Control de la esporulación de *Phyllosticta citricarpa* en fruta cítrica mediante el uso de aceites esenciales

Elena Pérez Faggiani, Andrea Guimaraens
Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Camino al Terrible s/n, Salto, Uruguay.
Contacto: elenaperez@inia.org.uy;

1. Introducción

La mancha negra de los cítricos es una enfermedad que afecta fruta de todas las variedades de interés comercial, aunque las naranjas del grupo de las Valencias y los limones son considerados cultivos más sensibles. La fruta es susceptible por aproximadamente 24 semanas luego de la caída de pétalos (Kotzé, 1981). Presenta un largo periodo de latencia desarrollando los síntomas en etapas cercanas a la madurez e inclusive luego de la cosecha, durante el periodo de transporte (Kotzé, 2000). La enfermedad presenta varios tipos de síntomas, pero algunos de ellos no producen estructuras reproductivas. Por tanto, no todas las lesiones sobre la fruta tienen el mismo riesgo de transformarse en fuentes de inóculo de la enfermedad. En el caso de las lesiones que presentan estructuras reproductivas (picnidios), bajo ciertas condiciones de humedad y temperatura, pueden liberar esporas (Kotzé, 1981) que se dispersan a corto plazo por el salpicado de agua. Por ello, la fruta infectada es considerada de bajo riesgo para la dispersión de la enfermedad a larga distancia (Whiteside, 1967). A pesar de ello, el marco regulatorio de la Unión Europea rechaza toda fruta con síntomas, con el argumento que puede ser una vía de entrada de la enfermedad (Council directive 2000/29/EU). Desde el manejo del riesgo, entre otras cosas, se debería considerar el tipo de lesión y la presencia o el potencial de producción de estructuras reproductivas con inoculo viable sobre las mismas. Con el propósito de incorporar herramientas que contribuyan a disminuir el riesgo de dispersión de la enfermedad a través de la fruta, se evaluó el efecto de dos aceites esenciales en la inhibición de la reproducción del hongo.

2. Materiales y Métodos

2.1 Aceites esenciales.

Se evaluó el efecto de los aceites esenciales obtenidos de *Conyza bonariensis* y *Chenopodium ambrosioides*. Estos aceites fueron seleccionados siguiendo los resultados obtenidos previamente en estudios *in vitro* (Lombardo et al., 2016).

2.2 Ensayos sobre lesiones retiradas de las frutas

Las evaluaciones fueron realizadas en frutas de naranja Valencia y de limones con síntomas de mancha dura sin la presencia de estructuras reproductivas (picnidios). Las lesiones (8 mm de diámetro x aprox. 5 mm de profundidad), fueron removidas de las frutas con la ayuda de un sacabocado y desinfectadas superficialmente con alcohol durante 30 s y luego 1 min con hipoclorito de sodio (5% v/v). Inmediatamente fueron enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril y fueron secadas sobre papel de filtro en condiciones de asepsia. Seis lesiones fueron colocadas en placas de Petri conteniendo una solución estéril de 1% (w/v) de agar agua apoyando el flavedo en el medio sólido. Para evaluar el efecto de la fase liquida de los aceites esenciales, una gota de 0.01 mL del aceite esencial

fue colocado sobre la lesión, mientras que para evaluar el efecto de la fase volátil el aceite esencial 0.1% (w/v) fue colocado sobre un porta objeto ubicado en el medio de la placa de Petri. Los controles se prepararon de idéntica manera pero no estuvieron expuestos a los aceites esenciales. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento (18 lesiones en total) y el experimento se repitió 2 veces. Las placas fueron selladas con parafilm® y se mantuvieron durante 7 días a 25°C con un ciclo de 16 h luz y and 8 h oscuridad. La presencia/ausencia de estructuras reproductivas fue evaluada en cada lesión y cuando presentes, el número de esporas fue cuantificado utilizando una cámara de Neubauer. Para ello, la suspensión de esporas fue preparada colocando los discos con estructuras reproductivas en tubos de vidrio conteniendo 5 mL de agua tritonada Triton-X-100 (0.01% w/v) que fueron agitados por 2 min con un vortex mixer.

2.3 Ensayo en condiciones semi-comerciales

Se formaron grupos de 60 frutas de naranja Valencia, colocando 40 frutas sanas y 20 frutas con síntoma de mancha dura sin estructuras reproductivas. Cada grupo de frutas se colocó en cajas telescópicas de cartón que previamente habían sido tratadas humedeciendo las caras internas de las cajas con la misma concentración de aceite esencial para obtener concentraciones de 0.01 y 0.05% (w/v) en relación al volumen de la caja. Los controles se trataron de la misma forma, pero no fueron expuestos al aceite esencial. Las cajas fueron almacenadas por 20 días a 5°C y oscuridad y posteriormente fueron expuestas a temperatura ambiente (25ºC ±2) por 7 d. La presencia de estructuras reproductivas se observó después de la exposición a las temperaturas mencionadas anteriormente. En el caso de resultados positivos, la presencia de picnidios y el número de esporas fue cuantificada. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento (60 frutas enfermas) y el experimento se repitió dos veces.

3. Resultados

3.1. Ensayo sobre lesiones retiradas de las frutas.

Los aceites esenciales evaluados no inhibieron significativamente la formación de estructuras reproductivas cuando fueron colocados directamente sobre la lesión (fase líquida). Sin embargo, en fase vapor, ambos aceites fueron efectivos. El aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* inhibió 100% la reproducción del patógeno en ambas especies evaluadas. El aceite esencial de *Conyza bonaerensis* también redujo significativamente la esporulación del patógeno comparado con el control, pero con un efecto menor que el aceite esencial de *Ch. ambrosioides* (Tabla 1). Se destaca, que el desarrollo de otros hongos contaminantes comunes de la fruta tales como *C. gloeosporioides* y *Fusarium* sp., fueron inhibidos completamente.

Tabla 1. Efecto i*n vivo* de la fase volátil de los aceites esenciales de *Ch. ambrosioides* y *C. bonaerensis* (0.1% w/v) en la producción de esporas de *P. citricarpa* sobre lesiones de mancha dura en fruta de naranja Valencia y limón.

	Limón	Naranja
Tratamiento	**Producción de esporas (Log SN[a]+1)[b]**	
Ch. ambrosioides	0.00 a	0.00 a
C. bonaerensis	3.66 b	1.96 b
Control	4.85 c	4.31 c
CV (%)	11.33	60.37

[a]SN = número de esporas. [b]Medias con la misma letra en cada columna no se diferencian significativamente p < 0.05 (Tukey). El número de esporas (SN) fue transformado (Log SN+1).

3.2 Ensayo en condiciones semicomerciales

El hongo no se reprodujo mientras la fruta estuvo almacenada a temperatura fría (5°C). No obstante, luego de 7 días a temperatura ambiente, se observaron estructuras reproductivas en todos los tratamientos. El aceite esencial de *Ch. ambrosioides* redujo significativamente la producción de picnidios. El mejor tratamiento (40% de inhibición comparado con el control) se obtuvo aplicando una concentración de 0,05% (v/w) (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* en la reproducción de *P. citricarpa* sobre lesiones de mancha dura en naranjas Valencia después de 20 días de almacenamiento a 5°C y un periodo de 7 días a temperatura ambiente (25 ±2ºC).

	Temperatura	
	5°C	**Ambiente**
Concentración de aceite esencial (%)	**Producción de picnidios(%)[ab]**	
0.01	0	35 b
0.05	0	19 a
Control	0	59 c

[a]Cada valor representa la media de 3 repeticiones. [b]Medias con la misma letra en cada columna no se diferencian significativamente p < 0,05 (Tukey).

4. Conclusiones y Perspectivas

El mantener la cadena de frío durante todo el periodo de transporte a temperaturas menores o iguales a 5°C es una medida de manejo adecuada para evitar, durante el periodo de transporte, la producción de estructuras reproductivas del patógeno sobre frutas con síntomas de mancha dura.

La posible dispersión de la enfermedad a través de la fruta puede ser mitigada si durante el periodo de comercialización es acompañada de compuestos fumígenos que inhiban la reproducción del patógeno como lo demostramos con el aceite esencial de *Ch. ambrosioides.*

Continuamos trabajando en conjunto con la industria nacional con el propósito de desarrollar formulaciones de uso comercial para el control, no solo de mancha negra, sino para otros patógenos de poscosecha de cítricos.

Bibliografía

Council Directive 2000/29/EC of 8 May 2000 on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community. En: http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES-EN/TXT/?uri=CELEX:02000L0029-20140630&from=ES EPPO Standards (consutado Junio 2014).

Kotzé, J.M., 1981. Epidemiology and control of Citrus Black Spot in South Africa. Plant Dis. 65, 945-950.

Kotzé, J.M., 2000. Black Spot. In: Garnsey, S.M., Graham, J.H., Timmer, L.W. (Eds), Compendium of citrus diseases. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA, pp. 23-25.

Lombardo, P., Guimaraens, A., Franco, J., Dellacassa, E., Pérez, E. 2016. Effectiveness of essential oils for postharvest control of *Phyllosticta citricarpa* (citrus black spot) on citrus fruit. Postharvest Biol. Technol., 121, 1–8.

Whiteside, J.O., 1967. Sources of inoculum of the black spot fungus, *Guignardia citricarpa,* in infected Rhodesian citrus orchards. Rhodesia, Zambia, Malawi Journal of Agricultural Research 5, 171-177.