

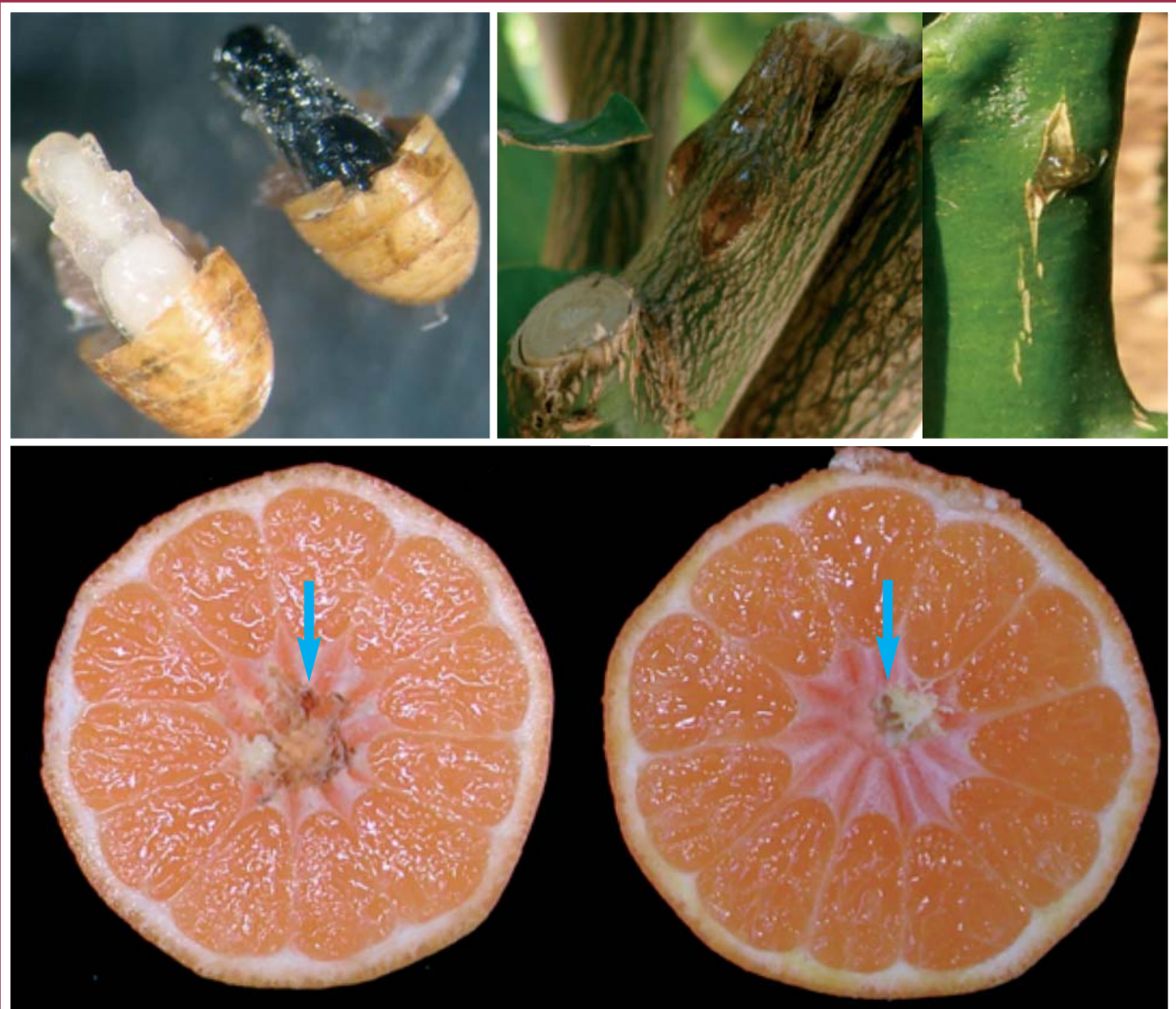


Desde 1962

REVISTA INTERNACIONAL
DE CITRICOS

INTERNATIONAL
MAGAZINE OF CITRUS

REVUE INTERNATIONALE
DES AGRUMES



Año LIII - Núm 423 - 3^{er} Trimestre 2014

Depósito Legal: V-144-1962 / ISSN 0457-6039

LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS EN NARANJAS: ¿ES UN PROCESO EFECTIVO PARA EVITAR LA PODREDUMBRE DE POSCOSECHA DE *Penicillium digitatum*?

¹ IRTA, XaRTA-Postcollita,
Lleida, Cataluña, España.

² Universitat de Lleida,
XaRTA-Postcollita,
Centro Agrotecnio,
Lleida, Cataluña, España

INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas son una de las principales causas de las pérdidas que se producen durante la poscosecha de frutos cítricos. Aunque estas pérdidas son muy difíciles de valorar debido a sus diferencias según la zona productora, las condiciones climatológicas, la recolección y las condiciones de conservación (Eckert y Brown, 1986), diversos estudios indican que pueden representar entre un 3 y un 6 % de todo el producto manejado en centrales citrícolas (Perucho y Tuset, 2001).

Penicillium digitatum, causante de la podredumbre verde, es uno de los patógenos que causa mayores pérdidas en la poscosecha de frutos cítricos. La infección del fruto por parte de este patógeno tiene lugar exclusivamente a través de heridas producidas en la piel, las cuales pueden tener lugar durante la recolección de los frutos o bien durante el posterior manejo de los mismos. La fuente de inóculo puede encontrarse en el campo, en la central citrícola o en cualquiera de los canales de distribución y venta de la fruta debido a que las esporas (conidios) de las especies de *Penicillium* se encuentran de manera ubicua en estos

lugares. Los frutos ya colonizados son una importante fuente de infección debido a que las esporas son de muy pequeño tamaño y por lo tanto pueden diseminarse muy fácilmente por corrientes de aire. Por lo tanto, es imprescindible establecer unos programas de limpieza y desinfección así como unas buenas prácticas de manipulación tanto en el campo como en la central citrícola para evitar dichas fuentes de inóculo.

A pesar de utilizar estas acciones preventivas, para controlar las podredumbres poscosecha continúan utilizándose los tratamientos convencionales con fungicidas de síntesis aplicados en dréncher, en forma de botes fumígenos o en ducha en las líneas de confección. Sin embargo, la utilización masiva, continuada y en algunos casos poco controlada de estos productos ha generado una serie de problemas graves como son la presencia de residuos en la fruta, con el consecuente incremento del riesgo para la salud humana y el medio ambiente, así como la aparición de cepas fúngicas resistentes a estos fungicidas (Bus, 1992). Por consiguiente, cada vez existe una mayor necesidad de desarrollar alternativas de control que tengan menos riesgos para la salud humana y el medio ambiente. En este sentido, nuevos enfoques centrados en estudiar la resistencia innata de los frutos permitirían reducir el uso de fungicidas químicos, así como optimizar el momento óptimo de su aplicación.

Durante la recolección, manipulación, transporte y almacenamiento, los frutos son susceptibles a heridas como

resultado de factores abióticos como pueden ser el aire, la lluvia o el granizo, así como por factores bióticos como pueden ser el ataque por insectos u hongos. Por su parte, las plantas en general y los frutos en particular han desarrollado una amplia variedad de estrategias que incluyen respuestas inducidas ante factores abióticos como una herida, que les permiten defenderse de la posible invasión por parte de los patógenos. Además, en los frutos, estas respuestas de defensa se encuentran moduladas por el estado de madurez en el que se encuentran (Su *et al.*, 2011).

Una rápida respuesta de defensa por parte de la fruta puede determinar el grado de colonización por parte de los patógenos. Estas reacciones de defensa involucradas en la respuesta de los frutos a herida implican diferentes reacciones, como la generación de especies reactivas al oxígeno, así como la lignificación de las paredes como barrera física creada para frenar o reducir el posible ataque por patógenos.

En este estudio nos hemos centrado en una de estas reacciones de defensa de la fruta: el proceso de cicatrización de las naranjas de la variedad 'Valencia' y su efecto frente a la infección por el hongo *P. digitatum*. El estudio se ha realizado con naranjas a diferentes estados de madurez y diferente temperatura de almacenaje.



Fotografía 1. Ejemplo de cómo el proceso de cicatrización de las naranjas consiguió reducir la podredumbre de *P. digitatum* cuando la fruta fue almacenada a 20 °C y 85% HR.

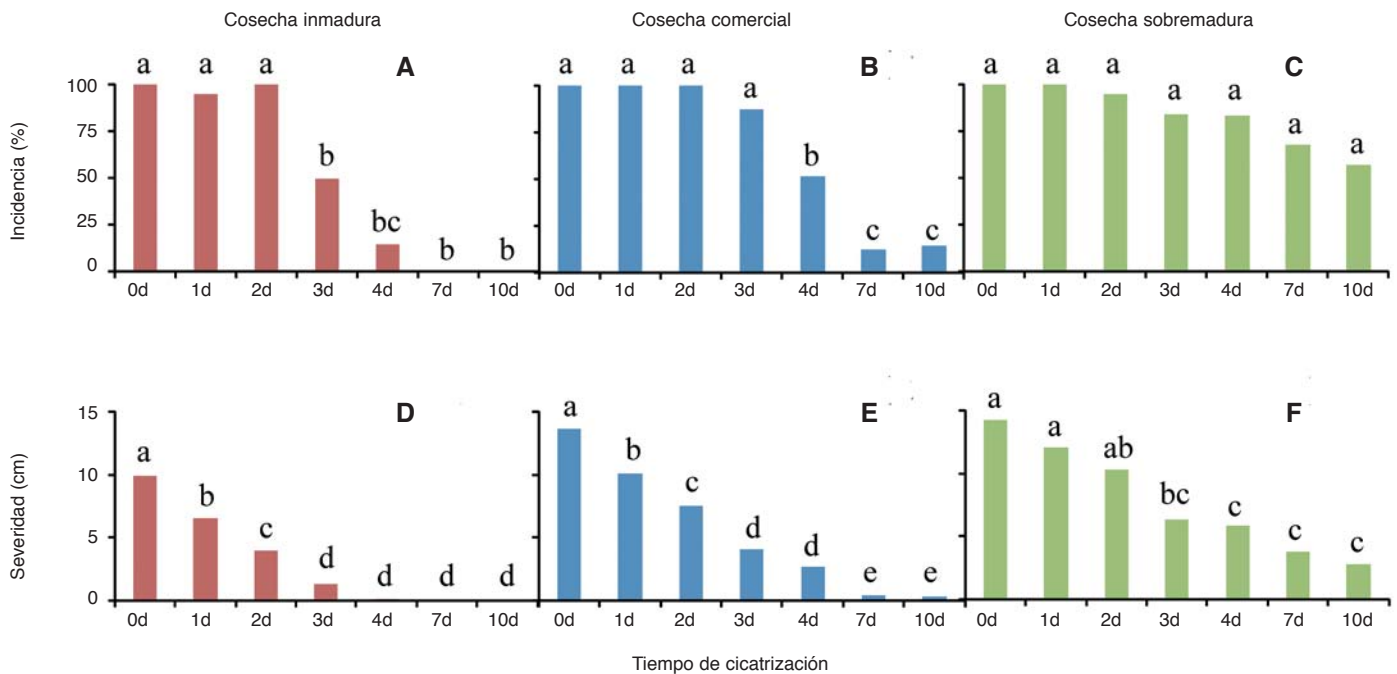


Figura 1. Incidencia (A, B y C) y severidad (D, E y F) de la podredumbre en naranjas 'Valencia' recolectadas a diferentes estados de madurez. Las naranjas fueron inoculadas con *Penicillium digitatum* a diferentes tiempos de cicatrización y almacenadas a 20 °C y 85% humedad relativa durante 7 días. Los datos de incidencia fueron transformados siguiendo una transformación angular. Para cada fecha de cosecha, letras diferentes indican diferencias significativas a un nivel de significación $P < 0,05\%$ utilizando el test de Tukey. Cada columna representa la media obtenida con 5 frutos x 4 repeticiones.

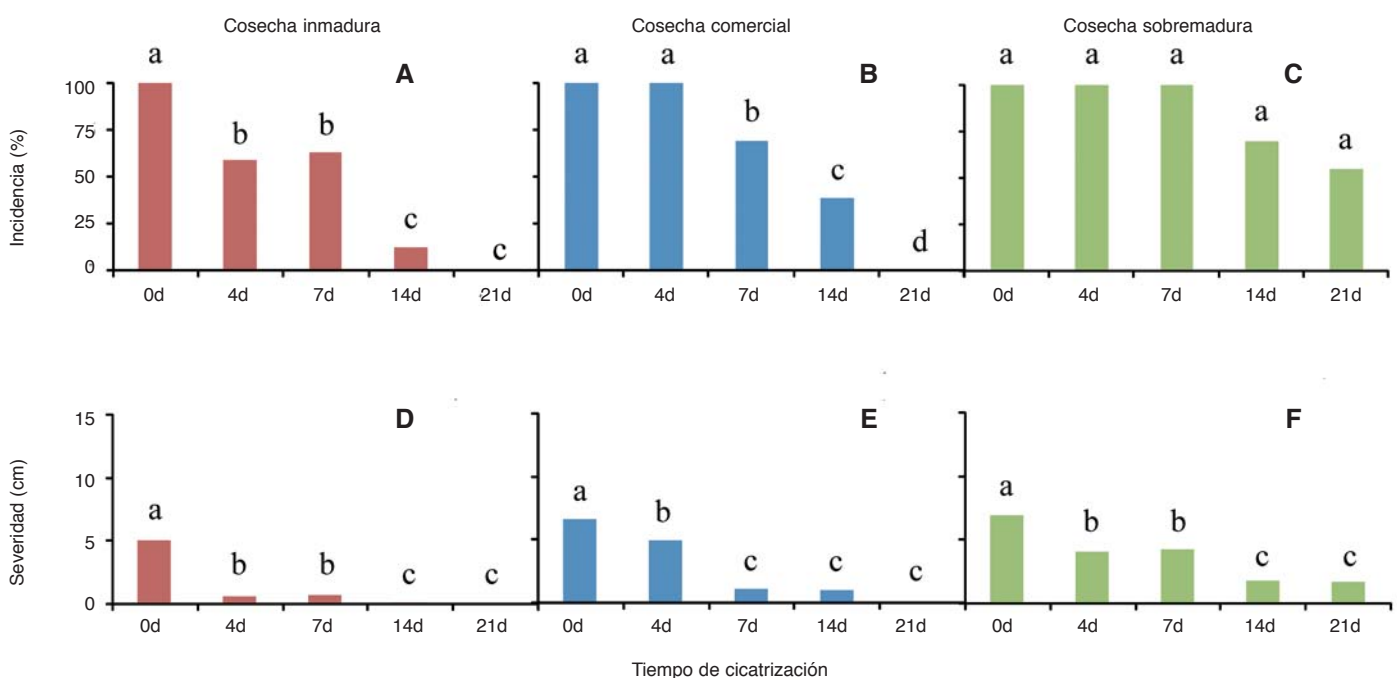


Figura 2. Incidencia (A, B y C) y severidad (D, E y F) de la podredumbre en naranjas 'Valencia' recolectadas a diferentes estados de madurez. Las naranjas fueron inoculadas con *Penicillium digitatum* a diferentes tiempos de cicatrización y almacenadas a 4 °C y 85% humedad relativa durante 30 días. Los datos de incidencia fueron transformados siguiendo una transformación angular. Para cada fecha de cosecha, letras diferentes indican diferencias significativas a un nivel de significación $P < 0,05\%$ utilizando el test de Tukey. Cada columna representa la media obtenida con 5 frutos x 4 repeticiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Frutos

Para la realización de este estudio se recolectaron naranjas de la variedad 'Valencia' en tres estados de madurez diferentes. Las cosechas se llevaron a cabo el 20 de Marzo (cosecha inmadura), 30 de Abril (cosecha comercial) y 29 de Junio (cosecha sobremadura) del 2010. Las naranjas se seleccionaron por uniformidad de tamaño y se descartaron aquellas que presentaban daños mecánicos o defectos en la piel. Una vez recolectadas, se llevaron al laboratorio y se desinfectaron por inmersión en una concentración de hipoclorito sódico al 10% durante 1 min, se aclararon con agua y posteriormente se secaron a temperatura ambiente.

Determinación de los parámetros de calidad

El color, la firmeza, los sólidos solubles y la acidez fueron determinados como parámetros de calidad a cada estado de madurez. El color se determinó en los dos lados opuestos de cada naranja usando un colorímetro Minolta CR-200. Para cada fruto se determinaron las coordenadas Hunter a, b y L y se expresaron como índice de color (IC) = $(1000 \cdot a) / (L \cdot b)$. La firmeza fue medida utilizando un texturómetro TA-XT2i que se basa en los milímetros de deformación que sufre el fruto ante 2 kg de presión a una velocidad constante de 2 mm s⁻¹. Una vez medidos estos parámetros, las naranjas fueron exprimidas y con el zumo obtenido se analizaron los sólidos solubles totales (SST) utilizando un refractómetro y la acidez titulable (AT) valorando 10 mL de zumo con NaOH 0,1 N usando fenofaleína como indicador. El índice de madurez fue calculado como el ratio SST/AT. Los datos de los parámetros de calidad representan la media de 4 repeticiones compuestas por 5 frutos cada una.

Patógeno

Para la preparación del inóculo se utilizó un cultivo de *P. digitatum* crecido en placa de PDA (patata dextrosa agar) durante un periodo de 7-10 días. Se pre-

paró una suspensión de esporas a la concentración final de 10⁵ conidios mL⁻¹.

Estudio de cicatrización de las heridas en naranjas

En este estudio se analizó el efecto del estado de madurez y de la temperatura de almacenaje en el proceso de cicatrización de las naranjas para prevenir la infección por *P. digitatum*. Las naranjas fueron heridas con un punzón y separadas en dos lotes distintos: un lote fue almacenado a la temperatura de 20 °C y el otro lote a 4 °C.

La fruta almacenada a 20 °C fue dividida en 7 diferentes subgrupos, cada uno de ellos inoculado a diferentes tiempos de cicatrización: 0 h (herido e inoculado al mismo tiempo) sirvió como control mientras que los otros 6 grupos fueron heridos a 0 h y posteriormente inoculados a 1, 2, 3, 4, 7 y 10 días. Las naranjas fueron inoculadas con 15 µL de una suspensión de *P. digitatum* a la concentración de 10⁵ conidios mL⁻¹. La incidencia y la severidad de las lesiones de cada subgrupo fueron evaluadas a los 7 días a 20 °C y 85% HR después de la inoculación.

La fruta almacenada a 4 °C fue dividida en 5 diferentes subgrupos, cada uno de ellos inoculado a diferentes tiempos de cicatrización: tiempo 0 h (herido e inoculado al mismo tiempo) sirvió como control mientras que los otros 4 grupos fueron heridos a 0 h y posteriormente inoculados a 4, 7, 14 y 21 días. El proceso de inoculación fue el descrito anteriormente. La incidencia y la severidad de las lesiones de cada subgrupo fueron evaluadas a los 30 días a 4 °C y 85% HR después de la inoculación.

En ambos casos (20 °C y 4 °C) cada tratamiento estaba formado por 4 repeticiones compuestas por 5 frutos cada una.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) con el programa estadístico JMP8 (SAS Institute, Cary, NC, USA), seguido del test de Tukey con un nivel de signifi-

cación de $P < 0,05$. En los datos expresados como porcentajes se evaluó la homogeneidad de la varianza por el test de Barlett y a los datos se les aplicó una transformación angular.

RESULTADOS

En general, se observó que el proceso de cicatrización fue capaz de detener la infección por *P. digitatum* siendo este efecto más pronunciado en frutos inmaduros y de madurez comercial. La respuesta observada en ambas temperaturas de almacenaje fue muy similar.

Efecto del tiempo de cicatrización y del estado de madurez ante la infección por *P. digitatum* en naranjas almacenadas a 20 °C

En la Fotografía 1 se puede observar un ejemplo de cómo el proceso de cicatrización de las naranjas consiguió reducir la podredumbre de *P. digitatum* cuando la fruta fue almacenada a 20 °C.

En las naranjas inmaduras se observó una reducción del porcentaje de frutos podridos de aproximadamente el 50% a partir del tercer día de inoculación (Figura 1A). Cabe destacar que a los 7 y 10 días de cicatrización no se observaron síntomas de podredumbre por lo que el porcentaje de reducción de frutos podridos fue del 100%. En lo que respecta a la severidad de las lesiones, todos los tiempos de cicatrización evaluados mostraron diámetros de podredumbre inferiores al control, destacando que a los 4 días de cicatrización el diámetro de lesión fue inferior a 0,5 cm (Figura 1D).

En las naranjas de madurez comercial se observaron reducciones del 50% a los 4 días de cicatrización (Figura 1B). Además, a los 7 y 10 días de cicatrización se observó una reducción del porcentaje de frutos podridos mayor al 80%. En lo que respecta a la severidad de las lesiones, todos los tiempos de cicatrización evaluados mostraron diámetros de podredumbre inferiores al control, destacando que a partir de los 7 días de cicatrización el diámetro de lesión fue inferior a 0,5 cm (Figura 1E).

En las naranjas sobremaduras se observó un alto grado de variabilidad entre los frutos, por lo que a pesar de que se observaron diferencias entre los distintos tiempos de cicatrización (una reducción de aproximadamente el 50% a los 10 días de cicatrización), no se detectaron diferencias estadísticas (Figura 1C). En lo referente a la severidad de las lesiones, se observaron diferencias significativas a partir de los 3 días de cicatrización, observando unos diámetros de lesión de 6,3, 5,8, 3,7 y 2,7 cm a los 3, 4, 7 y 10 días de cicatrización, respectivamente en comparación a los 14 cm del control (Figura 1F).

En general, las cosechas inmadura y comercial mostraron menor incidencia y severidad que la cosecha sobremadura. Además, las mayores reducciones en incidencia y severidad se observaron a tiempos de cicatrización superiores a 4 días.

Efecto del tiempo de cicatrización y del estado de madurez ante la infección por *P. digitatum* en naranjas almacenadas a 4 °C

En las naranjas inmaduras se observó un porcentaje de frutos podridos de aproximadamente el 60% a los 4 y 7 días de cicatrización, lo que supone una reducción de la incidencia del 40% (Figura 2A, pág. 214). Aún mejores fueron los resultados obtenidos a los 14 días de cicatrización donde la reducción de la incidencia fue de aproximadamente del 85%. En lo referente a la severidad de las lesiones, todos los tiempos de cicatrización evaluados mostraron diámetros de podredumbre inferiores a 1 cm y por lo tanto significativamente inferiores al tiempo de cicatrización de 0 h (alrededor de 5 cm) (Figura 2D). Además, las naranjas inmaduras inoculadas a los 21 días de cicatrización no mostraron síntomas de podredumbre.

En las naranjas de madurez comercial se observó una disminución del porcentaje de frutos podridos a los 7 y 14 días de cicatrización de aproximadamente el 30 y 60%, respectivamente

(Figura 2B). En lo que respecta a la severidad de las lesiones, los menores diámetros de lesión se encontraron en los tiempos de cicatrización mayores a 7 días (alrededor de 1 cm) (Figura 2E). Al igual que en las naranjas inmaduras, no se observaron signos de podredumbre a los 21 días de cicatrización.

Al igual que a la temperatura de 20 °C, en las naranjas sobremaduras se observó un alto grado de variabilidad entre los frutos, por lo que a pesar de que se observaron reducciones aproximadas del 30 y del 50% a los 14 y 21 días de cicatrización, no se detectaron diferencias estadísticas entre sí (Figura 2C). En cambio, en lo referente al diámetro de lesión, se observaron tres grupos diferenciados: por un lado el tiempo de cicatrización de 0 horas mostró los mayores diámetros de lesión, seguido por los tiempos de 4 y 7 días de cicatrización con diámetros alrededor de 4 cm y por último los 14 y 21 días de cicatrización con los menores diámetros de lesión (alrededor de 2 cm) (Figura 2F).

En general, la cosecha inmadura mostró menor incidencia que la cosecha comercial y la sobremadura y además, las mayores diferencias se observaron a tiempos de cicatrización superiores a 14 días.

Parámetros de calidad

En la Tabla 1 pueden observarse las diferencias en los diferentes parámetros de calidad de las naranjas recolectadas a tres estados de madurez. Tanto la acidez como el índice de color mostraron una disminución a medida que las naranjas maduraron. Por el contrario, se observó una mayor deformación de los frutos al aumentar la

madurez, pudiendo ser esto debido a la degradación de las pectinas durante este proceso. El índice de madurez o ratio TSS/TA es el parámetro más utilizado para medir la madurez de los frutos y en este caso mostró un valor superior en la cosecha sobremadura que en las otras dos.

DISCUSIÓN

La mayor parte de las investigaciones realizadas en el control de enfermedades fúngicas en poscosecha de cítricos se han focalizado en el estudio de tratamientos alternativos que garanticen una eficacia similar o superior a los fungicidas de síntesis, sin los problemas que éstos generan, sin afectar negativamente a la calidad y a un coste razonable. Entre estos tratamientos encontramos aquellos que se basan en la inducción de resistencia de los frutos, ya sea con tratamientos de curado (Plaza *et al.*, 2003) o con tratamientos por agua caliente (Palou *et al.*, 2001); en cambio, se han destinado pocos esfuerzos a conocer la respuesta de los frutos frente a las heridas.

Tanto *P. digitatum* como *P. italicum* son patógenos de herida, es decir, necesitan la presencia de una herida o una abertura en la corteza de los frutos para poder iniciar la infección. Es por eso que el proceso de cicatrización de las heridas es un factor determinante en la resistencia/susceptibilidad de los frutos cítricos a la infección por estos hongos. Consiguiendo una cicatrización eficaz de las heridas, reduciríamos los puntos de entrada de estos patógenos y por tanto podríamos reducir las podredumbres en poscosecha.

Tabla 1. Efecto de la fecha de cosecha de las naranjas 'Valencia' en los parámetros de calidad. Para cada fecha de cosecha, letras diferentes indican diferencias significativas a un nivel de significación *P* < 0,05% utilizando el test de Tukey.

Cosecha	Sólidos solubles totales (SST en %)	Acidez titulable (AT en % ácido cítrico)	Ratio SST/AT	IC (índice de color)	Deformación (mm)
Inmadura	10,0 a	1,49 a	6,7 b	4,6 a	2,2 b
Comercial	9,9 a	1,10 b	9,0 b	3,9 b	2,5 ab
Sobremadura	11,3 a	0,85 c	13,3 a	3,1 c	2,7 a

Durante los años 80 se hicieron algunos estudios acerca de la cicatrización de los frutos cítricos y su capacidad para frenar la infección de *P. digitatum* y/o *P. italicum*. Dichos estudios indicaron el gran potencial que representa el proceso de cicatrización frenando la infección por dichos patógenos. Con este estudio, nosotros pretendemos profundizar en el papel del proceso de cicatrización, evaluándolo a diferentes estados de madurez de la fruta, así como a diferentes temperaturas de almacenaje para poder potenciar la resistencia innata de los frutos reduciendo así la aplicación de productos químicos.

Los resultados obtenidos indicaron que el proceso de cicatrización tiene un claro efecto disminuyendo la infección de *P. digitatum* cuando la fruta es almacenada a 20 °C. Se observó una disminución significativa tanto de la incidencia como de la severidad a tiempos de cicatrización de 7 y 10 días. Aún mejores fueron los resultados en naranjas inmaduras. Esto nos indica que el proceso de cicatrización de las naranjas está determinado por el estado de madurez en el que se encuentran. Por lo tanto, el proceso de madurez puede incrementar la susceptibilidad de las heridas ante una infección fúngica debido a una menor respuesta de defensa por parte del fruto. Esto nos demuestra que el momento de recolección es un factor determinante. De todas maneras, las naranjas destinadas a conservación no suelen recolectarse sobremaduras. Además, Vilanova *et al.* (2013) correlacionaron el proceso de cicatrización de las naranjas con una acumulación de lignina como barrera física para dificultar la infección por parte de los hongos.

Este estudio también demostró que el efecto del proceso de cicatrización es dependiente de la temperatura. La temperatura y la humedad relativa son dos factores claves en el proceso de cicatrización. Por un lado, la temperatura debe ser lo suficientemente elevada como para potenciar el proceso de cicatrización y por otro, la humedad relativa debe ser suficientemente alta

para prevenir la desecación y la muerte de los tejidos circundantes a las heridas. Generalmente, son necesarias temperaturas por encima de 10 °C y humedades relativas por encima de 85% para que se inicie el proceso de cicatrización de las naranjas. En este estudio se observó un importante efecto del proceso de cicatrización ante la infección por *P. digitatum* a temperaturas de almacenaje de 4 °C. Sin embargo, al aumentar el período de almacenaje de las naranjas, las diferencias entre los diferentes días de cicatrización fueron más sutiles (datos no mostrados). Esto nos indica que, a pesar de que hay un efecto del proceso de cicatrización frenando la infección por *P. digitatum*, la temperatura de 4 °C hace que este proceso sea más lento que a la temperatura de 20 °C. Vilanova *et al.* (2014) también observaron estas diferencias en el proceso de cicatrización de manzanas ante la infección por *P. expansum*.

Si consiguiéramos tener las condiciones adecuadas para estimular el proceso de cicatrización de las heridas originadas en el campo o durante el proceso de recolección, el desarrollo de podredumbres en los frutos almacenados sería menor. Con estos resultados se podrían plantear estrategias que implicaran un período de cicatrización a la temperatura de 20 °C y un posterior almacenamiento de la fruta 4 °C con el fin de mejorar la capacidad de defensa de los frutos ante las infecciones por *P. digitatum* y así reducir las aplicaciones de fungicidas de síntesis. Además, esta información puede ser muy útil para determinar cuánto tiempo podemos almacenar la fruta sin riesgo a sufrir grandes pérdidas por infecciones fúngicas o decidir el mejor momento para realizar aplicaciones de productos poscosecha como puede ser los botes fumígenos y por tanto reducir su aplicación indiscriminada.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación recibida del Ministerio de Ciencia e Innovación mediante los proyectos AGL2008-04828 y AGL2011-30519 y

por la beca predoctoral a L. Vilanova del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

BIBLIOGRAFÍA

- Bus, V.G. 1992. ED50 levels of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* with reduced sensitivity to thiabendazole, benomyl and imazalil. *Postharvest Biology and Technology* 1, 305-315.
- Eckert, J.W., Brown, G.E. 1986. *Postharvest citrus diseases and their control*. In: Wardowski, W.F., Nagy, S., Grierson, W. (Eds.), *Fresh citrus fruits*. AVI Van Nostrand Reinhold Co. Inc., New York. 315-360.
- Palou, L., Smilanick, J.L., Usall, J., Viñas, I. 2001. Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. *Plant Disease* 85, 371-376.
- Perucho, J.J., Tuset, J.J. 2001. Hongos causantes del podrido en clementina y mandarinas en postcosecha. *Levante Agrícola* 355, 101-106.
- Plaza, P., Usall, J., Torres, R., Lamarca, N., Asensio, A., Viñas, I. 2003. Control of green and blue mould by curing on oranges during ambient and cold storage. *Postharvest Biology and Technology* 28, 195-198.
- Su, J., Tu, K., Cheng, L., Tu, S.C., Wang, M., Xu, H.R., Zhan, G. 2011. Wound-induced H₂O₂ and resistance to *Botrytis cinerea* decline with the ripening of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 62, 64-70.
- Vilanova, L., Torres, R., Viñas, I., González-Candelas, L., Usall, J., Fiori, S., Solsona, C., Teixidó, N. 2013. Wound response in orange as a resistance mechanism against *Penicillium digitatum* (pathogen) and *P. expansum* (non-host pathogen). *Postharvest Biology and Technology* 78, 113-122.
- Vilanova, L., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Buron-Moles, G., Teixidó, N. 2014. Increasing maturity reduces wound response and lignification processes against *Penicillium expansum* (pathogen) and *Penicillium digitatum* (non-host pathogen) infection in apples. *Postharvest Biology and Technology* 88, 54-60.

