



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

**CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO EN FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

**PATOGÉNESIS Y SENSIBILIDAD DE
PENICILLIUM SP. EN CÍTRICOS A
FUNGICIDAS**

GABRIELA PELAYO SÁNCHEZ

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO.DE MÉXICO

2012

La presente tesis, es titulada: **PATOGÉNESIS Y SENSIBILIDAD DE *PENICILLIUM* SP. EN CÍTRICOS A FUNGICIDAS** realizada por la alumna **GABRIELA PELAYO SÁNCHEZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: _____
DR. CARLOS DE LEÓN GARCÍA DE ALBA

ASESOR: _____
DR. DANIEL NIETO ÁNGEL

ASESOR: _____
DR. MARIO OROZCO SANTOS

Montecillo, Texcoco. Edo. de México Agosto de 2012

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento de mis estudios de maestría.

Al Dr. Carlos De León por su amistad, apoyo e invaluable dirección durante el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Daniel Nieto Ángel por su apoyo, paciencia y aportaciones las cuales enriquecieron la investigación. Agradezco la confianza que tuvo en mí para la realización de este proyecto.

Al Dr. Mario Orozco Santos por su disposición, aportaciones y apoyo en la ejecución de esta investigación.

A la Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce por su amistad, disponibilidad y sugerencias para el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Daniel Ochoa, Dra. María de Jesús Yáñez, M.C., Juan M. Tovar Pedraza, M.C. Luis Aguilar Pérez y al C. Oscar Moreno Cernas por el apoyo brindado en la fase de laboratorio de esta investigación.

Al Dr. Humberto Vaquera, M.C. Emilio Márquez Catillo, Dr. Francisco M. Lara Viveros por el apoyo brindado en el análisis de datos generados en esta investigación.

A mis amigos y compañeros de postgrado Alma Sánchez, Ma. Guadalupe Hernández, Berenice Valencia, Kesia Magos quienes me brindaron su apoyo durante mi estancia en la maestría y el desarrollo de mi investigación.

DEDICATORIA

A mis padres **José M.** y **María** porque aunque los tengo lejos siempre me dan muestras de amor y entusiasmo en todo los proyectos de mi vida. Gracias mami por todo tu apoyo siempre.

A mis hermanos **Leonardo, Oscar, Alberto** y **José** por todas sus porras y amor que son un aliciente para ser siempre un mejor ser humano.

A mi esposo **Samuel Flores** por tu infinito apoyo, invaluable comprensión y todo tu amor que me motivaron a concluir este proyecto. Mis sinceros agradecimientos por la entrega y los esfuerzos realizados para culminar esta investigación.

A mis amados hijos **Fernando** y **Alejandro** por que sin duda alguna son la inspiración y alegría de cada día, de cada proyecto. Gracias por la paciencia y por dicha de tenerlos.

A la familia Galarza Quintos por todo el apoyo incondicional brindado durante estos años sin el cual este proyecto no hubiese podido concluir, pero sobre todo por cuidar a mis más valiosos tesoros. ¡Gracias!

Contenido

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	i
INDICE DE FIGURAS	ii
Resumen general.....	1
Patogénesis y sensibilidad de <i>Penicillium</i> sp. en cítricos a fungicidas	1
Abstract.....	2
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
HIPÓTESIS	5
OBJETIVOS.....	5
REFERENCIAS.....	6
CAPITULO I	8
EFFECTO DE CONCENTRACIONES DE ESPORAS DE <i>Penicillium digitatum</i> EN INFECCIÓN DE FRUTOS DE LIMÓN PERSA ¹	8
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
Sitio de estudio	11
Aislamiento del hongo.....	12
Identificación morfológica y molecular	12
Prueba de patogenicidad	13
Preparación de la suspensión conidial de <i>P. digitatum</i>	14
Inoculación de los frutos	15
Análisis estadístico	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
Identificación morfológica	16
Prueba de patogenicidad	17
Concentración de inóculo óptima para la infección.....	18
CONCLUSIONES	23
REFERENCIAS.....	24

CAPITULO II	26
SENSIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE <i>Penicillium digitatum</i> A DIFERENTES FUNGICIDAS QUÍMICOS EN FRUTOS DE LIMÓN PERSA (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka).....	26
RESUMEN	26
ABSTRACT	27
INTRODUCCIÓN	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
Sitio de estudio	30
Aislamiento	30
Prueba de efectividad biológica <i>in vitro</i>	30
Análisis estadístico	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	38
REFERENCIAS.....	38

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
CAPITULO I	
Cuadro 1. Incidencia del moho verde en frutos de limón persa inoculados con <i>P. digitarum</i> a diferentes concentraciones.	18
Cuadro 2. Crecimiento del ablandamiento de frutos de limón persa inoculados con <i>Penicillium digitatum</i> a diferente concentraciones.	20
Cuadro 3. Crecimiento de micelio en frutos de limón persa inoculados con <i>Penicillium digitatum</i> a diferente concentraciones.	21
Cuadro 4. Esporulación de <i>Penicillium digitatum</i> a diferente concentraciones en frutos de limón persa inoculados.	22
CAPITULO I	
Cuadro 5. Fungicidas probados para inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento micelial de <i>Penicillium digitatum</i> . 2012.	31
Cuadro 6. Efectividad biológica de productos químicos para la inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento de <i>P. digitatum</i> en PDA. 2012.	33
Cuadro 7. Inhibición del crecimiento micelial de <i>P. digitatum</i> con diferentes de fungicidas químicos. 2012	34

INDICE DE FIGURAS

	Página
CAPITULO I	
Fig. 1. A) Cepa de <i>Penicillium digitatum</i> 15 días después de su siembra en PDA a temperatura ambiente. B) <i>Penicillium digitatum</i> (3x) con el típico pincel y fialides que dan origen a conidios hialinos de forma elíptica cilíndrica.	17
Fig. 2. Regresión lineal para determinar el porcentaje de incidencia de <i>P. digitatum</i> sobre frutos de limón persa en postcosecha.	19

Resumen general

Patogénesis y sensibilidad de *Penicillium* sp. en cítricos a fungicidas

Gabriela Pelayo-Sánchez, MC.
Colegio de postgraduados, 2012

Se evaluó el efecto de seis concentraciones de conidios de *Penicillium digitatum* con el objetivo de determinar la concentración óptima que permita 100% de infección en frutos de limón persa en postcosecha. El hongo se aisló de frutos de limón mexicano del estado de Colima, Méx. Cada concentración (1×10^5 , 3×10^5 , 5×10^5 , 7×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 esporas mL^{-1}), se colocó en heridas de 2 mm profundidad x 1mm de ancho, aproximadamente, hechas en frutos en etapa de madurez de corte. Las concentraciones 1×10^5 y 3×10^5 esporas mL^{-1} mostraron una incidencia de 33 y 50 % de infección, respectivamente, mientras que los frutos inoculados con 5×10^5 , 7×10^5 , 9×10^5 y 1×10^6 esporas mL^{-1} presentaron 100% de incidencia de la enfermedad. Asimismo, se observó que en concentraciones bajas (1×10^5 y 3×10^5 esporas mL^{-1}), el desarrollo de síntomas se mostraron en un tiempo mayor a tres días después de la inoculación (DDI); mientras que, en las concentraciones superiores a 5×10^5 esporas mL^{-1} los síntomas se presentaron desde los primeros DDI con el colapso de frutos a los cinco DDI. La concentración óptima para infectar 100 % de frutos es 10 000 esporas en 20 μL por herida. Los resultados indican que a mayor concentración de esporas, los síntomas de la enfermedad se desarrollan en menor tiempo. Adicionalmente se determinó la inhibición del crecimiento micelial y la eficiencia biológica en el control químico *in vitro* de ésta enfermedad. Los fungicidas evaluados fueron: cyprodianil+fludioxonil, fludioxonil, prochloraz, tiabendazol, imazalil, tryfloxistrobin y pirimetanil a concentraciones de 0.01, 0.10, 1, 5, 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm. Se tomó lectura cada 24 hrs. durante 10 días. Los resultados obtenidos mostraron que todos los fungicidas evaluados son eficientes en la inhibición micelial de *P. digitatum*. Cyprodianil+fludioxonil, fludioxonil, prochloraz, tiabendazol e imazalil resultaron en una eficiencia >90% a concentraciones 1.0 ppm.

Palabras claves: esporas, concentración, infección, control, fungicidas, eficiencia.

Abstract

Pathogenesis and sensitivity of *Penicillium sp.* to fungicides in citrus

Gabriela Pelayo-Sánchez, M. C.

Postgraduate College, 2012

It was evaluated the effect of six conidia concentrations of *Penicillium digitatum* with the objective to determine the optimal concentration that allows an infection at the 100% Persian lemon fruit in postharvest. The fungus was isolated of Mexican lemon fruits from Colima's state, Mexico. Each concentration (1×10^5 , 3×10^5 , 5×10^5 , 7×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 spores mL⁻¹) was placed in wounds of 2 mm for depth x 1mm for width, it was made into fruits with a maturity stage of cutting. Those concentrations (1×10^5 and 3×10^5 spores mL⁻¹) showed an infection incidence of 33 and 50 %, respectively, while the fruits inoculated with 5×10^5 , 7×10^5 , 9×10^5 y 1×10^6 spores mL⁻¹ presented 100% of disease incidence. It was also noted that at low concentrations (1×10^5 y 3×10^5 spores mL⁻¹), the development symptoms were expressed in a longer time than three days after inoculation (DAI), while at higher concentrations to 5×10^5 spores mL⁻¹, the symptoms were presented since the first DAI with the fruits collapse of the five DAI. The optimum concentration for infecting the fruits at 100% is 10 000 spores in 20 μ L per wound. The results indicate that in higher spores' concentration, the disease symptoms develop in less time. Additionally was determined mycelia growth inhibition and biological efficiency in chemical control in vitro of this disease. The fungicides evaluated were: Cyprodianil + Fludioxonil, Fludioxonil, Prochloraz, Thiabendazole, Imazalil, Pyrimethanil Tryfloxistrobin, at concentrations to 0.01, 0.10, 1, 5, 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 and 1000 ppm. Reading was taken every 24 hours or 10 days. The results showed that all fungicides are effective in mycelia inhibition of *P. digitatum*. Cyprodianil+ Fludioxonil, Fludioxonil, Prochloraz, Thiabendazole and Imazalil resulted in a 90% efficiency at concentrations of 1.0 ppm.

Keywords: spores, concentration, infection, control, fungicides, efficiency.

INTRODUCCIÓN GENERAL

México ocupa el segundo lugar en la producción mundial de limas y limones con 1.89 millones de toneladas de fruta (FAO, 2010), con una superficie cultivada de aproximadamente de 143 869 hectáreas (SAGARPA, 2010). En el ámbito nacional, el limón (agrio o mexicano, persa y real) es la especie cítrica que ocupa el segundo lugar en importancia respecto a la superficie sembrada (166, 580 Ha) con una producción de 2. 13 millones de toneladas (SIAP, 2011).

En los últimos años, las pérdidas en postcosecha en todo el mundo han sido cuantiosas, calculándose que se incluyen entre el 25% y 40% de pérdidas de la producción mundial de alimento (Ismail and Zhang, 2004), y puede ser tan alto como un 50% de la producción total en los países en desarrollo debido a que los frutos en almacenamiento son dañados por hongos y bacterias. En los cítricos el daño principal es causado por *Rhizopus nigricans* y *Penicillium* spp. (El-Ghaouth, 1997).

México posee un gran potencial para la producción de limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka), dadas sus condiciones climáticas y suelo. En general, la demanda por Estados Unidos de América, ha ido en aumento, por lo que nuestro país tiene buenas perspectivas de conquistar ese mercado externo.

En postcosecha, los cítricos son atacados por una amplia gama de microorganismos, manifestando signos y síntomas de deterioro cuando los patógenos comienzan a desarrollarse activamente (Hernández *et al.*, 2007). En ésta etapa de postcosecha, los cítricos son afectados por numerosas enfermedades fungosas. Las pudriciones más comunes y destructivas y que causan la principal alteración patológica son causadas por tres especies de *Penicillium*: *P. digitatum* Sacc., *P. italicum* Wehmer y *P. ulaiense* Hsieh, (Eckert and Eaks, 1989). De estas tres especies, Smilanick *et al.*, (1992) reportan a *P. digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc, agente causal del moho verde, como el patógeno responsable de más del 90% de las pérdidas de fruta de cítricos en postcosecha.

Tuset (1987) menciona que *Penicillium digitatum* es un hongo que penetra al fruto a través de heridas. El hongo permanece en estado parasitario sobre todo tipo de materia vegetal y se activa cuando el fruto cítrico se encuentra en período avanzado de maduración o completamente maduro. Asimismo, reporta que la contaminación por *P. digitatum* tiene lugar en el campo (recolección y transporte), almacén para la conservación del fruto y durante el período de distribución y venta.

Una vez que el hongo se encuentra sobre los frutos, si estos se encuentran maduros, con roturas en la cutícula y la humedad relativa es apropiada (más del 80%), los conidios entran en actividad. El primer síntoma visible sobre la superficie del fruto es un hundimiento, de consistencia acuosa, seguido del desarrollo de micelio blanco de consistencia algodonosa y por último la esporulación de color verde oliva. Alrededor del hundimiento del fruto enfermo se pueden observar tres círculos: un círculo verde con esporas, rodeada por una banda de micelio blanco sin esporular donde apenas se están formando los conidióforos; a su vez, ésta banda está formada por otra banda que causa un ligero hundimiento en el que aun no se ha desarrollado el micelio blanco (Barka-Golan, 2001)

Los factores ambientales y el manejo inadecuado de la fruta en postcosecha son algunas de las causas que favorecen al desarrollo de este hongo (Smilanick *et al.*, 2006), aunado al almacenamiento de frutos por largos periodos de tiempo (Kanetis *et al.*, 2008).

El grado de ataque de estos hongos está influido por una serie de factores, incluyendo los ambientales tales como la humedad relativa y la temperatura, la condición del tejido vegetal, haciendo énfasis en el estado fenológico y la presencia de heridas y de hongos (cantidad y calidad del inóculo). Aunado a estos factores, se deben añadir otros que propician el establecimiento del patógeno, incluyendo el factor humano que participa en el momento de la recolección, el método de conservación, la presencia de heridas debido al mal manejo del fruto, la

presencia de inóculo en el almacén de cosechas anteriores (Hernández *et al.*, 2007).

Lamentablemente la experiencia mexicana en el control de infecciones, conservación y almacenamiento de cítricos, no está bien documentada (Orozco-Santos, 1991).

Para el caso del limón persa, en México se han realizado pocos estudios sobre esta enfermedad. Aun cuando es notoria la importancia de esta especie en la región Pacífico Centro y del Golfo de México, hasta el momento existen pocos reportes sobre la etiología del patógeno *P. digitatum*, descripción de síntomas, mecanismo de penetración, concentración óptima de inóculo, y el manejo de la enfermedad.

HIPÓTESIS

En base a lo anterior se plantea la hipótesis:

- 1) Cuando mayor es la concentración de esporas de la solución de inóculo de *Penicillium digitatum* mayor será el porcentaje de incidencia de la enfermedad, así como mayor será el desarrollo de signos y síntomas.
- 2) Respecto a las heridas, si éstas existen el moho verde penetrará y causará enfermedad con éxito.
- 3) La enfermedad causada por *P. digitatum* es sensible al menos a uno de los fungicidas que se deben evaluar.

OBJETIVOS

- 1) Determinar la concentración de esporas mínima óptima de *Penicillium digitatum* para causar 100% de infección de frutos de limón persa.
- 2) Evaluar la efectividad biológica de diferentes fungicidas para el manejo postcosecha de *Penicillium digitatum* en frutos de limón persa.

REFERENCIAS

- Barka-Golan, 2001. Postharvest diseases of fruits and vegetables: Development and control. 268-269.
- Eckert, J. W., and Eaks, I. L. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus. The citrus industry 5: 179-260.
- El-Ghaouth A. 1997. Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. J. Ind. Microbiol. and Biotechnol. 19, 160-162.
- FAO. 2010. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. www.fao.org.
- Hernández-Luzardo, A., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M., Hernández-Rodríguez, A. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. Rev. Mex. Fitopatol. 25:66-74.
- Ismail, M., and Zhang, J.Z. 2004. Post-harvest citrus diseases and their control. Out. Pest Manag. 29-35.
- Kanetis, L., Förster, H. and Adaskaveg, J. E. 2008. Baseline sensitivities for new postharvest fungicides against *Penicillium* spp. on citrus and multiple resistance evaluations in *P. digitatum*. Plant Dis. 92:301-310.
- SAGARPA, 2010. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.sagarpa.com.mx.
- SIAP, 2011. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesca (SIAP). www.siap.gob.mx.
- Smilanick, J.L., and Arrue, D. 1992., R. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. Plant Dis.: 481-485.
- Smilanick, J.L., G.E. Brown and J.W. Eckert. 2006. Postharvest citrus diseases and their control: 339–396 W.F. Wardowski, W.M. Miller, D.J. Hall and W. Grierson, Editors, Fresh Citrus Fruits (Second ed.), Florida Science Source, Inc., Longboat Key, FL, USA.

Tuset, J.J., 1987. Podredumbres de los frutos cítricos. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Generalitat Valenciana. Valencia. 206 pp.

CAPITULO I

EFFECTO DE CONCENTRACIONES DE ESPORAS DE *Penicillium digitatum* EN INFECCIÓN DE FRUTOS DE LIMÓN PERSA¹

Gabriela Pelayo-Sánchez¹, Carlos De León-García de Alba¹, Daniel Nieto-Ángel¹, Mario Orozco-Santos²

¹Postgrado de Fitosanidad, especialidad de Fitopatología, ² INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán, Tecomán, Colima.

RESUMEN

Se evaluó el efecto de seis concentraciones de conidios de *Penicillium digitatum* con el objetivo de determinar la concentración óptima que permita 100% de infección en frutos de limón persa en postcosecha. Cada concentración (1×10^5 , 3×10^5 , 5×10^5 , 7×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 esporas mL^{-1}) se colocó en heridas hechas en frutos en etapa de madurez de corte. Los frutos inoculados se colocaron en cámaras húmedas para su incubación. Las concentraciones 1×10^5 y 3×10^5 esporas mL^{-1} mostraron una incidencia de 33 y 50 % de infección, respectivamente, mientras que los frutos inoculados con 5×10^5 , 7×10^5 , 9×10^5 y 1×10^6 esporas mL^{-1} presentaron 100% de incidencia de la enfermedad. Asimismo, se observó que en concentraciones bajas (1×10^5 y 3×10^5 esporas mL^{-1}), el desarrollo de síntomas se mostraron en un tiempo mayor a tres días después de la inoculación (DDI); mientras que, en las concentraciones superiores a 5×10^5 esporas mL^{-1} los síntomas se presentaron desde los primeros DDI con el colapso de frutos a los cinco DDI. Aunque la mayoría de las concentraciones mostraron ser efectivas para inducir la infección de *P. digitatum* en frutos de limón persa, la dosis óptima para infectar 100 % de frutos es 10 000 esporas en 20 μL por herida. Los resultados indican que a mayor concentración de esporas, los síntomas de la enfermedad se desarrollan en menor tiempo, afectando las características organolépticas y reduciendo la vida de anaquel de los frutos.

Palabras clave: concentración de esporas, crecimiento, enfermedad, *Penicillium digitatum*.

Effect of *Penicillium digitatum* Spore Concentration on Infection of Persian Lemon Fruits

ABSTRACT

The effect of six conidia concentrations of *Penicillium digitatum* was evaluated to determine the optimum concentration that will allow 100% infection in postharvest persian lemon fruits. Each concentration (1×10^5 , 3×10^5 , 5×10^5 , 7×10^5 , 9×10^5 , and 1×10^6 spores mL^{-1}) was placed on the wounds of fruits at the harvesting ripening stage. The inoculated fruits were placed in wet chambers for incubation. Concentrations of 1×10^5 and 3×10^5 spores mL^{-1} showed an incidence of 33 and 50%, respectively, while fruits inoculated with concentrations of 5×10^5 , 7×10^5 , 9×10^5 , and 1×10^6 spores mL^{-1} showed 100% incidence of the disease. Likewise, it was observed that with low concentrations (1×10^5 and 3×10^5 spores mL^{-1}), the symptoms took more than three days after inoculation (DDI) to develop, while with concentrations above 5×10^5 spores mL^{-1} , the symptoms became apparent in the first DDI and total fruit collapse onset at five DDI. Although most of the concentrations proved to be effective in inducing *P. digitatum* infection in persian lemon fruits, the optimum dose to infect 100% of the fruits is 10 000 spores in 20 μL per wound. The results indicate that the higher the spore concentration, the less time it takes for symptoms to develop; thus affecting the organoleptic characteristics and reducing the shelf life of the fruits.

Key words: spore concentration, growth, disease, *Penicillium digitatum*.

INTRODUCCIÓN

México posee un gran potencial para la producción de limón persa, dadas sus condiciones edafoclimáticas. En general, la demanda de este fruto por Estados Unidos, ha ido en aumento, por lo que nuestro país tiene buenas perspectivas de conquistar ese mercado.

Los cítricos son afectados por numerosas enfermedades fungosas en la etapa de postcosecha, las cuales ocasionan graves pérdidas a nivel internacional (Kanetis *et al.*, 2007). Los hongos más comunes en frutos de cítricos en postcosecha son: *Penicillium* spp., *Alternaria* sp., *Botrytis* sp., *Geotrichum* sp. y *Rhizopus* sp. (El-Ghaouth *et al.*, 2000a). Las pudriciones más comunes y destructivas son causadas por tres especies de *Penicillium* spp., responsables de más del 90% de las pérdidas (Hong Yin *et al.*, 2004), siendo *Penicillium digitatum* el agente causal del moho verde, el que mayor daño causa al fruto en etapa de postcosecha (Eckert and Eaks 1989). *P. digitatum* no germina ni penetra directamente en frutos sanos, únicamente infecta sitios donde existen heridas, que son los puntos de entrada del patógeno (Kanetis *et al.*, 2007). Además, se ha reportado provocando daños leves en el flavedo, así como daños severos en el albedo y en los sacos de jugo (Eckert and Eaks 1989; Kanetis *et al.*, 2007). El hongo tiene un ciclo de vida relativamente corto (3 a 5 días) (Holmes and Eckert, 1995). Se desarrolla rápidamente a temperaturas cercanas a 24° C y más lentamente a temperaturas sobre de 30° C y por debajo de 10° C. A 1° C su desarrollo es totalmente inhibido (Shellie and Skaria, 1998). Su importancia radica en la gran producción de esporas que se encuentran latentes sobre la superficie del fruto (Reuther *et al.*, 1989), donde germinan rápidamente y colonizan el tejido dañado (Droby *et al.*, 2002). Las infecciones primarias del moho verde se inician por heridas producidas por alteraciones de origen fisiológico durante la etapa de crecimiento, heridas mecánicas durante la cosecha o por la manipulación de las frutas hasta el consumo (El-Ghaouth, 2000b). El primer síntoma de infección visible en la superficie del fruto es un hundimiento del tejido vegetal de consistencia acuosa, seguido por desarrollo de micelio blanco algodonoso, y

esporulación de color verde olivo. Alrededor del hundimiento del fruto enfermo, se observa un círculo verde con esporas, rodeado por una banda de micelio blanco sin esporular en donde apenas se están formando los conidióforos; a su vez esta banda muestra un leve hundimiento en el que aun no se ha desarrollado el micelio blanco (Barkai-Golan, 2001). Varios factores relacionados con el fruto, el patógeno, las condiciones climatológicas y las condiciones en postcosecha, determinan la incidencia y severidad de esta enfermedad (Eckert and Eaks, 1989), en los que se encuentra la cantidad y calidad del inóculo. La probabilidad de infección depende de la cantidad de inóculo presente en un punto del fruto susceptible a ser infectado (Tuset, 1987). Esta relación se ha demostrado en patógenos tan significativos como *P. digitatum*, *Geotrichum candidum* y *Colletotrichum gloeosporioides* (Palou *et al.*, 2001). Según esto, y manteniendo constante otros factores, la cantidad de esporas presentes en el almacén influye decisivamente en los niveles de pudrición (Tuset, 1987). Por lo anterior, se puede inferir que la concentración del inóculo juega un papel importante en el éxito de la infección de los frutos de limón. Derivado de ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de seis concentraciones de esporas en la germinación, crecimiento y daño de *P. digitatum* en frutos de limón persa en etapa de postcosecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Enfermedades en Postcosecha del Instituto de Fitosanidad-Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México.

Aislamiento del hongo

El aislamiento del hongo utilizado fue proporcionado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en el km 35 de la autopista Colima-Manzanillo en Tecomán, Colima, México, (18° 53' 14" latitud N y 103° 50' 59" longitud W), a 29 msnm. El aislamiento del hongo se obtuvo a partir de frutos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm.) con síntomas del moho verde. En las cajas Petri conteniendo medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), recibidas del INIFAP, se aisló una colonia circular de micelio de consistencia aterciopelada, la cual presentó masas de conidios verde olivogrisáceos, además de una corona radial con contorno color blanco. De las colonias se obtuvieron cultivos monospóricos del hongo para purificar y realizar la identificación morfológica, molecular y lograr las pruebas de patogenicidad.

Identificación morfológica y molecular

La identificación del patógeno se realizó a partir de cultivos monospóricos de una semana de edad crecidos en medio de cultivo PDA. Se registró la forma de la colonia del hongo y se realizaron preparaciones temporales para observar las estructuras hifales portadoras de conidióforos, penicilos con sus ramas (métulas), presencia de fialides, así como la forma y color de los conidios. En base a sus características morfológicas el hongo se identificó a nivel de género siguiendo las claves taxonómicas propuestas por Barnett and Hunter (1998).

De los aislamientos monospóricos en PDA, se obtuvo micelio para la extracción de ADN de acuerdo al protocolo de CTAB 3% con modificaciones (Sambrook *et al.*, 1989). El micelio se depositó en un tubo de microcentrifuga frío y etiquetado, al cual se agregaron 600 µL de CTAB y se incubó a 60 °C por 1 h. Se adicionaron 600 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 10 000 rpm por 8 min. La fase acuosa se recuperó en un tubo de microcentrifuga al que se le adicionaron 600 µL de isopropanol frío y se incubó a -20 °C por 1 h. Después de ese período, se centrifugó a 8 500 rpm por 8 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó dos veces con etanol 70%. La suspensión se centrifugó nuevamente a 10 000 rpm por 8 min, eliminando el sobrenadante.

Finalmente, se recuperó el ADN en 100 µL de agua destilada estéril, se evaluó su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa (Agarose Ultra Pure, Invitrogen®) al 1% y se cuantificó en un espectrofotómetro Perkin Elmer® (Lambda BIO 10®).

Para la amplificación de las regiones internas ITS4 y ITS5 se usaron los iniciadores universales ITS4 (5´- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3´) e ITS5 (5´- GGA AGT AAA GTC GTA ACA AGG - 3´) (Gomes *et al.*, 2002). La mezcla de la reacción fue: Buffer 1x (2.5 µL), MgCl₂ 35 mM (2.0 µL), dNTP´s 2.5 mM (1 µL), ITS4 a 10 pmol (2 µL), ITS5 a 10 pmol (2 µL), Taq polimerasa 1U (0.2 µL), DNA 80 ng (2 µL), agua libre de nucleasas (completar para 25 µL por reacción).

La amplificación por PCR se efectuó en un termociclador Perkin Elmer (Geneamp®. Mod. PCR System 24009), con un período de predesnaturalización de 2 min a 95 °C y 30 ciclos, los cuales comprendieron una desnaturalización de 95 °C por 1 min; alineamiento por 30 s a 55 °C; preextensión de 2 min a 72°C, y una extensión final de 72°C por 10 min. El producto de la amplificación se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se tiñó con bromuro de etidio. Posteriormente, las muestras sin purificar se enviaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM. La comparación de la secuencia obtenida se realizó en el BLAST del GenBank.

Prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad se realizó para comprobar la patogenicidad y agresividad del aislamiento monospórico de *P. digitatum* en frutos de limón persa de tamaño uniforme, sin daños físicos y en madurez fisiológica. Los frutos fueron colectados directamente a partir de un huerto localizado en Cuitláhuac, Ver., (18° 42' latitud N y 96° 28' longitud W), altitud entre 140 y 500 msnm. Se lavaron con agua, se desinfestaron por inmersión en hipoclorito de sodio 3 % durante 5 min y adicionalmente se enjuagaron por tres ocasiones consecutivas con agua destilada estéril, se secaron usando toallas de papel estéril y se colocaron en charolas desinfestadas con alcohol etílico 70%, evitando el contacto entre los frutos y colocándolos sobre una base de papel absorbente estéril. Cada una de las

charolas se colocó en bolsas de polietileno y se sellaron con el fin de crear la atmósfera de una cámara húmeda. A 20 frutos de limón se les realizó una pequeña herida con una aguja de acero inoxidable estéril a una profundidad de 2 mm y un ancho de 1 mm, y se inocularon con 20 μL de la suspensión conidial a una concentración de 1×10^6 (20 000 esporas mL^{-1}), la cual se obtuvo de una colonia de una semana de edad. Se usaron 3 tipos de testigos, 10 frutos con herida a los que se les depositaron 20 μL de agua destilada estéril, 20 frutos sin herida marcados por un círculo con un marcador indeleble donde se depositaron 20 μL de la suspensión conidial de *P. digitatum* a una concentración 1×10^6 (20 000 esporas mL^{-1}) y como tercer testigo se utilizaron 10 frutos sin herida a los que se les depositó 20 μL de agua destilada estéril. Los frutos se mantuvieron en condiciones de laboratorio a temperatura ambiente (23 ± 2 °C) que se observaron diariamente durante ocho días, registrando los síntomas que se desarrollaron alrededor del sitio de inoculación, la incidencia y severidad de los daños.

Reaislamiento del patógeno. De acuerdo a los postulados de Koch, a partir de los síntomas reproducidos en la prueba de patogenicidad se reaisló a *Penicillium digitatum* de la misma manera en que fue aislado inicialmente (Agrios, 2005).

Preparación de la suspensión conidial de *P. digitatum*.

En las cajas Petri donde se desarrollaba el inóculo, se agregó agua destilada estéril y una gota del surfactante Tween 20[®] (polioxietilen sorbitan monosaturado), agitando para romper la tensión superficial entre las esporas y evitar su aglomeración. Posteriormente, se transfirió a un vaso de precipitados y se tomó una alícuota de 1 mL con una pipeta Pasteur. En seguida, se realizaron los conteos de conidios utilizando una cámara de Neubauer, Al conteo en C.P.C. se aplicó la siguiente fórmula para estimar el número de conidios por mL de suspensión (French and Herbert, 1982):

$$\text{Número de conidios/mL} = \text{Número de conidios en C.P.C.} \times 10\,000$$

Se prepararon las siguientes suspensiones de conidios: 1×10^5 , 3×10^5 , 5×10^5 , 7×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 /mL y un testigo en el que se utilizó de agua destilada estéril.

Inoculación de los frutos

Los frutos de limón persa se lavaron y desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio 3% durante 3 min. Posteriormente, los frutos se colocaron 3 min en agua destilada estéril y se secaron perfectamente con toallas de papel absorbente estériles. Los frutos se inocularon haciendo un piquete de 1 mm de ancho por 2mm de profundidad en el centro del fruto con una aguja de acero inoxidable estéril. Usando una micropipeta, se colocaron 20 μ L de la concentración de esporas sobre la herida. Los frutos se colocaron en charolas de plástico en las que previamente se habían colocado toallas de papel estéril humedecidas con agua destilada estéril. En cada charola se acomodaron seis frutos de limón persa inoculados con *P. digitatum* y finalmente las charolas se introdujeron en una bolsa de polietileno para mantener una atmósfera controlada a ≥ 95 % de humedad relativa y 25 °C.

Análisis estadístico

Diariamente durante 8 días se midieron en los frutos el diámetro del crecimiento del ablandamiento, el micelio y la esporulación de *P. digitatum*, usando un Vernier digital (Trupper ®). Cada tratamiento se hizo con seis repeticiones mismos que fueron alojados en un diseño experimental completamente al azar donde la unidad experimental fue un fruto de limón persa. El análisis de varianza y comparación de medias se realizó utilizando el paquete estadístico SAS System®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica

La colonia del hongo en PDA en los primeros 4 días, presentó un rápido y abundante crecimiento micelial aéreo con apariencia aterciopelada. La colonia creció con un color blanco dado al denso desarrollo de estructuras hifales y conidióforos. En los siguientes días, la colonia tomó un color verde olivo grisáceo debido a la abundante presencia de esporas asexuales, y una corona radial en su contorno color blanco que corresponde a las estructuras hifales. Al reverso de la caja Petri el hongo desarrolló una tonalidad amarillenta-cremosa (Figura 1 A).

Con microscopio de luz, se observaron estructuras hifales y conidióforos, con su característico penicilo o pincel hialino que define al género según Barnett and Hunter (1998). En este caso, presentó las estructuras de métulas, las cuales mostraron una variable cantidad de filaides que dan origen a los conidios de forma elíptica a cilíndrica, de color blanco verdoso a verde pálido con medida de 5-9 x 3-6 μm (Figura 1 B).

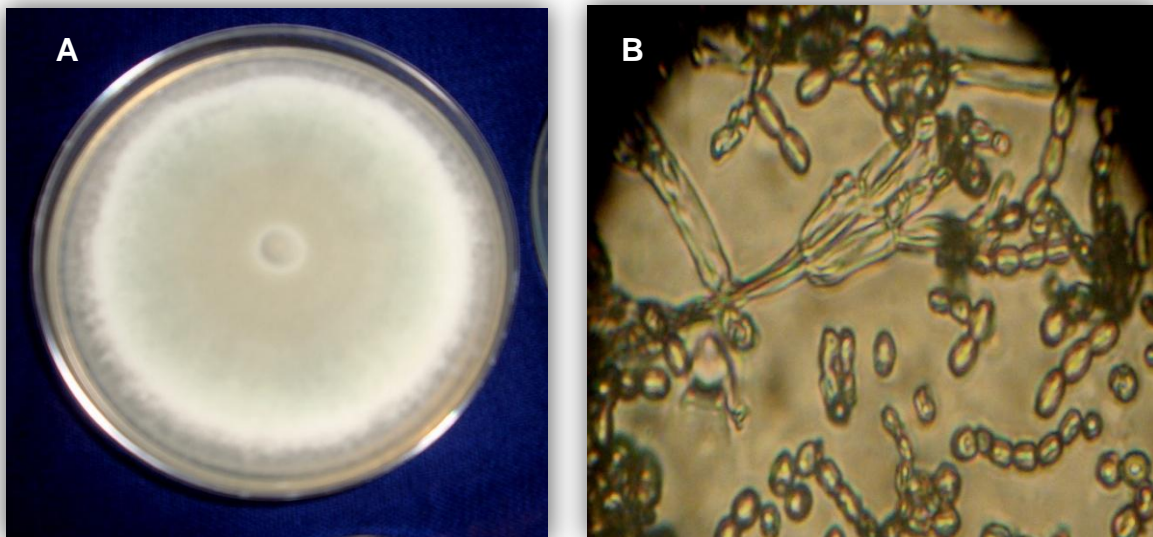


Fig. 1. A) Cepa de *Penicillium digitatum* 15 días después de su siembra en PDA a temperatura ambiente. B) *Penicillium digitatum* (3x) con el típico pincel y fialides que dan origen a conidios hialinos de forma elíptica cilíndrica.

Del producto de la PCR de los aislamientos monospóricos se alineó con las secuencias de *P. digitatum* del Banco de Genes del NCBI. La homologación de nucleótidos entre la secuencia de los cultivos monospóricos de ésta investigación fue de 99% y quedó depositado en el NCBI con número de acceso HQ637381, confirmando que el agente causal de la pudrición con moho verde de los frutos de limón persa en el municipio de Tecoman, Col., México es *P. digitatum*.

La secuencia de bases obtenidas fue la siguiente: bankit1410278
ggacaggccg cggcaacgag acgaacaagc ggccccctgg ggccgcccgc cggcgtgttt attttagttg
gagcttcggc gggcccgcct ttactggccg ccggggggct cacgctcccg ggccccgcgc cgccgaagac
acccccgaac tctgtctgaa gattgcagtc tgagtgaaaa cgaaattatt taaaacttcc aacaacggat
ctcttggttc cggcatcgat gaagaacgca gcgaaatgcg atacgtaatg tgaattgcaa attcagtgaa
tcatcgagtc tttgaacgca cattgcgccc cctggtattc cggggggcat gcctgtccga gcgtcattgc
tggcctcaag cccggcttgt gtgttgggcc ccgtcccccg atcccggggg acgggcccga aaggcagcgg
cggcaccgcg tccggtcctc gagcgtatgg ggctttgtca cccgctccgt aggcccggcc ggcgctgcc
gatcaacccc aaatttttaa tccaggttga cctcggatca ggtagggata cccgctgaac ttaagcatat
caaggctgag agcgacagag ggttgagctg gacgcgacga cttgtcgggt tgaagtgtct tctgaacccc
gcctttggca tttattgcc aaaggaatta 661 attcaaatcg gcctcagatt ggtaggacta cccgctgaac
ttaagcatat caataacccg gaggaacat cgcccactgc aggctgacct cagacatata caaaaatgac
gagtatatg aacactgctc ctcaacacac cctaccccc cagccccgc gcaactacc gccctcctc
tcaaacatcc tctccaca cacgtcatat tctccccct cttctcctc tatctattc tctactgtc
gtgccgtatt gtatcatcca tctctatcc tctctctct atatatggac tatgttcatt cactattatg cgtttctac
catcgctata acctacgacc catagccaca gtctgagtc aactaccg.

Prueba de patogenicidad

El aislamiento de *P. digitatum* resultó ser patogénico al inducir síntomas típicos de la enfermedad del moho verde en 100% de los frutos inoculados por herida. La aparición de síntomas se observó dos DDI, cuando los frutos presentaron lesiones iniciales que se manifestaron con manchas circulares

ligeramente hundidas de color café claro con aspecto húmedo, sin micelio. En estado avanzado, éstas lesiones mostraron masas de esporas color verde oliváceo rodeadas por un círculo de micelio blanco de consistencia algodonosa. En la etapa final del experimento, el hongo fue capaz de cubrir 80-100% de la superficie de los frutos inoculados. Estos síntomas fueron similares a los que manifestaron frutos con moho verde de donde se aisló originalmente la cepa de *P. digitatum*.

Concentración de inóculo óptima para la infección

En el Cuadro 1 se observa que existe una relación positiva entre la concentración de esporas e incidencia de la enfermedad, esto es, a medida que aumenta la concentración crece el porcentaje de incidencia.

Cuadro 1. Incidencia del moho verde en frutos de limón persa inoculados con *P. digitatum* a diferentes concentraciones.

Conc. de esporas	No. de esporas por herida	% Incidencia
1×10^5	2 000	33.33
3×10^5	6 000	50.00
5×10^5	10 000	100
7×10^5	14 000	100
9×10^5	18 000	100
1×10^6	20 000	100

La relación anterior se expresó mediante el modelo de la regresión lineal (Figura 2) para concentraciones menores e igual a 5×10^5 esporas mL^{-1} , siendo que a partir de ésta concentración se alcanza 100% de incidencia, indicando que no es necesario inocular a concentraciones mayores para lograr la infección en el fruto.

El parámetro estimado en la regresión lineal indica que a un incremento en la concentración de esporas de 1×10^5 se espera un aumento en la incidencia de

20%, llegando a 100% a una concentración de 5×10^5 esporas mL^{-1} (500 000 esporas).

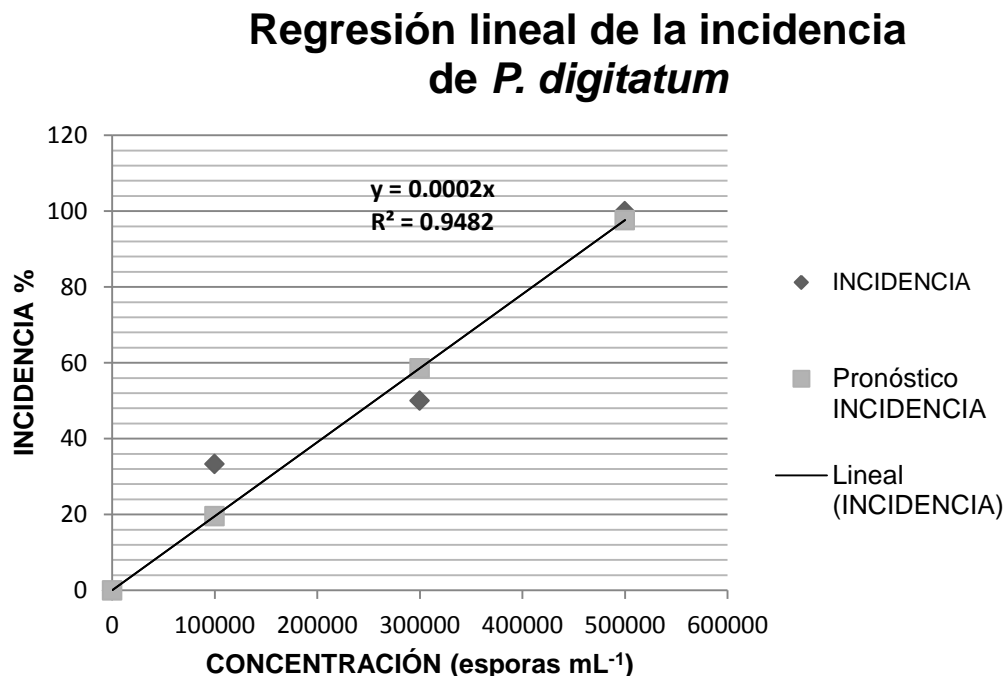


Fig. 2. Regresión lineal para determinar el porcentaje de incidencia de *P. digitatum* sobre frutos de limón persa en postcosecha.

El diámetro del ablandamiento del tejido de los frutos se midió diariamente durante una semana DDI y contrastó el efecto medio principal de los tratamientos a través de la prueba t pareada, de la que se concluye una diferencia significativa en el crecimiento del área de ablandamiento para algunas de las concentraciones de esporas. En el Cuadro 2, se observa que los tratamientos 1 y 2 no son significativamente diferentes entre ellos ($\alpha=0.05$) pero el tratamiento 2 sí lo es del testigo, el cual no presentó ablandamiento. El tratamiento 3, a su vez no presenta diferencias significativas con los tratamientos 4, 5 y 6.

Cuadro 2. Crecimiento del ablandamiento de frutos de limón persa inoculados con *Penicillium digitatum* a diferente concentraciones.

Conc. de esporas	No. de esporas por herida	Crecimiento (mm)	
T1. 1×10^5	2 000	9	bc*
T2. 3×10^5	6 000	14.888	b*
T3. 5×10^5	10 000	37.406	a*
T4. 7×10^5	14 000	37.829	a*
T5. 9×10^5	18 000	43.113	a*
T6. 1×10^6	20 000	44.150	a*
T7. Testigo	0.000	0.000	c*
DMS ($\alpha=0.05$)	9.995		

*Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

DMS: Diferencia Mínima Significativa.

CV=37.203

El análisis estadístico del crecimiento de micelio en los frutos inoculados a los diferentes niveles de concentración mostró diferencias significativas entre ellos. Para los tratamientos 1 y 2 el desarrollo de micelio no fue significativamente diferente del testigo ($\alpha=0.05$) que no presentó crecimiento de micelio, mientras que el resto de los tratamientos no fueron significativamente diferentes entre ellos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Crecimiento de micelio en frutos de limón persa inoculados con *Penicillium digitatum* a diferente concentraciones.

Conc. de esporas	No. de esporas por herida	Crecimiento (mm)	
T1. 1×10^5	2 000	6.930	b*
T2. 3×10^5	6 000	11.738	b*
T3. 5×10^5	10 000	29.480	a*
T4. 7×10^5	14 000	34.178	a*
T5. 9×10^5	18 000	37.140	a*
T6. 1×10^6	20 000	37.726	a*
T7. Testigo	0.000	0.000	b*
DMS($\alpha=0.05$)	11.835		

*Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

DMS: Diferencia Mínima Significativa.

CV=52.23

El efecto de los tratamientos en la esporulación del hongo mostró diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre las concentraciones de esporas, de manera que permitió la formación de dos grupos. En los tratamiento 1 y 2 no se encontró diferencia significativa ($\alpha=0.05$) en la esporulación del hongo con respecto al testigo, en donde no hubo desarrollo del hongo. Los resultados muestran que a bajas concentraciones de esporas la germinación del *P. digitatum* es considerablemente baja, en contraste con los tratamientos 3, 4, 5 y 6 que mostraron diferencia significativa con el testigo y una superficie esporulada mayor a 29 mm del diámetro del fruto (Cuadro 4).

Cuadro 4. Esporulaci3n de *Penicillium digitatum* a diferente concentraciones en frutos de lim3n persa inoculados.

Conc. de esporas	No. de esporas por herida	Crecimiento (mm)	
T1. 1×10^5	2 000	6.058	b*
T2. 3×10^5	6 000	10.315	b*
T3. 5×10^5	10 000	24.750	a*
T4. 7×10^5	14 000	32.674	a*
T5. 9×10^5	18 000	34.495	a*
T6. 1×10^6	20 000	34.958	a*
T7. Testigo	0.000	0.000	b*
DMS ($\alpha=0.05$)	11.348		

*Medias con la misma letra no son diferentes estadisticamente.

DMS: Diferencia M3nima Significativa.

CV=54.955

El efecto de la concentraci3n de esporas en el crecimiento del hongo ha sido anteriormente estudiado para otros frutos en postcosecha como manzana (Janisiewicz *et al.*, 2005). Para el caso de c3tricos, en M3xico solamente existe reporte para naranja (Gonz3lez, 2011). El presente trabajo aport3 informaci3n sobre la concentraci3n de esporas 3ptima para causar 100% de infecci3n de *P. digitatum* en frutos de lim3n persa. El hongo mostr3 eficiencia en causar infecci3n a partir de la concentraci3n 5×10^5 esporas mL^{-1} (500 000 esporas) lo cual servir3 como referencia para trabajos relacionados a este pat3geno en lim3n persa o en otros c3tricos, ya que en trabajos realizados para manejo de *Penicillium* spp. se usan concentraci3n 1×10^6 o mayores a estas. Se ha intentado el control qu3mico de la enfermedad en frutos inoculados a altas concentraciones de esporas. Por citar algunos ejemplos, Holmes *et al.*, (1999), estudiaron la sensibilidad de *P. digitatum* y *P. italicum* a fungicidas en postcosecha utilizando para la inoculaci3n una suspensi3n de esporas 200 μl a una concentraci3n de 1×10^7 esporas/mL; por otro lado, Sminilack *et al.*, (2007) estudiaron el control de la pudrici3n del moho verde en postcosecha con carbonato de potasio combinado con fungicidas y calor

utilizando en su metodología una concentración 1×10^8 y 1×10^9 esporas/mL. Kanetis *et al.*, (2008) en su trabajo relacionado con sensibilidad de *Penicillium* spp. a nuevos fungicidas de postcosecha en cítricos y la evaluación de la resistencia de *P. digitatum*, utilizaron una suspensión conidial de 1×10^6 esporas/mL. El presente trabajo muestra que la concentración de inóculo es importante para lograr el nivel de infección adecuado para reproducir los síntomas de la enfermedad para estudios posteriores; de igual forma, es importante documentar el comportamiento del hongo una vez que infecta al fruto, ya que esto permitirá determinar el tiempo de vida de anaquel de un fruto infectado o en su caso implementar un manejo de la enfermedad que retarde los síntomas del moho verde. Las bajas concentraciones de esporas en la inoculación de *P. digitatum* en frutos de limón persa reflejó un lento desarrollo de síntomas, lenta colonización de los frutos y poca germinación de esporas respecto a las concentraciones altas (7×10^5 , 9×10^5 y 1×10^6); sin embargo, todas las concentraciones tuvieron frutos enfermos en que el hongo cubrió totalmente o casi en su totalidad la superficie del fruto en el octavo DDI.

CONCLUSIONES

La concentración óptima para que ocurra 100% de incidencia de la enfermedad es la dosis 5×10^5 esporas/ml (10 000 esporas por 20 μ l por herida).

A menor concentración de esporas la presencia de síntomas es lenta y el crecimiento y esporulación de *Penicillium digitatum* es baja. Tal es el caso de las concentraciones $\leq 3 \times 10^5$ esporas m^{-1} donde la infección tuvo poco éxito.

Las concentraciones superiores a 5×10^5 esporas/ml favorece el rápido crecimiento y esporulación de *P. digitatum* causando mayor daño en los frutos de limón persa, impactando en sus características organolépticas y reduciendo la vida de anaquel.

En todas las concentraciones en que ocurrió la infección con el moho verde los frutos se encontraron colapsados al octavo día después de la inoculación de los frutos.

REFERENCIAS

- Agrios, N. 2005. Plant Pathology. 5th Edit.. Elsevier Acad. Press. 922 p.
- Barkai, G., R. 2001. Postharvest diseases of fruits and vegetables-Development and control. 1st Edit.. Elsevier Science B. V. Amsterdam, The Netherlands p. 268-269.
- Barnett, H., and Hunter, B. 2006. Illustrated genera of Imperfect Fungi. 4th Edit. MN, USA. 218 p.
- Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E., and Porat, R. 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology* 92:393-399.
- Eckert, W., and Eaks, L. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus. *The Citrus Industry* 5:179-260.
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J., Brown, E., Ippolito, A., Wisniewski, M., and Wilson, L. 2000 a. Application of *Candida saitoana* and *Glycolchitosan* for the control of postharvest disease of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Dis.* 84 (3): 243-248.
- El-Ghaouth, A., Smilanick, L., Wisniewski, M., and Wilson, L. 2000 b. Improved control of Apple and citrus fruits decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-Deoxy-D-Glucosa. *Plant Dis.* 84 (3):249-253.
- French, E., and Herbert T., T. 1982. Métodos de Investigación Fitopatológica. Ins. Interam. Coop. Agric. San José, Costa Rica. 173-179 p.
- González F., P. 2011. Virulencia y control postcosecha de *Penicillium digitatum* en frutos de naranja. Tesis de Maestría, Colegio de Posgraduados-Fitosanidad, Edo. de Méx. 47 p.
- Holmes, J., and Eckert, W; 1995. Relative fitness of imazalil-resistant and -sensitive biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant Dis.* 79:1068-1073.
- Holmes, J., and Eckert, W. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* 89:716-721.
- Hong-Yin Z., Cheng-Xin F., Xiao-Dong Z., Dan H., Li-Jun S., and Xi Z.. 2004. Effects of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner in combination with sodium

bicarbonate on biocontrol of postharvest green mold decay citrus fruit. Bot. Bul. Acad. Sinica, 45: 159-164.

Janisiewicz, J., Peterson, L., Yoder, S., and Miller, S. 2005. Experimental bin drenching system for testing biocontrol agents to control postharvest decay of apples. Plant Dis. 89:487-490.

Kanetis, L., Förster, H., and Adaskaveg, E. 2007. Comparative efficacy of the new postharvest fungicides azoxystrobin, fludioxonil, and pyrimethanil for managing citrus green mold. Plant Dis. 91:1502-1511.

Kanetis, L., Förster, H., and Adaskaveg, E. 2008. Baseline sensitivities for new postharvest fungicides against *Penicillium* spp. on citrus and multiple resistance evaluations in *P. digitatum*. Plant Dis. 92:301-310.

Palou, L., Usall, J., Pons J., Cerdà, C., and Viñas, I. 2001. Micoflora en centrales cítricas de Tarragona. Cataluña, España. Prod. Prot. Veg. 16 (3).

Reuther, W., Calavan, C., and Carman, E. 1989. The citrus industry 5: 210-212.

Sambrook, J., Fritsch, F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. Press. New York, USA.

Shellie, C., and Skaria, M. 1998. Reduction of green mold on grapefruit after hot forced-air quarantine treatment. Plant Dis. 82: 380-382.

Smilanick, L., Mansour, F., Mlikota, G., and Sorenson, D. 2007. Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. Postharvest Biol. Technol. 47: 226–238.

Tuset, J. J. 1987. Podredumbres de los frutos cítricos. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Generalitat Valenciana. Valencia, España. 206 p.

CAPITULO II

SENSIBILIDAD *IN VITRO* DE *Penicillium digitatum* A DIFERENTES FUNGICIDAS QUÍMICOS EN FRUTOS DE LIMÓN PERSA (*Citrus latifolia* Tanaka).

Gabriela Pelayo-Sánchez¹, Carlos De León-García de Alba¹, Daniel Nieto-Ángel¹, Mario Orozco-Santos²

¹Postgrado de Fitosanidad, especialidad de Fitopatología, ² INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán, Tecomán, Colima.

RESUMEN

El moho verde, causada por *Penicillium digitatum*, es responsable de pérdidas de cítricos en el proceso de almacenamiento y comercialización. El presente trabajo tuvo como objetivo la inhibición del crecimiento micelial y la eficiencia biológica en el control químico *in vitro* de ésta enfermedad. Los fungicidas evaluados fueron: cyprodianil+fludioxonil, fludioxonil, proclhoraz, tiabendazol, imazalil, tryfloxistrobin y pirimetanil a concentraciones de 0.01, 0.10, 1, 5, 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm. Se trabajó con medio de cultivo papa-dextosa-agar (PDA) en estado líquido a 45-50°C al cual se le adicionó cada una de las concentraciones de los diferentes fungicidas. Una vez solidificado el PDA, en cada caja Petri se sembró un disco micelial de 5 mm de diámetro de un cultivo con crecimiento activo de *P. digitatum* en PDA de 7 días de crecimiento, el cual se aisló de frutos de limón mexicano del estado de Colima, Méx. Se tomó lectura cada 24 hrs. durante 10 días. Los resultados obtenidos mostraron que todos los fungicidas evaluados son eficientes en la inhibición micelial de *P. digitatum*. Cyprodianil+fludioxonil, fludioxonil, proclhoraz, tiabendazol e imazalil resultaron en una eficiencia >90% a concentraciones 1.0 ppm.

Palabras claves: *P. digitatum*, *in vitro*, fungicidas, eficiencia.

SENSITIVITY IN VITRO OF *Penicillium digitatum* TO DIFFERENT CHEMICAL FUNGICIDES IN PERSIAN LEMON FRUITS (*Citrus latifolia* Tanaka).

ABSTRACT

The green mold caused by *Penicillium digitatum* is responsible for losses of citrus in the process of storage and marketing. The present study had like an objective the mycelia growth inhibition and biological efficiency in the chemical control in vitro of this disease. The fungicides evaluated were: Cyprodianil +Fludioxonil, Fludioxianil, Prochloraz, Thiabendazole, Imazalil, Pyrimethanil Tryfloxistrobin at concentrations of 0.01, 0.10, 1, 5, 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 and 1000 ppm. The culture medium was potato-dextrose-agar (PDA) in liquid at 45-50 ° C to which was added each of the various concentrations of fungicides. Once solidified the PDA, on each Petri dish was seeded a mycelia disc of 5 mm in diameter of actively growing culture of *P. digitatum* on PDA of 7 growth days, which was isolated from Mexican lemon fruits of the state of Colima, Mex. Reading was taken every 24 hours for 10 days. The results showed that all fungicides tested, are effective in mycelial inhibiting of *P. digitatum*. Cyprodianil + Fludioxonil, Fludioxonil, Prochloraz, Thiabendazole and Imazalil resulted in 90% efficiency at concentrations of 1.0 ppm.

Keywords: *P. digitatum*, in vitro, fungicides efficiency.

INTRODUCCIÓN

México posee un gran potencial para la producción de limón persa, dadas sus condiciones climáticas y suelo. En general, la demanda del fruto por Estados Unidos de América (EEUU), ha ido en aumento, por lo que nuestro país tiene buenas perspectivas de conquistar ese mercado externo.

La introducción de los cítricos al Nuevo Mundo lo hicieron los españoles y portugueses. De acuerdo con las narraciones de Fray Bartolomé de las Casas, en el segundo viaje de Cristóbal Colón, 1443, fue cuando se trajeron semillas de naranja dulce, naranjo agrio, limón sidra y probablemente limas, que fueron sembrados por vez primera en Haití. Posteriormente, los cítricos llegaron a América continental en las expediciones de Francisco Hernández de Córdoba en 1517 y Juan de Grijalva en 1518, donde se establecieron en formas silvestres en algunas regiones de México, el Caribe y Sur de Florida (Lara, 2006).

El limón pérsico ó “Tahití lime” como se le conoce en Estados Unidos, en México conocido como limón sin semilla, es una fruta relativamente nueva que aparece en los huertos de California, EEUU, en el siglo pasado, llevado presumiblemente por unos marineros desde la isla de Tahití, en Oceanía (Lara, 2006).

Los cítricos son afectados por una diversidad de hongos que contribuyen a la pudrición de los frutos, provocando enfermedades en la etapa de postcosecha que causan pérdidas económicas de importancia. En general, las causas de las pérdidas por enfermedades de postcosecha son de orden fisiológico y patológico. En el caso de frutos cítricos las enfermedades son provocadas por *Penicillium* spp., *Alternaria* sp., *Botrytis* sp., *Geotrichum* sp. y *Rhizopus* sp. Se considera a *Penicillium digitatum* Sacc. y *Penicillium italicum* Wehmer, el moho verde y el azul, respectivamente, como los hongos de mayor importancia a nivel mundial, que causan graves daños a los cítricos (Klotz, 1973). En México, el principal agente causal de pudriciones en limones en almacenaje es el género *Penicillium* spp. La cosecha en días húmedos y temperaturas templadas favorece el desarrollo de

estos patógenos, provocando más del 90% del total de las pérdidas en postcosecha (Eckert and Eaks, 1989).

La infección por hongos en los cítricos puede ocurrir en diversas etapas, incluyendo durante el cultivo, la cosecha, durante el procesamiento o empaclado, almacenamiento, transporte, mercado e incluso después de ser adquirido por el consumidor. Estos microorganismos producen una depreciación del producto, que en muchos casos se debe desechar y no se puede comercializar (Plaza *et al.*, 2004). *Penicillium digitatum* entra a la fruta a través de heridas, por lo cual resulta muy importante minimizar los golpes durante y después de la cosecha (Guédeza *et al.*, 2010). Las infecciones primarias se inician por heridas producidas por alteraciones de origen fisiológico durante la etapa de crecimiento, o mecánico durante la cosecha o por la posterior manipulación de las frutas hasta el consumo. Ciertas especies de *Penicillium* sp. productoras de etileno provocan un aumento de la tasa respiratoria de los frutos, afectando su coloración y acelerando su senescencia (Agrios, 1999). A pesar de la eficiencia de las medidas preventivas de limpieza y desinfección de equipos e instalaciones en la reducción de la población de patógenos, es la propia fruta la que generalmente llega contaminada del campo, por lo que se hace necesario realizar tratamientos dirigidos a controlar de forma activa las pudriciones mediante el tratamiento con productos químicos. Estos suelen ser fungicidas a base de imidazoles o benzimidazoles (Kanetis *et al.*, 2008).

A nivel mundial, el control de *Penicillium* spp. se basa principalmente en el uso de fungicidas químicos. Los principios activos más utilizados son el imazalil (IMZ), proclhoraz (PRO), orto-fenil fenato de sodio (SOPP) y tiabendazol (TBZ (Smilanick *et al.*, 2008).

En la actualidad existe un número reducido de fungicidas autorizados para su utilización en la postcosecha de fruta de pepita y ninguno para los de hueso. Los tratamientos más ampliamente utilizados se aplican mediante ducha ("drencher") que se basan generalmente en una combinación de dos o más fungicidas, donde el imazalil o el tiabendazol son la parte más importante de ella. Los fungicidas autorizados en postcosecha de cítricos son el imazalil,

metiltiofanato, miclobutanil, ortofenilfenol, prochloraz y tiabendazol (Tuset, 1987). La aplicación de productos fungicidas se basa en la eliminación del inóculo presente en la superficie del fruto, pero no se tiene en cuenta que para que se produzca una pudrición es necesario que se cumplan cinco condiciones: Nivel suficiente de inóculo, contacto del inóculo con la fruta, existencia de vías de penetración, condiciones ambientales adecuadas y nivel de susceptibilidad del fruto (Tuset, 1987).

En México lamentablemente no existe, o no está bien documentada la tecnología sobre el manejo de infecciones en almacenamiento de limón persa y es por ello que en este trabajo se evaluó la efectividad biológica *in vitro* de algunas formulaciones químicas para el manejo en postcosecha de *P. digitatum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Postcosecha del Instituto de Fitosanidad-Fitopatología del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, ubicado en Montecillo, Municipio de Texcoco, México.

Aislamiento

El aislamiento con el cual se trabajó en la presente investigación fue *Penicillium digitatum* aislado e identificado en el capítulo anterior.

Prueba de efectividad biológica *in vitro*

Se evaluaron 7 formulaciones comerciales de fungicidas (Cuadro 5) de forma *in vitro* para la inhibición del crecimiento micelial de *P. digitatum* en las siguientes concentraciones: 0.01, 0.10, 1, 5, 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 y

1000 ppm. Cada una de las diferentes combinaciones producto-concentración constituyó un tratamiento.

Se preparó una solución madre para cada una de las formulaciones y se adicionó el volumen indicado del producto a un matraz con medio de cultivo papa-dextosa-agar (PDA) en estado líquido a 45-50°C. Este procedimiento se repitió para cada una de las concentraciones de los diferentes fungicidas. PDA sin fungicida se uso como control o testigo. Aproximadamente 20 mL de medio de cultivo + fungicida se vertió dentro de cada una de las cajas Petri (60 mm de diámetro). Una vez solidificado el PDA, en cada caja se sembró un disco micelial de 5 mm de diámetro de un cultivo con crecimiento activo de *P. digitatum* en PDA de 7 días de crecimiento. Las cajas Petri se incubaron a 24 ± 2°C, se tomaron lecturas del diámetro polar y ecuatorial de las colonias cada 24 h con ayuda de un Vernier digital (Trupper ®) durante 10 días para posteriormente analizarlos.

Cuadro 5. Fungicidas probados para inhibición *in vitro* del crecimiento micelial de *Penicillium digitatum*. 2012.

Grupo químico	Ingrediente activo	Modo de acción	i.a.%	Formulación
Anilino pirimidinas/ Fenilpirroles	Cyprodinil+ Fludioxonil	Sistémico	37.5 + 25	WG ^a
Fenilpirroles	Fludioxonil	Contacto	50	WP ^b
DMI* -Imidazoles	Proclhoraz	Sistémico	45	EC ^c
Benzimidazoles	Tiabendazol	Sistémico	60	WP ^b
Imidazol	Imazalil	Sistémico	75	WG ^a
Estrobilurina	Trifloxystrobin	Mesostémico	25	SC ^d
Anilino pirimidinas	Pirimetanil	Sistémico	54.6	SC ^d

WG^a=Gránulos dispersables; WP^b=Polvo humectable; EC^c=Concentrado humectable; SC^d Suspensión concentrada. *Inhibidores de la demetilación.

Análisis estadístico

Las cajas Petri con las diferentes concentraciones de fungicida se instalaron siguiendo un diseño experimental de parcelas divididas para determinar la significancia del efecto promedio de los fungicidas, la concentración y la interacción entre ellos. El experimento se condujo con cuatro repeticiones donde la unidad experimental fue la caja Petri. Se calculó el análisis de varianza y comparación de medias por la mínima diferencia significativa (LSD) usando el paquete estadístico SAS System®. También se calculó la efectividad biológica de los fungicidas mediante la fórmula de Abbott (1925).

La fórmula Abbott para calcular la efectividad de los productos es la siguiente:

$$ET = \frac{RT - rt}{RT} \times 100$$

donde:

ET= eficiencia del tratamiento

RT= diámetro en mm del crecimiento micelial en el testigo (PDA)

rt= diámetro en mm de cada tratamiento (PDA + fungicidas)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza y comparación de medias (Cuadro 6) mostraron que existen diferencias significativas (LSD $P \leq 0.05$) entre los productos y concentraciones. La interacción de las anteriores también resultó significativa, lo que indica que la concentración tiene un efecto diferente sobre el crecimiento del hongo para cada uno de los productos.

De acuerdo al porcentaje de eficiencia Abbott todos los fungicidas inhibieron el crecimiento micelial del hongo en un porcentaje $>78\%$ y de acuerdo a la comparación de medias los fungicidas resultaron significativamente diferentes del testigo.

En orden descendente de efectividad biológica en la inhibición del crecimiento micelial del moho verde se encuentran el fungicida cyprodianil+fludioxonil que resultó ser el producto más eficiente con un control de

99% (Cuadro 6). Seguido los fungicidas fludioxonil, proclhoraz y tiabendazol que fueron significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) entre ellos con 96, 95 y 94%, respectivamente, de control micelial del hongo. Imazalil, de acuerdo a la comparación de medias fue significativamente diferente del resto de los productos (LSD $P\leq 0.05$) y de acuerdo con la eficiencia abott obtuvo 90% de control. El fungicida trifloxystrobin obtuvo en el control de *P. digitatum* cercano a 90%. El ingrediente activo pirimetanil fue el menos eficiente de los fungicidas para inhibir el crecimiento micelial del moho verde con un control < 80%.

Cuadro 6. Efectividad biológica de productos químicos para la inhibición *in vitro* del crecimiento de *P. digitatum* en PDA. 2012.

Ingrediente Activo	Ø de la colonia (mm)*	% eficiencia Abbott**
cyprodianil+fludioxonil	0.3778 f	99.02
Fludioxianil	1.5022 g	96.13
Proclhoraz	1.7878 ef	95.39
Tiabendazol	2.1784 e	94.38
Imazalil	3.7465 d	90.35
Tryfloxistrobin	4.4676 c	88.49
Pirimetanil	8.2328 b	78.79
Testigo	38.8265 a	0
DMS($\alpha=0.05$)	0.4505	

* Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente en la prueba (LSD $P\leq 0.05$). ** La eficiencia abott se calculó a partir de las medias de cada uno de los productos y testigo obtenidos en la comparación de medias. DMS: Diferencia Mínima Significativa. CV=202.72

Se observó que todas las concentraciones de fungicidas probadas fueron significativamente diferentes del testigo (LSD $P\leq 0.05$). Las concentraciones resultaron significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) entre ellas hasta el nivel de 5 ppm, a partir de la cual no existen diferencias significativas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Inhibición del crecimiento micelial de *P. digitatum* con diferentes de fungicidas químicos. 2012

Concentración (ppm)	Ø de la colonia (mm)
0	38.8265
0.01	15.2381
0.1	10.9680
1	4.3214
5	1.2989
10	1.1475
50	1.0823
100	0.9968
200	1.2989
400	1.2552
600	0.3219
800	0.2503
1000	0.1096
DMS($\alpha=0.05$)	1.0699

DMS: Diferencia Mínima Significativa.
CV=202.72

En general, más de un fungicida en diferentes concentraciones inhiben por completo el crecimiento micelial de *P. digitatum* a partir de 600 ppm; sin embargo, se tiene que cyprodianil+fludioxonil, fludioxonil, prochloraz, tiabendazol e imazalil en la mayoría de sus concentraciones mostraron resultados aceptables en el control del moho verde a partir de 1.0 ppm.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que más de un producto en sus diferentes concentraciones controlaron a *P. digitatum* dato que será de utilidad para decidir que producto aplicar en almacén para controlar esta enfermedad y prolongar el periodo de comercialización de los frutos estará en función del precio del fungicida.

La eficiencia alcanzada de cyprodianil+fludioxonil en la inhibición del crecimiento del hongo fue >99%, además de que la concentración 1.0 ppm inhibió casi por completo el crecimiento micelial de *P. digitatum*. La combinación de estas dos moléculas funciona mejor ya que juntos alcanzan casi 100% de control, cosa que el ingrediente activo fludioxonil (FLU) no logró cuando se aplicó de forma independiente. Esto se debe a que cyprodianil inhibe el crecimiento del tubo germinativo del hongo y FLU actúa provocando una hipertrofia que lleva a la destrucción de las células del hongo (Syngenta Crop Protection, Inc., 2004).

En el caso de prochloraz y fludioxonil (FLU) son productos que actualmente se usan en países donde el moho verde ha mostrado resistencia a los benzimidazoles (Schirra *et al.*, 2005). Estos ingredientes activos fueron efectivos en la inhibición del crecimiento micelial de *P. digitatum* a partir de la concentración 1.0 ppm con una efectividad de 95%. Acuña *et al.*, (2009) reportan que utilizando FLU se obtuvo un buen control del hongo en concentraciones de 100 y 200 ppm en pruebas *in vivo*. En otra investigación, Schirra *et al.*, (2005) reportan un control eficiente de FLU al aplicarse por inmersión (180 seg.) a 400 ppm en naranjas Tarocco. Este fungicida de bajo riesgo según la clasificación de la EPA, USA (Palou, 2008). Es conveniente mencionar que los resultados obtenidos en el presente trabajo tienen un comportamiento similar, ya que en las pruebas *in vivo* el hongo resulta ser menos sensible a FLU ya que en las otras pruebas se requiere de mayor concentración del fungicida para obtener resultados favorables en el control del patógeno en frutos inoculados con el hongo. En el caso de prochloraz Salvador *et al.*, (2007) mencionan que este ingrediente activo es eficiente en dosis de 10 ppm similares a los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Tiabendazol (TBZ), producto que se ha utilizado desde los años 50s para el control de pudriciones por *Penicillium* sp. en EEUU (Smilanick *et al.*, 1999), ha creado cepas resistentes en el moho verde. Este compuesto está autorizado en México para el manejo del moho verde en cítricos (COFEPRIS, 2012). Para el presente estudio TBZ mostró una eficiencia aceptable para el control del moho

verde inhibiendo el crecimiento desde 1.0 ppm con una eficiencia de 94%. Kanetis *et al.*, (2008) reportan sensibilidad de *P. digitatum* a TBZ en concentración de 120 ppm lo cual sugiere que la cepa con la cual se trabajó es muy sensible a este producto. Por otro lado, González (2011) reporta que TBZ *in vitro* a concentraciones de 420-1680 ppm obtuvo 100% de inhibición en el crecimiento micelial del moho verde, muy cercano al obtenido en el presente trabajo aun cuando aquí se reporta que este control fue a una menor concentración.

El ingrediente activo imazalil (IMZ) presentó un comportamiento aceptable en la inhibición del crecimiento micelial del hongo a partir de la concentración de 1.0 ppm inhibió totalmente el crecimiento del hongo. Según Zhang (2007) IMZ aplicado a concentraciones de 500-2000 ppm a frutos de naranja fue eficiente en el control de *P. digitatum*. En la investigación realizada por Acuña *et al.*, (2009) mencionan que IMZ a dosis de 750 ppm lograron un control efectivo del patógeno. Las diferencias con los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían deberse a que los trabajos anteriores fueron realizados *in vivo*.

El fungicida pirimetanil (PYR) ingrediente activo promisorio para el control de cepas resistentes al IMZ, presentó un efecto de inhibición del crecimiento micelial de *P. digitatum* en concentración más altas (600-1000 ppm) alcanzando un 78% de eficiencia. González (2011) estudió la eficiencia del control de *P. digitatum in vitro* reportando una concentración de PYR de 1 980 ppm dio 71.16% de control. Por lado, Orozco *et al.*, (2009) estudiaron el control químico de *P. digitatum* en limón persa *in vivo* a 2000 ppm de PYR + cera obteniendo una eficiencia de control de 97%. Estas discrepancias se deben, probablemente, a la mayor concentración de ingrediente activo utilizada y que en el segundo caso la prueba fue realizada en frutos no en medio de cultivo, además de la aplicación de cera contribuyó a la eficiencia del producto. Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los obtenidos en California EEUU, donde la aplicación de 500 o 1000 ppm de PYR en solución acuosa mediante inmersión durante 30 seg., redujo la incidencia de *P. digitatum*, en limones y naranjas en forma muy importante (Smilanick *et al.*, 2006).

En el presente trabajo se evaluaron fungicidas son de acción sistémica, a excepción de fludioxonil de acción contacto y trifloxystrobin con modo de acción mesostémico, que resultaron en la inhibición del crecimiento del micelio del moho verde a nivel *in vitro*. La presente investigación se generó información importante ya que en México sólo existe el trabajo de Orozco *et al.*, (2009) relacionado con el control de *P. digitatum* en limón persa. Los resultados obtenidos servirán como referencia para estudios posteriores como son los relacionados con la evaluación de estos fungicidas *in vivo* y que adicionalmente servirá de utilidad a productores, y en general a empacadores de éste fruto para evitar pérdidas debido a la presencia del patógeno

En EEUU, *P. digitatum* ha desarrollado resistencia a varios fungicidas, principalmente a tiabendazol e imazalil debido al uso excesivo de estos productos (Kinay, 2006). Sin embargo, en México se ha dado poco uso a estos ingredientes activos disminuyendo la probabilidad de desarrollar cepas de *P. digitatum* resistentes. El control químico es uno de los métodos para el control de patógenos, pero no es la única alternativa. Hoy en día se realizan muchos trabajos tratando de encontrar alternativas al control químico debido a la resistencia desarrollada por el moho verde, aunado a la tendencia a consumir productos inocuos libres de sustancias tóxicas que puedan afectar la salud humana. El éxito de un buen control de la enfermedad debe de incluir la integración de los métodos de control, incluyendo el buen uso y manejo adecuado de los fungicidas.

CONCLUSIONES

Todos los fungicidas evaluados en la prueba *in vitro* mostraron ser eficientes en la inhibición micelial de *P. digitatum*.

Cyprodianil+fludioxonil, fludioxonil, proclhoraz, tiabendazol e imazalil obtuvieron efectividad biológica por encima del 90% a concentraciones igual o mayores 1.0 ppm.

Es importante determinar la concentración a la cual el ingrediente activo tiene una eficiencia biológica aceptable para evitar costos innecesarios en el manejo de la enfermedad en postcosecha.

REFERENCIAS

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18:267-267.
- Agrios, G. N. 1999. Fitopatología. Edit. Noriega. México.
- Acuña, L.E., Kornowski, M.V., Agostini, J.P. y Haberle, T.J. 2009. Eficiencia de Fludioxinyl para el control de podredumbres causadas por *Penicillium digitatum* en rutas de híbridos de mandarina. XV Cong. Latinoam. de Fitopatol. EEA Montecarlo, INTA. Montecarlo, Argentina. 3384p.
- COFEPRIS. 2012. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. <http://www.cofepris.gob.mx>
- Eckert, J. W., and Eaks, I. L. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus. The citrus industry 5: 179-261.
- González F., P. 2011. Virulencia y control postcosecha de *Penicillium digitatum* en frutos de naranja. Tesis de Maestría, Colegio de Posgraduados-Fitosanidad, Edo. de Méx. 47p.
- Guédez, C., Cañizaleza, L., Castilloa, C., Olivarc, R., Maffeib. 2010. Alternativas para el control de hongos postcosecha en naranjas valencia (*Citrus sinensis*). Rev. Soc. Venezolana de Microbiol. 2010, 30:43-47.

Kinay, P., Mansour, M. F., Mlikota, F. G., Margosan, A. D., and Smilanick, J.L. 2006. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. Elsevier. California, USA. 647-656p.

Kanetis, L., Förster, H., and Adaskaveg, E. 2008. Baseline sensitivities for new postharvest fungicides against *Penicillium* spp. on citrus and multiple resistance evaluations in *P. digitatum*. Plant Dis. 92:301-310.

Klotz, L.I. 1973. Color handbook of citrus diseases. U. of California, Division of Agricultural Sciences. Pág. 122

Lara, R. E. 2006. Aislamientos y caracterización de levaduras antagonistas de hongos fitopatógenos post-cosecha de cítricos. Tesis de maestría, Centro de Biotecnología Genómica, IPN. Tam., México. 18p.

Orozco, S. M., Carrillo, M. S. H., and Vazquez, J. J. L. 2009. Chemical control of green mold (*Penicillium digitatum*) with the fungicide pirimetanil in Persian Lime. Phytopathology. 99:97.

Plaza, P., A. Sanbruno, J. Usall, N. Lamarca, R. Torres, J. Pons, and I. Viñas. 2004. Integration of curing treatments with degreening to control the main postharvest diseases of Clementine mandarins. Postharvest Biol. and Technol. 34:29-37.

Palou, V. L. 2008. Sistemas alternativos a los fungicidas sintéticos para el control de enfermedades de postcosecha de cítricos. Departamento de Postcosecha, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia, España. 3p.

Salvador, A., Navarro, P., Martínez-Jávega, J.M. 2007. Tecnología postcosecha de cítricos: causas de pérdida de calidad postcosecha. Simp. Inter. de Citricultura. Cd. Victoria, Tam., México. 11p.

Schirra M., D'Aquino S., Palma A., Marceddu S., Angioni A., Cabras P., Scherm B., and Migheli Q. 2005. Residue level, persistence and storage performance of citrus fruit treated with fludioxonil. J. Agric. Food Chem., 53: 6718-6724.

Smilanick, J. L., Margosan, D. A., Mlikota, F., Usall, J., and Michael, I. F. 1999. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Dis.* 83:139-145.

Smilanick J.L., Mansour M.F., Mlikota-Gabler F., and Sorenson D. 2008. Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. *Postharvest Biol. Technol.* 47: 226-238.

Smilanick J.L., Mansour M.F., Mlikota-Gabler F., and Goodwine W.R. 2006. The effectiveness of pirimetanil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control citrus green mold after harvest. *Postharvest Biol. and Technol.*, 42: 75-85.

Syngenta Crop Protection, Inc. 2004. Graduate: postharvest disease-protection in citrus. Disponible en ;
<http://www.farmassist.com/postharvest/images/graduateTechBrofinal.pdf>

Tuset, J. J. 1987. Podredumbres de los frutos cítricos. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Generalitat Valenciana. Valencia, España. 206p.

Zhang J. 2007. The potential of a new fungicide fludioxonil for stem-end rot and green mold control on Florida citrus fruit. *Postharvest Biol. and Technol.* 46: 262-270.