

Alteraciones y patologías en postcosecha

# Observaciones sobre la patogénesis y contribución al control de la podredumbre gris de los frutos cítricos

Juan J. Tuset y M. Marín (Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, IVIA, Moncada, Valencia)

Cinco fungicidas derivados del benzimidazol y del triazol fueron empleados sobre dos diferentes fases de desarrollo del hongo *Botrytis cinerea*, agente causante de la "podredumbre gris" en los frutos cítricos. *In vitro*, todos los fungicidas inhibieron el crecimiento micelial. Los derivados del benzimidazol no impidieron el desarrollo del tubo germinativo, que sí lograron los del triazol. *In vivo*, los depósitos ocasionados por la aplicación de los fungicidas en la corteza de los frutos cítricos en ninguno de los casos inhibió la germinación de los conidios. La falta de eficacia en ambas fases del desarrollo de *B. cinerea* por parte de los cinco fungicidas, permite a este hongo escapar al control de los mismos y no detener el podrido de los frutos cítricos.

## INTRODUCCIÓN

El hongo *Botrytis cinerea*, conocido como "moho gris", es un microorganismo con una elevada polifagia que, desde hace unos años, se ha convertido en un insistente patógeno de nuestros cítricos (Fig.ura1). Es activo en el campo en los años con primaveras lluviosas causando daños frecuentemente en la floración y cuajado de los frutos con antopsis (caída de flores), filoptosis (caída de hojas) y carpoptosis (caída de frutos) anticipadas, a veces importantes, y con malformaciones en los frutos que interesan únicamente la corteza. También este hongo constituye un problema evidente en los frutos ya maduros y a lo largo de la postrecolección con podredumbres que pueden llegar a tener una relevancia, especialmente en las naranjas. En el período floración y fase juvenil del fruto, la actividad del *B. cinerea*, generalmente es muy variable, difícil de valorar los perjuicios que ocasiona así como de posibilitar al citricultor un control aceptable de este hongo, lo que obliga prácticamente en nuestro ambiente a convivir con él. En la fase de maduración de los frutos, también resulta muy difícil combatirlo en el campo, el "moho gris" debe de ser exclusivamente controlado durante la postrecolección, principalmente en el almacén de confección, si bien las posibilidades actuales son poco efectivas.

*B. cinerea* lo podemos encontrar en un huerto de agrios en las siguientes formas de vida (Tuset, 1987):

- Como saprofito, extrayendo sus necesidades alimenticias a partir de substratos vegetales (hojas, tallos, ramas, flores, pétalos, frutos, etc.) en período más o menos avanzado de descomposición en el suelo.
- Como semi-parásito, o sea, en un estado de actividad patógena muy débil, sobre un gran número de plantas espontáneas herbáceas que él ha invadido a través de lesiones ya existentes en las mismas. También en los pétalos de la flor de los agrios antes de su caída.
- Como auténtico parásito, provocando daño ya sea a las flores, brotes, hojas o frutos recién cuajados y maduros. En este caso siempre las condiciones de humedad y temperatura deben ser apropiadas.

De todas ellas, es el estado saprofitario el más común y extendido para este hongo. Aquí, su esporulación es abundante si la humedad y al temperatura le son favorables. Los conidios secos, producidos en gran cantidad, son fácilmente transportados por el viento, agua (lluvia), insectos, etc., hasta alcanzar los tejidos epidérmicos de los frutos, depositándose junto a las heridas, roturas de la cutícula, lesiones por bajas temperaturas, zonas del pedúnculo, etc., donde germinan a las pocas horas, penetrando el tubo germinativo en el interior de la corteza (albedo) y dando comienzo a la infección.



Bajo condiciones favorables de humedad (más del 80%) y de temperatura muy suave, *B. cinerea* puede penetrar directamente a través de la cutícula sin estar ésta dañada. Esto ocurre cuando la piel del fruto se pone en contacto con cualquier trozo de materia orgánica (por ejemplo: un pétalo marchito) que éste invadido por el hongo.

También la infección se favorece, si en las gotas de agua en las que están depositados los conidios del hongo sobre la superficie de los frutos, existe aportación de nutrientes exógenos, tales como: granos de polen, gotitas de "melaza", etc. Ello estimula la germinación de los mismos así como la mejora de la vitalidad del tubo germinativo recién formado.

*B. cinerea* determina una cota de podrido en los frutos maduros del orden del 8-15% del total, representando ser en la actualidad el cuarto micromiceto en importancia.

Los daños mayores causados por este hongo se contabilizan en aquellas especies y variedades cuya recogida de frutos coincide con períodos de floración, o sea, que existen flores y frutos maduros al mismo tiempo, como son los limones, naranjas "Valencia late" y también –por su retraso en la recolección– muchas partidas de "Washington navel", "Salustiana", etc. En este caso, si el tiempo es húmedo o se producen lluvias ligeras, muchos pétalos al desprenderse se depositan sobre los frutos. Estos rápidamente invadidos por *B. cinerea* –que abundan con profusión en el ambiente del huerto de agrios– provocando en pocos días muchas infecciones. Los daños no se ven en el campo, pero una vez en el almacén de confección y también en el frigorífico, el hongo continua su desarrollo lentamente y a las pocas semanas se comprueba el podrido

También la baja calidad de la piel del fruto (por envejecimiento, heridas, manchas, etc.) así como la forma utilizada para ser éste desprendido del árbol (es malo el "tirón"), son factores determinantes en el desarrollo de la podredumbre.

Normalmente, la contaminación primaria y mayor de *B. cinerea* proviene del campo. Luego, en el almacén así como en los cajones, sacos, y contenedores, a partir del fruto infectado y especialmente por contacto, la podredumbre avanza. Esta es una clara podredumbre de "nido", eliminando con prontitud estos grupos de frutos afectados se disminuye eficazmente su evolución en el almacén.

El control químico de *B. cinerea* en los frutos cítricos es muy deficiente. Todos los ensayos realizados *in vivo*, empleando inoculaciones artificiales y naturales del "moho gris", con los fungicidas más utilizados en postcosecha ofrecen resultados pobres y, generalmente, erráticos que desorientan bastante (Tuset *et al.* 2000). En este trabajo, y para cinco fungicidas derivados del benzimidazol y del triazol, se pretende conocer con más profundidad los motivos de la baja respuesta fungitóxicas de las mismas a este hongo a fin de mejorar en lo posible su control, especialmente en los frutos cítricos.

## Materiales y métodos

**Fungicidas.** Las sustancias químicas empleadas fueron imazalil [1-(2-(2,4-diclorofenol) 2-(2-propeniloxil) etil) imidazol] al 22.5 % p.a., miclobutanil [2-p-clorofenol 2-(1,2,4-triazol 1-ilmetil) hexanonitrilo] al 12.5 % p.a., procloraz [N-propil N-(2-(2,4,6-triclorofenoxi) etil) carbamoilimidazol] al 40 % p.a. y tiabendazol [2-(4-tiazolil) bencimidazol] al 60 % p.a., todos ellos formulados como líquido concentrado emulsionable, y metil-tiofanato [4,4-(2-fenil) bis (3-tioalofanato) de dimetilo] como polvo mojable al 70 % p.a.

**Hongos.** Siete aislados de *Botrytis cinerea* procedentes de la Comunidad Valenciana fueron empleados: cinco de ellos se obtuvieron directamente de podredumbre gris en frutos cítricos (Bc1a, BcA, BcB, BcC, BcN), uno de uva (Bc-u) y otro procedente de ciruela (Bc-c). Todos los aislados se mantuvieron en agar patata glucosa (PDA).

**Frutos.** Frutos coloreados de naranjo dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) del cv "Washington Navel" fueron recolectados, seleccionados e inoculados con el hongo dentro de los dos días después de su recolección. Toda la fruta procedía de los campos de cítricos situados en la finca del IVIA. Previamente, los frutos fueron lavados, desinfectados con 0.5% de hipoclorito sódico y secados al aire.

**Fungitoxicidad.** El efecto de los fungicidas ha sido estudiado *in vivo* e *in vitro*. En el primer caso, tanto en medio de cultivo sólido como líquido, viendo el efecto de estos productos sobre el crecimiento micelial (conociendo el ED<sub>50</sub> y ED<sub>100</sub>), sobre la germinación de los conidios, así como, el desarrollo del tubo germinativo. En el segundo caso y empleando frutos maduros tratados con los distintos fungicidas, hemos observado la actividad

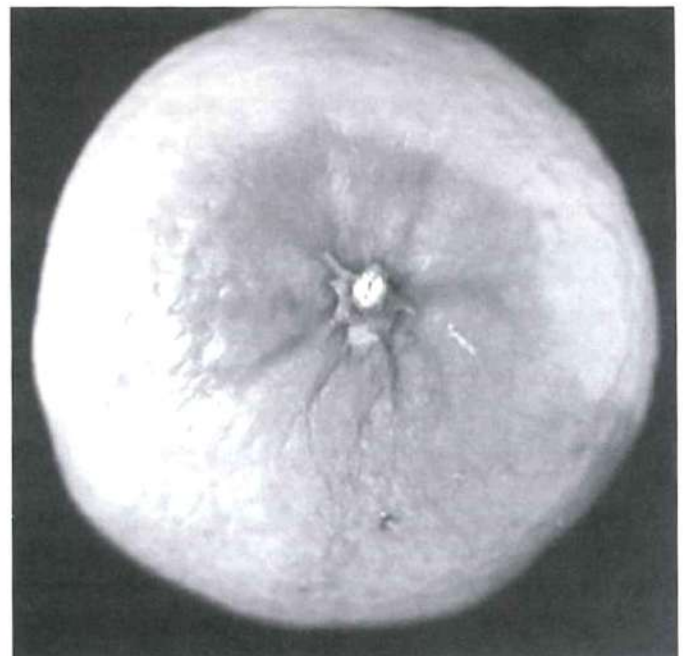


Figura 1. Podredumbre producida por *B. cinerea* en naranja "Washington Navel".

fungitóxicas del depósito producido por estos formulados en la corteza, mediante lavados con agua destilada de la misma, sobre la germinación de los conidios.



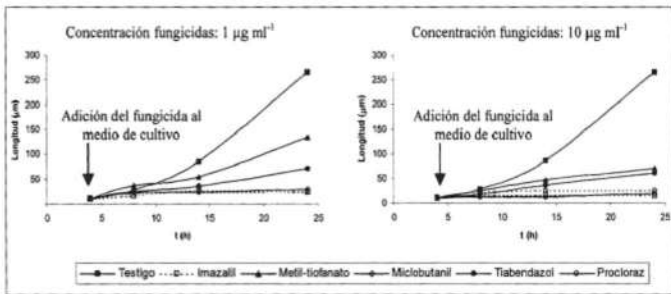


Figura 2. Crecimiento del tubo germinativo de los conidios del aislado Bc1a de *B. cinerea* desde el momento de contacto con los fungicidas.

FUNGICIDAS									
Imazalil		Metil-tiofanato		Miclobutanil		Procloraz		Tiabendazol	
ED <sub>50</sub>	ED <sub>100</sub>	ED <sub>50</sub>	ED <sub>100</sub>	ED <sub>50</sub>	ED <sub>100</sub>	ED <sub>50</sub>	ED <sub>100</sub>	ED <sub>50</sub>	ED <sub>100</sub>
≤ 0.80	≤ 25	≤ 0.25	≤ 2	≤ 1.20	≤ 40	≤ 0.10	≤ 8	≤ 0.50	≤ 3

<sup>2</sup>5 aislados procedentes de frutos cítricos, 1 de uva y 1 de ciruela

Tabla 1. Concentraciones ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) de cinco fungicidas que reducen el crecimiento micelial de 7 aislados<sup>2</sup> de *B. cinerea* un 50 % (ED<sub>50</sub>) y un 100 % (ED<sub>100</sub>).

## Resultados

### Fungitoxicidad *in vitro*

- Sobre el crecimiento micelial. Viene indicado en la Tabla 1.
- Sobre la germinación de los conidios. Metil-tiofanato y procloraz fueron los más activos en impedir la germinación de *B. cinerea*, observándose un ligero crecimiento micelial a la concentración de  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ . Imazalil y tiabendazol, a esta misma concentración, permitieron un constatable crecimiento del micelio, mientras que éste fue inhibido a la concentración de  $10 \mu\text{g l}^{-1}$ . Miclobutanil no impidió el crecimiento micelial a la concentración de  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  (Tabla 2).
- Efecto en el tiempo sobre el crecimiento del tubo germinativo. Los conidios del aislado Bc1a de *B. cinerea* que no fueron puestos en contacto con los fungicidas no interrumpieron el crecimiento de su tubo germinativo en todo el período de observación (Figura 2). Sin embargo, cuando a los conidios incubados 4 h en el medio de germinación se les adicionó imazalil, miclobutanil y procloraz a las concentraciones de  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  y  $10 \mu\text{g l}^{-1}$ , el crecimiento del tubo germinativo fue inhibido de forma casi inmediata. Metil-tiofanato y tiabendazol no frenaron el crecimiento del tubo germinativo durante toda la experimentación, siendo este crecimiento mayor en el metil-tiofanato a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  y persistiendo en ambos fungicidas a la concentración de  $10 \text{ mg l}^{-1}$ .
- Observaciones morfológicas del tubo germinativo. Los fungicidas, en general, provocaron en los conidios un engrosamiento de su pared y una vacuolización de estos (Figura 3). Por otro lado, la adición de los fungicidas una vez estuvo formado el tubo germinativo, provocó una menor longitud del mismo con engrosamientos en su pared y la formación de múltiples ramificaciones que no se observaron en los testigos.

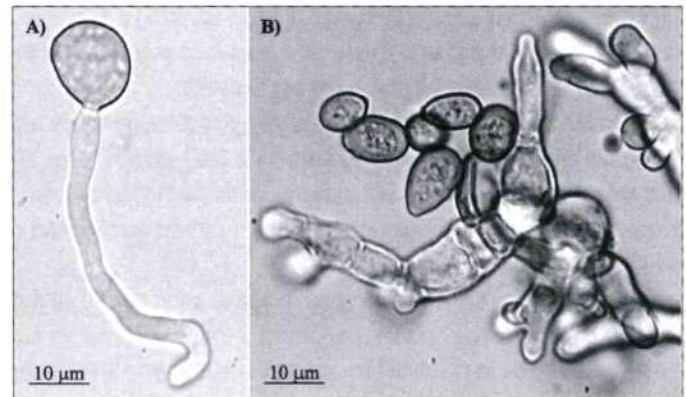


Figura 3. Conidios de *B. cinerea* incubados en medio de germinación durante 8 h. A) Testigo, sin adición de fungicida al medio. B) Adición a las 4 h de incubación de  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  de imazalil. Obsérvense en este caso los engrosamientos en el tubo germinativo.

Fungicidas	Concentración ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Aislados de <i>B. cinerea</i>			
		Bc1a <sup>x</sup>	BcN <sup>x</sup>	BcA <sup>x</sup>	Bc-c <sup>y</sup>
Imazalil	1	+++ <sup>z</sup>	+++	+++	+++
	10	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
Metil-tiofanato	1	+	++	++	+++
	10	-	-	-	++
	100	-	-	-	+
Miclobutanil	1	+++	+++	+++	+++
	10	++	++	++	+++
	100	+	++	+	++
Procloraz	1	+	++	+	++
	10	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
Tiabendazol	1	+++	+++	+++	+++
	10	-	+	+	+
	100	-	-	-	-

<sup>z</sup>Tiempo de incubación: 7 días

<sup>x</sup>Procedente de frutos cítricos

<sup>y</sup>Procedente de ciruela

<sup>z</sup>Colonias desarrolladas. +++: < 75%; ++: < 75-25%; +: > 25%; -: no germinación

Tabla 2. Colonias de *B. cinerea* originadas de conidios en medio de cultivo PDA previamente tratado en superficie con diversas concentraciones de cinco fungicidas<sup>z</sup>.

### Fungitoxicidad *in vivo*

Los conidios del aislado Bc1a germinaron en un 100% cuando fueron dispersados en el agua del lavado de la corteza de los frutos testigos y, también, de los tratados con miclobutanil al 0.2% en todos los casos (Figura 4). No obstante, cuando los conidios fueron sembrados en el agua del lavado de la corteza de frutos almacenados un día en frigorífico tratados con los otros fungicidas, éstos germinaron solamente en un 25%. Imazalil al 0.15% presentó la menor persistencia, germinando el 100% de los conidios en las soluciones de lavado de la corteza de frutos almacenados 10 días en frío y tratados con este fungicida. En el resto de los fungicidas (metil-tiofanato al 0.25%, tiabendazol al 0.20% y procloraz al 0.15%) los conidios germinaron en un 50% cuando fueron incubados en soluciones de lavado de corteza de frutos incubados en frío durante 10 días.

## Discusión

Los fungicidas empleados en este trabajo han mostrado *in vitro* que son capaces a bajas concentraciones de reducir el desarrollo micelial de *B. cinerea*. No obstante, se han observado diferencias en el modo de acción de cada uno de ellos según sean derivados del benzimidazol o del triazol. Los primeros (metiltiofanato y tiabendazol) inhiben fuertemente el crecimiento micelial del hongo, pero no lo impiden en las fases iniciales del desarrollo del tubo germinativo, incluso a concentraciones letales para el micelio. Por el contrario, los segundos (imazalil, miclobutanil y procloraz) detienen inmediatamente y de forma prolongada la formación del tubo germinativo a dosis no letales para el micelio. Los fungicidas derivados del triazol inhiben la biosíntesis de esteroides (PONTZEN Y SCHEINPFLUG, 1989), productos esenciales en las diferentes fases de la germinación de los conidios de *B. cinerea* (WOLF, 1982).

Dentro de los fungicidas derivados del triazol se comprobaron claras diferencias. Así, el imazalil y procloraz afectaron más al desarrollo del micelio y la germinación de los conidios que el miclobutanil. Este fungicida tuvo un comportamiento muy poco activo contra *B. cinerea*.

La aplicación de los fungicidas a concentraciones de uso comercial en los frutos cítricos, ocasiona unos depósitos de estos en la corteza que no impiden totalmente la germinación de los conidios de *B. cinerea*. En el caso del miclobutanil, el producto depositado no inhibió la germinación de los conidios desde el primer momento. Por otro lado, el imazalil mostró una baja persistencia, perdiendo el fungicida totalmente su eficacia en la conservación del fruto en el frigorífico a los pocos días.

En conclusión, todos los fungicidas muestran *in vitro* un cierto control sobre *B. cinerea*, sin embargo, éste no se produce en las fases de desarrollo del hongo: micelio y germinación de conidios. *In vivo*, la acción fungitóxica de éstos es aun mucho menor, permitiendo siempre el desarrollo del hongo y, con ello, infectar nuevos frutos.

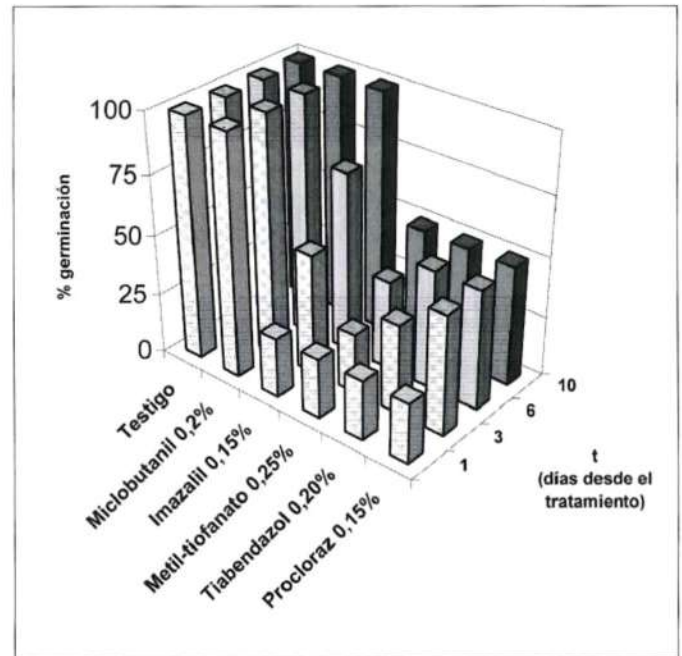


Figura 4. Porcentaje de conidios germinados del aislado Bc1a de *B. cinerea* en los lavados con agua destilada estéril de la corteza de frutos cítricos previamente tratados con cinco fungicidas.

## BIBLIOGRAFÍA

- PONTZEN, R. Y SCHEINPFLUG, H. 1989. *Effects of triazole fungicides on sterol biosynthesis during spore germination of Botrytis cinerea, Venturia inaequalis and Puccinis graminis f. sp. Tritici*. Netherlands Journal of Plant Pathology 95: 151-160.
- TUSET, J.J. 1987. *Podredumbre de los frutos cítricos*. Generalitat Valenciana. Conselleria d'Agricultura i Pesca, Valencia.
- TUSET, J.J., HINAREJOS, C. Y MIRA, J.L. 2000. *Eficacia de los tratamientos postcosecha tolerados en producción integrada en el control de Penicillium digitatum y Botrytis cinerea*. Levante Agrícola 352: 210-214.
- WOLF, G. 1982. *Physiology and biochemistry of spore germination*. IN: K.J. Scott and A.K. Chakravorty (Eds), The rust fungi. Academic Press, London, 151-178.