4 réplicas de 5 frutos cada

una. La incidencia y la severidad de la podredumbre amarga se evaluaron después de 8 días de incubación a 28 °C y 90% HR.

Efectividad en cítricos conservados en frío

Naranjas cv. 'Valencia Late' inoculadas artificialmente fueron bañadas 24 h más tarde durante 60 s en agua (con-

trol negativo) o en soluciones acuosas de 200 mM SMP, 3% SB o 0,6% PCZ (control positivo) a 20 °C. Cada tratamiento se aplicó a 4 réplicas de 5 frutos cada una. La fruta tratada se almacenó durante 8 semanas a 5 °C y 90% HR. La incidencia y la severidad de la podredumbre amarga se evaluaron cada dos semanas.

Análisis estadístico

Los datos de la incidencia de la enfermedad (%) se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada para asegurar la homogeneidad de las varianzas. Los datos transformados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con el programa Statgraphics Centurion XVI. El nivel de significación se estableció en $p=0,05$. Cuando resultó pertinente, se utilizó la prueba de la mínima diferencia significativa (MDS) para separar las medias. Los valores mostrados en los gráficos son medias no transformadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efectividad de baños en diferentes cultivos de cítricos

En general, la actividad curativa de los baños con aditivos alimentarios contra la podredumbre amarga fue más alta en naranjas que en mandarinas (Figura 1). De hecho, en algún estudio se ha identificado el nivel de susceptibilidad a la podredumbre amarga de algunos cultivares de cítricos, que se categorizaron en tres grupos (Nazerian y Alian, 2013): (i) altamente susceptibles: mandarina cvs. ‘Onshiu’ y ‘Ponkan’; (ii) moderadamente susceptibles: mandarina cvs. ‘Clementine’, ‘Page’ y ‘King’, naranja cvs. ‘Thomson Navel’ y ‘Washington Navel’, lima dulce y pomelo cv. ‘Pantano’; y (iii) poco susceptibles: naranja dulce cv. ‘Valencia’ y naranja agria.

El tratamiento con SMP no presentó diferencias significativas entre cultivares de la misma especie. El SMP redujo la incidencia y la severidad de la podredumbre amarga en un 35 y 85% respectivamente en mandarinas y en

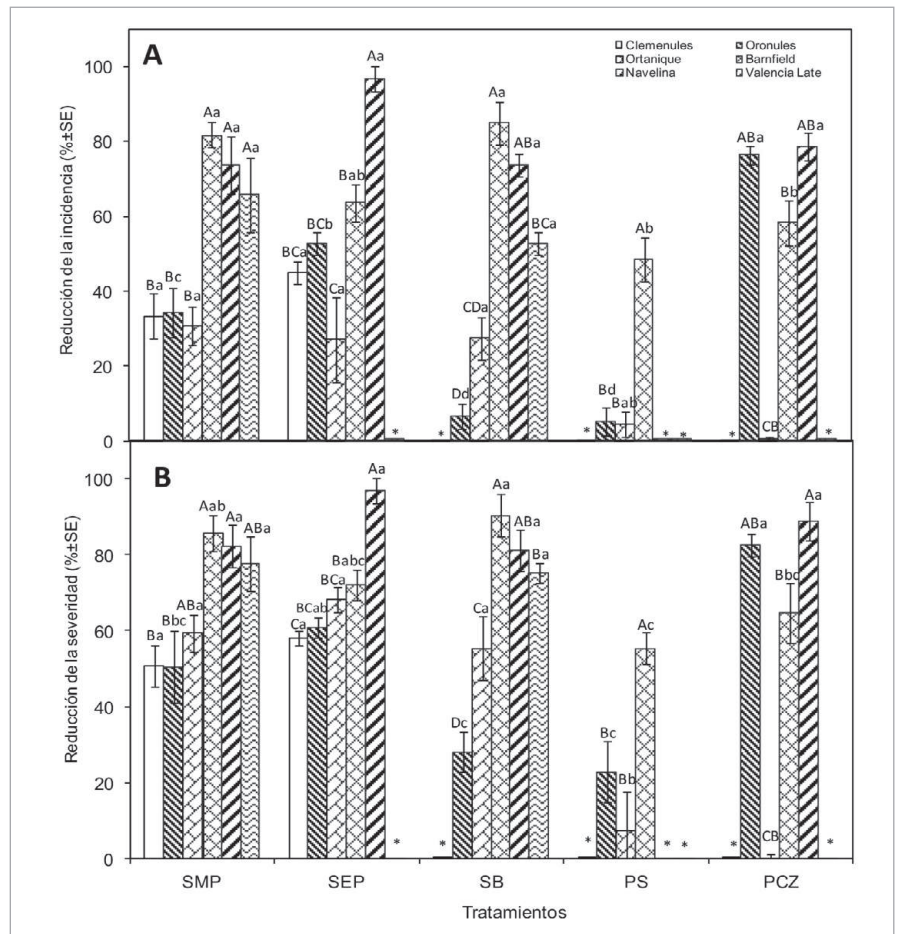


Figura 1. Reducción respecto al control de la incidencia (A) y la severidad (B) de la podredumbre amarga en especies y cultivares de cítricos inoculados artificialmente con *Geotrichum citri-aurantii*, bañados 24 h después en agua (control), 200 mM SMP, 200 mM SEP, 3% SB, 3% PS o 0,6% PCZ durante 60 s a 20 °C, e incubados durante 8 días a 28 °C y 90% HR. Las medias con letras mayúsculas y minúsculas distintas indican diferencias significativas entre cultivares y aditivos alimentarios, respectivamente, según la prueba de la MDS ($p<0,05$). Los asteriscos indican datos no registrados.

un 75 y 80% en naranjas. El tratamiento con SEP fue más efectivo en naranjas ‘Navelina’ (reducciones del 97% de incidencia y severidad) y menos efectivo en mandarinas ‘Ortanique’ (reducción del 27% de incidencia) que en el resto de variedades. El SB fue muy efectivo en naranjas ‘Barnfield’, seguidas de ‘Navelina’ y ‘Valencia Late’ (reducciones de incidencia del 85, 74 y 53%, respectivamente), mientras que fue ineficaz en mandarinas ‘Oronules’ (reducción del 7% de incidencia). Por su parte, el PS no controló eficazmente la podredumbre amarga en mandarinas ‘Oronules’ y ‘Ortanique’, pero redujo a la mitad la incidencia de la enfermedad en naranjas. Por otro lado, la actividad antifúngica de los

tratamientos con SMP, SEP y SB, pero no la del PS, fue similar o incluso mayor que la del PCZ en algunos cultivares (Figura 1). Trabajos anteriores habían reportado la actividad curativa de estas sales, incluido el PS, contra enfermedades de poscosecha causadas por *Penicillium* spp. en distintas especies y cultivares de cítricos (Montesinos-Herrero *et al.*, 2016; Moscoso-Ramírez *et al.*, 2013).

Efecto de la temperatura del baño

En general, los baños en soluciones calentadas a 50 °C aumentaron el control de la podredumbre amarga en naranjas en comparación con los baños a 20 °C, en un efecto sinérgico similar al observado al combinar

calor con PS u otros aditivos para el control de las podredumbres verde y azul (Palou, 2018; Smilanick *et al.*, 2008). El SMP y el SB, con reducciones de la incidencia y la severidad de la enfermedad de un 80 y 85% respectivamente a 20 °C y de un 100% a 50 °C, fueron más efectivos que el SEP y el PS, que redujeron la enfermedad en un 50-60% a 20 °C y en un 90% a 50 °C (Figura 2). Sin embargo, otros estudios indican que este beneficio no es general, sino que depende de las propiedades de cada aditivo alimentario particular, de la enfermedad diana y de las condiciones de aplicación (D'Aquino y Palma, 2020; Moscoso-Ramírez *et al.*, 2013). Además, el uso de calor debe controlarse de forma estricta dado que existe un rango muy estrecho entre las temperaturas efectivas y las fitotóxicas. Así, soluciones calentadas a temperaturas excesivas o tiempos de baño demasiado largos pueden dañar fácilmente la piel del fruto, causando manchas y picados y también el desarrollo de malos sabores (Fallik e Ilic', 2020).

Efectividad en cítricos conservados en frío

Con respecto al desarrollo de la enfermedad durante el almacenamiento en frío, los baños con SB y SMP a temperatura ambiente (20 °C) durante 60 s fueron tan efectivos como el tratamiento con PCZ para reducir la podredumbre amarga en naranjas 'Valencia Late' inoculadas artificialmente, tratadas y almacenadas a 5 °C durante 2 meses (Figura 3). Se confirmó que el crecimiento 'in vivo' de *G. citri-aurantii* a estas bajas temperaturas es muy limitado (severidad de menos de 5 y 20 mm en naranjas control a las 4 y 8 semanas de conservación) y que estos tratamientos con aditivos alimentarios podrían reemplazar a los fungicidas convencionales para el control de la pudrición amarga en cítricos de final de campaña almacenados en frío. La incidencia de la podredumbre amarga después de 8 semanas de almacenamiento en frío en la fruta

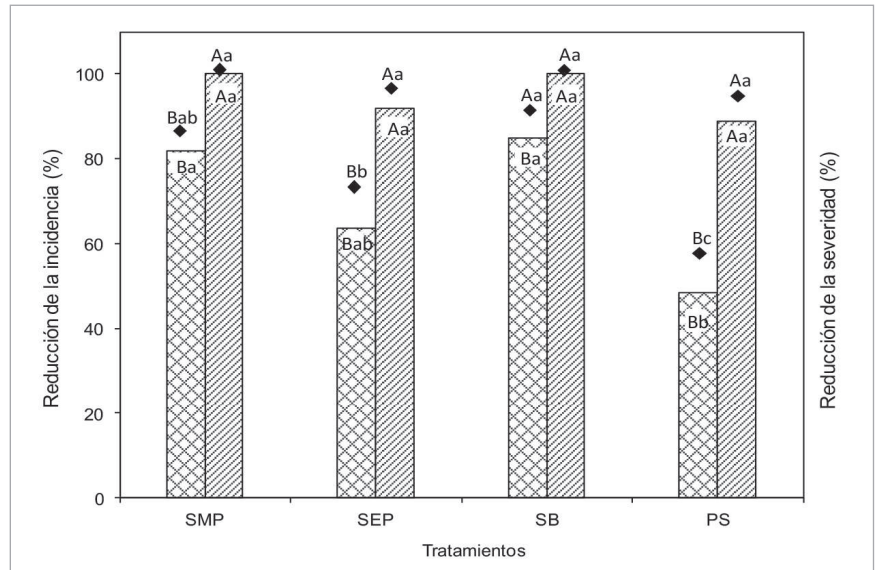


Figura 2. Efecto de la temperatura del baño [20 °C (▣) o 50 °C (▤)] en la efectividad de baños de 60 s en soluciones acuosas de 200 mM SMP, 200 mM SEP, 3% SB o 3% PS para el control de la podredumbre amarga en naranjas 'Barnfield' inoculadas artificialmente con *Geotrichum citri-aurantii*, tratadas 24 h después e incubadas durante 8 días a 28 °C y 90% HR. Las reducciones de la incidencia (barras) y de la severidad (diamante sólido) de la podredumbre se determinaron con respecto a los frutos control bañados en agua. Las medias con letras mayúsculas y minúsculas distintas indican diferencias significativas entre temperaturas de baño y aditivos alimentarios, respectivamente, según la prueba de la MDS ($p \leq 0,05$).

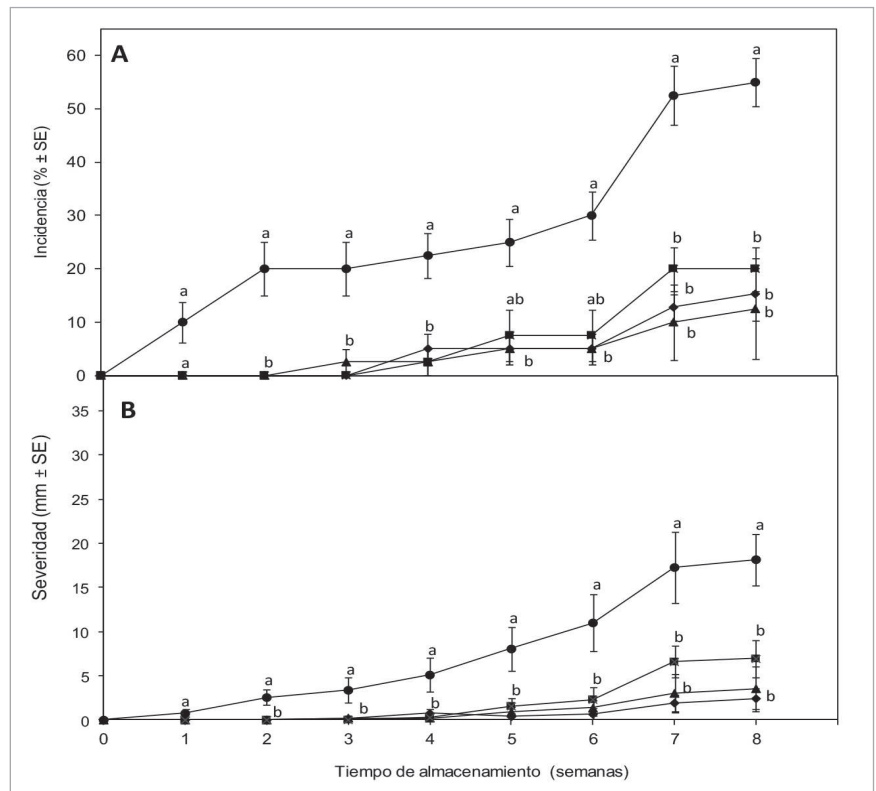


Figura 3. Incidencia (A) y severidad (B) de la podredumbre amarga en naranjas 'Valencia Late' inoculadas artificialmente con *Geotrichum citri-aurantii*, bañadas 24 h después en agua (control:●), 200 mM SMP (▲), 3% SB (■) o 0,6% PCZ (◆) durante 60 s a 20 °C, y almacenadas a 5 °C y 90% HR durante 8 semanas. Las medias con letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de la MDS ($p \leq 0,05$).

tratada con SMP, SB y PCZ fue del 12, 20 y 15%, respectivamente, mientras que fue del 55% en la fruta control (Figura 3A). Además, la severidad de la enfermedad fue de 18, 4, 7 y 2 mm en las naranjas control y tratadas con SMP, SB y PCZ, respectivamente (Figura 3B), lo que representa reducciones de severidad del 60-90%. Los resultados obtenidos con el PCZ fueron similares a los reportados por McKay

et al. (2012), quienes observaron una eficacia de este fungicida del 90% en pomelos inoculados artificialmente con *G. citri-aurantii*.

En conclusión, baños de 60 s en soluciones acuosas de 200 mM SMP o 3% SB a 20 o 50 °C presentan un importante efecto curativo contra la podredumbre amarga de los cítricos. Aunque este efecto antifúngico

depende en gran medida del cultivar, tratamientos de poscosecha con estos aditivos alimentarios muestran potencial para presuntas aplicaciones comerciales en caso de que el sector persiga su registro, puesto que también pueden reducir las podredumbres verde y azul y además no requerirían cambios significativos en las instalaciones y equipos utilizados actualmente en las centrales cítricas. ■

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Fontestad S.A. (Montcada, Valencia) la colaboración prestada en el suministro de fruta. Este estudio fue parcialmente financiado por el IVIA (proyecto N° 51910) y cofinanciado por la Unión Europea a través del Programa Operativo del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) de la Comunitat Valenciana 2014-2020. El programa postdoctoral de la Dra. Soto-Muñoz está financiado por el consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT-160058).



REFERENCIAS

- D'Aquino, S.; Palma, A. (2020). Reducing or replacing conventional postharvest fungicides with low toxicity acids and salts. En: Palou, L.; Smilanick, J.L. (Eds.), Postharvest Pathology of Fresh Horticultural Produce. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, EE UU, pp. 595-632.
- Fallik, E.; Ilic, Z. (2020). Control of postharvest decay of fresh produce by heat treatments: the risks and the benefits. En: Palou, L.; Smilanick, J.L. (Eds.), Postharvest Pathology of Fresh Horticultural Produce. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, EE UU, pp. 521-537.
- McKay, A.; Förster, H.; Adaskaveg, J.E. (2012). Efficacy and application strategies for propiconazole as a new postharvest fungicide for managing sour rot and green mold of citrus fruit. *Plant Disease* 96, 235-242.
- Montesinos-Herrero, C.; del Río, M.A.; Pastor, C.; Brunetti, O.; Palou, L. (2009). Evaluation of brief potassium sorbate dips to control postharvest *Penicillium* decay on major citrus species and cultivars. *Postharvest Biology and Technology* 52, 117-125.
- Montesinos-Herrero, C.; Moscoso-Ramírez, P.A.; Palou, L. (2016). Evaluation of sodium benzoate and other food additives for the control of citrus postharvest green and blue molds. *Postharvest Biology and Technology* 115, 72-80.
- Moscoso-Ramírez, P.A.; Montesinos-Herrero, C.; Palou, L. (2013). Characterization of postharvest treatments with sodium methylparaben to control citrus green and blue molds. *Postharvest Biology and Technology* 77, 128-137.
- Nazerian, E.; Alian, Y.M. (2013). Association of *Geotrichum citri-aurantii* with citrus fruits decay in Iran. *International Journal of Plant Production* 4, 1839-1843.
- Palou, L. (2018). Postharvest treatments with GRAS salts to control fresh fruit decay. *Horticulturae* 4, 46.
- Palou, L.; Ali, A.; Fallik, E.; Romanazzi, G. (2016). GRAS, plant-, and animal-derived compounds as alternatives to conventional fungicides for the control of postharvest diseases of fresh horticultural produce. *Postharvest Biology and Technology* 122, 41-52.
- 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 Disease* 85, 371-376.
- Smilanick, J.L.; Erasmus, A.; Palou, L. (2020). Citrus fruits. En: Palou, L.; Smilanick, J.L. (Eds.), Postharvest Pathology of Fresh Horticultural Produce. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, EE UU, pp. 3-53.
- Smilanick, J.L.; Mansour, M.F.; Mlikota Gabler, F.M.; Sorenson, D. (2008). Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. *Postharvest Biology and Technology* 47, 226-238.
- Soto-Muñoz, L.; Taberner, V.; de la Fuente, B.; Jerbi, N.; Palou, L. (2020). Curative activity of postharvest GRAS salt treatments to control citrus sour rot caused by *Geotrichum citri-aurantii*. *International Journal of Food Microbiology* 335, 108860.