



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Estudio de control de *Penicillium* spp. y *Geotrichum*
candidum afectando a cítricos en postcosecha.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

AUTOR/A: Checa Tapia, Jordi

Tutor/a: Armengol Fortí, Josep

Cotutor/a externo: NAVARRO CAVA, VICENTE

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Estudio de control de *Penicillium* spp. y *Geotrichum candidum* afectando a cítricos en postcosecha.

El podrido en postcosecha causado por los hongos *Penicillium digitatum*, *P. italicum* y *Geotrichum candidum* en cítricos es una de las principales problemáticas que afectan a la producción de naranjas, mandarinas, clementinas y otros frutos cítricos. En este trabajo, se ha realizado una evaluación de la eficacia para el control de *Penicillium* spp. y *G. candidum* con los siguientes productos: 1) Clorhidrato de quitosano + *Equisetum arvense* y 2) Suero de leche + *E. arvense*. Se realizaron dos experimentos en condiciones de postcosecha en almacén de cítricos con naranjas y clementinas, en los que se comparó el efecto de estos productos con una materia activa fungicida de referencia (imazalil). Además, también se realizó un estudio de inoculación de fruta con suspensiones de esporas de *G. candidum* mediante la realización de heridas superficiales en la fruta e incubación a 23°C durante una semana. Los resultados de este estudio muestran el potencial que estos productos podrían tener para su utilización en el control del podrido en postcosecha causado por *Penicillium* spp. y *G. candidum* en almacenes de cítricos.

Palabras clave: Biocontrol, clementinas, fungicidas, naranjas

Control of *Penicillium* spp. and *Geotrichum candidum* affecting citrus in postharvest.

Postharvest rot caused by *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum* in citrus is one of the main problems affecting the production of oranges, mandarins, clementines and other citrus fruit. In this work, an evaluation of the efficacy for the control of *Penicillium* spp. and *G. candidum* with the following products: 1) Chitosan hydrochloride + *Equisetum arvense* and 2) Buttermilk + *E. arvense* was conducted. Two experiments were carried out under postharvest conditions in a citrus packinghouse with oranges and clementines, in which the effect of these products was compared with a reference fungicidal active ingredient (imazalil). In addition, a fruit inoculation study with spore suspensions of *G. candidum* was also carried out by making superficial wounds on the fruit and incubating at 23°C for one week. The results of this study show the potential that these products could have for their use in the control of postharvest rot caused by *Penicillium* spp. and *G. candidum* in citrus packinghouses.

Keywords; Biocontrol, clementines, fungicides, oranges

Estudi de control de *Penicillium* spp. i *Geotrichum candidum* afectant cítrics en postcollita.

El podrit postcollita causat per *Penicillium digitatum*, *P. italicum* i *Geotrichum candidum* en cítrics és una de les principals problemàtiques que afecten la producció de taronges, mandarines, clementines i altres fruits cítrics. En aquest treball, s'ha realitzat una avaluació de l'eficàcia per al control de *Penicillium* spp. i *G. candidum* amb els productes següents: 1) Clorhidrat de quitosà + *Equisetum arvense* i 2) Sèrum de llet + *E. arvense*. Es van realitzar dos experiments en condicions de postcollita en un magatzem de cítrics amb taronges i clementines, en què es va comparar l'efecte d'aquests productes amb una matèria activa fungicida de referència (imazalil). A més, també es va realitzar un estudi d'inoculació de fruita amb suspensions d'espores de *G. candidum* mitjançant la realització de ferides superficials a la fruita i incubació a 23°C durant una setmana. Els resultats d'aquest estudi mostren el potencial que aquests productes podrien tenir per utilitzar-los en el control del podrit postcollita causat per *Penicillium* spp i *G. candidum* en magatzems de cítrics.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi tutor Josep Armengol Fortí la paciencia y el apoyo prestado durante todo el trabajo.

Agradecer también al comercio citrícola Fruites Boixadós y concretamente a Paco Nadal por facilitarme el material, instalaciones y todo lo necesario para poder realizar el trabajo.

Quiero también agradecer a mi compañero y cotutor externo Vicente Navarro Cava por estar a mi lado en todo momento, resolverme las dudas que han ido surgiendo y tratar de buscar siempre la mejor solución a los problemas.

Por último, agradecer a Fertiberia Tech la oportunidad de realizar el trabajo en la compañía y poder ayudar en el desarrollo e implementación de los productos.

Índice

Agradecimientos	II
Índice de figuras	III
Índice de tablas	IV
1. Producción y post cosecha en cítricos	1
1.1. <i>Penicillium</i> spp. y <i>Geotrichum candidum</i> como patógenos de postcosecha en cítricos...	3
1.2. Control del podrido postcosecha en cítricos.....	6
2. Objetivos	7
3. Materiales y métodos	8
3.1. Ensayo 1. Cámara de desverdización	8
3.2. Ensayo 2. Ensayo a temperatura ambiente	8
3.3. Ensayo 3. Inoculación con <i>Geotrichum candidum</i>	9
3.4. Análisis de datos.....	11
4. Resultados y discusión	11
5. Conclusiones.....	22
6. Bibliografía	23

Índice de figuras

Figura 1. Principales países productores de cítricos. (FUENTE: FAOSTAT, 2023)	2
Figura 2. Puntos críticos de pérdidas postcosecha en países desarrollados vs países en vías de desarrollo. (Fuente: Gustavsson et al., 2011)	3
Figura 3. (A) Síntomas de moho verde (izquierda) y moho azul (derecha). (B) Colonias de <i>Penicillium digitatum</i> (izquierda) y <i>P. italicum</i> (derecha). (C) Conidióforos de <i>P. digitatum</i> (izquierda) y <i>P. italicum</i> (derecha). (Fuente: Palou, 2014).....	5
Figura 4. Inoculación de <i>G. candidum</i> en naranja navelina a través de una herida ocasionada en la parte ecuatorial del fruto (Fuente: Elaboración propia).	10
Figura 5. A) Navelinas inoculadas con <i>Geotrichum candidum</i> en cámara de cultivo en condiciones controladas para los tratamientos control, quitosano + <i>E. arvense</i> , lactosuero + <i>E. arvense</i> e imazalil; B) Palletizado post tratamiento; C) <i>Penicillium</i> spp. en clementina variedad Clemenules; D) <i>G. candidum</i> en clementina variedad Clemenules; E) Herida ocasionada en la parte ecuatorial de la naranja variedad Navelina donde se inoculó <i>G. candidum</i> y se selló con cinta adhesiva para evitar la desecación; y F) Baño drencher durante los ensayos en almacén citrícola.....	12
Figura 6. Ensayo 1 (cámara de desverdización): Resultados de la evaluación de 3 tratamientos (quitosano + <i>E. arvense</i> , lactosuero + <i>E. arvense</i> , imazalil) y un tratamiento control mediante	

agua para el control del podrido postcosecha en naranjas variedad Navelina. A) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp. + *G. candidum*; B) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp.; y C) Porcentaje de fruta podrida causado por *G. candidum*. 17

Figura 7. Ensayo 1 (cámara de desverdización): Resultados de la evaluación de 3 tratamientos (quitosano + *E. arvense*, lactosuero + *E. arvense*, imazalil) y un tratamiento control mediante agua para el control del podrido postcosecha en clementinas variedad Clemenules. A) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp. + *G. candidum*; B) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp.; y C) Porcentaje de fruta podrida causado por *G. candidum*. 18

Figura 8. Ensayo 2 (a temperatura ambiente): Resultados de la evaluación de 4 tratamientos (quitosano + *E. arvense*, lactosuero + *E. arvense*, imazalil e imazalil + quitosano + *E. arvense*) y un tratamiento control mediante agua para el control del podrido postcosecha en naranjas variedad Navelina. A) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp. + *G. candidum*; B) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp.; y C) Porcentaje de fruta podrida causado por *G. candidum*. 19

Figura 9. Ensayo 2 (a temperatura ambiente): Resultados de la evaluación de 4 tratamientos (quitosano + *E. arvense*, lactosuero + *E. arvense*, imazalil e imazalil + quitosano + *E. arvense*) y un tratamiento control mediante agua para el control del podrido postcosecha en clementinas variedad Clemenules. A) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp. + *G. candidum*; B) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp.; y C) Porcentaje de fruta podrida causado por *G. candidum*. 20

Figura 10. Ensayo 3 (inoculación de *Geotrichum candidum*): Resultados de la evaluación de 3 tratamientos (quitosano + *E. arvense*, lactosuero + *E. arvense* e imazalil) y un tratamiento control mediante agua para el control del podrido postcosecha en clementinas variedad Clemenules. A) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp. + *G. candidum*; B) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp.; y C) Porcentaje de fruta podrida causado por *G. candidum*. 21

Índice de tablas

Tabla 1. Materias activas con actividad fungicida autorizadas en postcosecha en cítricos (Fuente: Elaboración Propia). 6

Tabla 2. Ejemplos de composiciones basadas en las materias fúngicas autorizadas para postcosecha en cítricos, géneros fúngicos para las cuales son eficaces y autorizada su autorización y dosis de aplicación (Fuente: Elaboración Propia). 6

1. Producción y post cosecha en cítricos

El género *Citrus* está presente en todo el mundo desde zonas templadas a tropicales, ya que algunas de las especies arbóreas incluidas en él se cultivan en numerosos países de diferentes continentes. Esta dispersión sucedió gracias a los grandes movimientos migratorios como las conquistas y, hasta hoy en día, el cultivo de cítricos y sus variedades con valor comercial para la alimentación, se ha asentado en aquellos lugares donde las especies de este género se han podido aclimatar (Durán-Vila, 2000).

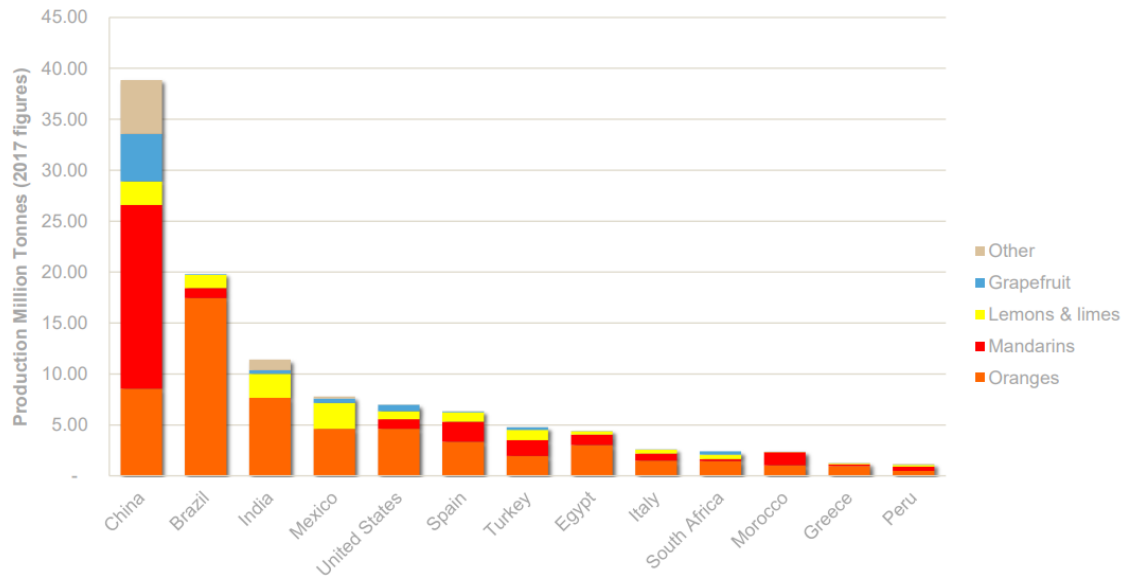
El género *Citrus* se originó hace alrededor de 20 millones de años en el sudeste asiático (Zaragoza, 2016) y, desde entonces, gracias a la agricultura, la selección natural y la hibridación natural y humana, han surgido muchas modificaciones genéticas cada una de ellas adaptadas a un tipo de clima y suelo. Actualmente, la selección humana es la que mayor importancia ha tomado en la multiplicación del material vegetal de cítricos, obteniéndose nuevas variedades bien sea por interés comercial, científico u ornamental (Durán-Vila et al., 2000).

En este sentido, en muchas ocasiones, la investigación y el desarrollo de nuevas variedades para empezar a cultivar en una zona en concreto, se realizan debido a que las enfermedades producidas por hongos, bacterias o virus, en algunos momentos de la citricultura han tenido efectos destructivos. Por ello, se buscan variedades menos sensibles o tolerantes a las enfermedades (Durán-Vila et al., 2000).

España tiene actualmente una producción cítrica de 6,705 millones de t en la campaña 2021/2022, con un descenso del 4,8% respecto a la campaña anterior, y un 2,1% respecto a la media de los últimos 5 años. Esto se debe a la regulación natural de los árboles para evitar el agotamiento ya que la campaña anterior (2020/2021) fue la cuarta campaña con más cosecha de la historia del país. (MAPA, 2022).

En el ámbito nacional, en 2021 la superficie cultivada alcanzó las 300.504 has y una producción de 6.850.000 t. España es el principal productor de cítricos de la UE con un 60% de cuota y el sexto productor mundial, con un 5% de la producción. España es el principal exportador de cítricos con un 25% de la cuota de exportaciones a nivel mundial (MAPA, 2022).

Como se muestra a continuación (Figura 1), España es el sexto productor mundial de naranjas por detrás de Brasil, EEUU, India, China y México. En cuanto al grupo de mandarinas y clementinas, España se sitúa como segundo productor a nivel mundial por detrás de China (FAOSTAT, 2023).



Fuente : FAOSTAT, Fresh Intelligence analysis

Figura 1. Principales países productores de cítricos. (FUENTE: FAOSTAT, 2023)

Se define como postcosecha al periodo de tiempo que pasa entre la recolección hasta la llegada de producto recolectado al consumidor final. Durante este tiempo, el producto que en este caso es percedero se ve influido principalmente por las condiciones de cultivo previas. Los objetivos principales de la postcosecha son dos: reducir las pérdidas de producto y mantener su calidad durante el mayor tiempo posible (Carvalho, 2012).

Según un estudio de la FAO (Figura 2), es durante el procesado de la fruta o llamado proceso postcosecha donde se producen las mayores pérdidas, pudiendo llegar a superar éstas el 50% en los países en vías de desarrollo (Gustavsson et al., 2011). Las principales causas de estas pérdidas son los daños mecánicos ocasionados durante el procesado de la fruta y el deterioro natural mediante los procesos biológicos. Estas causas, además de generar un rechazo comercial, pueden acelerar la actividad y presencia de hongos patógenos aumentando el número y severidad de los daños (Ortíz-Gimeno, 2020).

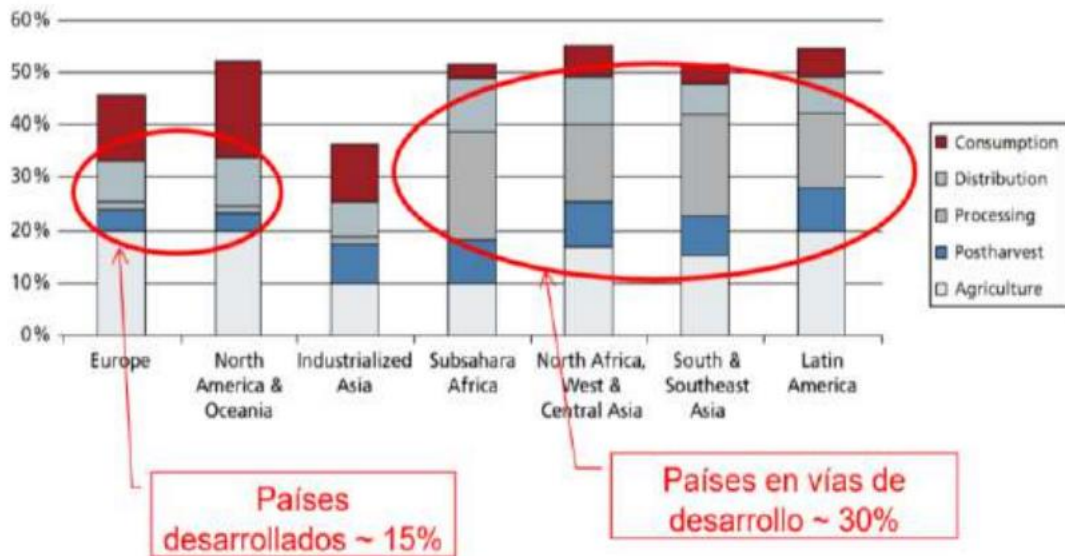


Figura 2. Puntos críticos de pérdidas postcosecha en países desarrollados vs países en vías de desarrollo. (Fuente: Gustavsson et al., 2011)

Los cítricos pueden ser almacenados hasta 3 meses en condiciones de temperatura y humedad controladas, es decir, de entre 0-8°C y entre 85-95% de HR. Esta vida útil de almacenamiento dependerá de los tratamientos fúngicos realizados, así como del estado de la fruta y las condiciones de la fruta en campo antes de la recolección (Hernández et al., 2011).

1.1. *Penicillium* spp. y *Geotrichum candidum* como patógenos de postcosecha en cítricos

En general, las pérdidas postcosecha en cítricos se deben principalmente a los factores naturales de degradación biológica y a factores patológicos. De estos últimos vamos a destacar los hongos patógenos *Penicillium* spp. y *Geotrichum candidum*, siendo *Penicillium* spp. el causante del 90% del total de las pérdidas en postcosecha de frutos cítricos (Visintin et al., 2000).

Los hongos pertenecientes al género *Penicillium* son filamentosos y de crecimiento rápido. En el inicio de la infección, éstos presentan una coloración blanca como resultado del desarrollo de las hifas, las cuales posteriormente por medio de la esporulación adquieren una coloración azul, azul verdosa, verde o gris dependiendo de la especie (González, 2013).

De la diversidad de especies que presenta *Penicillium* spp., las podredumbres verdes y azules representan las enfermedades más importantes en postcosecha de cítricos (Harries, 2013). El moho azul y el moho verde de los cítricos causado por *Penicillium* spp. son las enfermedades más comunes y destructivas a nivel de postcosecha, ya que afectan un amplio número de especies y variedades de cítricos, generando pérdidas económicas significativas, principalmente en la industria de almacenamiento y procesado (Wuryatmo et al., 2014). Estas enfermedades (moho azul y verde) están causadas por dos especies de hongos pertenecientes al género *Penicillium*; *P. italicum* y *P. digitatum*, respectivamente (Thompson, 1990) (Figura 3). Esta enfermedad se origina en el campo en las fases productivas, pero se manifiesta principalmente en postcosecha en almacén o durante la comercialización de la fruta.

Penicillium digitatum, agente causal del moho verde, penetra en la fruta a través de heridas. Una vez en el interior del fruto permanece en éste en estado latente hasta que el fruto está en

estado de madurez avanzada, cuando se activa (Tuset, 1987). Los factores ambientales de humedad y temperatura elevada junto a un manejo inadecuado de la fruta que pueda ocasionar heridas, son algunos de los principales factores de propagación de este hongo patógeno (Smilanick, 1999).

Para prevenir las infecciones y las pérdidas causadas por *P. digitatum* es necesario tener muy controladas las medidas de higiene y desinfección de los diferentes equipos por donde pasa la fruta como cajones, maquinaria, cajas, etc. A pesar de ello, suele ser la fruta la que ya viene contaminada del campo, por lo que normalmente, los almacenes se ven obligados a realizar tratamientos fungicidas con productos fungicidas autorizados, cuya eficacia en general es buena, aunque se han desarrollado resistencias a muchos de ellos en la mayoría de los países productores como España, Israel, California, Sudáfrica, Argentina y Florida entre otros. (El Ghaouth y Wilson, 2002).

El hongo *P. italicum*, es el agente causal del moho azul en los cítricos, afectando drásticamente a la calidad del fruto y su vida útil (Jing et al., 2020). *Penicillium italicum* se desarrolla mejor en temperaturas de refrigeración, por lo que durante el transporte y almacenamiento son las etapas donde más se desarrolla (Tuset, 1987). *Penicillium italicum*, a diferencia de *P. digitatum* puede penetrar el exocarpo del fruto sin necesidad de heridas, facilitando de esta forma la contaminación cruzada con otros frutos a través del simple contacto (González, 2013). Los síntomas que presenta son similares a los de *P. digitatum*, con la diferencia de que sus esporas son de color azul y se caracteriza por desarrollarse en temperaturas desde 3 a 32 °C, siendo ésta la enfermedad más importante en frutos preservados en frigoconservación (Gutiérrez-Rojas, 2017).

Al principio, las lesiones causadas por *P. italicum* son superficiales, pero progresan hacia el interior con rapidez a temperatura ambiente, hasta descomponer completamente el fruto (Figura 3) (Agrios, 2005).

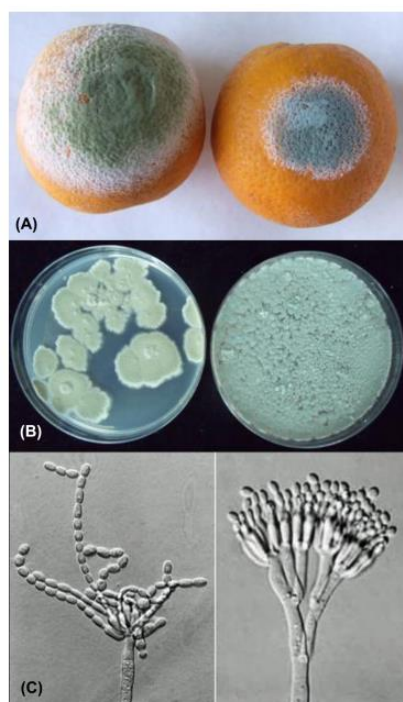


Figura 3. (A) Síntomas de moho verde (izquierda) y moho azul (derecha). (B) Colonias de *Penicillium digitatum* (izquierda) y *P. italicum* (derecha). (C) Conidióforos de *P. digitatum* (izquierda) y *P. italicum* (derecha). (Fuente: Palou, 2014).

Respecto a *G. candidum*, este hongo es el agente causal de la podredumbre ácida en los frutos cítricos. Se trata de una enfermedad emergente dentro de la producción citrícola debido al uso sistemático de los fungicidas bencimidazoles. La infección de los tejidos vegetales por parte de este hongo se produce generalmente por las artrosporas presentes en los medios líquidos, que en el caso de los almacenes citrícolas tienen lugar en el drencher y en la balsa. (Marín y Tuset, 2000).

La temperatura para su desarrollo óptimo es de aproximadamente 28 °C y también necesita una humedad relativa de entre 80-90%. La patogenicidad de *G. candidum* implica la secreción de endo-poligalacturonasas extracelulares (PG) que ayudan a la rápida descomposición de los tejidos infectados, facilitando la enfermedad y produciendo un reblandecimiento de la fruta (Nakamura et al., 2001). El hongo se expande de forma radial y únicamente adquiere un color marrón oscuro la zona que está más en contacto con la herida y normalmente no se produce ningún tipo de esporulación.

El control de estos patógenos de frutos cítricos con fungicidas de síntesis ha presentado últimamente distintas restricciones legales o comerciales, ya sea por prohibición de principios activos o por restricciones respecto al número de residuos demandados por los distintos mercados. A su vez, se han detectado un mayor nivel de resistencias de cepas de *Penicillium* spp. a los fungicidas de uso más frecuente en postcosecha (Bus et al., 1991; Ragone, 1999; Fogliata et al., 2000; Cocco, 2005; Pérez et al., 2011; Vázquez et al., 2014), lo que dificulta el control de enfermedades y lleva a la búsqueda de alternativas. Por otro lado, la actual preocupación de las autoridades por la inocuidad de los alimentos ha llevado a plantear el uso de otros fungicidas naturales, baños de calor, luz UV y ozono entre otros tratamientos alternativos (D'hallewin et al., 2004).

1.2. Control del podrido postcosecha en cítricos

Desde la aparición de las materias activas de síntesis con poder fungicida, éste ha sido el método más utilizado por la industria frutícola, teniendo estos tratamientos una pérdida de fruta que oscila entre el 2-4% dependiendo entre otros factores del estado de la fruta, el manejo, y las condiciones ambientales durante los diferentes procesos desde la recolección. En este mismo sentido, si la fruta no fuera tratada en absoluto, se podría llegar a unos niveles de pérdidas de entre el 15-30% (Tuset, 1987). Los fungicidas de síntesis pueden tener diferentes objetivos como inhibir la esporulación, actuar de forma preventiva evitando infecciones o actuando frente a infecciones ya existentes. Además, la eficacia de éstos depende de la materia activa utilizada, así como las condiciones de pH, humedad, tiempo de aplicación, composición, concentración, temperatura y tipo de fruta al cual se va a aplicar (Palou, 2014).

Actualmente, la utilización de fungicidas de síntesis está regulada en la Unión Europea por el reglamento 1107/2009 y la aprobación de un fungicida depende de los riesgos que pueda tener (Ortíz-Gimeno, 2020). Estas materias activas dejan residuos, y estos residuos a partir de un valor determinado pueden ser perjudiciales para la salud humana y animal, por lo que la Unión Europea mediante el reglamento 396/2005 deja establecidos los límites máximos de residuos (LMR) para cada materia activa y así asegurar la inocuidad de los alimentos (Tablas 1, 2 y 3)

Tabla 1. Materias activas con actividad fungicida autorizadas en postcosecha en cítricos (Fuente: Elaboración Propia).

MATERIA ACTIVA	INSCRIPCIÓN	CADUCIDAD
IMAZALIL	03/11/2020	31/12/2025
FOSFONATO POSTÁSICO	31/07/2018	30/09/2024
PIRIMETANIL	19/01/2018	15/03/2025
FOSETIL AL	13/06/2005	15/03/2025
FENILFENOL	14/12/2009	31/12/2023
FLUDIOXONIL	08/05/2017	31/10/2023
TIABENDAZOL	10/10/1987	31/03/2032

Estos fungicidas normalmente se aplican con la llegada de la fruta a la central citrícola mediante un tratamiento “drencher”, en el cual, se desinfecta superficialmente la fruta y las cajas de campo, además, también se desinfecta normalmente la fruta en balsas o duchas durante el proceso de confección.

Tabla 2. Ejemplos de composiciones basadas en las materias fúngicas autorizadas para postcosecha en cítricos, géneros fúngicos para las cuales son eficaces y autorizada su autorización y dosis de aplicación (Fuente: Elaboración Propia).

EJEMPLO COMPOSICIÓN PARA USO EN DRENCHER	GÉNERO FÚNGICO CONTROLADO	DOSIS
SULFATO IMAZALIL 7,5%	<i>Penicillium</i> spp. y <i>Diplodia</i> spp.	0,025-0,06 l/Tm
FOSFONATO POTÁSICO 25% (Exp. Como ácido fosfórico)	<i>Phytophthora</i> spp.	0,7-1l/hl
PIRIMETANIL 40%	<i>Penicillium</i> spp.	0,2%
FOSETIL AL 45%	<i>Phytophthora</i> spp.	0,5%
2-FENILFENOL	<i>Penicillium</i> spp. y <i>Rhizopus</i> spp.	0,5-0,6%
FLUDIOXONIL 60%	<i>Penicillium</i> spp. y <i>Rhizopus</i> spp.	0,07-0,1%
TIABENDAZOL 0,5%	Hongos en postcosecha	1l/Tm

Actualmente, algunos supermercados han marcado sus propios estándares de calidad limitando el número de materias activas fungicidas presentes en la fruta, lo que dificulta muchísimo el control de estas enfermedades postcosecha, ya que muchas veces se ven obligados a solo poder utilizar una materia activa en almacén debido a la utilización de otras en campo. También los supermercados marcan en algunas ocasiones qué materias activas concretamente quieren que el almacén utilice para la confección de la fruta que han comprado (Palou et al., 2008).

Debido a estas dificultades que experimentan los comercios citrícolas desde hace unos años, se han desarrollado formulados a base de extractos naturales sin residuos para el control de las enfermedades fúngicas en postcosecha que, o bien aplicados de forma única o en combinación con tratamientos de síntesis química, han demostrado tener un buen control de los hongos patógenos como *Penicillium* spp. y *G. candidum*. Algunos de estos formulados contienen: suero láctico, clorhidrato de quitosano y *Equisetum arvense*. A continuación, se describen los productos que se van a utilizar en los ensayos de postcosecha en cítricos de este trabajo, incluyendo la materia activa imazalil que se situará como producto de referencia.

- Clorhidrato de quitosano: La quitina se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza. Después de la celulosa es el polímero natural más abundante. Presenta una tasa de reposición tan alta en la biósfera que se estima que duplica a la de la celulosa, por lo que constituye un importante recurso renovable. La principal fuente de quitina son los exoesqueletos de crustáceos (Ríos-Ruiz et al., 2020).
- Existen evidencias de que la actividad antifúngica del quitosano puede depender del momento de desarrollo del hongo (Liu et al., 2007). También se ha detectado una relación directa entre el peso molecular del quitosano y su actividad fúngica (Hirano y Nagano, 1989; Bautista Baños et al., 2006). Otras explicaciones son la inhibición de síntesis de algunas enzimas presentes en los hongos (El-Ghaouth et al., 1992a) o la ocurrencia de alteraciones citológicas (Ait Barka et al., 2004).
- *Equisetum arvense*: La cola de caballo es una planta utilizada por su marcada actividad fúngica por su alto contenido en sílice y la presencia de una saponina tóxica para los hongos llamada Equisetonina. Su mecanismo de acción se basa principalmente en el engrosamiento de la pared celular, lo que impide o dificulta la entrada de hongos. Su uso se recomienda tanto en condiciones preventivas para evitar la entrada del hongo, como en condiciones curativas ya que tiene la capacidad de afectar al desarrollo del hongo (Santana, 2014).
- Lactosuero: El lactosuero tiene un efecto inhibitor del desarrollo de hongos debido a los metabolitos secundarios originados durante su fermentación (González et al., 2016)
- Imazalil: Es un fungicida sistémico de actividad preventiva y curativa que es utilizado como tratamiento en el control de podredumbres ocasionadas por hongos del género *Penicillium* spp. en postcosecha. El imazalil es un polvo soluble, químicamente estable a temperatura ambiente y a la ausencia de luz, térmicamente estable hasta 285 °C (Equaquímica, 2018). Esta materia activa actúa inhibiendo la biosíntesis del ergosterol, lo que afecta a la permeabilidad celular del hongo, en hongos del género *Penicillium* que afectan a cítricos se ha observado una actividad antiesporulante debido a que afecta principalmente a los conidios (esporas) y a los tubos germinativos (Terralia, 2016).

2. Objetivos

En este trabajo se va a realizar una evaluación de la eficacia para el control del podrido postcosecha en frutos cítricos causado por *Penicillium* spp. y *Geotrichum candidum* de las siguientes sustancias: Clorhidrato de quitosano + *Equisetum arvense* (Neoforce Defender) y

lactosuero + *E. arvense* (Neoforce Protector). Para ello, se van a realizar dos experimentos en almacén citrícola: 1) Cámara de desverdización en condiciones de humedad, temperatura y etileno controladas; y 2) A temperatura ambiente. Además, se realizará un experimento en condiciones controladas de laboratorio mediante la inoculación de esporas de *G. candidum* en frutos cítricos a una concentración determinada. Estos productos van a ser comparados con imazalil ya que es un fungicida postcosecha de referencia y, frente a un control sin tratar.

3. Materiales y métodos

3.1. Ensayo 1. Cámara de desverdización

El ensayo tuvo lugar en el almacén del comercio citrícola Fruitess Boixadós utilizando su cámara de desverdización para realizar el estudio. Esta cámara se utiliza para eliminar el color verde de la fruta cuando se recoge de campo con el interior maduro en cuanto a grados brix y acidez se refiere, pero por fuera todavía no ha adquirido la coloración naranja adecuada. Cuando se someten los frutos cítricos a este tratamiento es muy común la aparición de *Penicillium* spp. y *G. candidum*, debido a que son patógenos que necesitan de una alta humedad y temperatura para desarrollarse.

Se utilizaron 3 productos para realizar el ensayo: imazalil, clorhidrato de quitosano + *E. arvense*, lactosuero + *E. arvense*, y agua como tratamiento control. El procedimiento experimental fue sumergir las naranjas y clementinas en un baño drencher durante 30 segundos y, finalmente, llevar las muestras a la cámara de desverdizado, en la cual, las frutas se encontraban a un 80% de humedad, una temperatura de 21°C y una concentración máxima de etileno de 2000ppm.

Para el diseño del ensayo se utilizaron 3 repeticiones de 30 frutos por tratamiento, lo que suma un total de 360 frutos por cada variedad de cítrico tratada, que en este ensayo fueron clementinas Clemenules y naranjas Navelina.

En el momento del ensayo, en primer lugar, se realizó una herida en la parte ecuatorial del fruto a todos los frutos, de manera que esta herida facilitaría la entrada de los hongos patógenos y haría más rápida la evolución del podrido. Una vez realizada la herida, se preparó el baño drencher para cada tratamiento. El baño drencher consistió en llenar un recipiente grande en el que se pudiese sumergir un cajón de campo y dejar las frutas sumergidas con el cajón durante 30 segundos, simulando el baño drencher habitual que hacen los comercios citrícolas con la llegada de los cajones al almacén después de la recolección. El tratamiento con imazalil se realizó a una dosis de 6 l x 1000 l y los tratamientos con quitosano + *E. arvense* y lactosuero + *E. arvense* se realizaron ambos a una dosis de 10 l x 1000 l. Una vez realizados todos los tratamientos, los cajones se apilaron en un pallet y se llevaron a la cámara de desverdizado con las condiciones controladas de temperatura, humedad y etileno mencionadas anteriormente.

Tras una semana con las muestras sometidas al tratamiento de desverdización, se procedió a sacar el pallet y contabilizar los frutos, separando los que permanecían sanos de aquellos en los que se observaban daños de podrido causados por hongos. En los frutos que presentaban estos daños, se anotó el resultado según si tenían presencia de *Penicillium* spp., o *G. candidum* o ambos patógenos simultáneamente

3.2. Ensayo 2. Ensayo a temperatura ambiente

De nuevo, este ensayo fue realizado en las instalaciones de Fruitess Boixadós. Esta vez se decidió realizar el estudio sin la utilización de la cámara de desverdizado, debido a que en el momento de realizar este segundo ensayo ambas variedades presentaban ya la coloración naranja típica

de estos frutos. Gracias a esta variación en el ensayo respecto al anterior, se podría comparar la evolución y aparición de hongos en estas nuevas condiciones.

Se utilizaron 3 productos para realizar el ensayo: imazalil, quitosano + *E. arvense*, lactosuero + *E. arvense*, y agua como tratamiento control. Además, para ver si realmente se podía potenciar la eficacia de imazalil, también se utilizó la mezcla de imazalil con quitosano + *E. arvense*. El procedimiento experimental fue sumergir las naranjas y clementinas en un baño drencher durante 30 segundos y finalmente llevar las muestras a la cámara a temperatura ambiente durante una semana.

Para el diseño se utilizaron 3 repeticiones de 30 frutos por tratamiento, lo que suma un total de 450 frutos por cada variedad de cítrico tratada, que en este ensayo fueron también clementinas clemenules y naranjas navelina.

Esta vez no se realizaron heridas en la parte ecuatorial de los frutos, de esta manera se simuló la realidad del tratamiento y confección habitual, en la cual no todos los frutos contienen heridas que faciliten la entrada de hongos. Directamente, se preparó el baño drencher en un recipiente lo suficientemente grande para que se pudiese sumergir el cajón de campo con los frutos dentro durante 30 segundos. El tratamiento con imazalil se realizó a una dosis de 6 l x 1000 l, los tratamientos con quitosano + *Equisetum arvense* y lactosuero + *E. arvense* se realizaron ambos a una dosis de 10 l x 1000 l y el tratamiento combinado de imazalil con quitosano + *E. arvense* se realizó a una dosis de 6l x 1000l de imazalil y 10l x 1000l de quitosano + *E. arvense*. Una vez realizados todos los tratamientos, los cajones se apilaron en un pallet y se llevaron a la cámara, esta vez apagada, con las condiciones ambientales del momento.

Tras una semana con las muestras sometidas al tratamiento de desverdización, se procedió a sacar el pallet y contabilizar los frutos, separando los que permanecían sanos de aquellos en los que se observaban daños de podrido causados por hongos. En los frutos que presentaban estos daños, se anotó el resultado según si tenían presencia de *Penicillium* spp., o *G. candidum*, o ambos a la vez.

3.3. Ensayo 3. Inoculación con *Geotrichum candidum*

Este ensayo fue realizado en 2 partes: el tratamiento de los frutos se realizó en las instalaciones de Fruites Boixadós y la inoculación se realizó en el laboratorio de Patología Vegetal de la ETSIAMN de la Universitat Politècnica de València. Se realizó en laboratorio la inoculación de *G. candidum* con una suspensión de esporas a la concentración de 10^6 esporas/ml para determinar la eficacia de cada producto frente a las infecciones causadas por este hongo.



Figura 4. Inoculación de *G. candidum* en naranja navelina a través de una herida ocasionada en la parte ecuatorial del fruto (Fuente: Elaboración propia).

Se utilizaron 3 productos para realizar el ensayo: imazalil, quitosano + *E. arvense*, lactosuero + *E. arvense*, y agua como tratamiento control. El procedimiento experimental fue sumergir las naranjas en un baño drencher durante 30 segundos y finalmente llevar las muestras a laboratorio para su inoculación.

Para el diseño del ensayo se utilizaron 3 repeticiones de 8 frutos por tratamiento, lo que suma un total de 96 frutos cítricos de variedad Navelina tratados. En este caso no se utilizaron las clementinas Clemenules debido a la imposibilidad de tener frutos en las fechas en las que se realizó este ensayo.

En el momento del ensayo, en primer lugar, se realizó una herida en la parte ecuatorial del fruto a todos los frutos, de manera que esta herida sería posteriormente el punto de inoculación del hongo mediante una micropipeta, con un volumen de aplicación en cada fruto de 30 μ l. Después se realizó el baño drencher durante 30 segundos para cada tratamiento en un recipiente grande donde se pudieran sumergir los cajones de campo con los frutos dentro. El tratamiento con imazalil se realizó a una dosis de 6 l x 1000 l, los tratamientos con quitosano + *E. arvense* y lactosuero + *E. arvense* se realizaron ambos a una dosis de 10l x 1000l y el tratamiento combinado de imazalil con quitosano + *E. arvense* se realizó a una dosis 6 l x 1000 l de imazalil y 10 l x 1000 l de quitosano + *E. arvense*. Una vez realizado el tratamiento, se trasladaron las frutas de forma inmediata al laboratorio para la inoculación de *G. candidum*. Finalmente, una vez realizada la inoculación, se cubrieron las heridas con celofán para evitar que el volumen aplicado se saliera de la herida y se secase la herida. Una vez sellada la herida, se posicionaron los frutos en una cámara de cultivo en condiciones controladas de temperatura a 23°C.

Tras una semana con los frutos inoculados incubándose en la cámara de cultivo, éstos se sacaron y se evaluaron los resultados, separando los frutos sanos de los que habían sido atacados por hongos. Los frutos atacados por hongos se separaron según si en ellos se observaba la presencia de *Penicillium* spp., *G. candidum* o ambos.

3.4. Análisis de datos

Para el tratamiento de los datos de forma estadística y ver si había diferencias significativas entre los tratamientos estudiados (control, quitosano + *E. arvense*, lactosuero + *E. arvense*, imazalil e imazalil + quitosano), primero se calcularon las medias de podrido para cada tratamiento y hongo estudiado (*Penicillium* spp. y *G. candidum*), es decir, se calculó el promedio de las tres repeticiones de cada uno de los tratamientos de los tres ensayos realizados para los análisis sin diferenciación de los hongos estudiados y también para cada hongo en particular. Una vez realizadas las medias del porcentaje de podrido para cada tratamiento y ensayo, se calcularon las desviaciones estándar y se realizó un análisis Kruskal-Wallis para la comparación de medias mediante el test de rango múltiple con un nivel de significación de $P < 0,05$.

4. Resultados y discusión

Los resultados de los ensayos de evaluación de diferentes productos para el control del podrido postcosecha en cítricos realizados en este trabajo se muestran la Figura 8, en la que se muestran fotografías de las diferentes fases y momentos del estudio, en las Figuras 9 y 10 (ensayo 1), 11 y 12 (ensayo 2) y 13 (ensayo 3).

La Figura 8 muestra diferentes aspectos de los ensayos realizados. En la Figura 8 A se puede ver la disposición en cámara de cultivo de las naranjas variedad Navelina que se inocularon mediante *G. candidum* (ensayo 3) separadas según el producto con el que fueron tratadas. En la Figura 8 B se muestra en el ensayo 1, la disposición en pallet de las diferentes repeticiones de cada tratamiento una vez realizado, dispuestos a dejarlos almacenados para ver su evolución. En la Figura 8 C se muestra en el ensayo 2 el desarrollo de *Penicillium* spp. que se observó en clementinas variedad Clementines en el tratamiento control tratado con agua. En la Figura 8 D (ensayo 2), se muestra el desarrollo de síntomas de *G. candidum* observado en clementinas variedad Clementines en el tratamiento control con agua. En la Figura 8 E (ensayo 3), se muestra la herida en la parte ecuatorial de la naranja variedad Navelina que se hizo para la inoculación de esporas de *G. candidum* en el ensayo en condiciones controladas de laboratorio y, finalmente, en la Figura 8 F, se muestra la simulación de baño drencher que se hizo en cada una de las repeticiones de cada tratamiento en el almacén cítrico para los ensayos 1 y 2.

La Figura 9 muestra los resultados del ensayo 1 (cámara de desverdización) en naranja variedad Navelina en relación con el podrido causado por los hongos *Penicillium* spp. y *G. candidum*. En esta figura los resultados han sido organizados en 3 análisis diferentes: A) Porcentaje total de frutos podridos sin diferenciación de los hongos que lo causaron; B) Porcentaje de podrido de frutos causado por *Penicillium* spp.; y C) Porcentaje de podrido de frutos causado por *G. candidum*. En todos los ensayos hay que tener en cuenta que puede haber frutos que simultáneamente presentaran síntomas de podrido causado por *Penicillium* spp. y síntomas causados por *G. candidum*.

En este ensayo se evaluaron 3 tratamientos (quitosano + *E. arvense*, lactosuero + *E. arvense* e imazalil) y un tratamiento control mediante agua, y como se observa en la Figura 9, el resultado fue que se observaron diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos, siendo esta diferencia similar en cada uno de los análisis realizados (podrido total, podrido causado por

Penicillium spp., y podrido causado por *G. candidum*). Todos los tratamientos mostraron una diferencia significativamente positiva respecto al control no tratado, presentando un porcentaje inferior de frutos podridos que éste. El imazalil fue la materia activa con mejores resultados en cada uno de los análisis y el lactosuero + *E. arvense* la sustancia básica con mejor resultado de reducción de frutos podridos en cada análisis por delante del quitosano + *E. arvense* y el control.



Figura 5. A) Navelinas inoculadas con *Geotrichum candidum* en cámara de cultivo en condiciones controladas para los tratamientos control, quitosano + *E. arvense*, lactosuero + *E. arvense* e imazalil; B) Palletizado post tratamiento; C) *Penicillium* spp. en clementina variedad Clemenules; D) *G. candidum* en clementina variedad Clemenules; E) Herida ocasionada en la parte ecuatorial de la naranja variedad Navelina donde se inoculó *G. candidum* y se selló con cinta adhesiva para evitar la desecación; y F) Baño drencher durante los ensayos en almacén citrícola.

La Figura 10 muestra los resultados del ensayo 1 (cámara de desverdización) en clementina variedad Clemenules en relación con el podrido causado por los hongos *Penicillium* spp. y *G. candidum*. Los resultados han sido ordenados también en 3 análisis diferentes: A) Porcentaje de frutos podridos sin diferenciación de hongos; B) Porcentaje de podrido de frutos causado por *Penicillium* spp.; y C) Porcentaje de podrido de frutos causado por *G. candidum*. Este ensayo, realizado en condiciones controladas en una cámara de desverdización se llevó a cabo mediante la aplicación de 3 tratamientos diferentes (quitosano + *E. arvense*, lactosuero + *E. arvense* e imazalil) y un tratamiento control mediante agua y, como bien se observa en la Figura 10, hubo diferencias significativas entre cada tratamiento en cada uno de los 3 análisis realizados (podrido total, podrido causado por *Penicillium* spp. y podrido causado por *G. candidum*). Todos los tratamientos realizados en cada uno de los análisis tuvieron como resultado diferencias

significativamente positivas con relación a la reducción del porcentaje de podrido respecto al tratamiento control no tratado. Destacar en este caso que el tratamiento con mayor eficacia fue el imazalil, seguido por el tratamiento mediante lactosuero + *E. arvense*, para el que se obtuvieron mejores resultados que para el tratamiento de quitosano + *E. arvense*.

La Figura 11 muestra los resultados del ensayo 2 (a temperatura ambiente) en naranja variedad Navelina correspondiente al podrido causado por los hongos *Penicillium* spp. y *G. candidum*. Los resultados han sido desglosados en 3 análisis: A) Porcentaje de frutos podridos sin diferenciación de hongos; B) Porcentaje de frutos podridos causado por *Penicillium* spp.; y C) Porcentaje de frutos podridos causado por *G. candidum*. El ensayo se realizó mediante la aplicación de 4 tratamientos (quitosano + *E. arvense*, lactosuero + *E. arvense*, imazalil e imazalil + quitosano + *E. arvense*) y un tratamiento control mediante agua. Como se observa en la Figura 11-A, el tratamiento realizado con imazalil + quitosano + *E. arvense* fue el más eficaz en cuanto a la reducción del porcentaje de frutos podridos, aunque no mostró diferencias significativas con el tratamiento con imazalil y con el tratamiento mediante lactosuero + *E. arvense*. Por otro lado, los tratamientos control no tratado y quitosano + *E. arvense* no mostraron diferencias significativas entre ellos, aunque sí que mostraron diferencias significativas con el resto de los tratamientos, siendo menos efectivos en el control del podrido. En referencia al análisis B donde se estudia el porcentaje de podrido causado por *Penicillium* spp, todos los tratamientos realizados presentaron diferencias significativamente positivas respecto al control, aunque entre ellos no se observaron diferencias. El análisis C, que hace referencia al control de podrido causado por *G. candidum*, presentó diferencias significativas entre los tratamientos de control y quitosano + *E. arvense* frente a los tratamientos de imazalil e imazalil + quitosano + *E. arvense*, siendo los 2 primeros tratamientos los que peor resultado obtuvieron. El tratamiento realizado mediante lactosuero + *E. arvense* no ha mostrado diferencias significativas con ninguno de los otros tratamientos en este caso. El imazalil + quitosano + *E. arvense* al igual que en el análisis A, ha sido el tratamiento que mejor control ha mostrado frente a *G. candidum*.

La Figura 12 presenta los resultados del ensayo 2 (a temperatura ambiente) en clementina variedad Clemenules en relación con el podrido causado por los hongos *Penicillium* spp. y *G. candidum*. Los resultados han sido diferenciados en 3 análisis: A) Porcentaje de frutos podridos sin diferenciación de hongos; B) Porcentaje de frutos podridos causado por *Penicillium* spp.; y C) Porcentaje de frutos podridos causado por *G. candidum*. El ensayo se realizó mediante la aplicación de 4 tratamientos (quitosano + *E. arvense*, lactosuero + *E. arvense*, imazalil e imazalil + quitosano + *E. arvense*) y un tratamiento control mediante agua. En el análisis A, donde se muestra el porcentaje total de frutos podridos sin diferenciar el tipo de hongo que lo causa, se observa como los tratamientos de imazalil e imazalil + quitosano + *E. arvense* presentaron diferencias significativamente positivas respecto al control, mientras que los tratamientos con quitosano + *E. arvense* y lactosuero + *E. arvense* mostraron diferencias significativas respecto al resto de tratamientos, aunque el porcentaje de frutos podridos fue menor frente al del control. En relación con el análisis B, destacar que todos los tratamientos presentaron diferencias significativamente positivas respecto al control. Los tratamientos con imazalil e imazalil + quitosano + *E. arvense* fueron los que mejor resultado obtuvieron y, aunque no muestran diferencias significativas respecto al tratamiento mediante lactosuero + *E. arvense*, sí que las muestran respecto al quitosano + *E. arvense* y el control en cuanto a la reducción del porcentaje de frutos podridos. El tratamiento mediante lactosuero + *E. arvense* no presentó diferencias significativas respecto al resto de tratamientos realizados excepto con el control, en el que sí se mejoraron los resultados de podrido y muestra diferencias significativas. El análisis C muestra los resultados obtenidos frente al control de *G. candidum*, y al igual que el análisis B, todos los

tratamientos mostraron diferencias significativamente positivas respecto al control, siendo los tratamientos con imazalil e imazalil + quitosano + *E. arvense* los que tuvieron mejores resultados de reducción de porcentaje de frutos podridos, y diferencias significativas respecto al control y también el tratamiento con quitosano + *E. arvense*. El tratamiento mediante lactosuero + *E. arvense* se situó en un término medio y, aunque mejoró los resultados del tratamiento con quitosano + *E. arvense*, no mostró diferencias significativas con éste ni tampoco con los tratamientos mediante imazalil e imazalil + quitosano + *E. arvense*.

Finalmente, en la Figura 13 se presentan los resultados del ensayo 3 (inoculación con *G. candidum*) en naranja variedad Navelina en relación con el podrido causado por *Penicillium* spp. y *G. candidum*. Este ensayo se realizó en laboratorio mediante condiciones controladas de temperatura y con un nivel de inóculo conocido de *G. candidum*, con el objetivo de determinar la eficacia de cada tratamiento respecto a un hongo que no siempre está presente en un almacén de procesado de frutos cítricos. Igual que en los ensayos anteriores, los resultados se desglosaron en 3 análisis: A) Porcentaje de frutos podridos sin diferenciación de hongos; B) Porcentaje de frutos podridos causado por *Penicillium* spp.; y C) Porcentaje de frutos podridos causado por *G. candidum*. Este ensayo se llevó a cabo mediante la aplicación de 3 tratamientos diferentes (quitosano + *E. arvense*, lactosuero + *E. arvense* e imazalil) y un tratamiento control mediante agua. Hay que comentar aquí que, aunque no se inoculó *Penicillium* spp. en los frutos, éstos presentaban infecciones naturales que se manifestaron durante el ensayo y por eso se evaluaron y se tuvieron en cuenta en el análisis. En los 3 análisis realizados todos los tratamientos mostraron diferencias significativas de reducción del podrido de frutos en comparación con el control. En el caso del análisis A, todos los tratamientos han mostrado diferencias significativas entre sí, siendo el imazalil el tratamiento con mejores resultados, seguido del lactosuero + *E. arvense* y quitosano + *E. arvense* respectivamente. En cuanto al análisis B, donde se estudió el efecto de control sobre *Penicillium* spp., los tratamientos con imazalil y lactosuero + *E. arvense* fueron los que mejor resultado han dado sin mostrar diferencias significativas entre ellos. Éstos, además mostraron diferencias significativas de forma positiva respecto al tratamiento con quitosano + *E. arvense* y éste diferencias significativas sobre el control. Respecto al análisis C, en el que se estudió el efecto sobre *G. candidum*, también los tratamientos con imazalil y lactosuero + *E. arvense* fueron los que mejores resultados mostraron sin tener diferencias entre ellos dos, aunque sí que encontraron diferencias significativamente positivas respecto al tratamiento con quitosano + *E. arvense* y de éste respecto al control.

Como se ha podido observar en los resultados obtenidos de los diferentes análisis en los diferentes ensayos que se realizaron en el trabajo, la incidencia de hongos en postcosecha en frutos cítricos es bastante elevada, especialmente en lo que respecta a los hongos del género *Penicillium* y *G. candidum*, y también en los tratamientos control en los que no se aplicaron productos fitosanitarios. Estos resultados confirmaron la importancia de estos patógenos en los almacenes citrícolas, que pueden llegar en algunos casos dependiendo del manejo, clima y otros factores, a causar más del 50% de pérdidas de producto con graves consecuencias económicas (Trujillo-Negrellos, 2010).

Por ello, el uso de materias activas con actividad fungicida se ha convertido en una práctica habitual en los almacenes de almacenamiento y procesado de cítricos, haciendo un uso masivo de los mismos y, en muchos casos, se utilizaban las mismas materias activas continuamente. Todo ello, ha ido provocando una mayor resistencia de los hongos patógenos a los fungicidas, teniendo como consecuencia un menor control y mayores porcentajes de pérdidas postcosecha. Además, las nuevas legislaciones han ido limitando el uso de materias activas y sus dosis

máximas de aplicación (Palou y Montesinos-Herrero, 2015). De este modo, se ha ido generando la necesidad y urgencia del estudio de nuevos productos que no tengan residuos nocivos y no sean tóxicos para la salud, además de ser efectivos y una alternativa a los productos de síntesis química.

Penicillium spp. ha sido el conjunto de hongos con mayor presencia en nuestro estudio y es muy frecuente en postcosecha de cítricos en todo el mundo. Aunque de momento todavía existen algunas herramientas que hacen posible su control, éstas son cada vez más limitadas. En cambio, para *G. candidum* que no estaba afectando de forma tan abundante en los almacenes citrícolas, hoy en día con el tratamiento de ducha en drencher se ha estado favoreciendo mucho su evolución debido a que es un hongo que necesita de humedad continua, presente en el fruto, para desarrollarse (Tuset, 2008). Las herramientas fúngicas de síntesis química que han estado quedando con el paso de los años cada vez son menos eficaces por la aparición de cepas resistentes y, debido al reducido número de materias activas y el limitado número de usos y dosificación que tienen para cumplir con el límite máximo de residuos (LMR) que marca la legislación y los mercados, hacen que *G. candidum* aunque no tenga una presencia tan grande como *Penicillium* spp. tenga un control problemático (Tuset, 2008). Además, la identificación de *G. candidum* en muchas ocasiones es dificultosa, por lo que ha sido necesario el desarrollo de sustancias naturales que actúen con amplio espectro, de manera que puedan ser usadas para el control simultáneo de varios hongos patógenos, sin generar residuos y que puedan ser una alternativa y puedan usarse en combinación con los fungicidas de síntesis autorizados. El objetivo final es disminuir el desarrollo de resistencias y poder tener un control más eficaz de los hongos que afectan a los almacenes citrícolas en la fase de postcosecha (Cocco et al., 2016).

Tanto *Penicillium* spp. como *G. candidum* son hongos patógenos que necesitan de heridas o micro heridas ocasionadas durante la recolección, rameado, transporte o manejo en almacén. Estas heridas pueden ocasionarse desde el campo durante su producción hasta la llegada al consumidor final, por lo que son muchas etapas en las que el fruto puede verse afectado por heridas y como consecuencia por estos hongos. Además, un fruto puede verse afectado por ambos a la vez o por uno de ellos únicamente (Martínez-Blay, 2021).

Los dos primeros ensayos de este trabajo se plantearon de forma que encajaran con las condiciones que pueden ser habituales en los almacenes citrícolas: 1) Cámara de desverdización; y 2) Almacenado a temperatura ambiente. De esta manera pudimos comprobar si las condiciones de almacenamiento provocaban una variación en la incidencia de los hongos y la eficacia de los productos probados. De esta manera, evitamos que los resultados obtenidos por un solo ensayo en unas condiciones determinadas pudiesen distorsionar la información sobre la eficacia real de estos productos. Además, en laboratorio se realizó un ensayo en condiciones controladas en el que se inoculó una concentración determinada de esporas de *G. candidum* en la parte ecuatorial de naranjas variedad Navelina, de manera que así evaluamos la eficacia frente a este hongo patógeno, ya que la presencia de este patógeno en almacén en muchas ocasiones es baja y, por tanto, no es fácil obtener resultados suficientemente esclarecedores.

Respecto a los productos ensayados, el imazalil fue en todos los ensayos y análisis realizados el producto con mejor eficacia respecto al control de podrido tanto para *Penicillium* spp, como para *G. candidum*. Éste era un resultado esperado, ya que el imazalil es un fungicida de referencia muy usado en postcosecha de cítricos hasta hoy en día (Sánchez-Torres, 2007). No obstante, se observa una tendencia general al aumento de resistencias a esta materia activa campaña tras campaña atribuidas a mecanismos como: reducción de la afinidad en el local de acción del fungicida, reducción de la absorción del fungicida, detoxificación del fungicida, no

conversión en el compuesto activo, aumento de producción de la enzima inhibida o desvío del local bloqueado por una operación alternativa (Salazar, 2009).

Respecto a los dos productos alternativos ensayados, quitosano + *E. arvense* y lactosuero + *E. arvense*, los resultados de los tres ensayos incluidos en este trabajo mostraron que el producto basado en lactosuero + *E. arvense* fue el que presentó mejores resultados, llegándose a obtener en algunos casos resultados sin diferencias significativas respecto al imazalil, lo que demuestra que puede ser una alternativa frente a este tipo de hongos. Además, tuvo un mejor control de forma generalizada frente al producto basado en quitosano + *E. arvense*, que, aunque mejoró el control sin tratar en prácticamente todos los casos, tuvo un menor control que lactosuero + *E. arvense* e imazalil.

El producto en base a quitosano + *E. arvense*, aunque en muchos casos tuvo un menor porcentaje de podrido que el tratamiento control con agua, éste no tuvo los resultados esperados. Otros autores que estudiaron la eficacia del quitosano en postcosecha en cítricos como Chien et al. (2005) obtuvieron, mediante la aplicación de quitosano, niveles de reducción de infección similares e incluso inferiores a los conseguidos mediante la aplicación de tiabendazol al 0.1% (p/p), otro fungicida de referencia muy utilizado. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el hecho de que en el presente trabajo se utiliza un tipo de quitosano distinto y que la capacidad antimicrobiana del mismo se depende, entre otros factores, del origen de la quitina, grado de desacetilación y peso molecular del mismo (Cuero, 1999). Se ha observado que la reducción del porcentaje de podrido es mayor conforme aumenta la dosis de quitosano, llegando a tener resultados similares a imazalil o tiabendazol que son fungicidas de síntesis química de referencia en los almacenes de procesado de cítricos (Hernández-Muñoz et al., 2006), y se cree que es debido a la naturaleza policatiónica y al grado de polimerización de este compuesto (Bautista-Baños et al., 2006).

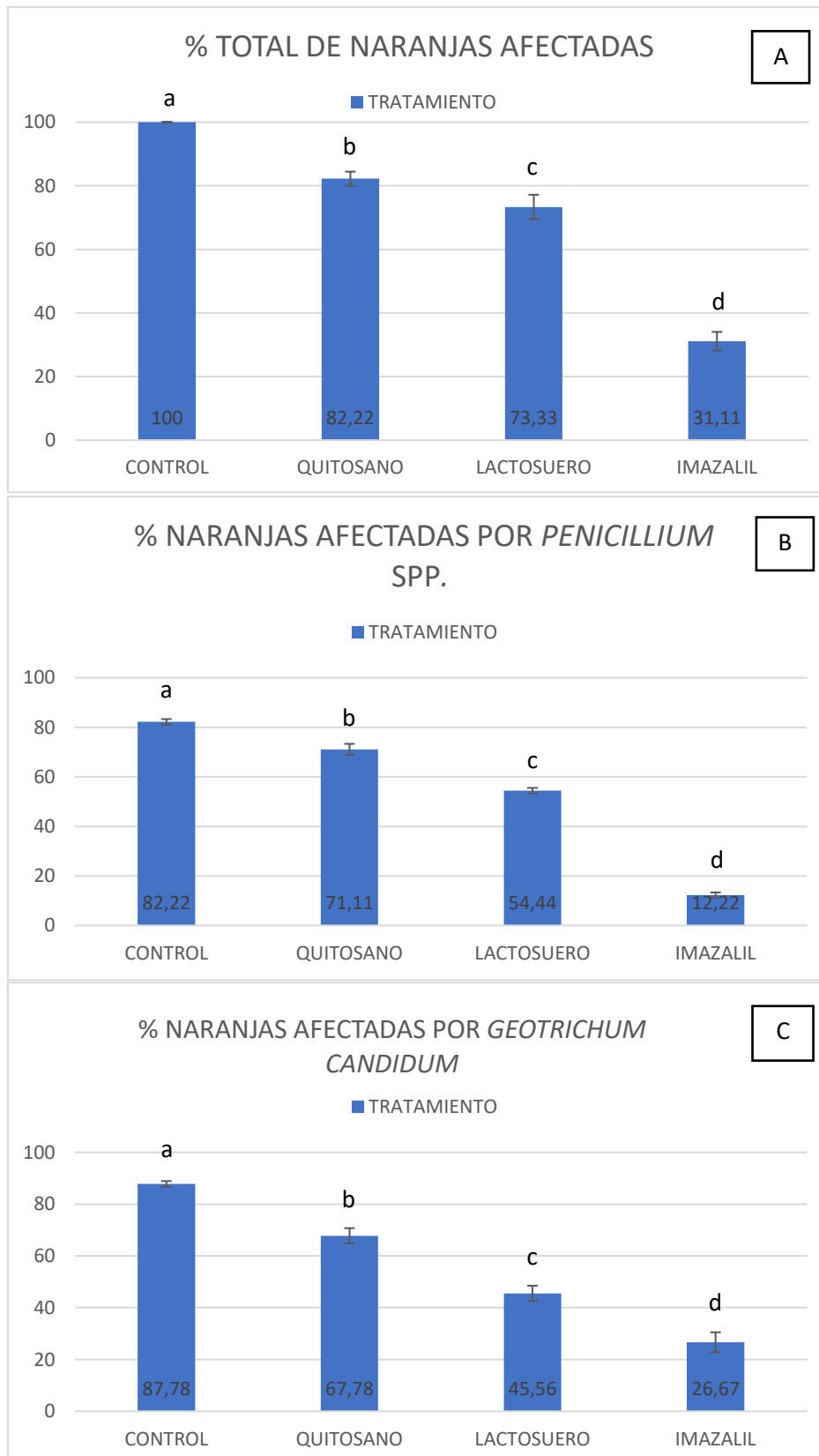


Figura 6. Ensayo 1 (cámara de desverdezación): Resultados de la evaluación de 3 tratamientos (quitosano + *E. arvense*, lactosuero + *E. arvense*, imazalil) y un tratamiento control mediante agua para el control del podrido postcosecha en naranjas variedad Navelina. A) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp. + *G. candidum*; B) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp.; y C) Porcentaje de fruta podrida causado por *G. candidum*.

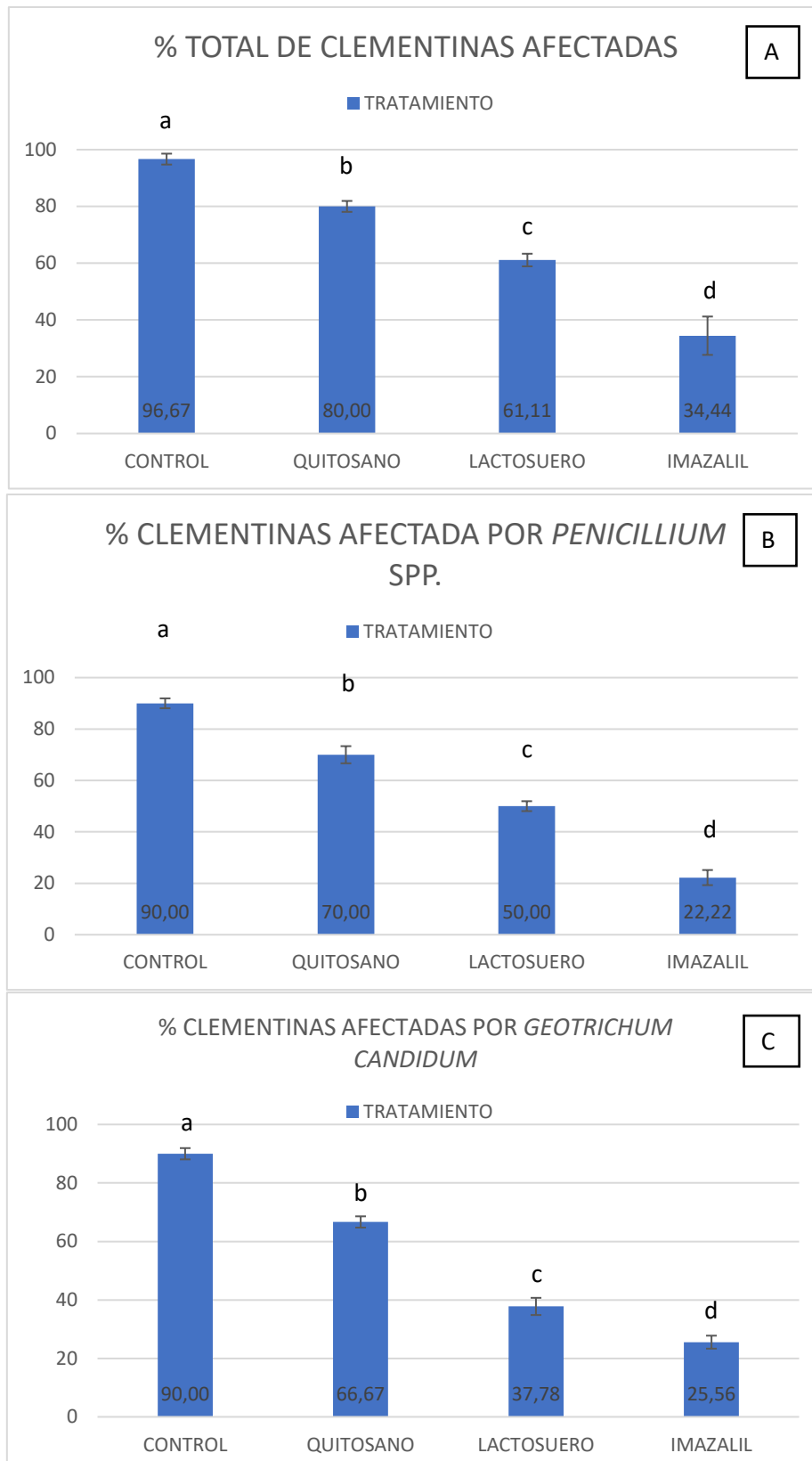


Figura 7. Ensayo 1 (cámara de desverdezación): Resultados de la evaluación de 3 tratamientos (quitosano + *E. arvense*, lactosero + *E. arvense*, imazalil) y un tratamiento control mediante agua para el control del podrido postcosecha en clementinas variedad Clemenules. A) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium spp.* + *G. candidum*; B) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium spp.*; y C) Porcentaje de fruta podrida causado por *G. candidum*.

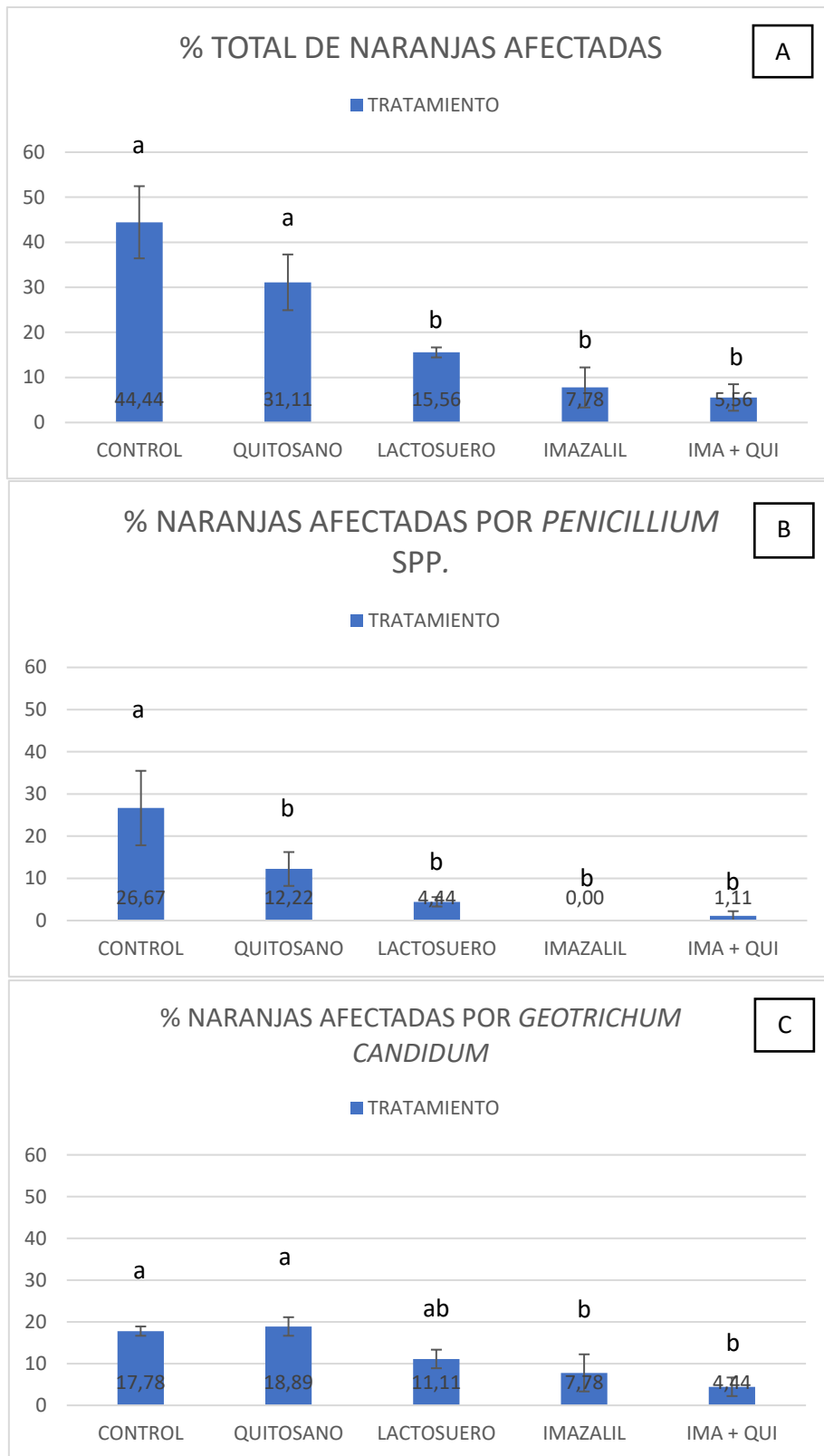


Figura 8. Ensayo 2 (a temperatura ambiente): Resultados de la evaluación de 4 tratamientos (quitosano + E. arvense, lactosuero + E. arvense, imazalil + E. arvense, imazalil + quitosano + E. arvense) y un tratamiento control mediante agua para el control del podrido postcosecha en naranjas variedad Navelina. A) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp. + *G. candidum*; B) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp.; y C) Porcentaje de fruta podrida causado por *G. candidum*.

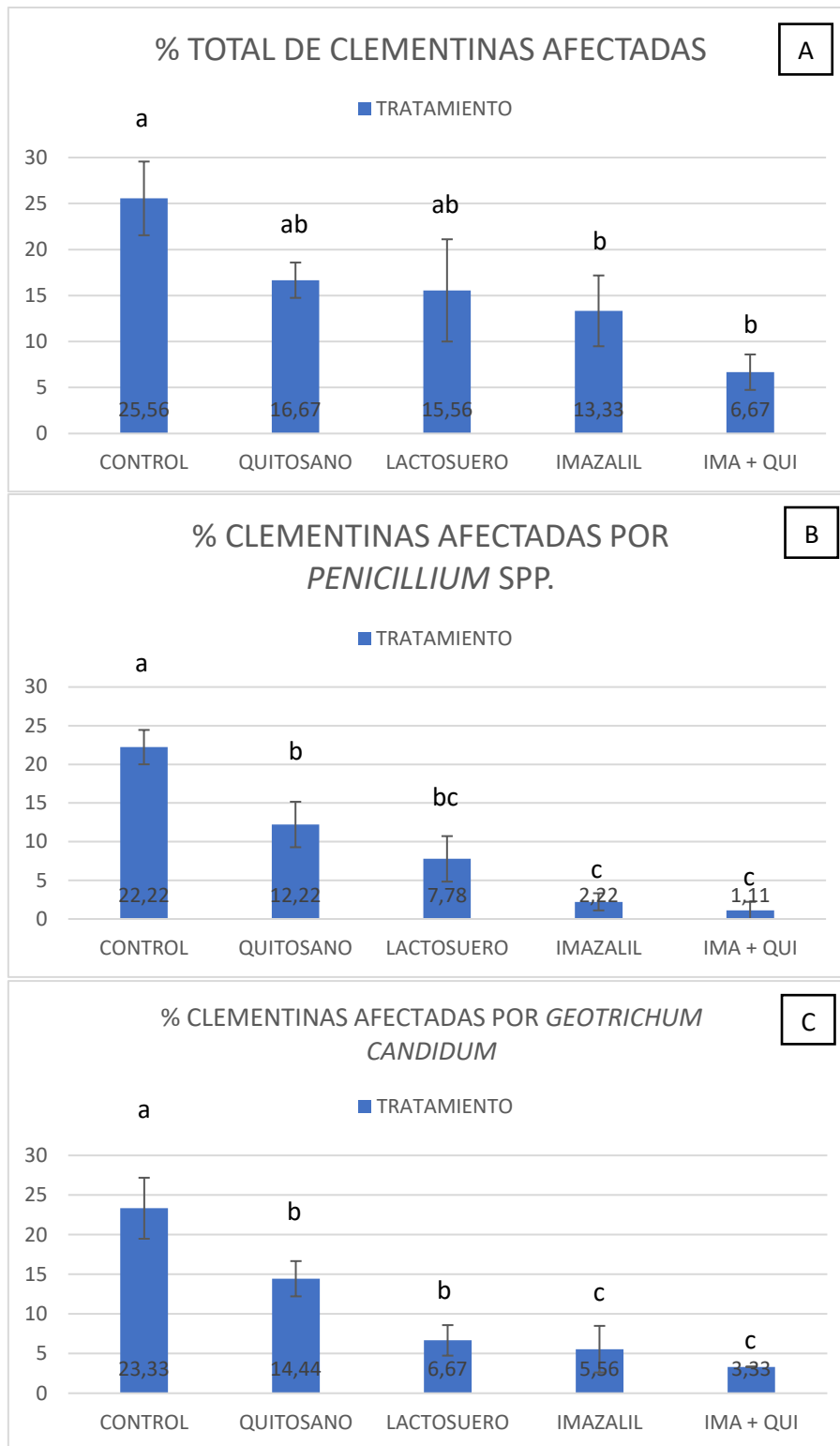


Figura 9. Ensayo 2 (a temperatura ambiente): Resultados de la evaluación de 4 tratamientos (quitosano + E. arvense, lactosuero + E. arvense, imazalil e imazalil + quitosano + E. arvense) y un tratamiento control mediante agua para el control del podrido postcosecha en clementinas variedad Clemenules. A) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp. + *G. candidum*; B) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp.; y C) Porcentaje de fruta podrida causado por *G. candidum*.

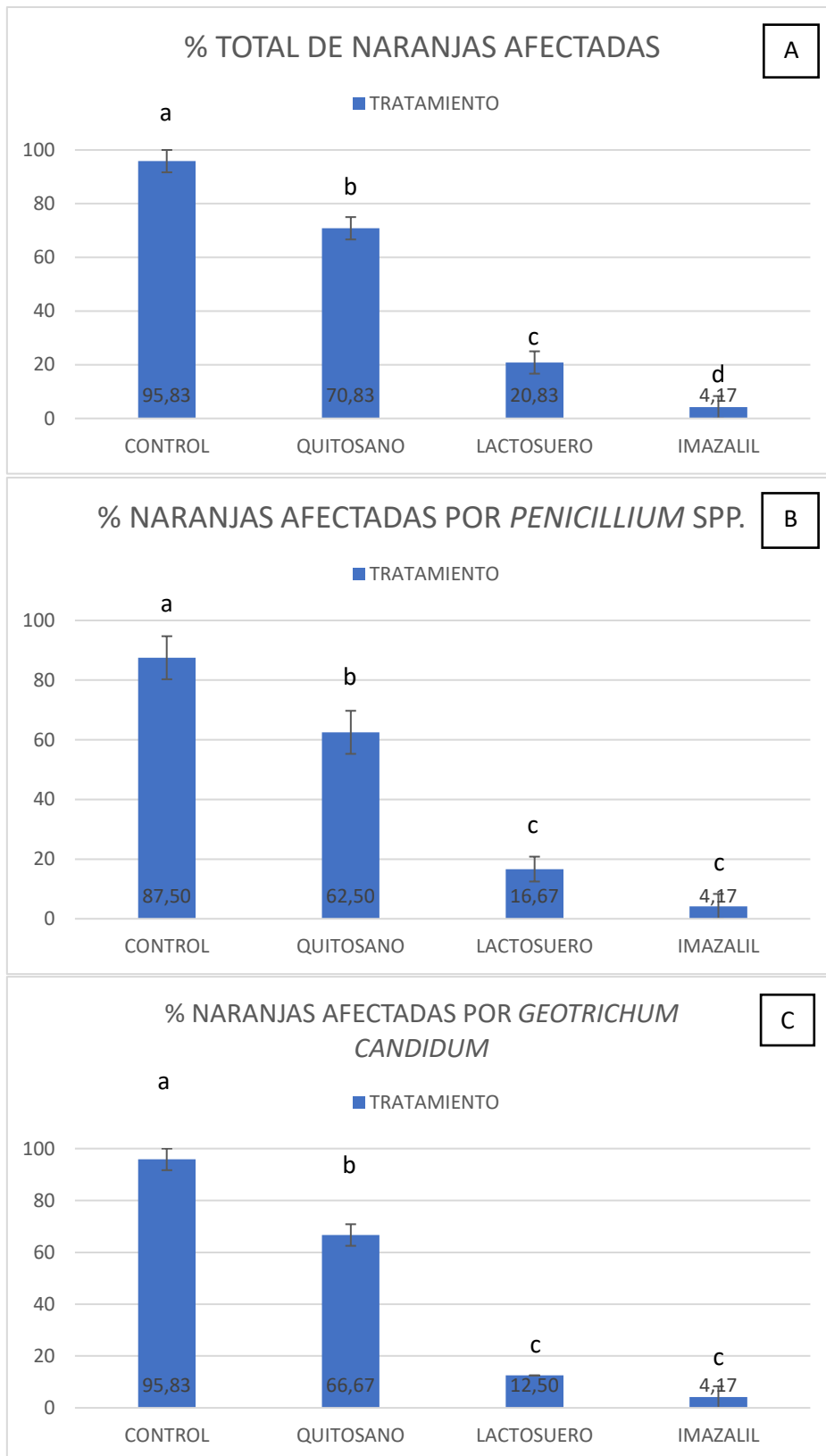


Figura 10. Ensayo 3 (inoculación de *Geotrichum candidum*): Resultados de la evaluación de 3 tratamientos (quitosano + *E. arvense*, lactosuero + *E. arvense* e imazalil) y un tratamiento control mediante agua para el control del podrido postcosecha en clementinas variedad Clemenules. A) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp. + *G. candidum*; B) Porcentaje de fruta podrida causado por *Penicillium* spp.; y C) Porcentaje de fruta podrida causado por *G. candidum*.

5. Conclusiones

Los ensayos realizados para evaluar la eficacia en el control de *Penicillium* spp. y *G. candidum* afectando a cítricos en postcosecha de los productos quitosano + *E. arvense* y lactosuero + *E. arvense* han mostrado, en general, una reducción en el porcentaje de frutos afectados respecto a los frutos control sin tratar, aunque inferior a la materia activa de referencia imazalil.

Estos resultados muestran el potencial para el uso de quitosano + *E. arvense* y lactosuero + *E. arvense* en condiciones de postcosecha en almacenes citrícolas, bien alternando estos tratamientos con materias activas de síntesis para evitar resistencias o bien, complementándolo para potenciar su efecto al tener un amplio espectro de acción.

6. Bibliografía

- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology 5th edition: Elsevier academic press. *Burlington, Ma. USA*, 922pp.
- Ait Barka, E., Eullaffroy, P., Clément, C., y Vernet, G. (2004). Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant cell reports*, 22, 608-614.
- Bautista-Baños, S., Hernandez-Lauzardo, A. N., Velazquez-Del Valle, M. G., Hernández-López, M., Barka, E. A., Bosquez-Molina, E., y Wilson, C. L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop protection*, 25, 108-118.
- Bus, V. G., Bongers, A. J., y Risse, L. A. (1991). Occurrence of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* resistant to benomyl, thiabendazole and imazalil on citrus fruit from different geographic origins. *Plant Disease*, 75, 1098-1100.
- Carvalho, C.P., Navarro, P., Salvador, A., (2012). Poscosecha. En: Garcés Giraldo, L.F. (ED.). *Cítricos: Cultivo, poscosecha e industrialización, Universitaria Lasallista, Colombia*, 223-284.
- Chien, P. J., Sheu, F., y Lin, H. R. (2007). Coating citrus (Murcott tangor) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. *Food chemistry*, 100, 1160-1164.
- Cocco, M. (2005). Determinación de resistencia a fungicidas tradicionales en cepas de *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* en distintas quintas y empaques de la región. *Actas del II Seminario Internacional de Poscosecha de Cítricos*. Vázquez, DE; Meier, GE y Cocco, M. Ediciones INTA, 104-107.
- Cocco, M., Almirón, N., y Meier, G. (2016). Alternativas a los fungicidas de síntesis para el control de *Geotrichum citri-aurantii* y *Penicillium digitatum* en poscosecha de naranjas y mandarinas. *Poscosecha de frutos cítricos, Difusión INIA, nº 770*. 28pp.
- Cocco, M., Vázquez, D. E., Albors, A., Cháfer, M., Meier, G. E., y Bello, F. (2008). Combinación de tratamientos térmicos y bicarbonato de sodio para el control de *Penicillium digitatum* en frutos cítricos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha*, 9, 55-62.
- Cuero, R. G. (1999). Antimicrobial action of exogenous chitosan. *Experientia Supplementum*, 87, 315-333.
- D'hallewin, G., Arras, G., Venditti, T., Rodov, V., y Ben-Yehoshua, S. (2004). Combination of ultraviolet-c irradiation and biocontrol treatments to control decay caused by *Penicillium digitatum* in washington navel orange fruit. In *V International Postharvest Symposium*, 682, 2007-2012.
- Duran-Vila, N., y Moreno, P. (2000). *Enfermedades de los cítricos*. Sociedad Española de Fitopatología, Mundi-Prensa, 165pp.
- Ecuaquimica. (2018). Fungaflor® 75 ps. <http://www.ecuaquimica.com.ec/producto/fungaflor/>
- El Ghaouth, A., Ponnampalam, R., Castaigne, F., y Arul, J. (1992). Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. *HortScience*, 27, 1016-1018.
- El Ghaouth, A., y Wilson, C. (2002). *U.S. Patent No. 6,419,922*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

FAOSTAT (2023). Datos de producción y consumo de cítricos.

<https://www.fao.org/faostat/es/#home>

Fogliata, G. M., Torres Leal, G. J., y Ploper, L. D. (2000). Detección de Cepas de *Penicillium digitatum* Sacc. resistentes a imazalil en empaques cítricos de la provincia de Tucumán (Argentina) y comportamiento de las mismas frente a fungicidas de uso corriente y fungicidas alternativos. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 77, 71-75.

Gonzalez, J. R. B., Castilla, G., y Upegui, P. (2016). Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de *Lactobacillus casei* var. *rharnosus* sobre hongos fitopatógenos. *Revistas de Investigación Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, 1, 51-57.

González Martínez, R. (2013). Aplicación de esencias de canela y clavo como alternativa a los fungicidas de síntesis en el control de las podredumbres del limón. Proyecto fin de carrera, Universidad Politécnica de Cartagena, 150pp.

Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., Van Otterdijk, R., y Meybeck, A. (2011). Global food losses and food waste. *Proceedings of the Save Food Congress*. Düsseldorf 15-25.

Gutiérrez-Rojas, I. D. S. (2017). Evaluación del efecto de condiciones de cultivo sobre la conidiogénesis en *Penicillium* sp.(HC1). *Facultad de Ciencias. Tesis doctoral de la Universidad Nacional, Colombia*, 250pp.

Harries, E. (2013). Identificación y caracterización funcional de genes PMT relacionados con la glicosilación de proteínas en el hongo patógeno de frutos cítricos *Penicillium digitatum*. *Tesis doctoral, Universitat de València*, 251pp.

Hernández, J. F., Ruiz, J. M., y Félix, A. R. (2011). Efecto de recubrimiento con Quitosano y cera comercial en la calidad de naranja 'valencia' durante el almacenamiento. *Revista Iberoamericana de tecnología postcosecha*, 12, 164-174.

Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Ocio, M. J., y Gavara, R. (2006). Effect of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*). *Postharvest Biology and Technology*, 39, 247-253.

Hirano, S., y Nagao, N. (1989). Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural and biological chemistry*, 53, 3065-3066.

Jing, J. Y., Zhang, H. Y., Xue, Y. B., y Zeng, K. F. (2020). Effects of INA on postharvest blue and green molds and anthracnose decay in citrus fruit. *Journal of Integrative Agriculture*, 19, 1396-1406.

Liu, J., Tian, S., Meng, X., y Xu, Y. (2007). Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 300-306.

MAPA, (2022). Anuario de estadística agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/default.aspx>

Marin, M., y Tuset, J. J. (2000). Efectos fungi-tóxicos de compuestos químicos en medio líquido sobre las artrosporas de *Geotrichum candidum* en cítricos, *Phytoma España*, 122, 136-138.

Martínez-Blay, V., Taberner, V., Pérez-Gago, M. B., y Palou, L. (2021). Control de las podredumbres verde, azul y ácida de los cítricos mediante tratamientos de poscosecha con aditivos alimentarios a base de azufre. *Phytoma España*, 332, 14-22.

Nakamura, M., Suprpta, D. N., Iwai, H., y Arai, K. (2001). Comparison of endo-polygalacturonase activities of citrus and non-citrus races of *Geotrichum candidum*, and cloning and expression of the corresponding genes. *Molecular Plant Pathology*, 2, 265-274.

Ortiz Gimeno, M. D. M. (2020). Nuevos materiales con propiedades antifúngicas para el tratamiento postcosecha de cítricos. *Universitat Politècnica de València*, 80pp.

Palou, L. (2014). *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (green mold, blue mold). In *Postharvest decay*, Academic Press, 45-102.

Palou, L., y Montesinos-Herrero, C. (2015). Uso de fungicidas en poscosecha de frutos cítricos. *Horticultura*, 321, 72-76.

Palou, L., Smilanick, J. L., y Droby, S. (2008). Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Review*, 2, 1-16.

Pérez, E., Blanco, O., Berreta, C., Dol, I., y Lado, J. (2011). Imazalil concentration for in vitro monitoring of imazalil resistant isolates of *Penicillium digitatum* in citrus packinghouses. *Postharvest Biology and Technology*, 60, 258-262.

Ragone, M. E. (1999). Niveles de contaminación fúngica en galpones de empaque de exportación de frutas cítricas de la región de Concordia. *Trabajo Final de Graduación, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina*, 173pp.

Rios-Ruiz, C. A., Vejar, G. B., Robles, A. C., Camacho, J. M., López, A. C. J., y Carreño, M. A. N. N. (2020). Quitosano como fungicida a partir de exoesqueleto de camarón. *Revista de Ciencias Tecnológicas*, 3, 57-62.

Salazar, M., Vero, S., Mendes, S., Plaza, P., Nunes, C., y Afonso III, D. (2009). Resistencia a los fungicidas Imazalil y Tiabendazol en las centrales citrícolas del Algarve. *Actas de Horticultura*, 54, 268-271.

Sánchez-Torres, P. (2007). Desarrollo de resistencias a fungicidas durante la poscosecha. *Phytoma España*, 189, 94-98.

Santana Mayorga, R. C. (2014). *Evaluación de métodos de extracción y dosis de aplicación de cola de caballo (Equisetum arvense) para el control ecológico de roya (Puccinia sp.) en el cultivo de la cebolla blanca (Allium fistulosum)*, Tesis de master, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador, 81pp.

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 disease*, 83, 139-145.

Terralia. Imazalil. <https://www.terralia.com/>

Thompson, A. K. (1990). A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruit and Vegetables. Volume 1: General Introduction and Fruits. By Anna L. Snowdon. *London: Wolfe Publishing*, 302pp.

- Trujillo-Negrellos, E. (2010). Biocontrol de hongos fitopatógenos en cítricos. *CienciaUAT*, 4, 20-23.
- Tuset, J. J. (1987). *Podredumbres de los frutos cítricos*. Conselleria d'Agricultura i Pesca/IVIA, 186pp.
- Tuset, J. J. (2008). Evolución de las podredumbres postcosecha de los cítricos. *Phytoma España*, 201, 42-44.
- Vázquez, D., Panozzo, M., Almirón, N., Bello, F., Burdyn, L., y Garrán, S. (2014). Characterization of sensitivity of grove and packing house isolates of *Penicillium digitatum* to pyrimethanil. *Postharvest Biology and Technology*, 98, 1-6.
- Visintin, G., García, B., de Alcaraz, L. F., y Garrán, S. (2000). Agentes biocontroladores de *Penicillium* spp. en la cera de cobertura para frutos cítricos. *Fitopatología*, 35, 163-168.
- Wuryatmo, E., Able, A. J., Ford, C. M., y Scott, E. S. (2014). Effect of volatile citral on the development of blue mould, green mould and sour rot on navel orange. *Australasian Plant Pathology*, 43, 403-411.
- Zaragoza, S. (2016). El origen geográfico de los cítricos. *Levante Agrícola*, 434, 257-261.

