

# Proyecto Fin de Carrera

Estrategias para combatir la podredumbre  
ocasionada por *Monilinia* spp. en post-cosecha de  
frutos de hueso

Autor:

**Miguel Broto Joven**

Director/es:

**Dª. María Eugenia Venturini Crespo**  
**D. Domingo Blanco Parmo**

Escuela Politécnica Superior de Huesca  
**Ingeniero Agrónomo**

2013



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quisiera agradecer todo esfuerzo, tiempo y dedicación de mis directores de proyecto, la Dra. Mº Eugenia Venturini Crespo y el Dr. Domingo Blanco Parmo. Muchas gracias por todo lo aprendido, por haberme iniciado en este mundo tan complejo y extenso de la microbiología y sobretodo agradecer el trato recibido durante este periodo de tiempo.

Muchas gracias a todos los profesores, compañeros y personal del departamento de Bromatología de la Facultad de Veterinaria por esta etapa tan agradable y por todos los buenos momentos vividos.

A mis padres y mi hermana por apoyarme y animarme en todos estos años junto a ellos, por toda su paciencia y esfuerzo, gracias de todo corazón. A mi familia en general por todo el interés mostrado.

A mis amigos, estén cerca o lejos, siempre están ahí. Por todos los buenos momentos vividos y por vuestro apoyo a lo largo de todos estos años.

Y por último, cómo no agradecer a María todo lo que ha tenido que aguantar, todas las charlas sobre frutos de hueso, mohos, experimentos...etc. Muchas gracias por toda tu confianza, apoyo y comprensión.

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

## ÍNDICE DE TABLAS

## ÍNDICE DE IMÁGENES

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS Y DESARROLLO EXPERIMENTAL</u></b>	<b>4</b>
<b>2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u></b>	<b>8</b>
2.1. LOS FRUTOS DE HUESO	9
2.1.1. Clasificación botánica y origen	9
2.1.2. Producción anual y superficie cultivada	11
2.1.2.1. En España	12
2.1.2.2. En Aragón	15
2.2. LA MONILIOSIS O PODREDUMBRE MARRÓN EN LOS FRUTALES DE HUESO	17
2.2.1. El género <i>Monilinia</i> . Características culturales y microscópicas	18
2.2.2. La podredumbre marrón	21
2.2.3. La moniliosis en España y en el mundo (pérdidas, distribución, especies...)	24
2.3. ESTRATEGIAS PARA REDUCIR LA INCIDENCIA POST-COSECHA DE <i>MONILINIA</i>	27
2.3.1. Estrategias pre-cosecha	27
2.3.1.1. Prácticas culturales	27
2.3.1.2. Fungicidas	27
2.3.2. Estrategias post-cosecha	32
2.3.2.1. Métodos físicos	33
2.3.2.2. Métodos químicos	35
2.3.2.3. Control biológico	40
<b>3. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	<b>46</b>
3.1. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ENZIMAS PROCEDENTES DE <i>PENICILLIUM PURPUROGENUM</i> FRENTE A <i>MONILINIA LAXA</i> Y <i>MONILINIA FRUCTICOLA</i> .	47
3.1.1. Obtención de los extractos enzimáticos	47
3.1.1.1. Microorganismos utilizados	47

3.1.1.2. Preparación de la pared celular	49
3.1.1.3. Inducción de la actividad $\beta$ -1,3-glucanasa de <i>P. purpurogenum</i>	50
3.1.1.4. Purificación de la suspensión enzimática al 95% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	51
3.1.2. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> en medio sólido	51
3.1.2.1. Método difusión en agar	52
3.1.2.2. Método del agar enriquecido con adición de soluciones enzimáticas	54
3.1.3. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> en medio líquido	56
3.1.3.1. Medio líquido enriquecido con adición de soluciones enzimáticas	56
3.1.3.1.a. Curva de crecimiento de <i>M. laxa</i> .	56
3.1.3.1.b. Determinación de la actividad antifúngica	58
3.1.4. Actividad antifúngica <i>in vivo</i> sobre melocotones y brotes de cerezo	58
3.1.4.1. Determinación de la actividad antifúngica en melocotones	59
3.1.4.2. Determinación de la actividad antifúngica en brotes de cerezo	60
3.1.5. Determinación de la actividad enzimática de las soluciones enzimáticas	61
3.1.6. Tabla resumen	63
<b>3.2. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE METABOLITOS PROCEDENTES DE FRUTOS DEL ACLAREO FRENTE A <i>M. LAXA</i> Y <i>M. FRUCTICOLA</i></b>	<b>64</b>
3.2.1. Obtención de los extractos acuosos y metanólicos	65
3.2.2. Obtención de los aceites esenciales	66
3.2.3. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> en medio sólido	70
3.2.3.1. Método de difusión en agar con extractos acuosos y metanólicos	70
3.2.3.2. Método de difusión en agar con aceites esenciales	70
3.2.3.3. Método del agar enriquecido con adición de extractos acuosos y metanólicos	71
3.2.3.4. Método del medio enriquecido con adición de aceites esenciales	72
3.2.4. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> en medio líquido	73
3.2.4.1. Medio líquido enriquecido con adición de extractos acuosos y metanólicos	73
3.2.4.2. Medio líquido enriquecido con adición de aceites esenciales	73
3.2.5. Actividad antifúngica <i>in vivo</i> en melocotones	74
3.2.6. Tablas resumen	75
<b>3.3. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE UNA CEPA BACTERIANA DE <i>PAENIBACILLUS POLYMYXA</i> AISLADA DE MIEL</b>	<b>78</b>

3.3.1. Identificación de la cepa de microbiana aislada	78
3.3.2. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> en medio sólido	80
3.3.2.1. Método de difusión en agar	80
3.3.3. Actividad antifúngica <i>in vivo</i> en melocotones	80
3.3.4. Tabla resumen	81
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>82</b>
4.1. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ENZIMAS PROCEDENTES DE <i>PENICILLIUM PURPUROGENUM</i> FRENTE A <i>MONILINIA LAXA</i> Y <i>M. FRUCTICOLA</i>	83
4.1.1. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> en medio sólido	83
4.1.1.1. Método de difusión en agar con soluciones enzimáticas	83
4.1.1.2. Método del agar enriquecido con adición de soluciones enzimáticas	84
4.1.2. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> en medio líquido	86
4.1.2.1. Medio líquido enriquecido con adición de soluciones enzimáticas	86
4.1.3. Actividad antifúngica <i>in vivo</i> sobre melocotones y brotes de cerezo	89
4.1.3.1. Determinación de la actividad antifúngica en melocotones	89
4.1.3.2. Determinación de la actividad antifúngica en brotes de cerezo	89
4.1.4. Determinación de la actividad de las soluciones enzimáticas	90
4.2. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE METABOLITOS PROCEDENTES DE FRUTOS DE ACLAREO FRENTE A <i>M. LAXA</i> Y <i>M. FRUCTICOLA</i>	93
4.2.1. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> en medio sólido	93
4.2.1.1. Método de difusión en agar con extractos acuosos y metanólicos	93
4.2.1.2. Método de difusión en agar con aceites esenciales	94
4.2.1.3. Método del agar enriquecido con adición de extractos acuosos y metanólicos	114
4.2.1.4. Método del agar enriquecido con adición de aceites esenciales	117
4.2.2. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> en medio líquido	119
4.2.2.1. Medio líquido enriquecido con adición de extractos acuosos y metanólicos	120
4.2.2.2. Medio líquido enriquecido con adición de aceites esenciales	123
4.2.3. Actividad antifúngica <i>in vivo</i> en melocotones	124
4.3. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE UNA CEPA BACTERIANA DE <i>PAENIBACILLUS POLYMYXA</i> AISLADA DE MIEL	126
4.3.1. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> en medio sólido	126

4.3.1.1. Método de difusión en agar	126
4.3.2. Actividad antifúngica <i>in vivo</i> en melocotones	127
<b>5. <u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>130</b>
<b>6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>133</b>

## INDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 2.1:</b> Evolución de la superficie cultivada de los principales frutales de hueso en España. Años 2001-2011	<b>13</b>
<b>Gráfica 2.2:</b> Evolución de la producción de los principales frutales de hueso en España. Años 2001-2011.	<b>14</b>
<b>Gráfica 2.3:</b> Evolución de las exportaciones de las principales frutas de hueso en España. Años 2000-2010.	<b>14</b>
<b>Gráfica 2.4:</b> Importaciones de las principales frutas de hueso en España. Años 2000-2010.	<b>15</b>
<b>Gráfica 2.5:</b> Porcentaje de incidencia de la podredumbre marrón tras la aplicación pre-cosecha de diferentes fungicidas (Adaskaveg et al., 2006)	<b>31</b>
<b>Gráfica 3.1:</b> Curva de crecimiento de <i>M. laxa</i> en caldo ZMCZB-E	<b>57</b>
<b>Gráfica 3.2:</b> Curva de crecimiento de <i>M. fructicola</i> en caldo ZMCZB-E	<b>57</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1:</b> Especies y nombres científico de los principales frutales de hueso	<b>10</b>
<b>Tabla 2.2:</b> Producción en toneladas de los principales frutos de hueso en Aragón.	<b>16</b>
<b>Tabla 2.3:</b> Pautas para diferenciar las distintas especies de <i>Monilinia</i> crecidas sobre medio PDA a 22º C.	<b>21</b>
<b>Tabla 2.4:</b> Fungicidas permitidos contra <i>Monilinia</i> spp. en frutales de hueso	<b>30</b>
<b>Tabla 3.1:</b> Composición por litro de MM.	<b>50</b>
<b>Tabla 3.2:</b> Tabla resumen de los ensayos realizados para determinar la actividad antifúngica de enzimas procedentes de <i>P. purpurogenum</i>	<b>63</b>
<b>Tabla 3.3:</b> Tabla resumen de los ensayos realizados para determinar la actividad antifúngica de extractos acuosos y metanólicos procedentes de frutos de aclareo.	<b>75</b>
<b>Tabla 3.4:</b> Tabla resumen de los ensayos realizados para determinar la actividad antifúngica de aceites esenciales (A.E.) procedentes de frutos de aclareo con el método de difusión en agar.	<b>76</b>
<b>Tabla 3.5:</b> Tabla resumen de los ensayos realizados para determinar la actividad antifúngica de aceites esenciales procedentes de frutos del aclareo.	<b>77</b>
<b>Tabla 3.6:</b> Tabla resumen de la actividad antifúngica de una cepa bacterinana de <i>P. polymyxa</i> frente a <i>Monilinia</i> spp.	<b>81</b>
<b>Tabla 4.1:</b> Evolución del diámetro colonial de <i>M. laxa</i> en placas con agar patata dextrosa enriquecido (PDA-E) adiconado o no (control) con diferentes soluciones enzimáticas al 2% e incubadas a 25ºC / 16 días.	<b>85</b>
<b>Tabla 4.2.:</b> Peso del micelio seco obtenido en caldo ZMCZB-E adicionado con diferentes soluciones enzimáticas al 2%, inoculados con <i>M. laxa</i> e incubado a 25º C / 10 días. *Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas ( <b>p &gt; 0,05</b> )	<b>87</b>
<b>Tabla 4.3.:</b> Peso del micelio seco obtenido en caldo ZMCZB-E adicionado con diferentes soluciones enzimáticas al 2 y 4%, inoculados con <i>M. laxa</i> e incubado a 25º C / 10 días. *Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas ( <b>p &gt; 0,05</b> )	<b>87</b>
<b>Tabla 4.4:</b> Tabla resumen de los aceites esenciales extraídos de melocotón de aclareo y su actividad antifúngica frente a <i>M. laxa</i> y/o <i>M. fructicola</i> medida según Davidson y Parish, (1989) como: (R) Resistente; (P.S.): Poco Sensible; (M.S.): Medianamente Sensible; y (S): Sensible.	<b>112</b>
<b>Tabla 4.5:</b> Tabla resumen de los aceites esenciales extraídos de nectarina, paraguayo, cereza, albaricoque y una mezcla de cereza y melocotón de aclareo y su actividad antifúngica frente a <i>M. laxa</i> y/o <i>M. fructicola</i> medida según Davidson y Parish, (1989) como: (R) Resistente; (P.S.): Poco Sensible; (M.S.): Medianamente Sensible; y (S): Sensible.	<b>113</b>
<b>Tabla 4.6:</b> Evolución del diámetro colonial de <i>M. laxa</i> sembrada en placas PDA-E de 85 mm de diámetro adicionando extractos acuosos y metanólicos procedentes de frutos de aclareo e incubados a 25º C / 16 días.	<b>115</b>
<b>Tabla 4.7:</b> Evolución del diámetro colonial de <i>M. laxa</i> y <i>M. fructicola</i> sembradas superficialmente en botón en placas de PDA-E sin adición (control) o con adición de aceites esenciales de melocotón y	<b>118</b>

cereza de aclareo al 2% e incubadas a 25° C / 15 días.

**Tabla 4.8:** Inhibición del crecimiento de *M. laxa* inoculada en medio ZMCZB-E con adición de extractos acuosos y metanólicos procedentes de diferentes frutos de aclareo al 2% y tras incubación a 25° C / 10 días 120

**Tabla 4.9:** Inhibición del crecimiento de *Monilinia* spp. incubada en medio CZB-E y con adición de aceites esenciales procedentes de frutos de aclareo al 2% y tras incubación a 25° C / 10 días 124

## ÍNDICE DE IMÁGENES

<b>Imagen 2.1:</b> Melocotonero en flor	<b>10</b>
<b>Imagen 2.2:</b> Frutos momificados (a y b), gomosis en chancros (c) y cerezas afectadas (d) por <i>Monilinia</i> spp.	<b>17</b>
<b>Imagen 2.3:</b> Macrocoinidos de <i>M. laxa</i> vistas al microscopio (1000 X)	<b>19</b>
<b>Imagen 2.4:</b> Especies de <i>Monilinia</i> crecidas sobre PDA: <i>M. laxa</i> (A), <i>M. fructicola</i> (B), <i>M. fructigena</i> (C).	<b>20</b>
<b>Imagen 2.5:</b> Brote infectado por <i>Monilinia</i> spp.	<b>22</b>
<b>Imagen 2.6:</b> Fruto momificado en el árbol (a) y nectarina afectada por <i>Monilinia</i> (b)	<b>23</b>
<b>Imagen 2.7.</b> Melocotones procedentes de un árboles no tratados con fungicidas (izquierda) y tratados (derecha)	<b>28</b>
<b>Imagen 3.3:</b> Placas de PDA inoculadas con <i>M. laxa</i> y con los discos de celulosa impregnados en las soluciones enzimáticas.	<b>54</b>
<b>Imagen 3.5:</b> Imágenes de los matraces inoculados tras la incubación: (a) Control sin tratamiento; (b) Tratamiento con 2 mL sol. enzimática de <i>M. laxa</i> ; (c) Tratamiento con 1 mL sol. enzimática de <i>M. laxa</i> .	<b>58</b>
<b>Imagen 3.6..</b> Melocotones inoculados con <i>M. laxa</i> y tratados con los extractos enzimáticos	<b>59</b>
<b>Imagen 3.7:</b> Incisión e inoculación con solución enzimática de <i>M.laxa</i> (izquierda) y brote protegido con papel aluminio tras la inoculación (derecha)	<b>60</b>
<b>Imagen 3.8:</b> Frutos de aclareo de los principales frutales de hueso	<b>64</b>
<b>Imagen 3.9:</b> Imagen completa del Sistema Soxtec HT 2, Tecator (a), aspecto de la solución al comienzo de la extracción del aceite esencial del melocotón (b) y aspecto tras 2 horas de funcionamiento (c).	<b>67</b>
<b>Imagen 3.10:</b> Siembra en botón de <i>M. laxa</i> sobre medio ZMPDA-E+Ex.	<b>72</b>
<b>Imagen 3.11:</b> Matraces con caldo ZMCZB-E inoculados con <i>M. laxa</i> e incubados a 25° C / 10 días; (a): sin adición de extractos (control); (b): con 1 mL de extracto metanólico de melocotón.	<b>73</b>
<b>Imagen 3.12:</b> Aislamiento en agar TSA de la cepa procedente de miel (a) y su aspecto vista al microscopio con aceite de inmersión (b).	<b>79</b>
<b>Imagen 3.13:</b> Aspecto de los melocotones comerciales inoculados primero con conidios de <i>M. laxa</i> y tratados después con bacterias pertenecientes a la especie <i>P. polomyxa</i> .	<b>81</b>
<b>Imagen 4.1.:</b> Crecimiento de <i>M. laxa</i> sobre agar patata dextrosa enriquecido (PDA-E) y adicionado con soluciones enzimáticas de <i>M. laxa</i> (a), <i>M. fructicola</i> (b) y Laminarina Sigma (c) tras 16 días de incubación a 25° C	<b>86</b>
<b>Imagen 4.2:</b> Crecimiento de <i>M. laxa</i> en medio líquido enriquecido (ZMCZB-E) adicionado con: soluciones enzimáticas de Laminarina (Sigma-Aldrich) al 4% (1A) y al 2% (1B) (a); solución enzimática de <i>M. laxa</i> al 4% (b) y al 2% (c); y ZMCZB-E (Control) (d) incubado a 25° C / 10 días	<b>88</b>
<b>Imagen 4.3.:</b> Aspecto de melocotones comerciales inoculados con una suspensión esporal de <i>M. laxa</i> . (a): Control; (b): tratados con solución enzimática de Laminarina; (c): tratados con solución	<b>89</b>

enzimática de *M. laxa*. Incubación a 25° C / 3 días.

**Imagen 4.4.** Detalle de la incisión realizada (izquierda) en un brote de cerezo en la que se inoculó una suspensión esporal de *M. laxa* y de otro brote protegido con papel de aluminio tras la inoculación (derecha).

90

**Imagen 4.5:** Placas de PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* (a) y *M. fructicola* (b) e incubadas 8 días /25° C / aerobiosis; los discos de celulosa fueron impregnados con aceite esencial de melocotón de aclareo.

95

**Imagen 4.6:** Placas de PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 10 días / aerobiosis. Arriba: Aspecto del halo de inhibición producido por el aceite esencial de melocotón frente a *M. laxa* para las dos réplicas. Abajo: Detalle de cada réplica por separado. Los discos de celulosa fueron impregnados con aceite esencial de melocotón de aclareo.

96

**Imagen 4.7:** Placas de PDA inoculadas superficialmente con *P. expanum* (izda.) y *R. stolonifer* (dcha.) e incubadas a 25° C / 5 días / aerobiosis. Los discos de celulosa fueron impregnados con aceite esencial de melocotón de aclareo.

97

**Imagen 4.8:** Placas de PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 10 días / aerobiosis. (a): Reverso de ambas réplicas y (b): anverso. (c): Detalle de halo de inhibición. Los discos de celulosa fueron impregnados con aceite esencial de melocotón de aclareo.

98

**Imagen 4.9:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 10 días / aerobiosis. (a): Reverso de ambas réplicas y (b): anverso; (c): detalle halo inhibición réplica 1 y (d): réplica 2. Los discos de celulosa fueron impregnados con 20 µL de aceite esencial de melocotón de aclareo.

99

**Imagen 4.10:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 10 días / aerobiosis. (a): Reverso de ambas réplicas y (b): anverso; (c): detalle halo inhibición réplica 1 y (d): réplica 2. Los discos de celulosa fueron impregnados con 25 µL de aceite esencial de melocotón de aclareo.

100

**Imagen 4.11:** Placas de PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubados a 25° C / 7 días / aerobiosis. Los discos fueron impregnados con aceite esencial de melocotón de aclareo concentrado al 25% (a), 50% (b) y 75% (c).

101

**Imagen 4.12:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 9 días / aerobiosis. Los discos fueron impregnados con aceite esencial de paraguayo de aclareo concentrado al 25% (a) y al 50% (b).

103

**Imagen 4.13:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 7 días / aerobiosis. Los discos fueron impregnados con aceite esencial de cereza de aclareo concentrado al 25% (a); al 50% (b); y al 75% (c).

104

**Imagen 4.14:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. fructicola* e incubadas a 25° C / 7 días / aerobiosis. Los discos fueron impregnados con aceite esencial de cereza de aclareo concentrado al 25% (a); al 50% (b); y al 75% (c).

105

**Imagen 4.15:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 7 días / aerobiosis. Los discos fueron impregnados con aceite esencial de albaricoque de aclareo concentrado al 25% (a); al 50% (b); y al 75% (c).

106

**Imagen 4.16:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. fructicola* e incubadas a 25° C / 7 días / aerobiosis. Los discos fueron impregnados con aceite esencial de albaricoque de aclareo concentrado al 25% (a); al 50% (b); y al 75% (c).

107

**Imagen 4.17:** Placas de PDA inoculadas superficialmente con *M. fructicola* e incubadas a 25° C / aerobiosis / 4 días (a) y 7 días (b). Discos impregnados con aceite esencial de albaricoque de aclareo

108

al 50%.

**Imagen 4.18:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 7 días / aerobiosis. Los discos fueron impregnados con aceite esencial de cereza-melocotón de aclareo concentrado al 25% (a); al 50% (b); y al 75% (c). 110

**Imagen 4.19:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. fructicola* e incubadas a 25° C / 7 días / aerobiosis. Los discos fueron impregnados con aceite esencial de cereza-melocotón de aclareo concentrado al 25% (a); al 50% (b); y al 75% (c). 111

**Imagen 4.20:** Detalle de los halos de inhibición del A.E.Cereza-Melocotón al 25% (a) y al 50% (b) frente a *M. fructicola* 111

**Imagen 4.21:** Placas de PDA-E adicionadas de extracto metanólico de paraguayo (a), de metanol (b), y sin extracto ni metanol, inoculadas superficialmente en botón con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 16 días / aerobiosis 116

**Imagen 4.22:** Placas de PDA-E sin adición (a, control) o con adición de aceites esenciales de melocotón (b) y cereza (c) al 2% e inoculadas superficialmente en botón con *M. fructicola* e incubadas a 25° C / 13 días / aerobiosis. 119

**Imagen 4.23:** Aspecto de matraces con caldo ZMCZB-E inoculados con *M. laxa* y adicionados de distintos extractos de frutos de aclareo e incubados a 25° C / 10 días. (a): ausencia de micelio; (b): ligera presencia de micelio; (c): notable presencia de micelio. 122

**Imagen 4.24:** Papel de filtro tras haber sido desecado en estufa a 80° C durante 48 horas. (a) Presencia notable de micelio fúngico; (b) ausencia de micelio fúngico seco sobre papel de filtro. 123

**Imagen 4.25:** Aspecto de los melocotones inoculados con *Monilinia* spp. (a) y con *Monilinia* spp. + aceite esencial de melocotón (b) e incubados a 25° C / 4 días. 125

**Imagen 4.26:** Placas de PDA sembradas superficialmente con *M. laxa* y en línea con *P. polymyxa* e incubadas a 30° C / 10 días / aerobiosis. 126

**Imagen 4.27:** Inhibición del crecimiento de *M. fructicola* con la cepa de *P. polymyxa* en agar PDA incubadas a 25° C / (a): tras 3 días; (b): tras 11 días. 127

**Imagen 4.28:** Aspecto de los melocotones inoculados con *Monilinia* spp. (a) y con *Monilinia* spp. + *P. polymyxa* (b) e incubados a 25° C / 4 días. 128

**Imagen 4.29:** Detalle de incisiones inoculadas con *M. laxa* + *P. polymyxa* e incubadas a 25° C / 4 días. 128

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> Mapa de distribución de la especie <i>M. laxa</i> .	<b>24</b>
<b>Figura 2.2:</b> Mapa de distribución de <i>M. fructicola</i> .	<b>25</b>
<b>Figura 2.3:</b> Mapa de distribución de <i>M. fructigena</i>	<b>26</b>
<b>Figura 3.1:</b> Tipos de inhibición que se pueden detectar con el método de difusión en agar	<b>52</b>
<b>Figura 3.2:</b> Desarrollo esquemático del método de difusión en agar.	<b>53</b>
<b>Figura 3.3:</b> Desarrollo esquemático del método del agar enriquecido con adición de extractos	<b>55</b>
<b>Figura 3.4:</b> Curva estándar de la malta $\beta$ -glucanasa en Azo barley glucan a pH 4,6 y 30°C durante 10 min, utilizando 3 ml de solución precipitante A	<b>62</b>

## RESUMEN

La podredumbre marrón ocasionada por las distintas especies del moho *Monilinia* (*M. laxa*, *M. fructicola* y *M. fructigena*) causa graves pérdidas durante la conservación post-cosecha en frutas de hueso. La imposibilidad del empleo de fungicidas en la post-cosecha, abre las puertas a nuevos métodos de control, entre los que destaca el biológico o biocontrol.

En este proyecto se ha evaluado la actividad antifúngica de enzimas excretadas por *Penicillium purpurogenum*, como las chitinasas y las  $\beta$ -1,3-glucanasas, que producen la lisis del micelio de *Monilinia* (Melgarejo y Larena 1993; 1996). También se ha determinado el potencial antifúngico de extractos acuosos y metanólicos y de aceites esenciales, procedentes de frutos del aclareo; estos frutos de aclareo han demostrado tener un alto contenido en compuestos fenólicos (Redondo et al., 2012) por lo que podrían tener una actividad antimicrobiana notable. Además, también se ha estudiado la capacidad fungicida frente a *Monilinia* de una cepa bacteriana (*Paenibacillus polymyxa*) aislada en un análisis microbiológico rutinario de distintas muestras de miel, puesto que se observó cómo algunas colonias produjeron inhibición del crecimiento de los mohos presentes en dicho alimento.

El trabajo se ha dividido en dos partes bien diferenciadas: estudios *in vitro* para determinar la actividad antifúngica de las distintas sustancias y extractos en medios de cultivo laboratoriales y estudio *in vivo* donde esta actividad es evaluada sobre frutos de hueso.

No se detectaron actividades antifúngicas significativas ni con los extractos acuosos y metanólicos, ni con los enzimas obtenidos de *P. purpurogenum*. Sin embargo, los resultados *in vitro* han demostrado cierta inhibición del crecimiento de *M. laxa* y *M. fructicola* con algunos aceites esenciales procedentes de frutos de aclareo. En el método de difusión en agar, los halos de inhibición obtenidos fueron de 12-17 mm para el aceite esencial de melocotón, 13-35 mm para el de albaricoque y 12-21 mm para el de cereza. El aceite esencial de melocotón fue el que mayor reducción del crecimiento obtuvo con porcentajes de inhibición del 55-62% en medio sólido y del 23,5-46,5% en medio líquido. Sin embargo, estos resultados obtenidos *in vitro* no se confirmaron en los ensayos *in vivo*, donde no se consiguió reducir el desarrollo de la podredumbre.

Por otra parte, la elevada actividad antifúngica mostrada por *P. polymyxa* frente a *M. laxa* en el método de difusión en agar con halos de inhibición de 40 mm, no se vio confirmada por los ensayos *in vivo* realizados sobre melocotones comerciales, donde sólo se apreció un ligero retraso en el crecimiento fúngico en el 25% de las incisiones practicadas.

## ABSTRACT

Brown rot caused by species of *Monilinia* genus (*M. laxa*, *M. fructicola* and *M. fructigena*), produces serious losses during the postharvest conservation of stone fruits. The use of pesticides in the post-harvest phase are not allowed, so new control methods have to be developed. Among them, the biological control appears promising.

In this study we have evaluated the antifungal activity of the lytic enzymes, such as chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase, produced by *Penicillium purpurogenum*, that degrade the fungal cell wall components (Melgarejo and Larena, 1993; 1996). This activity has also been determined in aqueous and metanolic extracts and essential oils obtained from fruit thinning, which have demonstrated to have a high level of phenolic compounds (Redondo et al., 2012) and therefore may have a notable antimicrobial effect. Also, the antifungal activity of a bacterial strain (*Paenibacillus polymyxa*), isolated from a routine microbiological analysis of different samples of honey, has been studied as it was observed that their colonies inhibited the growth of the molds present in that food.

This work has been divided in two different parts: *in vitro* trials to determine the antifungal activity of the different extracts or substances in laboratory culture media; and *in vivo* trials where that activity was evaluated on stone fruits.

It was not detected any antifungal activity neither with aqueous and metanolic extracts, nor lytic enzymes. However, *in vitro* trials using some essential oils have demonstrated an inhibitory effect of the growth of *M. laxa* and *M. fructicola*.

In the agar diffusion method we have obtained the following inhibition halo diameters: 12-17 mm with peach essential oil, 13-35 with apricot essential oil, and 12-21 with cherry essential oil. The peach essential oil obtained the highest antifungal activity, with percentages of inhibition between 55 and 62% on solid medium, and

between 23,5 to 46,5% on liquid medium. Unfortunately, *in vivo* trials did not confirm these results, as no inhibition of brown rot was detected.

The bacterial strain *P. polymyxa* showed a high antifungal activity against *M. laxa* in the agar diffusion method with an inhibition halo diameter of 40 mm but, this effect was not confirmed in *in vivo* trials where it was observed a soft delay on the fungal growth on the 25% of inoculations practiced in commercial peaches, but no sign of inhibition for brown rot was appreciated.

## **1. INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS Y DESARROLLO EXPERIMENTAL**

## 1. INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS Y DESARROLLO EXPERIMENTAL

La podredumbre marrón ocasionada por distintas especies del moho *Monilinia* (*M. laxa*, *M. fructigena* y *M. fructicola*), ocasiona enormes pérdidas durante la conservación post-cosecha de frutos de hueso, especialmente en melocotón, albaricoque y nectarina. En España la principal especie responsable de la aparición de podredumbres es *M. laxa*, mientras que en otros territorios, Estados Unidos, Sudáfrica y Nueva Zelanda, la especie predominante es *M. fructicola*. Sin embargo, en los últimos años se ha detectado la presencia de esta última especie en el Valle del Ebro.

Los daños que este moho produce en flores, brotes y tejidos leñosos son poco importantes aunque pueden conllevar un debilitamiento del árbol que conduce a una menor producción y en ocasiones hasta la muerte del mismo. Este moho coloniza los frutos desde el envero y conforme el fruto madura va aumentando su susceptibilidad a la infección. Por tanto, la aparición de la podredumbre es máxima durante el periodo de conservación y comercialización, cuando se dan las condiciones ambientales óptimas de temperatura y humedad relativa para el desarrollo fúngico. Este hecho unido a la imposibilidad de aplicación de sustancias fungicidas en la post-cosecha de frutos de hueso hace necesaria la búsqueda de métodos alternativos de control. Entre ellos han sido ampliamente investigados los tratamientos con agua caliente solos o combinados con bicarbonato (Casals et al., 2010; Spadoni et al., 2013) y más recientemente con radiofrecuencias (Casals et al., 2010; Sisquella et al., 2014), diversos aceites esenciales obtenidos de plantas (Lazar-Baker et al., 2011; Hassani et al., 2012), bacterias antagonistas como *Bacillus subtilis* (Casals et al., 2010; Yáñez-Mendizábal et al., 2012), *Pantoea agglomerans* y *Citrobacter freundii* (Janisiewicz et al., 2013), o levaduras como *Aureobasidium pullulans* (Mari et al., 2012; Holb y Kunz, 2013). Todas estas estrategias están en sintonía con la tendencia actual en el sector hortofrutícola de sustitución de los pesticidas de síntesis por tratamientos naturales y que no dejen residuos en el producto.

En este proyecto, y siguiendo estas líneas de investigación, se ha estudiado la actividad antifúngica frente a *M. laxa* y *M. fructicola* de:

1º- Enzimas exocelulares generados por el metabolismo de *Penicillium purpurogenum*

2º- Extractos acuosos y metanólicos y aceites esenciales obtenidos de frutos de aclareo

3º- La bacteria esporulada *Paenibacillus polymyxa*

Tras realizar una extensa revisión bibliográfica con el objetivo de encontrar microorganismos cuya actividad frente a *Monilinia* estuviese científicamente probada, seleccionamos el moho *Penicillium purpurogenum*, en concreto la cepa ATCC 66107. Esta cepa fue aislada por Paloma Melgarejo e Inmaculada Larena, dos investigadoras del Departamento de Protección Vegetal del CIT-INIA, las cuales demostraron que sus extractos exo-celulares tenían actividad frente a *M. laxa*. Sus estudios confirmaron que esta actividad se debía en gran parte a las chitinasas y β-1,3-glucanasas excretadas y que producían la destrucción de la pared celular de las células hifales de *Monilinia*.

La utilización de extractos naturales aislados de diversas plantas como antimicrobianos también ha sido objeto de múltiples investigaciones en los últimos años. En este proyecto se han empleado extractos acuosos y metanólicos y aceites esenciales obtenidos de frutos del aclareo. Partiendo de la premisa de que el contenido fenólico en algunas frutas es mayor cuanto menor índice de madurez presentan (Celli et al., 2011) es de suponer que a partir de los frutos procedentes del aclareo, en los que el desarrollo madurativo está muy poco avanzado, se podrían llegar a obtener extractos con altos niveles de compuestos fenólicos. Este hecho ha sido confirmado recientemente en diversos estudios (Redondo et al., 2012 a, b) realizados en el grupo de investigación “Alimentos de origen Vegetal” de la Universidad de Zaragoza. Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividades (Martínez-Valverde et al., 2000). A los compuestos fenólicos se les relaciona con numerosos beneficios para la salud, debido sobre todo a que pueden actuar como antioxidantes, pero también está demostrada su actividad antimicrobiana (Mason y Wasserman, 1987; Scalbert, 1991).

Por último, se ha testado la actividad antifúngica de una cepa bacteriana aislada en unos análisis rutinarios de miel. Las colonias de esta cepa daban lugar a fuertes halos de inhibición del crecimiento de las colonias de mohos presentes en dicha matriz alimentaria. Este microorganismo fue identificado como *Paenibacillus polymyxa*,

especie, muy cercana filogenéticamente a *Bacillus subtilis*, uno de los microrganismos cuya actividad antibacteriana y antifúngica está más estudiada y del que ya se disponen productos antimicrobianos comerciales como Serenade Max®. Actualmente, en la Universidad de Lleida están trabajando con la cepa CPA-8 de *Bacillus subtilis*, cuya actividad frente a *Monilinia* ya está demostrada (Yanez-Mendizábal et al. 2011)

La búsqueda de una sustancia o estrategia eficaz frente a un moho implica una serie de estudios de laboratorio, estudios *in vitro* y estudios sobre el propio fruto, *in vivo*. Para establecer la eficacia antimicrobiana *in vitro* se seleccionaron las dos especies de *Monilinia* presentes en nuestro país, *M. laxa* y *M. fructicola*, aunque en algunos de los ensayos realizados también se han incluido otros mohos causantes de alteración en frutas como *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer* y *Alternaria alternata*. Los métodos *in vitro* incluyeron, por este orden, el método de difusión en agar, la inhibición del crecimiento radial en medio sólido suplementado con las sustancias a ensayar o inoculado con la cepa de *P. polymyxa* y estudios de inhibición en medio líquido. Una vez realizada esta primera fase las sustancias con mayor actividad fueron testadas *in vivo* mediante inoculaciones experimentales en melocotones comerciales.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **2.1. LOS FRUTOS DE HUESO**

### **2.1.1. Clasificación botánica y origen.**

En España como bien sabemos, predomina el clima mediterráneo en gran parte de su territorio, con inviernos suaves y veranos calurosos. Estas condiciones climáticas permiten una agricultura a gran escala. Los principales cultivos en nuestro país son el olivo, cebada, trigo, remolacha azucarera, maíz, patatas, centeno, avena, arroz, tomates y cebollas (MAGRAMA 2012). Los frutales en España también tienen una elevada importancia, además de para el autoconsumo, para el comercio exterior, porque gran parte de la producción es exportada.

Las llamadas frutas de hueso son aquellas que contienen en su interior un hueso, como pueden ser el melocotón, la nectarina, el albaricoque, la cereza, la ciruela o el paraguayo. Los frutales donde se desarrollan, se cultivan en climas moderados y la maduración se produce en verano y en otoño.

Prácticamente, todos los frutales de hueso tienen la misma clasificación botánica, diferenciándose a nivel de especie:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Rosales*

Familia: *Rosaceae*

Subfamilia: *Amygdaloideae*

Tribu: *Amygdaleae*

Género: *Prunus*

Especie:

La tabla 2.1 muestra las especies de los principales frutales de hueso y su nombre binomial:

FRUTAL	NOMBRE CIENTÍFICO
Melocotonero	<i>Prunus persica (L.) Batsch</i>
Nectarino	<i>Prunus persica var. nectarina (L.)</i>
Albaricoquero	<i>Prunus armeniaca (L.)</i>
Cerezo	<i>Prunus avium (L.)</i>
Ciruelo	<i>Prunus domestica (L.)</i>

**Tabla 2.1:** Especies y nombres científico de los principales frutales de hueso

En cuanto al origen de los frutales, todos provienen del continente asiático. El melocotonero (Imagen 2.1) y nectarino son originarios de China, de donde pasaron a Persia, de aquí a Grecia y después a toda Europa durante la Edad Media por medio de los griegos y los romanos. (Fálder Rivero, 2003).

El albaricoquero parece ser originario del Turkestán chino. Su cultivo comenzó en China, desde donde



se expandió a Asia central, Irán, Asia menor, Armenia y Siria (Crossa-Raynaud y Audergon, 1987). A Europa llegó en el siglo I a.C., procedente de Armenia a través de Grecia e Italia (Rodrigo y Herrero, 2000). El cerezo y ciruelo sin embargo, son originarios de Persia, de donde llegaron a Grecia y se extendieron por toda Europa. (Fálder Rivero, 2003).

**Imagen 2.1:** Melocotonero en flor

Todas las drupas producidas por los frutales mencionados, están caracterizados por tener un hueso en su interior. Las diferencias visuales entre unas y otras están en la forma, color y aspecto de la piel. Los melocotones y las nectarinas proceden de la misma especie, siendo estas últimas, una mutación natural caracterizada por la ausencia de tomentosidad en la piel del fruto. Los albaricoques son similares a los melocotones, pero de tamaño más pequeño y de color amarillo o pálido anaranjado. Las ciruelas son

redondeadas u ovales y presentan colores amarillos, rojos o violáceos. Las cerezas son las más pequeñas y son drupas de color rojo negruzco y presentan formas redondeadas o acorazonadas.

### **2.1.2. Producción anual y superficie cultivada.**

Los principales frutos de hueso cultivados en nuestro país son el melocotón, la nectarina, el albaricoque, la cereza y el ciruelo. A continuación se detallan datos, para cada uno de ellos, en cuanto a extensión y producción mundial y el lugar que ocupa en España (FAO, 2011).

#### Melocotonero y nectarino

En cuanto al área de melocotoneros y nectarinos cultivados en 2011, hay una extensión mundial de 1.570.562 ha. donde cabe destacar China con 767.346 ha. seguido de Italia (88.580 ha.) y España (81.500 ha.). La producción mundial en 2011 fue de 21.528.690 t., donde China acapara el 53% con 11.528.801 t., seguido de Italia (1.636.750 t.) y España (1.335.600 t.).

#### Albaricoquero

La superficie mundial cultivada de albaricoqueros en 2011 es de 485.747 ha., de las cuales 59.696 ha. pertenecen a Turquía, seguida por Irán (50.177 ha.) y Uzbekistán (36.500 ha.). España se sitúa en 8º lugar con una extensión de 18.727 ha.

En cuanto a producción, son los tres mismos países los que están al frente al igual que en la extensión. Con una producción mundial total de 3.834.475 t., destaca Turquía con 676.138 t, seguido de Irán y Uzbekistán, con producciones de 452.988 t. y 356.000 t., respectivamente. España ocupa el puesto 13º con una producción de 86.889 t.

#### Cerezo

La superficie mundial cultivada de cerezos en 2011 es de 380.674 ha., de las cuales 45.246 pertenecen a Turquía, 34.326 pertenecen a EEUU y 30.207 se encuentran en Italia. España ocupa el 5º lugar con una extensión de cerezos de 24.933 ha.

En cuanto a la producción, es similar a la extensión en cuanto a países destacados, con la única diferencia que Irán, ocupa el 3º lugar en detrimento de Italia. La producción mundial es de 2.240.491 t. Turquía es el principal productor con 438.550 t, seguido por EEUU (303.363 t..) e Irán (241.117 t..). España ocupa el 5º lugar con una producción de 101.729 t..

### Ciruelo

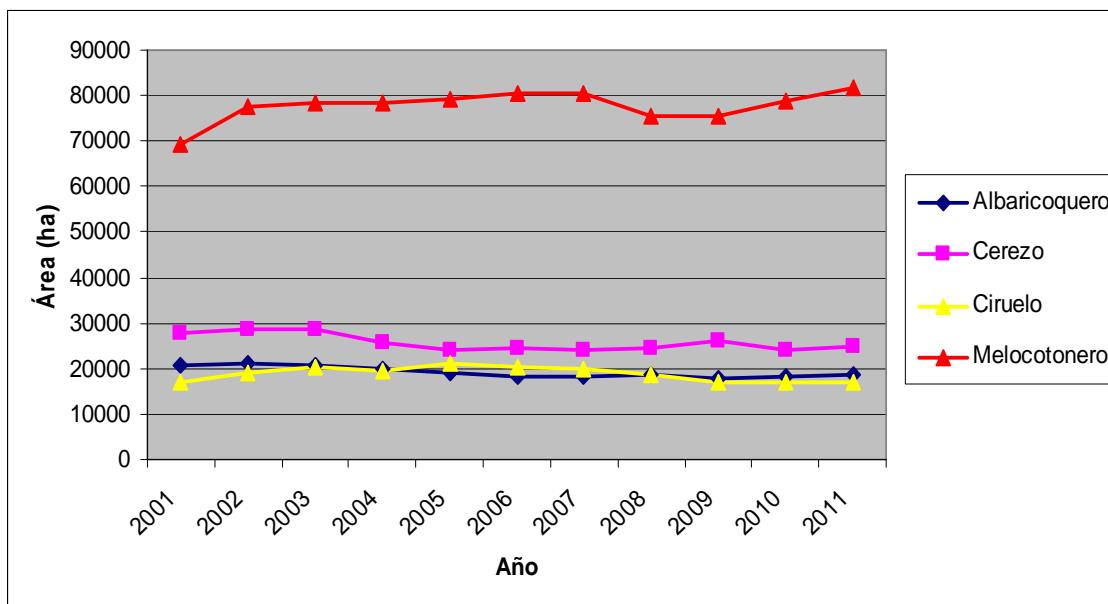
En cuanto al ciruelo, la superficie mundial ocupada para este frutal en el año 2011 asciende a 2.495.351 ha. La mayor concentración de este cultivo se encuentra en China, Serbia y Bosnia con unas extensiones de 1.702.850 ha, 168.000 ha y 78.176 ha., respectivamente. España ocupa el 15º lugar con 17.108 ha. cultivadas.

Respecto a la producción en 2011, de un total de 11.359.707 t producidas a nivel mundial, nuevamente China es el principal productor con 5.873.656 t, seguido de Serbia (581.874 t) y Rumania (573.596 t). España ocupa el 8º lugar con una producción de 230.656 t.

#### **2.1.2.1. En España**

En España el frutal de hueso más cultivado es el melocotonero (incluido el nectarino) con 81.500 ha. en 2011, seguido por el cerezo con 25.000 ha y por último, y muy parecidos entre sí, están el albaricoquero y el ciruelo con cerca de 20.000 ha. (FAO, 2011). (Gráfica 2.1).

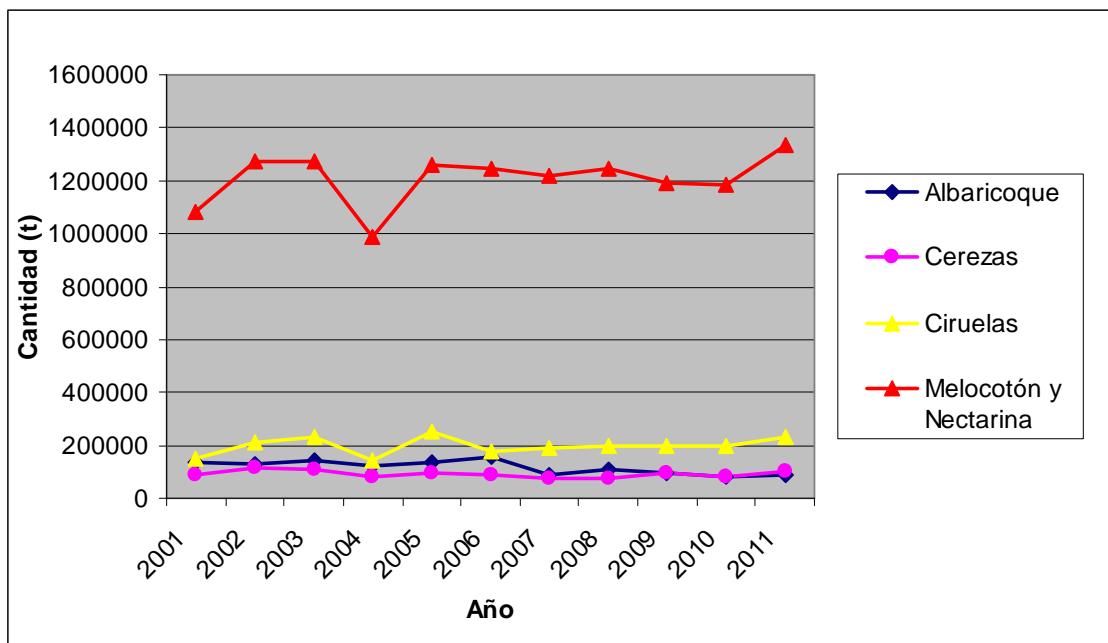
Comparándolo con otros frutales de elevada importancia en nuestro país, como es el caso del naranjo, manzano y peral, tenemos que el naranjo es el más cultivado con una superficie de 153.000 ha, seguido por el manzano (31.500 ha) y el peral (27.000 ha).



**Gráfica 2.1:** Evolución de la superficie cultivada de los principales frutales de hueso en España. Años 2001-2011.

Como podemos observar en la gráfica 2.1, la tendencia en cuanto a la superficie cultivada en los últimos 10 años no ha sufrido grandes variaciones. El cultivo de cerezo ha descendido ligeramente y sí que se ha observado un incremento en la superficie cultivada del melocotonero.

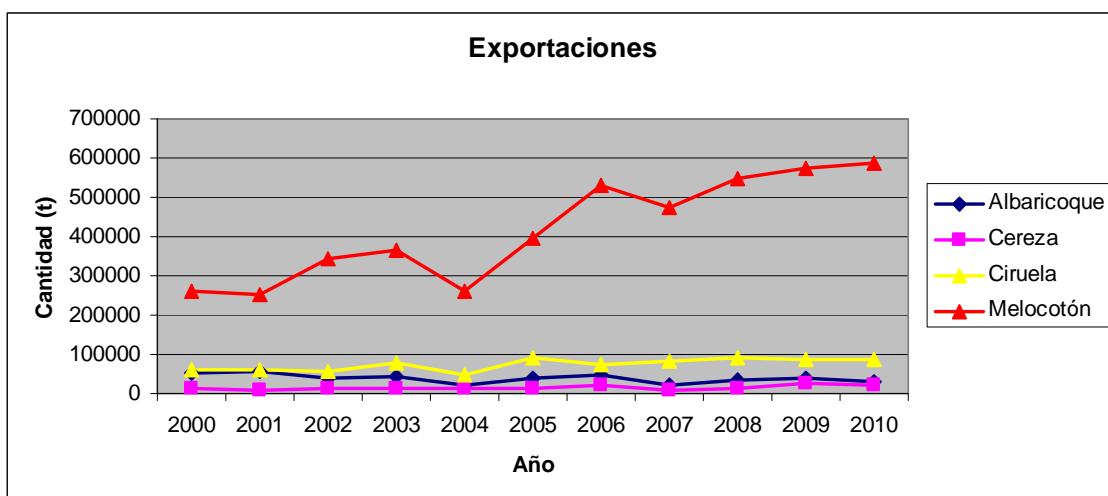
En cuanto a la producción, el melocotón y la nectarina son las frutas de hueso más producidas con 1.335.600 toneladas en el año 2011 (FAO, 2011). Las siguientes son las ciruelas con una cantidad de 230.656 t y por último están las cerezas (101.729 t) y albaricoques (86.889).



**Gráfica 2.2:** Evolución de la producción de los principales frutales de hueso en España. Años 2001-2011.

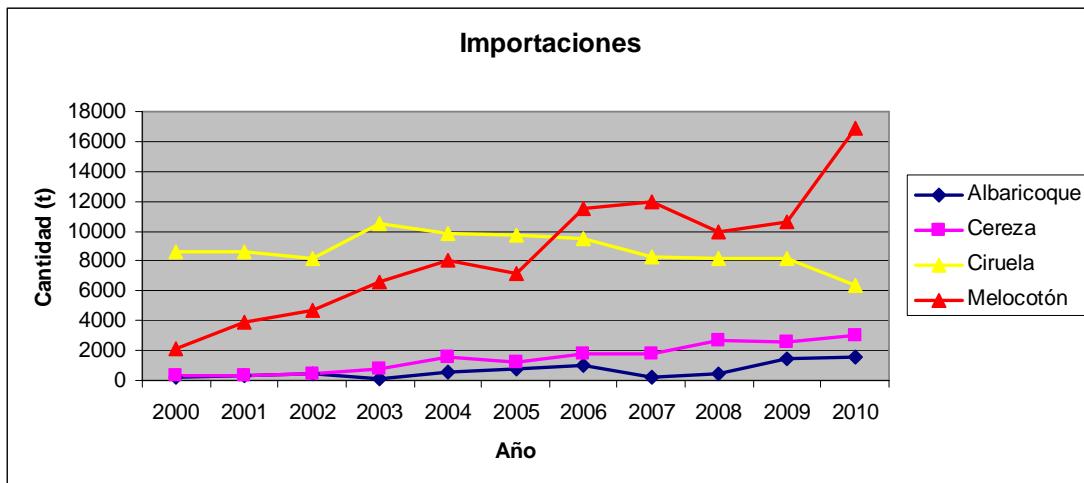
Al igual que con la superficie cultivada, observamos que la producción en los últimos 10 años se mantiene prácticamente constante para albaricoque, cereza y ciruela y sí que se ha incrementado ligeramente la producción de melocotón y nectarina, especialmente en el año 2011 (Gráfica 2.2).

En cuanto a las exportaciones de frutas de hueso de España a otros países, la fruta más exportada es el melocotón, seguido de la ciruela, el albaricoque y la cereza (Gráfica 2.3).



**Gráfica 2.3:** Evolución de las exportaciones de las principales frutas de hueso en España. Años 2000-2010.

En cuanto a las importaciones, cabe destacar la creciente importación de melocotón en los últimos 10 años, siendo ésta 10 veces mayor que en el año 2000 (Gráfica 2.4)



Gráfica 2.4: Importaciones de las principales frutas de hueso en España. Años 2000-2010.

Dentro de España, hay 6 comunidades autónomas que destacan sobre las demás en cuanto a superficie cultivada de frutales de hueso y producción: Aragón, Extremadura, Comunidad Valenciana, Cataluña, Murcia, Extremadura y Andalucía.

Cataluña, Aragón y Murcia son las mayores productoras de melocotón y nectarina con un 74% de la producción total de España. En el caso del albaricoque, las comunidades con mayor producción son Murcia, Comunidad Valenciana y Aragón. Respecto a la cereza, las más productoras son Extremadura, Aragón y Cataluña. Por último, la producción de ciruela está repartida entre las tres grandes productoras que son Extremadura, Andalucía y Murcia (MAPA 2010).

Como vemos, Aragón ocupa un buen lugar en la producción de la mayoría de los frutos de hueso.

### 2.1.2.2 En Aragón

La superficie dedicada al cultivo de los frutales de hueso en Aragón supera las 27.500 ha., de las que casi 18.000 son de melocotón y nectarina. El siguiente cultivo en importancia es el cerezo, con más de 7.000 ha, (Vida rural, 2012), seguido a mucha distancia por el albaricoquero y el ciruelo con más de 1.000 ha cada uno.

La producción de los principales frutales de hueso en el año 2011 se detalla en la tabla 2.2, junto con la producción total de España y el porcentaje que ocupa Aragón respecto al total, según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), 2011.

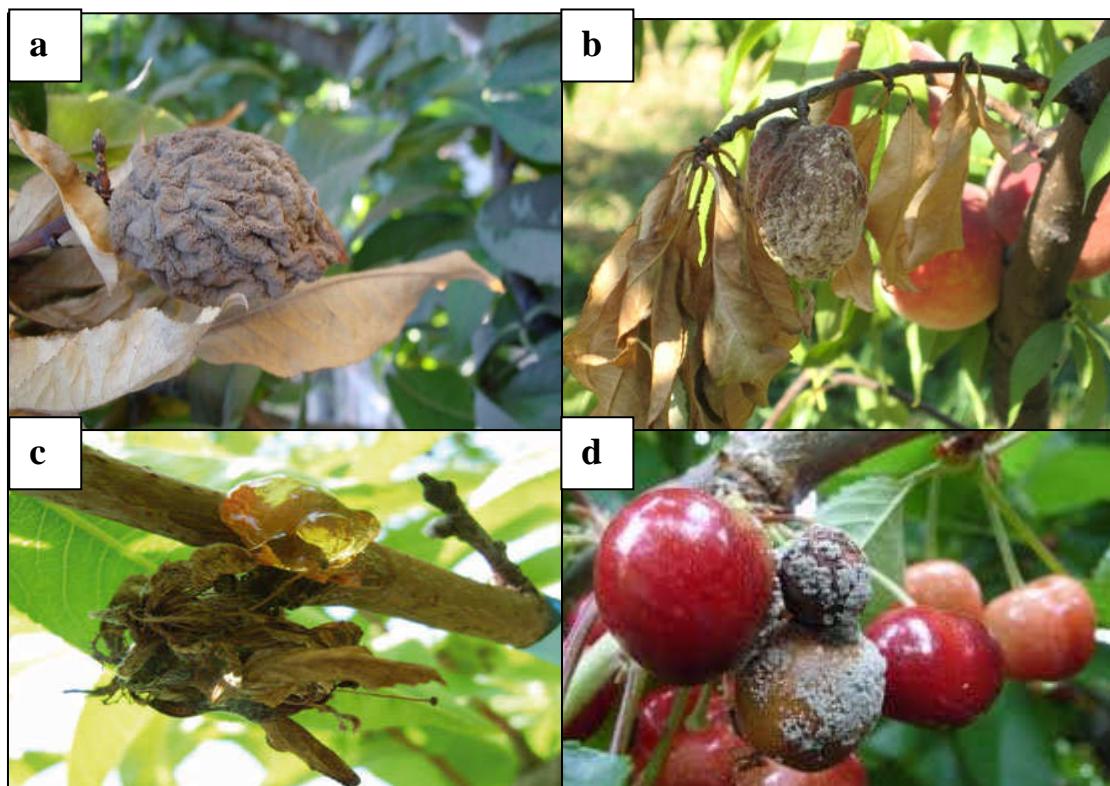
PRODUCCIÓN (t.)	Aragón	España	%
<b>Cerezo</b>	21.034	101.729	20,67
<b>Melocotón y Nectarina</b>	284.539	1.335.600	21,30
<b>Albaricoque</b>	5.522	86.889	6,35
<b>Ciruela</b>	7.518	230.656	3,26

**Tabla 2.2:** Producción en toneladas de los principales frutos de hueso en Aragón.

## 2.2. LA MONILIOSIS O PODREDUMBRE MARRÓN EN LOS FRUTALES DE HUESO

La podredumbre marrón, es una de las enfermedades más importantes que afectan a los frutales de hueso y también a otros frutales de pepita como manzano o peral. Esta podredumbre está ocasionada por distintas especies del moho *Monilinia* y se encuentra presente en todas las zonas de cultivo de los distintos frutales de hueso. En años con climatología favorable para el desarrollo del moho, éste puede afectar al 80% de los frutos (Ahmadi et al., 1999; Larena et al., 2005).

La sintomatología de esta enfermedad en el árbol frutal (Imagen 2.2), se caracteriza por la marchitez de yemas y brotes, chancros en ramas y momificado de las frutas (Heaton, 1972; Ogawa y col. 1995; De Cal y Melgarejo, 2000).



**Imagen 2.2:** Frutos momificados (a y b), gomosis en chancros (c) y cerezas afectadas (d) por *Monilinia* spp. **Fuentes:** [www.elrancaguino.cl](http://www.elrancaguino.cl), Servicio Agrícola y Ganadero y University of Delaware, College of Agriculture & Natural Resources.

### 2.2.1. El género *Monilinia*. Características culturales y microscópicas

La podredumbre y el momificado de los frutales de hueso está causada por dos especies del género *Monilinia*: *M. laxa* y *M. fructicola*. La clasificación de *Monilinia* ha variado en los últimos años en función del propio género o de las distintas clasificaciones de los hongos. Actualmente, siguiendo a Ericsson (2006), podemos clasificar taxonómicamente a estos mohos de la siguiente manera:

Dominio: *Eucariotas*

Reino: *Fungi*

Filo: *Ascomycota*

Subfilo: *Pezizomycotina*

Clase: *Leotiomycetes*

Subclase: *Leotiomycetidae*

Orden: *Helotiales*

Familia: *Sclerotiniaceae*

Género: *Monilinia*

Especie:

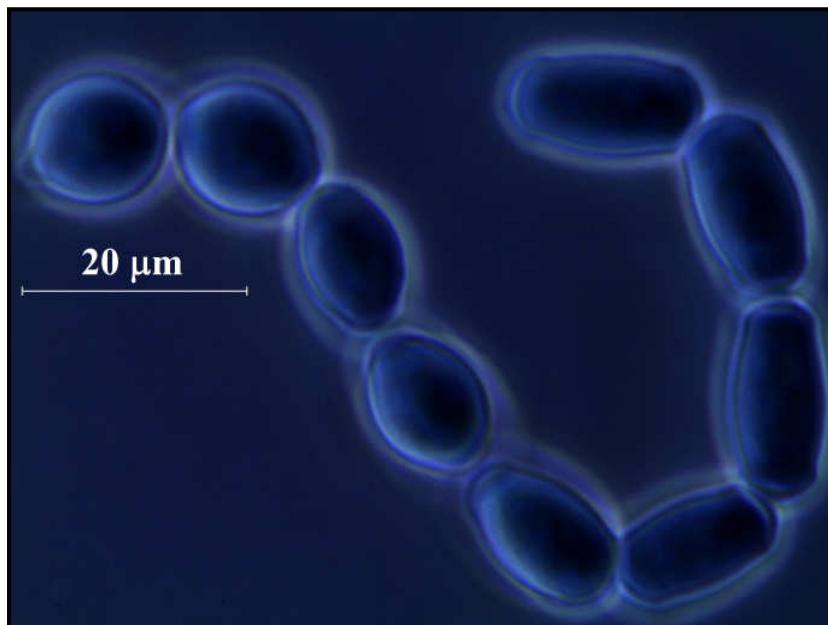
El género *Monilinia*, inicialmente se consideró como *Monilia* y estaba caracterizado por conidióforos y conidios moniliformes. Desde el momento que se conoció su fase sexual, el género pasó a denominarse *Monilinia*.

Dentro del Gº *Monilinia*, se contemplan cuatro especies: *M. laxa*, *M. fructicola*, *M. fructigena* y *M. polystroma*, siendo esta última la menos común de las cuatro.

*Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey: El estado anamorfo, o forma asexual, presenta hifas primarias con una o varias ramificaciones antes del primer septo, formadas en cadenas, con la espora más joven al final. Los conidios son elipsoidales, ovoides o alimonados y miden de 8-25 x 5-19 µm. El micelio es hialino con aspecto grisáceo en masa, con abundante esporulación de color crema.

*Monilinia laxa* (Aderhold & Ruhl.) Honey ex Whetzel (*Monilinia laxa* (Ehrenb.) Sacc.): El anamorfo, o forma asexual, presenta un micelio hialino, y al envejecer forma

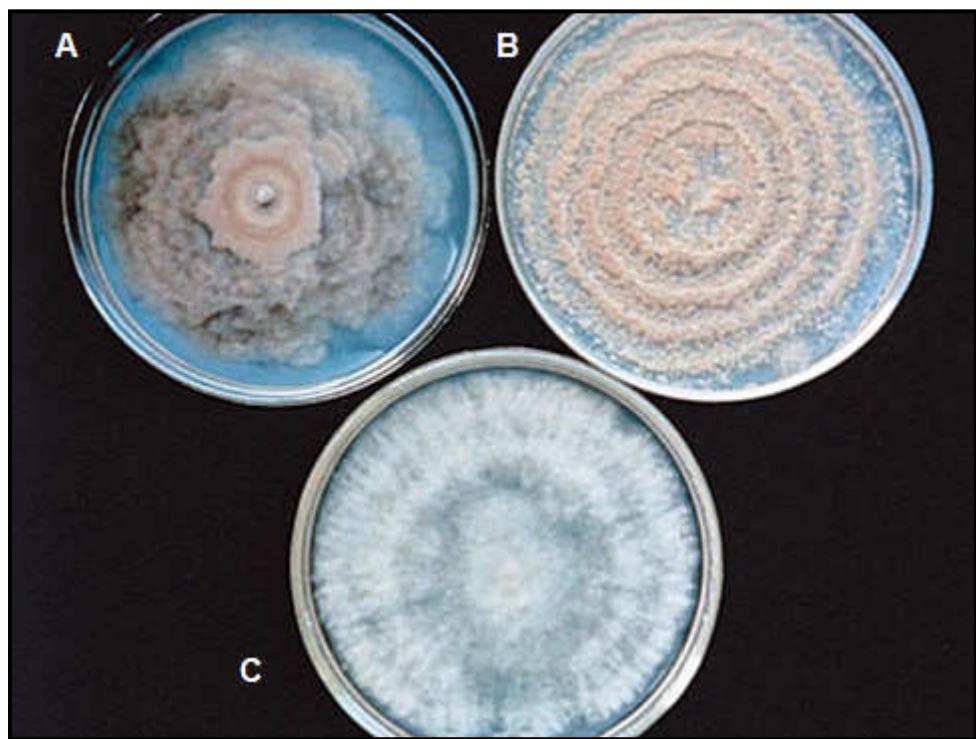
una costra estromática grisácea. Los macroconidios formadas en la reproducción asexual son elipsoidales, ovoides o alimonados. Forman cadenas cortas y miden 5-23 x 4-16  $\mu\text{m}$  (Imagen 2.3).



**Imagen 2.3:** Macrocoinidos de *M. laxa* vistas al microscopio (1000 X)

*Monilinia fructigena* (Aderhold & Ruhl.) Honey ex Whetzel (*Monilinia fructigena* Pers.): El anamorfo tiene también micelio hialino y al envejecer forma una costra oscura. Los macroconidios son también elipsoidales, ovoides o alimonados y miden de 12-34 x 6-15  $\mu\text{m}$ . Se encuentran en cadenas ramificadas, agrupadas en esporodoquios de color blanco crema a pardo.

En la imagen 2.4 se muestran las tres especies de *Monilinia* más importantes. Para facilitar su diferenciación, en la tabla 2.3 se recogen algunas características macro y microscópicas.



**Imagen 2.4:** Especies de *Monilinia* crecidas sobre PDA: *M. laxa* (A), *M. fructicola* (B), *M. fructigena* (C). **Fuente:** Pests And Diseases Image Library (PADIL)

**Tabla 2.3:** Pautas para diferenciar las distintas especies de *Monilinia* crecidas sobre medio PDA a 22° C.

**Fuente:** Pests And Diseases Image Library (PADIL)

Característica	<i>M. laxa</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>M. fructigena</i>
<b>Color de la colonia</b>	Avellana-grisáceo	Avellana-grisáceo	Blanquecino-crema
<b>Diámetro crecimiento en 24 horas</b>	2-11 mm	9-20 mm	0-12 mm
<b>Esporulación</b>	Escasa	Abundante	Escasa
<b>Anillos concéntricos de esporas</b>	No	Si	A veces
<b>Patrón de crecimiento en forma de rosetón</b>	Sí	Muy rara vez	No
<b>Dimensión de los conidios</b>	5-23 x 4-16 µm	8-25 x 5-19 µm	12-34 x 6-15 µm
<b>Ramificación del tubo germinativo</b>	Ramificación cerca de las conidias	Tubo germinativo no ramificado	Tubo germinativo largo antes de ramificar

## 2.2.2. La podredumbre marrón

Las cuatro especies de *Monilinia* pueden persistir en los frutos caídos en el suelo o en los que han sido atacados y continúan momificados en el árbol. Sus conidios son dispersados por el viento, la lluvia y/o los insectos, contaminando los frutos sanos. Este hecho hace que una vez se presenta la enfermedad en los árboles frutales, sea muy difícil de eliminar.

Como ya hemos reseñado, los frutos de hueso afectados presentan podredumbres de color gris-marrón, de forma circular, que son producidas por grupos de conidios.

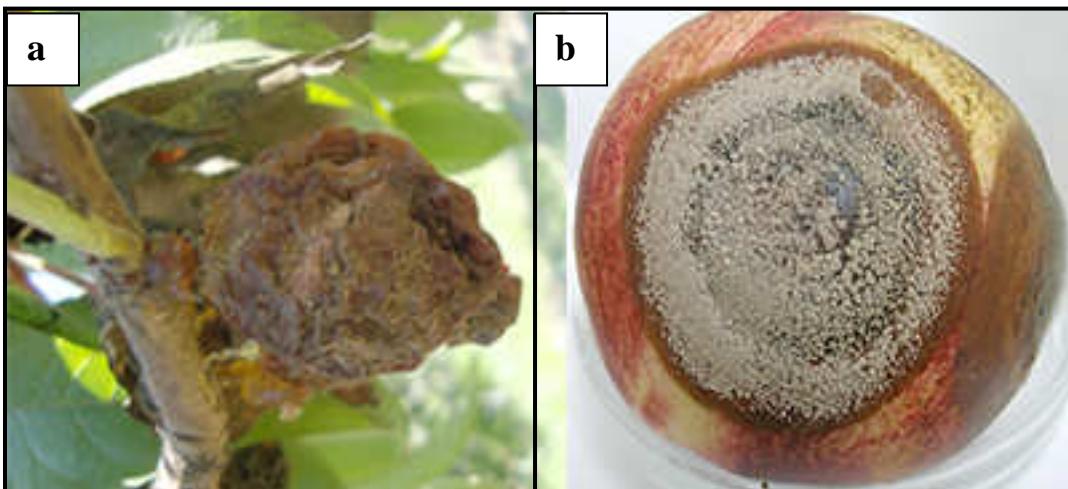
De las cuatro especies, *M. laxa* es la que más problemas suele dar en el momento de la floración. La infección se suele iniciar en este proceso de floración y se suele manifestar antes de la recolección. En el momento de la floración, los órganos florales más sensibles a la enfermedad son el estambre y el estigma. Si además se dan unas condiciones de humedad del 80% o superiores, los pétalos y sépalos son rápidamente invadidos por el hongo. Despues, el hongo penetra en las ramas más pequeñas, produciendo un chancre de forma elíptica con una masiva formación de gomosis que avanza paulatinamente. Los brotes y las yemas se infectan generalmente a partir de las flores o de otros brotes infectados (Imagen 2.5).



Imagen 2.5: Brote infectado por *Monilinia* spp.

Fuente: [www.plantwise.com](http://www.plantwise.com)

Los frutos colonizados presentan una podredumbre marrón que los invade rápidamente, apareciendo en su superficie una capa pulverulenta de tonalidad gris o beige y manteniéndose en el árbol durante todo el otoño (Imagen 2.6)



**Imagen 2.6:** Fruto momificado en el árbol (a) y nectarina afectada por *Monilinia* (b)

**Fuente:** Servicio Agrícola y Ganadero (SAG)

*M. laxa* se mantiene en invierno en forma de micelio vegetativo en los chancros y órganos momificados. Sobre estos órganos contaminados se producen en abundancia las conidias durante el invierno y las primaveras húmedas, siempre que la temperatura supere los 10° C. Se producen nuevas esporas sobre los tejidos muertos, que se extienden a otros brotes, tallos y frutos. Si la madera infectada no se poda, los chancros son una fuente de inóculo, puesto que son capaces de generar una abundante esporulación durante varios años.

El fruto puede ser contaminado en cualquier momento de su desarrollo, pero normalmente, en estados inmaduros, es más resistente a la enfermedad, por la presencia de sustancias naturales inhibidoras, que van desapareciendo con la madurez (Smith et al., 1992; Ogawa et al., 1995; De Cal y Usall, 2000). Conforme el fruto va madurando, la susceptibilidad a la infección va aumentando hasta la post-cosecha, que es cuando se dan las condiciones óptimas para el crecimiento del moho, siendo necesarias solamente de 3 a 5 horas a 20° C y humedades relativas elevadas para provocar una grave infección. Además, si hay alguna pequeña herida en la superficie del fruto, por minúscula que sea, la contaminación progresará más rápidamente. El fruto puede descomponerse completamente al cabo de unos días. Los frutos que se mantienen suspendidos en el árbol pierden humedad y se arrugan transformándose en una momia; ésta puede caer al suelo y persistir así durante dos o más años (Agrios, 1999).

### 2.2.3. La moniliosis en España y en el mundo (pérdidas, distribución, especies...)

La moniliosis es la enfermedad que produce los daños más cuantiosos en la postcosecha de los frutales de hueso cuando las condiciones climáticas le son favorables. También afecta, aunque en menor medida, a los frutales de pepita.

Las temperaturas entre 22 y 25º C son las óptimas para el desarrollo del hongo. El rango varía entre los 4 y los 30º C, lo que no significa que las infecciones a flores o frutos se inhiban con temperaturas fuera de ese rango. Por otra parte, la presencia de agua en las flores, frutos y ramas ya sea por agua de lluvia, humedad del ambiente o por el riego, favorece enormemente el desarrollo del moho. En el Valle del Ebro, por ejemplo, es muy fácil encontrar estas condiciones.

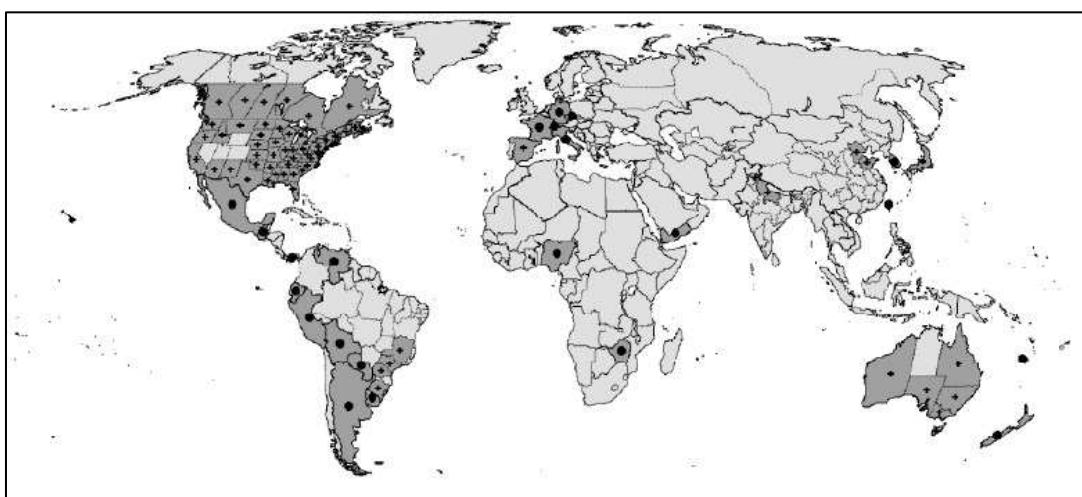
*M. laxa* (Aderhold & Ruhland) Honey y *M. fructigena* Honey son las especies de *Monilinia* que causan la podredumbre marrón en España. *M. laxa* es la especie más importante (85-90% de los aislados de podredumbre en frutos) (Sampayo y Palazón, 1977; Larena et al., 2005), mientras que el 10-15% restante lo causa *M. fructigena*. La distribución mundial de *M. laxa* se extiende por toda Europa, Marruecos, países de Oriente Próximo, La India, China, Japón, zona Norte de EEUU y algunos países de Sudamérica como Brasil, Argentina y Chile. (plantwise, 2011)

La figura 2.1, muestra un mapa de distribución de la especie *M. laxa*, aunque no resulta muy fiable puesto que no aparecen zonas donde debería indicar su presencia.



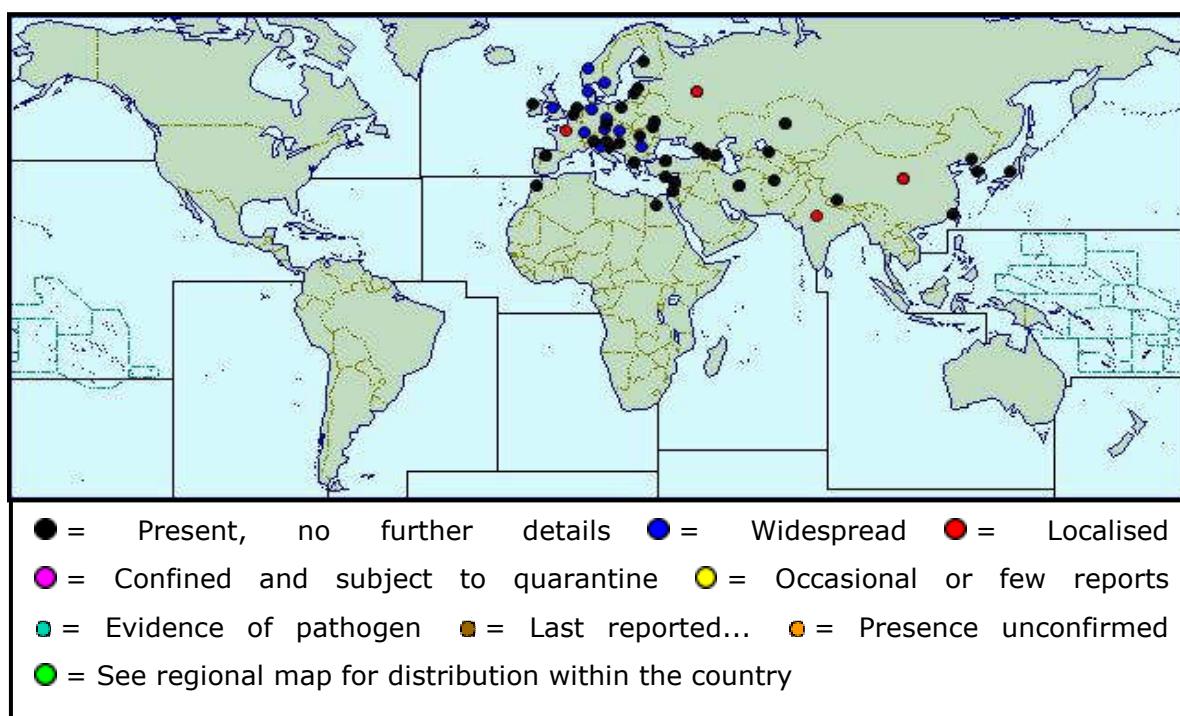
**Figura 2.1:** Mapa de distribución de la especie *M. laxa*. **Fuente:** [wwwdiscoverlife.org](http://wwwdiscoverlife.org)

*M. fructicola* se puede encontrar como especie causal predominante de la podredumbre marrón en Australia, Sudáfrica, Japón, República de Corea, India y todo el continente americano. En Europa se encuentra en la lista A2 de organismos en cuarentena. *M. fructicola* fue encontrada en Europa por primera vez en 2001, en Francia (Lichou et al., 2002), declarándose posteriormente en Austria (NPPO of Austria, 2002), República Checa (Duchoslavova et al., 2007) y en Hungría y Suiza en frutos importados desde España e Italia (Bosshard et al., 2006; Petroczy et al., 2006).



**Figura 2.2:** Mapa de distribución de *M. fructicola*. **Fuente:** CABI/EPPO, 2010.

Respecto a *M. fructigena* se ha encontrado en el sur y oeste de Europa, en los países de la antigua Unión Soviética, en países del Oriente Próximo, la India, en el Norte de África y por último también en el continente asiático. La figura 2.3 muestra su distribución.



**Figura 2.3:** Mapa de distribución de *M. fructigena*.

Fuente: [www.cabi.org](http://www.cabi.org)

## **2.3. ESTRATEGIAS PARA REDUCIR LA INCIDENCIA PRE-COSECHA Y POST-COSECHA DE MONILINIA.**

### **2.3.1. Estrategias pre-cosecha**

#### **2.3.1.1. Prácticas culturales**

Para tratar de reducir la incidencia de las podredumbres por *Monilinia* en frutales de hueso se llevan a cabo prácticas culturales, que tratan ante todo de evitar su propagación; entre ellos se encuentran la retirada de frutos podridos, la poda de madera infectada y la limpieza del suelo alrededor de los árboles y de la parcela afectada.

La enfermedad se propaga por la producción de conidias en los tejidos infectados. Además de atacar frutos, también forman chancros en los brotes o en las ramas, y si no se podan las ramas infectadas del árbol, los chancros pueden seguir desarrollándose durante años, aumentando de esta forma el tamaño de la herida y siendo un punto de entrada para otros patógenos.

Como prácticas culturales también podemos destacar el manejo cuidadoso durante la cosecha para evitar traumatismos y heridas en los frutos. Como ya hemos mencionado antes, cualquier herida en el fruto por minúscula que sea, puede facilitar enormemente el desarrollo de la enfermedad.

#### **2.3.1.2. Fungicidas**

Otra estrategia para reducir la incidencia de la podredumbre marrón es la aplicación de fungicidas. Aunque es la más efectiva (imagen 2.7), hay cada vez más rechazo por parte de los consumidores y de las normativas legales a la aplicación de estas sustancias en alimentos. Sin embargo, combatir la podredumbre marrón sin el uso de estas sustancias es prácticamente imposible, especialmente en años con pluviometrías elevadas.



**Imagen 2.7.** Melocotones procedentes de un árboles no tratados con fungicidas (izquierda) y tratados (derecha) (Cortesía de D.F. Ritchie).

Según la Dirección General de Tecnología Agraria (2006), en otoño, coincidiendo con la caída de las hojas, y en semanas previas a la floración, se deben efectuar pulverizaciones con compuestos cúpricos, ya que es una buena medida, capaz de reducir la carga fúngica de la parcela. En primavera, también se debe efectuar un tratamiento preventivo poco antes de la apertura de la primera flor; si la floración coincide con lluvias frecuentes debe hacerse una nueva aplicación cuando empiecen a caer los pétalos. De igual modo, en las cuatro semanas anteriores a la recolección deben efectuarse aplicaciones con fungicidas solo si se producen lluvias. Es fundamental que estas intervenciones se realicen lo antes posible, en cuanto las condiciones climatológicas lo permitan. Parece fuera de toda duda que, si en los momentos de mayor sensibilidad, las condiciones climáticas favorecen el desarrollo de la enfermedad, los tratamientos fitosanitarios atenuarán los daños, pero no los anularán.

Según el Centro de Protección Vegetal de Aragón (2012), en melocotonero, nectarina y albaricoquero, las pérdidas en la floración también llegan a ser importantes si las lluvias acompañan a este estado fenológico. En los últimos años se ha detectado la presencia de *M. fructicola* en algunos municipios del valle del Cinca y del Bajo Aragón. Los tratamientos se centran en las semanas previas a la recolección, y si es preciso, durante la floración.

Un problema importante en el control químico de *Monilinia* es la aparición de resistencias a los fungicidas penetrantes y sistémicos. Para evitarlo es necesario no utilizar de forma consecutiva fungicidas del mismo modo de acción, seleccionando materias activas de diferente grupo. Otra opción es intercalar un fungicida de contacto entre dos penetrantes o sistémicos, ya que *Monilinia* no es capaz de generar resistencias a fungicidas de contacto.

Entendemos como fungicida de contacto aquél que actúa solamente en la superficie de la planta evitando que las esporas germinen y penetren en las células. Es un fungicida protector y preventivo y debe aplicarse antes de que lleguen las esporas.

Los fungicidas sistémicos y penetrantes son, a diferencia de los de contacto, aquellos que acceden al interior de la planta. Ambos se aplican para el tratamiento de la planta ya enferma, y son absorbidos a través del follaje o de las raíces. La diferencia entre unos y otros es su capacidad de moverse en el interior de la planta. Los penetrantes tienen muy poca movilidad, mientras que los sistémicos se mueven por toda la planta.

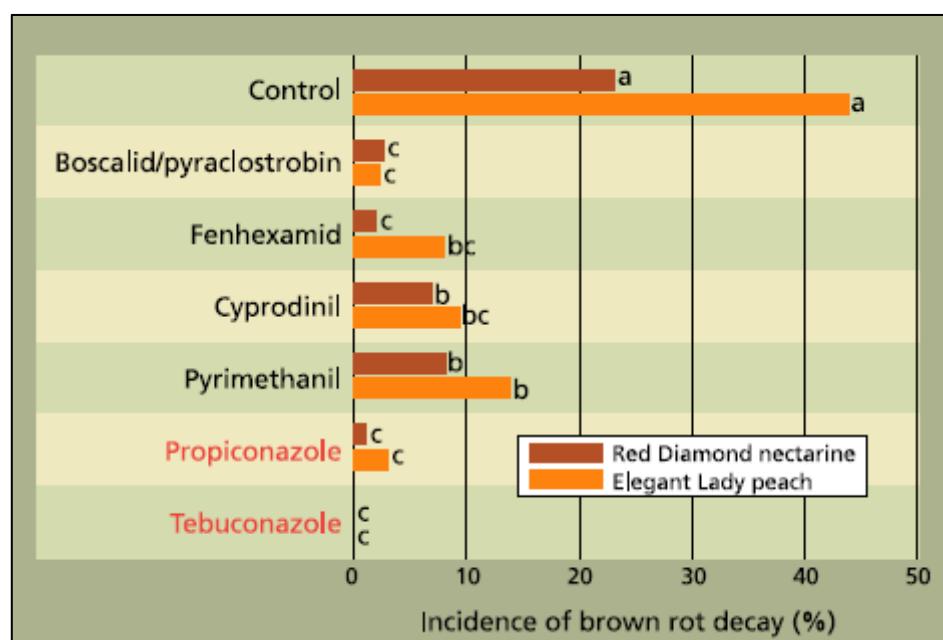
Recopilando información de la Dirección General de Tecnología Agraria (2006), del Boletín Fitosanitario (2012) y del Centro de Protección Vegetal de Aragón (2012), las materias activas recomendadas a emplear en pre-cosecha contra el género *Monilinia*, se recogen en la tabla 2.4.

Materia activa y modo de acción	Plazo de seguridad (días)	Observaciones
<b>Ciproconazol (sistémico)</b>	14	No autorizado en almendro
<b>Ciprodinil (sistémico)</b>	7	No autorizado en ciruelo y cerezo.
<b>Ciprodinil + fludioxonil (sistémico + contacto)</b>	7	-
<b>Difenoconazol (sistémico)</b>	7	Sólo está autorizado SCORE 25 EC- Syngenta
<b>Fenbuconazol (sistémico)</b>	3	No autorizado en ciruelo y cerezo
<b>Fenhexamida (contacto)</b>	1	-
<b>Tebuconazol (sistémico)</b>	7	Sólo autorizadas formulaciones 20 EW y 25 WG.
<b>Iprodiona (penetrante)</b>	14 para ciruelo 3 para albaricoquero, cerezo y melocotonero	-
<b>Metil-tiofanato (sistémico)</b>	14 para ciruelo 3 para albaricoquero y melocotonero.	No autorizado en cerezo.

**Tabla 2.4:** Fungicidas permitidos contra *Monilinia* spp. en frutales de hueso

En Estados Unidos, donde la aplicación post-cosecha de algunos productos fitosanitarios sí que está permitida, se utilizan dos estrategias para combatir esta infección. Una consiste en aplicar fungicidas en precosecha que previenen la activación de las infecciones latentes y/o protegen la fruta frente a infecciones posteriores y otra en tratar los frutos tras la cosecha con fungicidas de bajo impacto como fenhexamida ó fludioxonil (Förster et al., 2007). Estos fungicidas de bajo impacto no son muy nocivos para el medio ambiente, son muy específicos para los microorganismos objetivo y además tienen bajo potencial de contaminación del agua del suelo y de las personas. Se puede utilizar satisfactoriamente para el control de la podredumbre marrón con un programa de aplicaciones en años de lluvias no muy abundantes. Estudios de Adaskaveg et al., (2006) demostraron que estos fungicidas aplicados de 1 a 14 días antes de la cosecha fueron efectivos contra la podredumbre marrón, e incluso protegieron la fruta de las infecciones durante la cosecha. Si además se combinan estos

tratamientos con prácticas tales como rotaciones de fungicidas con distintos modos de acción o mezclas de los mismos, la efectividad es mayor. En estos estudios se comprobó la actividad antifúngica de fungicidas de bajo impacto aplicados en la precosecha tales como fenhexamida, ciprodinil, pirimetanil, una mezcla de boscalida y piraclostrobina y dos fungicidas convencionales, propiconazol y tebuconazol, en melocotones y nectarinas. Todos los fungicidas evaluados, redujeron significativamente la incidencia de la pudrición (Gráfica 2.5).



**Gráfica 2.5:** Porcentaje de incidencia de la podredumbre marrón tras la aplicación pre-cosecha de diferentes fungicidas (Adaskaveg et al., 2006)

En post-cosecha estudiaron la actividad antifúngica de estos fungicidas frente a la podredumbre marrón, la gris causada por *Botrytis cinerea* y la podredumbre por *Rhizopus*, de dos maneras distintas: A) inocular esporas, incubar durante 14 horas a 20° C, tratar con dichos fungicidas e incubar de nuevo a la misma temperatura; B) tratar con fungicidas, inocular las esporas e incubar a 20° C. Los tratamientos que mostraron una excelente actividad antifúngica fueron Fenhexamida, Boscalida + Piraclostrobina, Pirimetalina y Fludioxonil. Estos fungicidas fueron altamente eficaces previniendo la podredumbre inoculada a través de heridas realizadas en los frutos. Los que produjeron un efecto antifúngico similar a fungicidas convencionales y prohibidos hoy en día en EEUU (Iprodiona) fueron la mezcla de boscalida + piraclostrobina y fludioxonil.

El fludioxonil es un fungicida comercializado aquí en España bajo el nombre de Scholar 230 SC. Es un fungicida de contacto, de amplio espectro, utilizado con el objetivo de controlar hongos fitopatógenos causantes de enfermedades o pudriciones que afecten a la fruta durante el almacenaje y/o transporte a los mercados de destino.

El Ministerio de Agricultura ha autorizado desde el 1 de Junio y hasta el 30 de Septiembre, el formulado fludioxonil 23% p/v como fungicida para tratamientos en centrales hortofructicolas de cerezas, ciruelas y melocotones, especialmente para aquellas partidas con destino a mercados de ultramar. Alonso et al.(2010), estudiaron este fungicida en el control de enfermedades fúngicas en cerezas como las causadas por *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Rhizopus stolonifer*. Como resultados, obtuvieron que los tratamientos con este fungicida, fueron eficaces en el control de las infecciones post-cosecha en cerezas producidas por los tres primeros. Además, el aumento de la dosis del tratamiento del fungicida fludioxonil aumenta su eficacia, siendo recomendable concentraciones de 150-200 cc/hL.

### **2.3.2. Estrategias post-cosecha para el control de la podredumbre marrón**

Ya hemos indicado que el uso de fungicidas tiene un gran número de limitaciones e inconvenientes: leyes cada vez más estrictas, rechazo social debido a problemas toxicológicos que afectan tanto a personas como al medio ambiente y limitaciones biológicas por la resistencia que inducen. Además, los consumidores demandan cada vez con más frecuencia alimentos seguros, naturales y libres de residuos o sustancias químicas.

Es por ello que muchas de las investigaciones que actualmente se están llevando a cabo buscan alternativas a estos tratamientos. Muchos países han reducido la tolerancia de residuos de plaguicidas, ejerciendo presión a los productores de frutas para que intenten evitar su aplicación, con lo que a las empresas de plaguicidas les interesa orientar su producción hacia los llamados biofungicidas. Algunos de estos fungicidas están constituidos por agentes microbianos antagonistas del patógeno a eliminar (antagonismo microbiano) y otros son de naturaleza física o química.

Muchas han sido las investigaciones en este sentido, sin embargo, la mayoría de las estrategias utilizadas no consiguen evitar totalmente la aparición de la infección.

Repasamos a continuación algunas de las estrategias más estudiadas dividiéndolas en métodos físicos, químicos y biológicos.

### 2.3.2.1. Métodos físicos

#### Radiación Ultravioleta (UV)

Como ya hemos reseñado la industria alimentaria busca nuevos métodos de control no químico para las podredumbres de frutas y hortalizas. Entre ellos, uno de los más destacados es el uso de radiaciones ultravioletas. La radiación ultravioleta (UV) es el principal agente responsable de la acción antimicrobiana de la luz solar. La longitud de onda de mayor poder germicida es de 260 nm. La acción letal depende del tiempo de exposición, de la intensidad de la luz y del tipo de microorganismo (procariota o eucariota).

El mecanismo de acción de la luz ultravioleta no está claro pero parece ser un efecto letal indirecto debido a la generación de peróxido de hidrógeno, ozono o a la producción de distintos cambios bioquímicos y fisicoquímicos en los componentes celulares. La luz UV de longitudes de onda entre 200-290 nm penetraría a través de las membranas plasmáticas y dañaría el ADN (formación de dímeros de timina) evitando la replicación celular. Asimismo, el efecto germicida puede deberse a la degradación de las paredes celulares que ocasionaría la muerte celular.

Además, en frutas y hortalizas se ha señalado el concepto relativamente reciente de “efecto hermético” de la luz ultravioleta (UV-C, 254 nm) como responsable de la inducción de resistencia frente a las podredumbres post-cosecha por el aumento de la producción de fitoalexinas y de la prolongación de la vida útil por retraso del proceso madurativo.

La reducción de la incidencia de podredumbres durante el almacenamiento de cebollas y patatas fue una de las primeras referencias en las que se evaluaba la acción antifúngica de la luz UV (Lu et al., 1988). En frutas cítricas, por ejemplo, la aplicación de radiaciones UV potencia los mecanismos de resistencia ante el patógeno *Penicillium digitatum*. La dosis de UV requerida para observar este fenómeno varía entre 1,6 y 8 kJ/m<sup>2</sup>. (Droby et al., 1993). Incluso dosis bajas de luz UV inducen la resistencia ante

patógenos microbianos en productos como zanahoria, mango y pimiento (Terry et al., 2004)

Actualmente la luz ultravioleta se aplica para la potabilización del agua en plantas depuradoras de moluscos, para el ablandamiento de carnes, la maduración de quesos, la prevención de crecimiento fúngico en la superficie de productos de panadería, la purificación del aire en plantas embotelladoras, establecimientos de procesado y manipulación de alimentos y en las cubas de encurtidos, entre otros usos en la industria alimentaria.

### Agua caliente

A pesar de las dificultades que entraña el tratamiento acuoso de las frutas (calidad higiénica del agua, secado posterior,...) su uso ya es habitual en algunas centrales hortofrutícolas. Dentro de los tratamientos que se pueden aplicar destaca el uso de agua caliente. La utilización del agua caliente ha sido ampliamente estudiada en multitud de productos hortofrutícolas, tanto para inhibir el desarrollo de podredumbres postcosecha (Barkai-Golan and Phillips 1991; Lurie 1998; Margosan et al., 1997; Couey, 1989), como para aumentar la resistencia de algunas frutas al daño por el frío durante la conservación (Rodov et al., 1995). El tratamiento de pimientos con agua caliente a 53° C durante 4 minutos y su posterior conservación en plásticos de polietileno a 8° C redujo la incidencia de podredumbres y mantuvo las características organolépticas durante 28 días (González-Aguilar et al., 1998). En manzanas Golden Delicious el pretratamiento con agua caliente disminuye la severidad de las podredumbres causadas por *B. cinerea* y *P. expansum* (Fallik . 1996; Klein et al., 1997; Lurie et al., 1998). En cítricos, el desarrollo de resistencia a los fungicidas utilizados habitualmente (imazalil, tiabendazol y sodio ortofenil fenato) en *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, ha potenciado la búsqueda de tratamientos alternativos como el agua caliente sola o combinada con carbonato de sodio o bicarbonato de sodio (Palou et al., 2001).

La aplicación de agua caliente en melocotones y nectarinas ha resultado muy efectiva para inactivar esporas de *Monilinia* y *Rhizopus* (Sommer et al., 1967). También podemos citar estudios recientes como los de Spadoni et al. (2013), que evalúan la capacidad del agua caliente para inhibir *Monilinia* spp. en frutas como melocotones y

nectarinas infectadas de forma natural. Con una temperatura de 55° C y una exposición de 1 minuto, consiguieron inhibir completamente la germinación de esporas y, en líneas generales, controlaron la enfermedad un 78%.

### Radiofrecuencias/ Microondas

El calentamiento por radiofrecuencia/microondas incluye la interacción directa entre la energía cedida por la radiofrecuencia y las propiedades dieléctricas de la fruta. En estos tratamientos el aumento de la temperatura interna de la fruta es mucho más rápido que en los tratamientos convencionales de agua caliente. De este modo además, si la infección por *Monilinia* spp. permanece de forma latente en el interior del fruto, se puede eliminar de forma más eficaz (Casals, et al., 2010)

Para la correcta aplicación de esta tecnología, también hay que tener en cuenta las dimensiones de la fruta y el medio que la rodea (Birla et al., 2008).

Como ejemplos de aplicaciones de radiofrecuencia podemos citar trabajos recientes de Sisquella et al. (2013 y 2014, pendiente de publicación), en los que someten melocotones y nectarinas artificialmente inoculadas con diferentes concentraciones de esporas de *M. fructicola*. La radiofrecuencia se aplicó con una frecuencia de 27,12 MHz y detectaron inhibición de la podredumbre con todos los tiempos de exposición y temperaturas ensayadas, siendo el más eficaz el de 4,5 minutos a 40° C. En frutas contaminadas con esporas de *Monilia* de forma natural, la infección fue reducida de un 92 % a un 26% en melocotones y en un 100% en nectarinas.

#### **2.3.2.2. Métodos químicos**

##### Etanol

Otra sustancia utilizada en el tratamiento post-cosecha de frutas y hortalizas ha sido el etanol, especialmente para disminuir la hidrofobicidad de la piel de frutas y hortalizas, mejorando la eficacia del lavado con cloro, pero su uso se restringe por sus efectos sobre las propiedades organolépticas de muchos productos (Adams et al., 1989; Zhang and Farber, 1996). Los alcoholes son líquidos incoloros, inflamables, miscibles

en agua y disolventes de numerosos compuestos orgánicos. Entre los alcoholes, los que tienen una evidente actividad antimicrobiana son el etanol y el isopropanol.

Aunque no se sabe bien cuál es el mecanismo de acción de los alcoholes, se cree, por su incremento de eficacia en presencia de agua, que causan daño en la membrana y desnaturalizan rápidamente las proteínas que interfieren con el metabolismo y la lisis celular (McDonell and Russell, 1999). La presentación etanólica más efectiva frente a los microorganismos es al 70%, puesto que tiene una elevada capacidad de penetración, ejerciendo la acción en el interior de la célula e impidiendo la actividad enzimática. Si el porcentaje es superior se evidencia una deshidratación en la célula que actúa como preventivo de la penetración del producto en el interior de la célula, disminuyendo su efecto antimicrobiano.

Galán (2003) establece un tiempo de contacto de 5 minutos para que el etanol al 70% pueda ser efectivo. Himathongkham et al. (1999) utilizan un método para desinfectar huevos inoculados con *Salmonella enteriditis*, que consiste en sumergirlos en una solución de etanol al 75% durante 5 minutos; su eficacia resultó ser del 100%. Asimismo, Guo et al., (2001) utilizan etanol 70% durante 2 minutos en tomates frescos.

En melocotones y nectarinas, Margosan et al. (1997), aplican etanol al 10% y al 20% durante distintos períodos de tiempo (1 a 8 minutos) y a temperaturas de 46 y 50° C para optimizar el tratamiento. Estos investigadores seleccionan los tratamientos de etanol 10 % a 50° C durante 2,5 minutos y etanol 20% a 46° C durante 1,5 minutos para el control de *M. fructicola* y *R. stolonifer*.

Por tanto, el etanol es reconocido como un claro inhibidor de mohos (Legan, 1993). Este efecto fungicida se puede obtener mediante aplicación directa del producto en solución, o bien mediante la utilización de vapores ya que Dao et al. (2008) comprueban que ambos procedimientos son válidos para inactivar conidios de *Penicillium chrysogenum*, *P. digitatum*, y *P. italicum*. Lukšiene et al. (2007) estudian el empleo de soluciones de etanol como tratamientos descontaminantes de semillas de trigo y Gangneux et al., (2004) comprueban la eficacia del etanol 70% en superficies de frutas y pimienta negra contaminadas con *Aspergillus fumigatus*.

También, Bouix et al., (2002) señalan la actividad antimicrobiana que puede ejercer el etanol frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como ante esporas, mohos y levaduras.

### Ácido peracético

Diversos estudios han utilizado el ácido peracético como sustancia química para el control de la podredumbre marrón. Recientemente, Sisquella et al. (2013), testaron este ácido a concentraciones de 200 mg/L junto con agua caliente a 40° C durante 40 s. Como resultados, obtuvieron que la podredumbre se controlaba al 100% cuando la fruta era tratada al mismo tiempo que inoculada. Sin embargo, cuando la fruta era inoculada 24, 48 ó 72 horas antes, no consiguieron controlar la enfermedad. En melocotones contaminados de forma natural, la infección se redujo en un 61% para melocotones “Roig d’Albesa” y en un 36%, para melocotones “Placido”.

### Aceites esenciales

Además de los compuestos químicos ya citados, podemos incluir dentro de este tipo de control, sustancias químicas presentes de forma natural en algunos elementos de la naturaleza que nos rodea. Es conocido el uso de aceites esenciales procedentes de hierbas aromáticas como compuestos antifúngicos. Estos aceites son metabolitos secundarios, mezclas de componentes volátiles, mayoritariamente terpenos y sus derivados oxigenados, producidos en pequeñas cantidades por muchas especies de plantas como mecanismo químico de defensa frente a microorganismos e insectos fitopatógenos (Rosenthal y Jansen, 1979).

Estos aceites se han utilizado como agentes saborizantes y odorizantes en las industrias farmacéuticas, cosméticas y alimentarias, y por sus propiedades terapéuticas y curativas en la medicina tradicional y en la aromaterapia. Sin embargo, fueron su carácter antiséptico y su acción conservante las propiedades conocidas y las más ampliamente estudiadas. Las investigaciones en esta dirección han logrado identificar los componentes de un mismo extracto. El componente responsable de la actividad antimicrobiana se encuentra generalmente en la fracción oleica. Los fenoles son los componentes de aceites esenciales con mayor actividad antimicrobiana y dentro de este grupo destacan el timol y el eugenol. Por ejemplo, el componente responsable de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de ajo es la alicina (2-propenil-2-

propenetiol sulfinato), que presenta actividad incluso a concentraciones tan bajas como 1:85000 (Cavallito y Bailey, 1944). Los componentes de los aceites esenciales en los que se ha detectado mayor actividad antimicrobiana, centrándonos sobretodo en la actividad antifúngica, han sido el timol, el citral, el eugenol, el cineol, la vanilina, el carvacrol y el cinamalehído.

Lazar-Baker et al. (2011) evaluaron la actividad frente a *M. fructicola* de varios aceites esenciales obtenidos del mirto limón (*Backhousia citriodora*), corteza de canela, (*Cinnamomum zeylanicum*), orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*); clavo (*Eugenia caryophyllata*), valeriana (*Valeriana officinalis*) y árbol del té australiano (*Melaleuca alternifolia*). El aceite esencial del mirto limón fue el más efectivo de todos los aceites testados consiguiendo controlar el crecimiento del micelio a bajas concentraciones (200-500 µL/L.)

Las investigaciones de Caccioni et al., (1994) valoraron la inhibición de la germinación y del crecimiento de hongos patógenos en la post-cosecha con diferentes compuestos de aceites esenciales. Como resultado, obtuvieron que el componente más efectivo fue el carvacrol; a concentraciones de 125 ppm, inhibió por completo el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*, *M. laxa*, *Mucor piriformis*, *Penicillium digitatum*, , *Penicillium expansum* y *Rhizopus stolonifer*. Además también inhibió la germinación de esporas de *M. laxa*, *M. piriformis* y *R. stolonifer*.

Por otro lado, Neri et al. (2007) investigaron el potencial antifúngico de los componentes volátiles de 9 plantas frente a *M. laxa*. Los ensayos *in vitro* mostraron que los mejores resultados se obtuvieron con el trans-2-hexenal y el carvacrol. La concentración mínima inhibitoria del primero fue de 12,3 µL/L, mientras que la del segundo fue de 6,1 µL/L. Los ensayos *in vivo* confirmaron que el componente más efectivo era el trans-2-hexenal con inhibiciones de germinación de esporas del 46,2% e inhibiciones del crecimiento micelial del 80,3%, mientras que la eficacia fue menor para el carvacrol con 40 y 39,2% respectivamente.

En sintonía con esta línea de investigación el Grupo de Investigación “Alimentos de Origen Vegetal” de la Universidad de Zaragoza ha estudiado la composición química de extractos procedentes de frutos de aclareo. Se partió además de la premisa de que el contenido fenólico en algunas frutas es mayor cuanto menor es su índice de madurez

(Celli y col. 2011); es de suponer por tanto que en los frutos procedentes del aclareo, en los que el desarrollo madurativo está poco avanzado, se encuentran altos niveles de estos compuestos. En las frutas, los compuestos fenólicos o polifenoles son muy importantes y constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras químicas y actividades (Martínez-Valverde et al. 2000). Químicamente poseen un anillo bencénico (con uno o más grupos hidroxilo) que incluyen además, derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. (Martínez-Navarrete et al. 2008). Es por ello que su clasificación es muy compleja debido al gran número de compuestos que la forman, dividiéndose en diferentes grupos: fenoles simples, ácidos benzoicos, ácidos cinámicos, flavonoides, etc.

Todos ellos están relacionados con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal; son los responsables del color de ciertas frutas, de la formación de quinonas durante la reacción de pardeamiento enzimático, de la astringencia y el sabor amargo que presentan muchas frutas antes de alcanzar el grado de madurez óptimo (Martínez-Valverde et al. 2000). También se les relaciona con numerosos beneficios para la salud, debido sobre todo a que pueden actuar como antioxidantes y antimicrobianos.

Así, el estragón y el tomillo contienen ácido cafeíco, que es efectivo frente a virus, bacterias y hongos (Duke 1985). El catecol y el pirogalol son dos fenoles hidroxilados que han mostrado ser tóxicos para los microorganismos. El catecol tiene dos grupos OH y el pirogalol tres; el lugar y el número de grupos hidroxilo en el anillo fenólico parece ser que está relacionado con la toxicidad, en el sentido de que a mayor hidroxilación mayor poder antimicrobiano. Además algunos autores han demostrado que cuanto más oxidado está el fenol mayor actividad inhibitoria posee (Scalbert 1991). Los flavonoides son también sustancias fenólicas hidroxiladas que se presentan con un grupo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> unido a un anillo aromático y que se sintetizan en las plantas como respuesta a una invasión microbiana (fitoalexinas); no es sorprendente que posean un amplio espectro de actividad antimicrobiana. Dentro de este grupo de flavonoides merecen especial mención las catequinas, presentes en el té verde y que han sido ampliamente estudiados debido a que desde hace tiempo se sabe que esta infusión posee actividad antimicrobiana (Toda et al., 1989). Estas catequinas poseen actividad

antibacteriana *in vitro* frente a *Streptococcus mutans* (Sakanaka y col. 1992), *Vibrio cholerae* O1 (Borris 1996) y *Shigella* (Vijaya y col. 1995) entre otras.

### 2.3.2.3. Control biológico

El control biológico consiste en el control de plagas, enfermedades y malezas que mediante el uso de organismos vivos antagónicos. En el caso de las frutas, el biocontrol consiste limitar, reducir o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes utilizando otros microorganismos que actúen como antagonistas; la acción antagónica puede deberse a procesos de antibiosis y lisis enzimática, a la competencia por el espacio o por los nutrientes, a las interacciones biológicas directas con el patógeno, por ejemplo microparasitismos, o a la inducción de resistencia.

#### Principales microorganismos utilizados en biocontrol.

Las investigaciones de los últimos 20 años se han centrado en la búsqueda y aplicación de agentes microbianos efectivos frente a las principales enfermedades postcosecha de la fruta. Sin embargo, pocos de ellos han sido lo suficientemente eficaces como para crear un producto comercial.

Los productos que se encuentran disponibles en el mercado actualmente para combatir distintas enfermedades en distintos frutos (generalmente protegidos por patentes), son los formulados a base de los siguientes microorganismos:

##### a) Bacterias:

-*Pseudomonas syringae* en el control de podredumbre en cítricos, cerezas, manzanas y peras (Janisiewicz et al., 2002).

-*Pantoea agglomerans*, para la podredumbre de cítricos y frutas de pepita (Nunes et al., 2002; Plaza et al., 2004; Cañamás et al., 2008a).

-*Bacillus subtilis* frente a *M. fructicola* en melocotón (Pusey y Wilson, 1984).

##### b) Levaduras:

- *Aureobasidium pullulans* contra podredumbres de cítricos, uva, fresas, frutas de pepita y de hueso (Kurtzman et al. 2001).

-*Candida oleophila*, frente a *P. expansum* y *B. cinerea* en manzana y pera. (Wisniewski et al., 1995).

-*Candida sake CPA-1*, para enfermedades de frutas de pepita (Viñas et al., 1998; Usall et al., 2001).

### Mecanismos de acción del antagonista en biocontrol

Resulta complicado determinar con exactitud los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos sobre la planta. Además no suele darse únicamente un mecanismo de acción, sino que pueden concurrir varios, reduciendo así las posibilidades de crear resistencia. Se han descrito varios modos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos sobre frutas (Cook and Baker, 1983):

- Antibiosis

Se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para otros microorganismos. Es deseable que la antibiosis no sea el principal mecanismo de acción de un antagonista, puesto que, existe riesgo de la aparición de resistencias. Un claro ejemplo de este tipo de resistencia fue la aparición de cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (causante de la agalla de la corona de las plantas) resistentes al Agrosin 84, un antibiótico producido por una cepa de *Agrobacterium radiobacter* (Campbell, 1989). Sin embargo, la eficacia de la antibiosis como método de control comparada con el uso de agroquímicos, deja mucho que desear, puesto que no se puede comprar la liberación de una sustancia a escala microbiana con el uso masivo de agroquímicos.

- Competencia

Otro de los posibles mecanismos de acción antagónica es la competencia. Se puede definir competencia como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los microorganismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Si hay exceso de un elemento, no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio.

- Interacción directa con el patógeno

Existen dos tipos de interacciones directas entre los antagonistas y los patógenos (parasitismo y predación).

El parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo parasite a otro. Consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente se ven implicadas las enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas y proteasas que lisan las paredes de las hifas, conidios o filamentos miciliares (Melgarejo 1989, Ulhoa 1996). El ejemplo más claro lo encontramos en el presente proyecto. Testaremos las enzimas producidas por *Penicillium purpurogenum* frente a mohos patógenos como del género *Monilinia*.

En el caso de la predación, el antagonista se alimenta con materia orgánica entre la cual se encuentra ocasionalmente el patógeno. Los estudios más conocidos citan la presencia de amebas en suelos con potencial antifúngico, las cuales se alimentan de las hifas de hongos patógenos entre otras fuentes de alimento (Campbell, 1989)

- Inducción de resistencia

A lo largo de su existencia, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa muy poderosos contra sus invasores. Estos son mecanismos bioquímicos, físicos o estructurales de resistencia. Se ha demostrado que algunas levaduras utilizadas para el biocontrol de patógenos de post-cosecha además de competir por espacio y nutrientes, son capaces de inducir resistencia en la planta. Tal es el caso de *Pichia guillermondi* (US-7), la cual ha mostrado ser inductora de la producción de fitoalexinas en frutos cítricos (Wilson et al., 1994).

Como ventajas del biocontrol podemos citar las siguientes:

- Complejo modo de acción y bajo riesgo de desarrollo de resistencia. No solo interviene un mecanismo de acción, sino que son varios los que actúan frente a un patógeno, con lo que es más difícil que se desarrolle resistencia frente al antagonista.
- Reducción o eliminación de residuos químicos. Los productos del biocontrol son el futuro próximo para el control de plagas y enfermedades.

- Seguridad para los trabajadores y el medio ambiente. El uso de agentes de biocontrol reduciría la exposición por parte de los trabajadores a los tóxicos químicos. Además son biodegradables, no dejan residuos químicos y no contaminan ni el medio ambiente, ni el agua de los campos.

Aunque también debemos reseñar algunas desventajas:

- Requieren un especial manejo, supervisión y una serie de restricciones. Algunos agentes de biocontrol no pueden ser mezclados con otros fungicidas porque éstos, podrían matar al agente biológico empleado. Además a la hora de aplicar el agente de biocontrol, hay que saber cuándo hacerlo, puesto que los microorganismos antagonistas empleados, deben ser aplicados antes o al mismo tiempo que el patógeno para ser eficaz. Esto, reduce la viabilidad de los agentes en almacenes o plantas de envasado.
- Eficacia. Los informes de eficacia son variados y contradictorios, en gran parte, porque los usuarios esperan poder utilizar un producto de biocontrol como si fuera un químico, sin considerar sus limitaciones.
- Estabilidad. Algunos agentes de biocontrol no producen esporas y consisten sólo en células bacterianas o micelios fúngicos, y como resultado la vida útil de un producto de biocontrol no podría equipararse a un producto químico.

Acabamos de ver las limitaciones del biocontrol en el control de plagas y enfermedades. Sin embargo, la efectividad de estos tratamientos aumenta si se combinan con otros métodos. Se han desarrollado diversos estudios para conocer la eficiencia biológica de los antagonistas; por ejemplo, al analizar el comportamiento de cuatro levaduras antagonistas (*Trichosporon pullulans*, *Cryprtococcus laurentii*, *Rhodotorula glutinis* y *Pichia membranefaciens*), se encontró que fueron efectivas contra importantes patógenos post-cosecha como *A. alternata*, *P. expansum*, *B. cinerea* y *R. stolonifer* en cerezas almacenadas a 25° C. Sin embargo, a bajas temperaturas y en condiciones de atmósfera controlada se suprimió el crecimiento de *T. pullulans* y *P. membranefaciens* (Qin et al., 2004). Pero también se ha encontrado el efecto inverso, ya que en estudios realizados en melocotones para controlar las podredumbres causadas

por *B. cinerea* y *P. expansum* con el antagonista *Candida oleophila* se puso de manifiesto que esta levadura por sí sola no era capaz de ejercer un efecto notable de biocontrol, pero que cuando se combinaba con atmósferas modificadas se reducía la incidencia de podredumbres (Karabulut y Baykal, 2004).

Todo esto nos indica que las combinaciones posibles de distintos microorganismos con otros métodos de control son muy numerosas y hay que profundizar en su estudio.

Como ejemplos de biocontrol podemos citar varios artículos que hacen referencia a la cepa CPA-8 de *Bacillus subtilis* aislada de la superficie de nectarinas como agente de biocontrol de la podredumbre marrón. Yáñez-Medizábal et al., (2012) utilizaron compuestos producidos por *B. subtilis* y descubiertos por Ongena y Jaques (2008), los lipopéptidos (fengicinas, iturinas y surfactinas), como antagonistas frente a la podredumbre marrón y con resultados muy positivos.

Estudios de Casals et al., (2010), también profundizan en la utilización de la cepa CPA-8 de *Bacillus subtilis*, del agua caliente y del bicarbonato de sodio como agentes de control de la podredumbre marrón en melocotones y nectarinas. En primer lugar estudiaron cada método por separado obteniendo los resultados más eficaces (agua caliente 60° C / 40 s, bicarbonato de sodio 2% / 40 s y *B. subtilis* a  $10^7$  ufc/mL). Diferentes combinaciones de estos tres métodos fueron testadas en los frutos contaminados de forma artificial con *M. laxa*. El mejor resultado lo obtuvieron con el uso de agua caliente, y posterior aplicación de la cepa microbiana. Solamente el 8% de las frutas tratadas con esta combinación se infectaron, en comparación con el control (84%), CPA-8 (52%) y la utilización exclusiva de agua caliente (24%).

Otros estudios tratan de integrar varios métodos de control. Así, Holb y Kunz (2013) combinan hidróxido de cobre y sulfuro de cal con la levadura *Aureobasidium pullulans*, como agente de biocontrol, para combatir la podredumbre marrón causada por *Monilinia* spp. en una plantación orgánica de cerezas. Como resultados, obtuvieron que los tratamientos con *A. pullulans* combinados con sulfuro de cal e hidróxido de cobre, aplicados tres veces durante la floración, fueron menos efectivos que un fungicida convencional (vinclozolin + penconazol). Sin embargo, los tratamientos con *A. pullulans* controlaron significativamente mejor la enfermedad que los árboles control

no tratados y además, se observaron mejoras en el rendimiento del cultivo en 2 de los 3 años que duró el ensayo.

También se han hecho estudios testando microorganismos presentes de forma natural en la superficie de los frutos frente a *M. fructicola* (Janisiewicz et al., 2013). En la superficie de las ciruelas, los compuestos con mayor actividad antifúngica fueron identificados como *Pantoea agglomerans* y *Citrobacter freundii*, ambos microorganismos pertenecientes a la F<sup>a</sup> *Enterobacteriaceae*. En la superficie de las nectarinas, las más eficaces fueron *Cryptococcus Magnus*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Aureobasidium pullulans* y *Rhodotorula sp. nov.*

La utilización de las cepas L1 y L8 de la levadura *Aureobasidium pullulans* como agente de biocontrol frente a *Monilinia* spp. fue estudiada por Mari et al., (2012), obteniendo inhibición total frente a *M. laxa* y *M. fructicola* y un 70% (cepa L1) - 90% (cepa L2) de inhibición frente a *M. fructigena*.

Gonçalves et al., 2010 estudiaron el control de la podredumbre marrón causada por *M. fructicola* y *R. stolonifer* mediante la aplicación de cera de carnauba (*Copernicia prunifera*), un tipo de palmera brasileña. En aplicaciones *in vivo* consiguieron inhibir en gran medida la germinación de esporas con aplicaciones de la cera a concentraciones del 9%.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ENZIMAS PROCEDENTES DE *PENICILLIUM PURPUROGENUM* FRENTE A *MONILINIA LAXA* Y *MONILINIA FRUCTICOLA*.**

En numerosos estudios se ha observado la destrucción de las hifas de *Monilinia laxa* en presencia de *Penicillium purpurogenum* (Melgarejo et al., 1985; Melgarejo et al., 1986; Melgarejo y Sagasta, 1986). Investigaciones posteriores mostraron que la actividad antifúngica de *P. purpurogenum* procedía de enzimas como la quitinasa y la β-1,3-glucanasa, detectadas en los filtrados del cultivo durante la autolisis de *P. purpurogenum* (Larena y Melgarejo, 1993). Esta actividad enzimática de *P. purpurogenum* varía según el sustrato nutritivo empleado, por lo que el objetivo de este ensayo ha sido evaluar distintos sustratos para determinar cuál era el que generaba mayor producción de enzimas. Los sustratos utilizados han sido: pared celular de diferentes especies de mohos, tres tipos de laminarina y glucosa.

La laminarina es un polímero de glucosa, extraído del alga *Laminaria digitata*. Entre sus características, destaca la de ser fitofortificante, pudiendo emplearse también como potenciador de las defensas naturales de las plantas. Larena y Melgarejo en sus artículos la emplean como sustrato sustitutivo de la glucosa en medio líquido para potenciar la actividad enzimática de *P. purpurogenum*.

#### **3.1.1. Obtención de los extractos enzimáticos**

Para la realización de esta parte del experimental, se han seguido las instrucciones recogidas por Larena y Melgarejo (1993 y 1996) donde citan que enzimas producidos por *P. purpurogenum*, como la β-1,3-glucanasa y la quitinasa, causan la inhibición de *M. laxa*. Se han introducido sin embargo, algunas modificaciones en cuanto a los sustratos inductores de dicha actividad enzimática.

##### **3.1.1.1. Microorganismos utilizados**

###### Microorganismo productor de enzimas exocelulares

Como microorganismo productor de extractos enzimáticos exocelulares se utilizó la cepa *Penicillium purpurogenum* ATCC 66107, aislada por Melgarejo et al.,

(1985). Esta cepa fue suministrada por LGC Standards (Teddington, Middlesex, Reino Unido) y aislada de la filosfera de ramas de melocotonero de una finca experimental en Madrid.

#### Microorganismos fitopatógenos

En este estudio se han utilizado 5 cepas fitopatógenas pertenecientes a 4 géneros: *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata* y *Rhizopus stolonifer*. Se han incluido por tanto otras cuatro especies de mohos también reconocidos patógenos en la post-cosecha de frutas de hueso.

La cepa de *Monilinia laxa* fue aislada de nectarinas infectadas por el Grupo de Investigación en Alimentos de Origen Vegetal de la Universidad de Zaragoza.

La cepa de *Monilinia fructicola* ATCC 44557 fue aislada de nectarina en California (EEUU) y suministrada por LGC Standards.

La cepa de *Penicillium expansum* CECT 20140 procedía de manzanas y fue suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). La cepa de *Alternaria alternata* CECT 2662, aislada de tomate, también fue suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo y por último la cepa de *Rhizopus stolonifer* fue aislada de melocotones afectados de podredumbre por el Grupo de Investigación en Alimentos de Origen Vegetal. Todas estas cepas se sembraron para su crecimiento en placas con agar patata-dextrosa (PDA, Merck, Darmstadt, Alemania) se incubaron durante 7 días en oscuridad a 25ºC y se mantuvieron en tubos con el mismo medio a 4ºC hasta su uso.

#### Obtención de suspensiones esporales

En cada tubo PDA que contenía las cepas fúngicas crecidas se añadieron 5 mL de agua destilada estéril, con un 0,05% de Tween 80; posteriormente se raspó la superficie con asa de siembra estéril para separar el micelio y las esporas de su superficie y se homogenizó el tubo en vortex. A continuación el líquido era filtrado a través de 4 capas de gasa estéril. El número de esporas por mL se realizó por recuento microscópico directo depositando 10 µL de la suspensión en una superficie de 1 cm<sup>2</sup> delimitado en un porta y contando el número de esporas presentes en 20 campos. En

todos los casos se ajustó la suspensión para obtener una concentración aproximada de  $10^5$  esporas/mL.

### 3.1.1.2. Preparación de la pared celular

Los extractos de micelio fúngico se prepararon a partir de cultivos en tubos con PDA de *M. laxa*, *M. fructicola*, *P. expansum*, *A. alternata* y *R. stolonifer*. Para ello se obtuvieron suspensiones esporales de cada moho, con la diferencia, en este caso, de que a cada tubo de PDA, se le añadieron 5 mL de caldo patata-dextrosa (PDB) estéril, en vez de agua destilada. Tras el recuento, se añadió 1 mL de la suspensión de esporas a un matraz con 50 mL contenido PDB estéril. Los matraces se incubaron a 23° C durante 10 días en oscuridad y sin agitación. Para recoger el micelio crecido se filtró el contenido de los matraces con papel Whatman nº1, lavando posteriormente con agua destilada. El papel de filtro se colocó en el interior de una placa de Petri y se congeló durante 12 horas a -20° C. Transcurrido este periodo se separó el micelio endurecido del papel Whatman y se molvió en un mortero. Este micelio molido se depositó en un tubo de centrífuga con 30 mL de agua destilada estéril y se sometió a ultrasonidos (35 KHz / 3 min a intervalos de 1 min) para romper la pared celular. Después se sometió a centrifugación (1000 g / 10 min / 4° C), se eliminó el sobrenadante y se añadieron 30 mL de acetona. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se eliminó de nuevo el sobrenadante. Este lavado con agua destilada y acetona se repitió 10 veces ya que su objetivo era eliminar todo el contenido citoplasmático presente en la muestra.

La ausencia de contenido citoplasmático se determinó mediante examen microscópico con tinción de Coomassie (90 mL de tinte = 0,0585 g azul de Coomassie + 30 mL metanol + 50 mL agua destilada + 10 mL ácido acético). Debido a que en el artículo de Larena y Melgarejo (1996) no se especifica cuántos lavados deberían efectuarse, tuvimos dificultades en determinar cuándo se había eliminado todo el contenido citoplasmático, ya que después de diez lavados aun se observaban restos fúngicos teñidos de azul.

Finalmente, las paredes celulares lavadas se secaron hasta peso constante a 60° C (aproximadamente 6 h). Se molvió el micelio seco en mortero y molino hasta convertirlo en polvo y se almacenó en tubos de centrífuga a 4° C hasta su uso.

### 3.1.1.3. Inducción de la actividad $\beta$ -1,3-glucanasa de *P. purpurogenum*

Para la inducción de la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de *P. purpurogenum* se utilizaron los siguientes sustratos:

- Paredes celulares en polvo obtenido a partir de *M. laxa*, *M. fructicola*, *P. expansum*, *A. alternata* y *R. stolonifer* (epígrafe 2.1.1.2)
- Laminarina del alga *Laminaria digitata* (Sigma-Aldrich, ref. L9634)
- Alga deshidratada de *Laminaria ochroleuca* (adquirida en El Corte Inglés)
- Extracto de laminarina en polvo suministrado por la empresa Arvensis Agro S.A.
- Glucosa como control.

En tubo de PDA inclinado con cultivo de *P. purpurogenum* se adicionaron 6 mL de Mineral Medium (MM) estéril preparado por nosotros (Arie Geerlof – Helmholtz Center Munich) (Tabla 3.1); posteriormente la superficie del agar fue raspada con un asa de siembra para separar el micelio y las esporas. Tras homogeneizar el tubo en vortex se filtró el líquido a través de 4 capas de gasa estéril y se realizó el recuento del número de esporas mediante microscopio. En todos los casos se obtuvo una concentración de  $10^5$  esporas/mL.

COMPOSICIÓN POR LITRO DE MINERAL MEDIUM	
Reactivos	Cantidad
Agua destilada	867 mL
Solución de sales M9	100 mL
1M MgSO <sub>4</sub>	1 mL
1M CaCl <sub>2</sub>	0,3 mL
Biotina	1 mL
Tiamina	1 mL
Solución de oligoelementos	10 mL

Tabla 3.1: Composición por litro de MM.

La composición original del MM, lleva también 20 mL de glucosa al 20%. Sin embargo no fue añadido al medio, ya que lo que se pretendía era que las soluciones enzimáticas utilizaran los distintos extractos secos y no la glucosa como fuente de carbono.

En matraces de 100 mL conteniendo 20 mL de MM estéril se añadieron los extractos secos obtenidos de las paredes celulares y la laminarina del alga *L. digitata* hasta obtener una concentración final de 0,5 mg/mL. En el caso de *L. ochroleuca* deshidratada y del extracto de laminarina obtenida por Arvensis Agro S.A. se prepararon concentraciones de 5, 25 y 50 mg/mL. La glucosa se empleó como control a una concentración de 0,5 mg/mL. A continuación, cada matraz se inoculó con 1 mL de la suspensión de esporas de *P. purpurogenum*, se agitó hasta disolver el extracto seco y se incubó en agitación (50 rpm) durante 10 días a 28° C. Transcurrido este periodo de incubación se filtró el contenido de los matraces a través de papel Whatman nº1 y se guardaron en tubos de centrífuga a 4° C, finalizando así la obtención de las soluciones enzimáticas.

#### **3.1.1.4. Purificación de la suspensión enzimática al 95% con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

El objetivo de este paso fue purificar las soluciones enzimáticas obtenidas en el paso anterior, mediante la utilización de sulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El sulfato de amonio se emplea como floculante y además, como un reactivo de purificación de proteínas ya que precipita las solubles.

Un volumen de 10 mL de las soluciones enzimáticas obtenidas a partir de la glucosa, *M. laxa*, *M. fructicola*, laminarina (Sigma-Aldrich), *L. ochroleuca* y extracto de laminarina (Arvensis Agro S.A.) se ajustó al 95% de saturación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Larena y Melgarejo, 1996). Se adicionaron 7,29 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a los 10 mL de solución enzimática y se homogeneizaron en Vibromatic (300 rpm) durante 2 h a 4° C. Seguidamente se centrifugó a 15.000 g durante 20 min a 4° C. Se eliminó el sobrenadante y se suspendió el pellet en agua destilada estéril agitando de nuevo en Vibromatic (300 rpm) durante 2 h a 4° C. Finalmente se volvió a centrifugar a 30.000 g durante 20 min a 4° C. Las soluciones o los pellets así obtenidos se conservaron a 4° C hasta su uso.

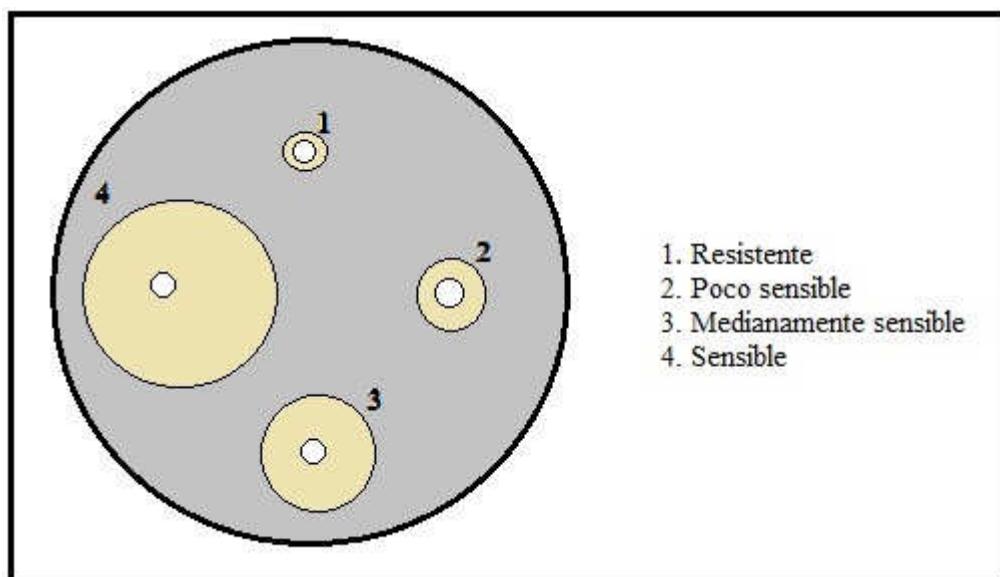
#### **3.1.2. Actividad antifúngica *in vitro* en medio sólido**

En este capítulo se testó la capacidad de los compuestos enzimáticos obtenidos anteriormente para la inhibición de *M. laxa* *in vitro*. Además, también se evaluó el potencial inhibitorio de estos extractos frente a *M. fructicola*, *P. expansum*, *A. alternata*

y *R. stolonifer* pero sólo en medio sólido. Para ello, se empleó el método de difusión en agar.

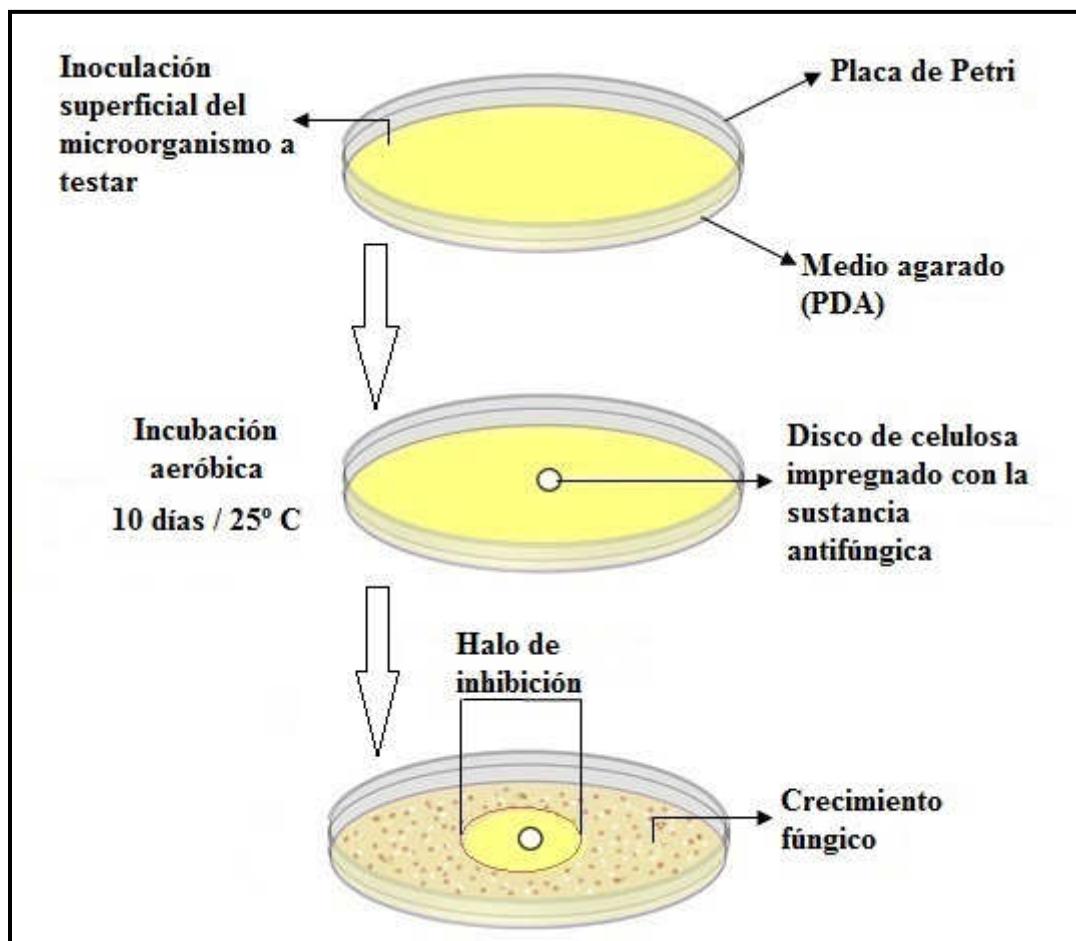
### 3.1.2.1 Método de difusión en agar

Este método consiste en depositar un disco de celulosa estéril impregnado con la solución enzimática en una placa de agar PDA previamente inoculada superficialmente con las esporas del moho a testar. Se trata de un método cualitativo que determina la sensibilidad de un microorganismo ante una determinada sustancia y concentración. En función de esta sensibilidad el microorganismo se clasifica como resistente, poco sensible, medianamente sensible o sensible (Davidson y Parish, 1989) (figura 3.1).



**Figura 3.1:** Tipos de inhibición que se pueden detectar con el método de difusión en agar

En la figura 3.2, se representa el protocolo seguido en la realización del método de difusión en agar.



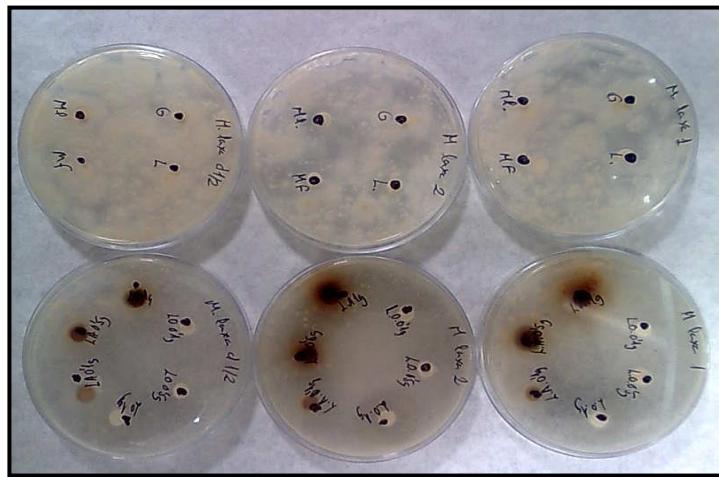
**Figura 3.2:** Desarrollo esquemático del método de difusión en agar.

Se testó la actividad antimicrobiana frente a *M. laxa*, *M. fructicola*, *P. expansum*, *A. alternata* y *R. stolonifer* con las soluciones enzimáticas obtenidas a partir de glucosa, *M. laxa*, *M. fructicola*, *P. expansum*, *A. alternata* y *R. stolonifer*, laminaria (*L. digitata*, Sigma-Aldrich), *L. ochroleuca* deshidratada y extracto de laminaria (Arvensis Agro S.A.) sin purificar y saturadas al 95% con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Se preparó una suspensión esporal de cada uno de los mohos a testar.

Las placas de PDA se inocularon con la suspensión de esporas depositando 0,2 mL en el centro de la placa en el caso de *M. laxa* y *M. fructicola* y 0,1 mL para el resto de mohos. Por la misma razón anteriormente expuesta, se decidió en el caso de *Monilinia* aumentar el volumen del inóculo. Finalmente se colocaron tres o cuatro discos de celulosa estériles por placa impregnados de las soluciones enzimáticas. Las

placas se incubaron en posición invertida y en aerobiosis durante 10 días a 25° C (Imagen 3.3).

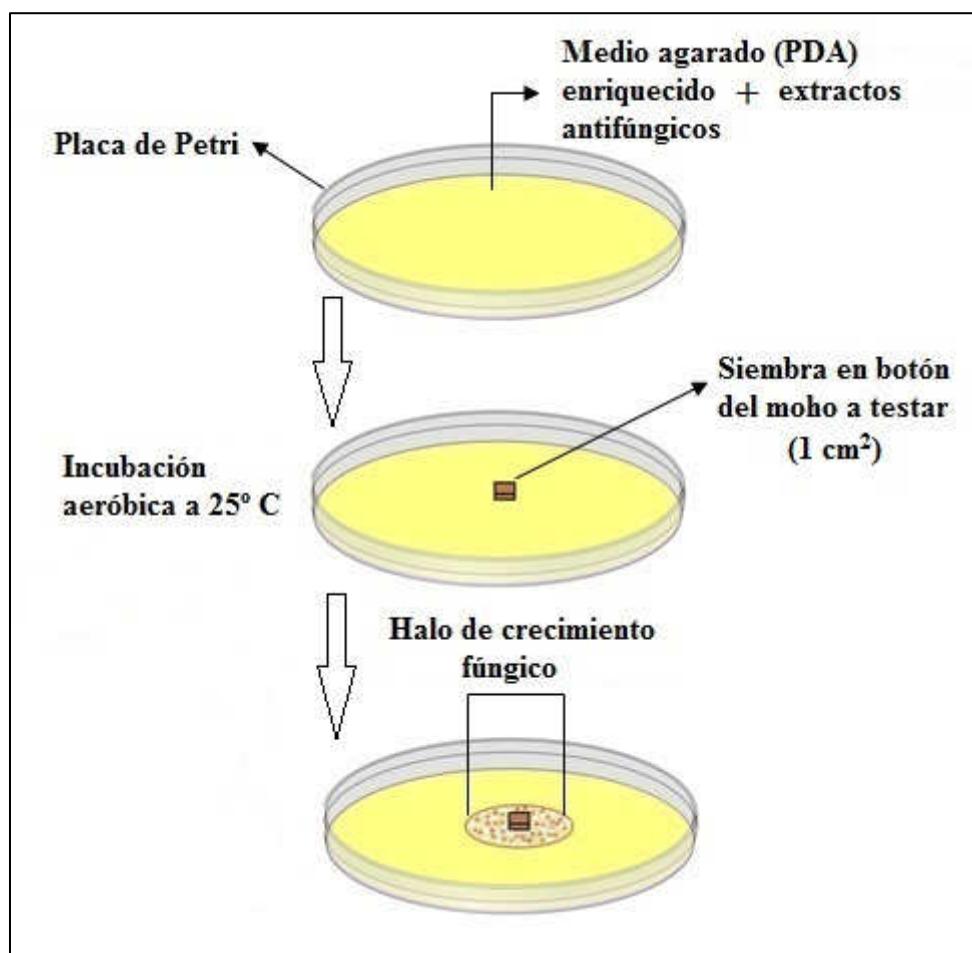


**Imagen 3.3:** Placas de PDA inoculadas con *M. laxa* y con los discos de celulosa impregnados en las soluciones enzimáticas.

### 3.1.2.2 Método del agar enriquecido con adición de soluciones enzimáticas

El agar enriquecido, consiste en añadir al medio de cultivo agarado los nutrientes necesarios para posibilitar el crecimiento de ciertos microorganismos. En el presente proyecto, hablaremos de agar enriquecido con adición de extractos como aquél, al que le añadimos un 0,1% de extracto de levadura y un 0,1% de caseína y además, los extractos o soluciones enzimáticas obtenidos en cada ensayo para establecer su poder antimicrobiano. La figura 2.4 muestra el desarrollo esquemático de éste método.

El objetivo principal del enriquecimiento del PDA (PDA-E) es posibilitar la esporulación de *M. laxa*.



**Figura 3.3:** Desarrollo esquemático del método del agar enriquecido con adición de extractos

En este caso se ensayaron las soluciones enzimáticas o extractos antifúngicos obtenidas a partir de *M. laxa*, de *M. fructicola* y de Laminarina (Sigma-Aldrich) que se añadieron a una concentración del 4% (PDA-E+S.E.). Además se incluyó un control negativo (medio enriquecido sin adición de extractos). El estudio se realizó por triplicado.

#### Siembra en botón de *M. laxa*

Una vez solidificado el PDA-E+S.E., se procedió a la siembra de *M. laxa*. Para ello, se utilizó una placa de PDA con crecimiento manifiesto de *M. laxa*. Con la ayuda de un bisturí y pinzas estériles, se cortaron pequeños cuadrados de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, que se situaron en el centro de las placas con el medio PDA-E+S.E.. A continuación, fueron incubadas en oscuridad a 25° C.

La inhibición del crecimiento del moho respecto al control se evaluó diariamente hasta que en las placas control el microorganismo fitopatógeno ocupaba toda la superficie.

### **3.1.3. Actividad antifúngica *in vitro* en medio líquido**

#### **3.1.3.1. Medio líquido enriquecido con adición de soluciones enzimáticas**

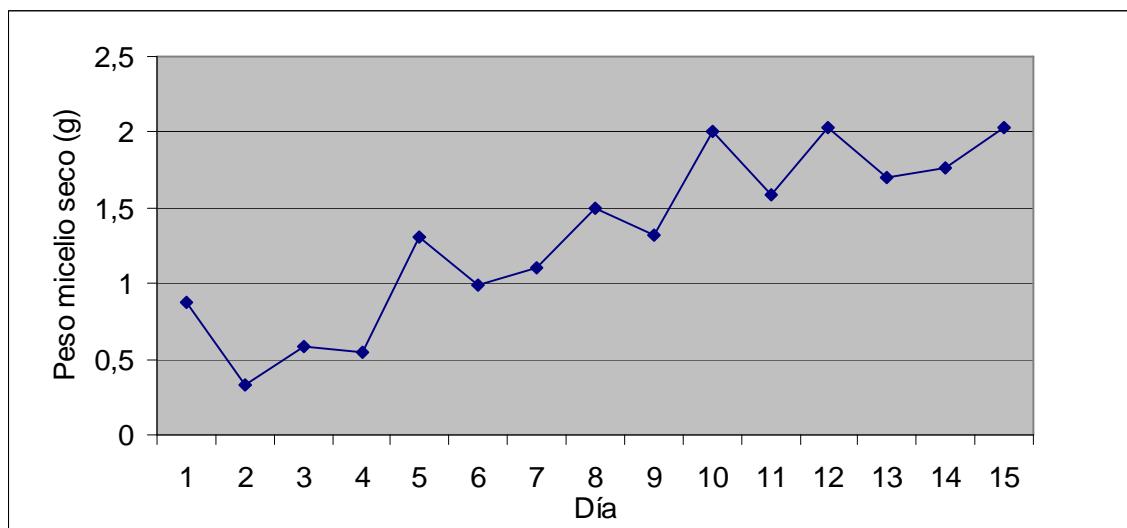
En este experimental, se estudió la actividad antifúngica de las soluciones enzimáticas obtenida a partir de *M. laxa* y de laminarina de Sigma-Aldrich frente a *M. laxa*, en medio líquido con el fin de facilitar un contacto más íntimo entre extracto y moho.

Como medio líquido se utilizó un medio compuesto por un 50% de zumo de melocotón y un 50% de caldo Czaapeck a doble concentración enriquecido con un 0,1% de caseína y un 0,1% de extracto de levadura. En lo sucesivo será denominado como ZMCZB-E. Se utilizó este medio, ya que se detectó que *M. laxa* no producía micelio fértil o conidios en un medio sin zumo añadido.

##### **3.1.3.1.a. Curva de crecimiento de *M. laxa***

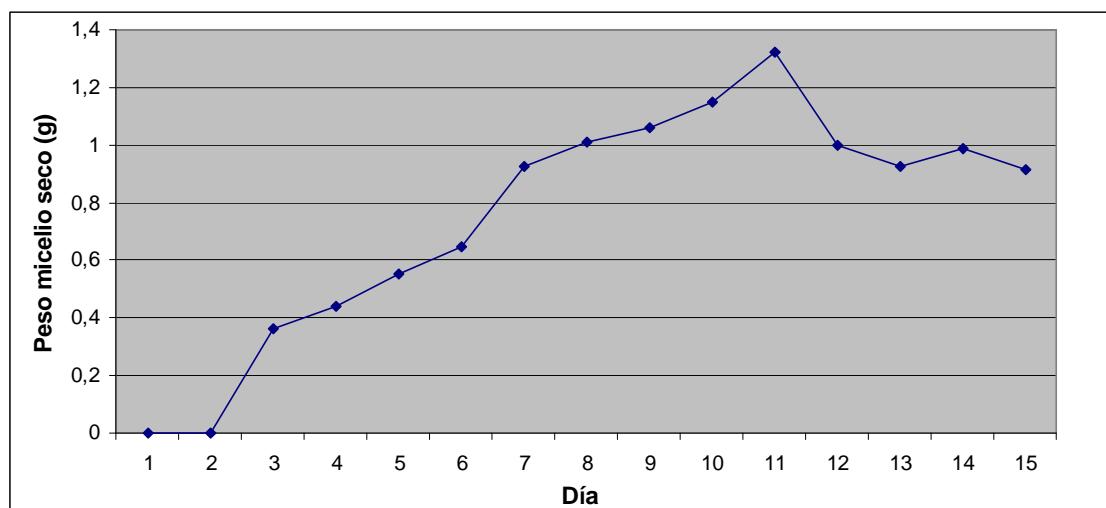
En primer lugar y para determinar el día de máximo crecimiento del moho, se realizó una curva de crecimiento de *M. laxa* en medio ZMCZB-E. Para ello, se emplearon 30 matraces con 50 mL de dicho medio y se inocularon con 1 mL de la suspensión esporal. Cada día y hasta cumplir 15 días de incubación a 25° C, se filtraban 2 matraces a través de papel Whatman nº 4, previamente pesado; posteriormente era desecado en estufa a 80° C durante 48 horas y pesado de nuevo.

Las diferencias obtenidas entre el peso del papel antes de ser utilizado y después de la filtración y desecación, nos permitió determinar la curva de crecimiento de *M. laxa*. (Gráfica 3.1)



**Gráfica 3.1:** Curva de crecimiento de *M. laxa* en caldo ZMCZB-E

También se realizó la curva de crecimiento de *M. fructicola* (Gráfica 3.2)

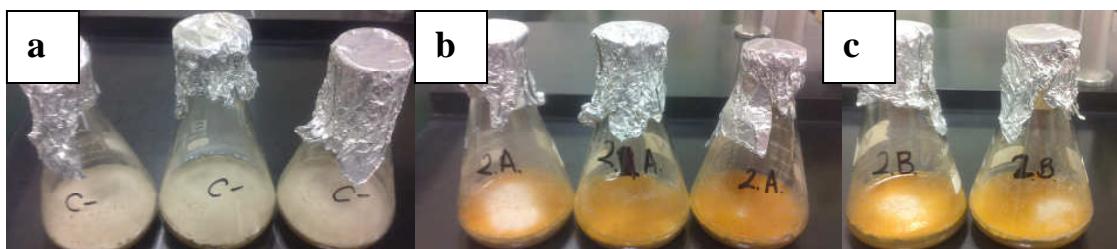


**Gráfica 3.2:** Curva de crecimiento de *M. fructicola* en caldo ZMCZB-E

El crecimiento máximo de *P. expansum*, *A. alternata* y *R. stolonifer* se estableció en 9, 12 y 8 días respectivamente (Venturini, 2004).

### 3.1.3.1.b. Determinación de la actividad antifúngica

La determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos enzimáticos se llevó a cabo por duplicado en matraces de 250 mL con un volumen de 50 mL de ZMCZB-E. A los matraces utilizados para el tratamiento, se les añadió 1 ó 2 mL de solución enzimática y 1 mL de solución de esporas de *M. laxa*. Tras su homogenización, se incubaron a 25° C durante 10 días. Además se incluyeron dos matraces control contaminados con *M. laxa*, pero sin extracto enzimático. En la imagen 3.5 se puede observar el aspecto de los matraces tras la inoculación y la incubación.



**Imagen 3.5:** Imágenes de los matraces inoculados tras la incubación: (a) Control sin tratamiento; (b) Tratamiento con 2 mL sol. enzimática de *M. laxa*; (c) Tratamiento con 1 mL sol. enzimática de *M. laxa*.

Transcurrido el periodo de incubación, se filtró el contenido de todos los matraces (control y tratamientos) a través de papel Whatman nº 4 y se desecó el papel de filtro en estufa a 80° C durante 48 h. Por diferencia de pesada, comparando con los controles, se determinó la actividad antifúngica de cada tratamiento.

### 3.1.4. Actividad antifúngica *in vivo* sobre melocotones y brotes de cerezo

Tras la determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro*, se testó la actividad de las soluciones enzimáticas *in vivo* sobre brotes de cerezo y melocotones.

El objetivo de estos experimentos era determinar la actividad de los extractos en dos situaciones reales: la infección por *M. laxa* en árboles frutales (pre-cosecha) y el biodeterioro en frutos ya recolectados (post-cosecha).

### 3.1.4.1. Determinación de la actividad antifúngica en melocotones

Las soluciones enzimáticas estudiadas fueron las obtenidas a partir del micelio de *M. laxa* y de la laminarina de Sigma-Aldrich esterilizadas por filtración y saturadas al 95% con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Todos los tratamientos se testaron por duplicado además de un control positivo contaminado solo con *M. laxa* (Imagen 3.6).



Imagen 3.6.. Melocotones inoculados con *M. laxa* y tratados con los extractos enzimáticos.

La suspensión esporal de *M. laxa* se preparó de la misma manera indicada en el apartado 3.1.1.1.

La superficie del melocotón a inocular se descontaminó previamente con un hisopo de algodón impregnado en etanol 80%. Se realizaron tres pequeñas incisiones equidistantes en la epidermis próxima a la zona peduncular con una punta de micropipeta estéril de 1 mm de profundidad; en cada uno de ellos se inocularon 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión de esporas de *M. laxa*.

Tras mantener los melocotones inoculados durante 2 horas para favorecer la aclimatación esporal, a temperatura ambiente y en cabina de flujo laminar, se aplicó el tratamiento inyectando 15  $\mu\text{l}$  y 45  $\mu\text{l}$  de cada solución enzimática.

Los frutos fueron conservados a 20° C durante 10 días, tiempo tras el cual se procedió a registrar el porcentaje de heridas o incisiones infectadas y el diámetro de éstas.

### 3.1.4.2. Determinación de la actividad antifúngica en brotes de cerezo

Para este experimental se emplearon como tratamientos las soluciones enzimáticas obtenidas a partir del micelio de *M. laxa*, de la laminarina (Sigma-Aldrich), una suspensión de esporas de *P. purpurogenum* y un fungicida comercial (Tebuconazol). Además se incluyeron controles negativos únicamente inoculados con *M. laxa*.

La obtención del inóculo fúngico con *M. laxa* se realizó de la misma manera indicada anteriormente.

En la base de cada brote (1 cm por debajo) se realizó una incisión con bisturí estéril de 3-4 mm de longitud, 1 mm de anchura y 0,5 mm de profundidad. En cada incisión se inocularon 15 µl de la solución de esporas de *M. laxa*. Seguidamente se tapó la herida con algodón estéril prehumedecido en agua destilada estéril, se envolvió el brote con papel de aluminio y se mantuvo así durante 24 h, con el fin de que *M. laxa* se adapte a las nuevas condiciones. Transcurrido este periodo se aplicó cada tratamiento. Las soluciones enzimáticas obtenidas a partir del micelio de *M. laxa* y de la laminarina de Sigma-Aldrich se aplicaron rociando el brote con un pulverizador, mientras que el resto de tratamientos se inocularon (15 µl) directamente en la herida (Imagen 3.7).



**Imagen 3.7:** Incisión e inoculación con solución enzimática de *M.laxa* (izquierda) y brote protegido con papel aluminio tras la inoculación (derecha)

### **3.1.5. Determinación de la actividad enzimática de las soluciones enzimáticas**

Se determinó por duplicado la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de las soluciones enzimáticas obtenidas a partir del micelio de *M. laxa*, *M. fructicola* y de laminarina de Sigma-Aldrich mediante el Malt beta-D-glucanase assay kit (azo-barley glucan) (Megazyme, Ref. K-MBGL). Para ello se adicionó 0,5 mL de la solución de sustrato azo-barley glucan (precalentado a 30° C) a tubos de centrífuga y se preincubaron a 30° C durante 5 min. También se preincubaron las soluciones enzimáticas a 30° C durante 5 min. A continuación, a cada uno de los tubos de centrífuga con 0,5 mL de solución de sustrato azo-barley glucan se le añadió 0,5 mL de la solución enzimática problema, se homogeneizaron fuertemente y se incubaron a 30° C durante 10 min. Transcurrido este periodo se adicionaron 3 mL de solución precipitante A (disolver 40 g de acetato de sodio y 4 g de acetato de zinc en 150 mL de agua destilada, ajustar el pH a 5 con HCl y el volumen a 200 mL). Posteriormente se añadieron 800 mL de metoxietanol y se mezcló de forma apropiada. Se dejaron incubar los tubos durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 1000 g durante 10 min. Finalmente se realizó la lectura de la absorbancia a 590 nm con un espectrofotómetro (Spectronic 20, BAUSCH LOMB). Se preparó un control para establecer la lectura del blanco con agua destilada estéril en lugar de solución enzimática.

Para el cálculo de la actividad se utilizó la ecuación  $Y = MX + C$  (Figura 3.3)

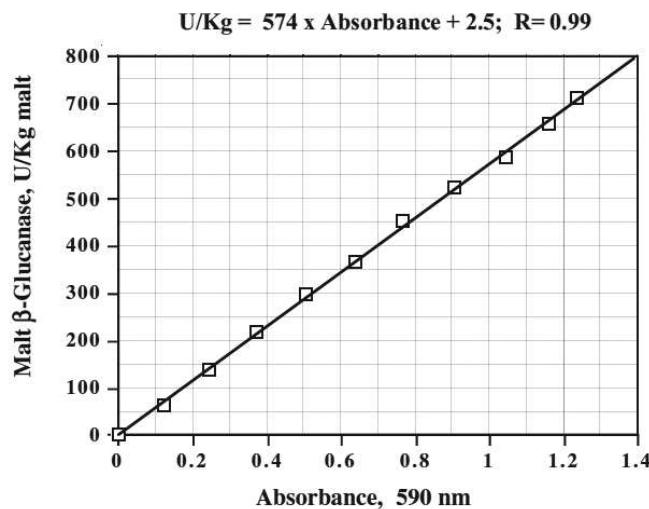
Donde:

$Y$  = actividad malta  $\beta$ -glucanasa (en U/kg de malta)

$M$  = pendiente de la recta de calibración

$X$  = absorbancia de la reacción a 590 nm

$C$  = punto de corte con el eje  $Y$



**Figura 3.4:** Curva estándar de la malta  $\beta$ -glucanasa en Azo barley glucan a pH 4,6 y 30°C durante 10 min, utilizando 3 ml de solución precipitante A

### 3.1.6. Tabla resumen

La tabla 3.2 muestra un resumen con todos los medios, métodos, soluciones, concentraciones y mohos testados hasta ahora.

**Tabla 3.2:** Tabla resumen de los ensayos realizados para determinar la actividad antifúngica de enzimas procedentes de *P. purpurogenum*

Medio	Método de determinación de la actividad	Soluciones enzimáticas purificadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a partir de:	Concentración	Moho testado (inóculo)
<b>ENSAYOS IN VITRO</b>				
Agar PDA	Difusión en agar (disco)	Glucosa	–	<i>M. laxa</i> <i>M. fructicola</i> <i>P. expansum</i> <i>R. stolonifer</i> <i>A. alternata</i> (suspensión esporal homogeneizada con asa de Drigalski)
		<i>M. laxa</i>	–	
		<i>M. fructicola</i>	–	
		<i>P. expansum</i>	–	
		<i>R. stolonifer</i>	–	
		<i>A. alternata</i>	–	
		Laminarina (Sigma-Aldrich)	–	
		<i>Laminaria ochroleuca</i>	–	
		Laminarina (Arvensis)	–	
Agar PDA-E+S.E.	Adición de enzimas en medio sólido	<i>M. laxa</i>	2%	<i>M. laxa</i> (botón)
		<i>M. fructicola</i>	2%	
		Laminarina (Sigma-Aldrich)	2%	
Caldo ZMCZ-E+S.E.	Adición de enzimas en medio líquido	<i>M. laxa</i>	2% 4%	<i>M. laxa</i> (suspensión esporal)
		Laminarina (Sigma-Aldrich)	2% 4%	
<b>ENSAYOS IN VIVO</b>				
Melocotón comercial	Inoculación superficial	<i>M. laxa</i>	–	<i>M. laxa</i> (suspensión esporal)
		Laminarina (Sigma-Aldrich)	–	
Brotes de cerezo	Inoculación superficial	<i>M. laxa</i>	–	<i>M. laxa</i> (suspensión esporal)
		Laminarina (Sigma-Aldrich)	–	

### **3.2. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE METABOLITOS PROCEDENTES DE FRUTOS DEL ACLAREO FRENTE A *MONILINIA LAXA* Y *M. FRUCTICOLA***

Actualmente se están llevando a cabo estudios por parte del Grupo de Investigación en Alimentos de Origen Vegetal de la Universidad de Zaragoza, del contenido fenólico en determinados frutos de hueso, especialmente en estadíos inmaduros (Imagen 3.8). Los fenoles son reconocidos antioxidantes y antimicrobianos, por lo que se decidió estudiar su posible actividad frente a los microorganismos fitopatógenos, objeto de estudio en el presente proyecto.



**Imagen 3.8:** Frutos de aclareo de los principales frutales de hueso

Para testar la capacidad antimicrobiana de los metabolitos procedentes de frutos del aclareo, se siguieron dos estrategias distintas. Por un lado el empleo de extractos acuosos o metanólicos y por otro lado el de aceites esenciales.

Para la obtención de los primeros, se siguió el protocolo siguiendo de Venturini et al. (2008) y para la extracción de los aceites esenciales, se siguió el protocolo descrito por Abbasi et al. (2008), Eikani et al. (2012) y Goula (2013).

La actividad antimicrobiana se evaluó tanto en medio sólido, siguiendo el método de difusión en agar y el método del agar enriquecido con adición de extractos procedentes de frutos del aclareo, como en medio líquido también enriquecido y con adición de extractos.

### **3.2.1. Obtención de los extractos acuosos y metanólicos**

Los frutos seleccionados del aclareo (melocotón, nectarina, albaricoque, paraguayo, ciruela y cereza) fueron triturados en un molino de martillos refrigerado (IKA Labortechnik) para después ser desecados en horno de aire caliente (Selecta) a 50° C durante 24-48 horas. Posteriormente se molieron de nuevo en molino refrigerado (IKA Labortechnik) y se tamizaron las muestras (20 mm de luz), se envasaron a vacío y se conservaron a temperatura ambiente y oscuridad. Para la extracción de los compuestos fue necesario moler la muestra con un molinillo de cuchillas con refrigeración (IKA Labortechnik) hasta hacerla polvo con el fin de facilitar la extracción de sus componentes.

Se tomaron 5 g. y se mezclaron con 50 mL del disolvente (agua destilada o metanol al 99,5%, según corresponda). Esta solución, se homogeneizó mediante ultratúrrax (T25 basic, IKA Labortechnik) y se agitó en Vibromatic (Selecta) durante 30 min a 600 rpm. Una vez transcurrido este periodo se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos a 20°C. Tras la centrifugación, se procedió a separar el sobrenadante del sedimento filtrando el primero a través de papel Whatman nº4.

Tras la filtración, se procedió de forma distinta según fuera extracción acuosa o metanólica. Para la de tipo acuoso, los tubos con el sobrenadante se dispusieron en un baño termostático a 60° C para concentrar la muestra hasta un volumen final de 5 mL. El tiempo de evaporación fue de unas 48 horas. Para la extracción metanólica, se utilizó un concentrador con corriente de nitrógeno (TurboVap II, Zymark). La temperatura durante la concentración fue de 40° C y la presión de 0,5 bar. El extracto se concentró hasta obtener un volumen final de 5 ml. El tiempo necesario para la extracción metanólica hasta dicha cantidad fue de unos 40 minutos. Una vez obtenidos los extractos, se almacenaron en congelación a -18° C hasta su uso.

Los extractos obtenidos para el estudio de su actividad antifúngica fueron doce (6 extractos acuosos y 6 extractos metanólicos) procedentes de las 6 frutas seleccionadas.

### **3.2.2 Obtención de los aceites esenciales**

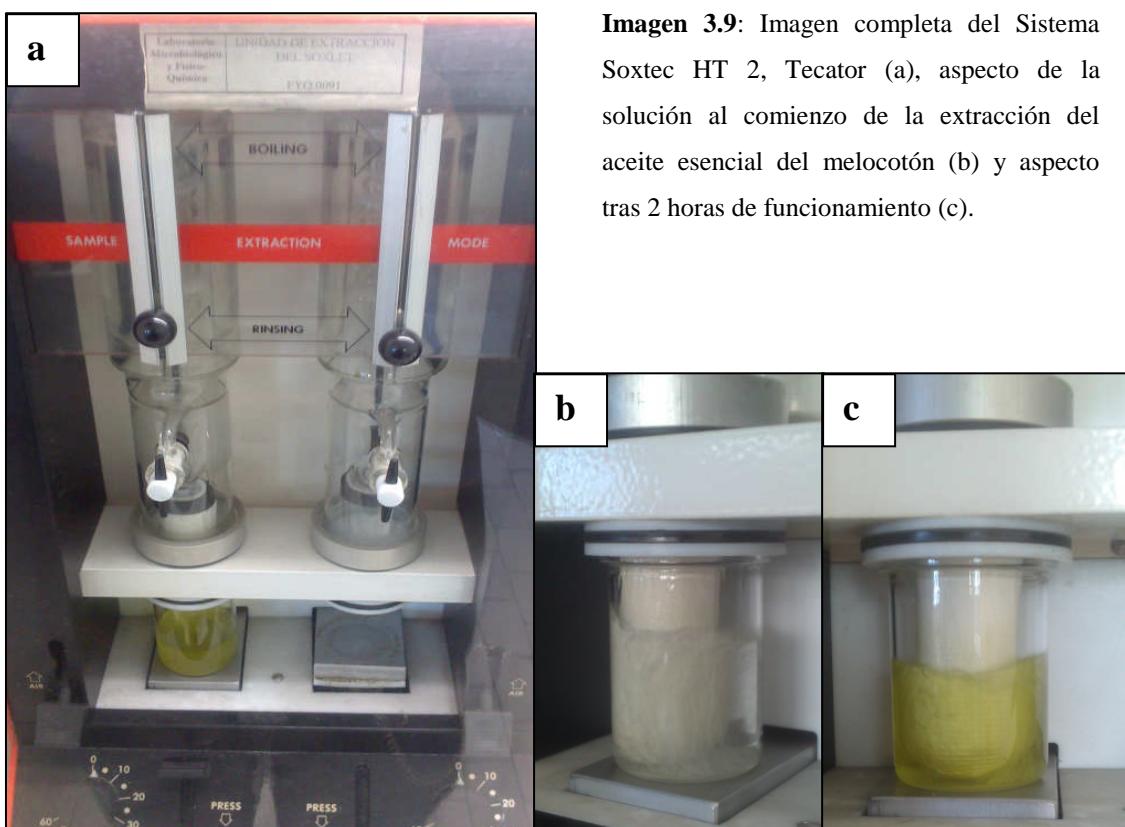
En este caso fueron numerosos los ensayos realizados hasta dar con el procedimiento más eficaz. Todos ellos se realizaron con el fruto de aclareo que más abundaba, el melocotón. Tras seleccionar el proceso óptimo, se testó el potencial antimicrobiano del resto de frutos del aclareo.

En primer lugar se probó una hidrodestilación empleando grandes cantidades de melocotón triturado, dada la escasa presencia de aceites esenciales en estas matrices alimentarias. Sin embargo, no se consiguió el objetivo propuesto.

#### **Ensayo 1**

Posteriormente se efectuó una extracción más potente mediante el Soxtec (Soxtec System HT 2, Tecator). Debido a sus dimensiones, la cantidad de muestra a emplear estaba limitada por el vaso que contenía el líquido extractor. Para que el aparato funcionase de manera óptima, la cantidad de líquido a emplear fue estimada en unos 80 mL. En el artículo publicado por Eikani et al. (2012), se indica que para un volumen determinado de líquido, la muestra a emplear es 10 veces menor. Es por ello que se emplearon 8 g de melocotón triturado. Como líquido extractor se emplearon los mencionados 80 mL de hexano. La temperatura de extracción la marcaba la temperatura de ebullición del hexano, la cual se consiguió ajustando la máquina a 118° C. Una vez alcanzado el punto de ebullición, se mantuvo la extracción durante 2 horas.

Como resultado se obtuvo una solución compuesta por hexano y el supuesto aceite esencial disuelto en él (Imagen 3.9).



Esta solución fue concentrada en Turbovap (Zymark), a unas condiciones de presión de 0,5 bares y temperatura de 45° C durante 30 minutos, hasta eliminar por completo el disolvente, quedando únicamente el aceite esencial.

Sin embargo y debido a la viscosidad tan elevada que tenía, era complicado extraerla de los matraces específicos del Turbovap. En principio se trató de recuperar el aceite calentando con agua caliente para reducir la viscosidad. Sin embargo, al tratar de recuperarlo con una pipeta, volvía a solidificar, quedando atrapado en las paredes, e impidiendo su recuperación. Únicamente se consiguió recoger en un vial transparente una sola gota de aceite.

El siguiente paso, fue recoger el aceite del matraz del Turbovap con una espátula; pero a pesar de raspar todo lo posible, la mayor parte del aceite aun permanecía pegado en las paredes del matraz y la recuperación era muy escasa. La cantidad que se consiguió recoger se añadió al vial donde previamente guardamos el aceite obtenido en el paso anterior.

Se decidió entonces aumentar la consistencia del aceite esencial conservándolo a 4º C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se intentó su recuperación nuevamente por raspado con una espátula, consiguiendo nuevamente cantidades muy escasas y añadiéndolas al mencionado vial de recogida.

Todo el “aceite puro” recuperado en las 3 primeras extracciones realizadas, se guardó, como hemos indicado, en el mismo vial obteniendo una cantidad muy discreta de aceite esencial de 0,01 g. Esta cantidad fue resuspendida en 900 µL de agua destilada estéril y Tween 20 al 5%. El aceite así resuspendido se utilizó para determinar su actividad antimicrobiana frente a *M. laxa* y *M. fructicola*.

## **Ensayo 2**

En una nueva extracción, la recuperación del aceite se hizo nuevamente con espátula al igual que anteriormente. El aceite puro obtenido y guardado en un nuevo vial transparente, se resuspendió en 900 µL de agua destilada estéril y Tween 20 al 5%, tratando de homogenizar con la propia espátula. Antes de testar el nuevo aceite así obtenido, se concentró en baño termostático a 65º C durante 1 hora, tras la cual se hicieron nuevas pruebas de actividad antifúngica frente a *M. laxa* y *M. fructicola*, siendo el segundo ensayo.

## **Ensayo 3**

En este caso, la recuperación del aceite puro se hizo añadiendo los 900 µL de agua destilada estéril directamente en el matraz del Turbovap y raspando con espátula. De este modo, la recuperación fue ligeramente superior que en ensayos anteriores, puesto que el aceite se separaba más fácilmente de las paredes del matraz. La suspensión se recogió con micropipeta y fue llevada a un nuevo vial transparente. Se introdujo un imán, y se homogeneizó en agitador magnético (BasicMagMix, OVAN) a una temperatura de 50º C durante 15 minutos. Tras su homogeneización, se concentró en baño de termostático a 65º C durante 2 horas. Este aceite se testó frente a *M. laxa*, *M. fructicola*, *P. expansum*, *A. alternata* y *R. stolonifer*.

## **Ensayo 4**

Para el cuarto ensayo se actuó de la misma manera que en el anterior, con la excepción del tiempo de concentración en baño termostático que se incrementó hasta las 4 horas. Los mohos testados fueron *M. laxa* y *M. fructicola*.

## **Ensayo 5**

En el quinto ensayo, el procedimiento fue el mismo, pero para estandarizar el proceso, se calcularon las concentraciones finales. En este caso, el aceite permaneció en baño termostático a 65° C hasta que se concentró un 50%. El tiempo de concentración fue de unas 6 horas. Transcurrido dicho tiempo, se hicieron pruebas frente a *M. laxa*, *M. fructicola*, *P. expansum*, *A. alternata* y *R. stolonifer* impregnando el disco con 20 µL. Debido a la densidad de la solución obtenida y con el fin de que se difundiera de manera óptima alrededor del disco, se hizo una segunda prueba, sólo frente a *M. laxa*, e impregnando los discos con 25 µL. En lo sucesivo, los discos serán impregnados con este volumen de aceite esencial.

## **Ensayo 6**

Puesto que el rendimiento de la recuperación del aceite seguía siendo escaso, se decidió optar por un nuevo método de recuperación: concentrar en Turbovap hasta una cantidad aproximada de 5 mL. Este volumen fue fácilmente recuperable con una pipeta con la que se vertió el contenido en un vial transparente, donde se concentraría hasta pesada constante mediante un concentrador menos potente que el Turbovap, el Tembloc (Selecta). De este modo, fue posible concentrar directamente sobre el vial, quedando el 100% de aceite extraído en el vial en el que posteriormente se resuspendería. Este último proceso de suspensión se hizo de la misma manera que anteriormente, es decir, añadiendo 900 µL de agua destilada estéril y Tween 20 al 5%. El proceso de homogenización en agitador magnético se realizó a 50° C durante 20 minutos. Posteriormente se concentró en baño termostático a 65° C hasta 3 concentraciones distintas (25, 50 y 75%) y se hicieron pruebas para cada una de ellas. Los microorganismos testados en este ensayo fueron *M. laxa* y *M. fructicola*.

Este último proceso de extracción, resuspensión y concentración pareció ser el más eficaz, por lo que todas las extracciones posteriores se realizaron de acuerdo al mismo.

### **3.2.3 Actividad antifúngica *in vitro* en medio sólido**

#### **3.2.3.1 Método de difusión en agar con extractos acuosos y metanólicos**

Se ha estudiado la actividad antifúngica de los extractos procedentes de los frutos del aclareo frente a los mohos *M. laxa*, *M. fructicola* y *A. alternata*.

Este experimento fue realizado en placas de Petri con dos medios agarados distintos: PDA para *A. alternata* y una mezcla de PDA y zumo de melocotón para *M. laxa* y *M. fructicola*, con el objetivo de facilitar su esporulación. Este último medio fue preparado mezclando 50% de PDA a doble concentración, 50% de zumo de melocotón y enriquecido con un 0,1% de extracto de levadura y un 0,1% de caseína (ZMPDA-E).

En primer lugar, se preparó una suspensión esporal de cada moho a testar. Las placas con el medio ZMPDA-E fueron sembradas con *M. laxa* y *M. fructicola* añadiendo 0,2 mL de dicha suspensión y extendiendo con asa de Drigalski. Las placas con el medio PDA fueron sembradas añadiendo 0,1 mL de la solución de esporas de *Alternaria* y extendiendo con asa de Drigalski. Una vez sembradas las placas con el correspondiente moho, se procedió a colocar los discos impregnados en los doce extractos obtenidos. Cada tratamiento se realizó por duplicado. Las placas sembradas con *A. alternata* se incubaron a 28º C durante 7 días y las placas de *M. laxa* y *M. fructicola* a 25º C durante 10 días.

#### **3.2.3.2 Método de difusión en agar con aceites esenciales**

Las placas de PDA se sembraron con 0,2 mL de la suspensión esporal, en el caso de *M. laxa* y *M. fructicola*, y 0,1 mL en el caso de *P. expansum*, *R. stolonifer* y *A. alternata* y se extendieron con asa de Drigalski. Una vez inoculadas, se colocó en el

centro de la placa un disco de celulosa estéril impregnado en 25 µL del aceite esencial a testar. Las placas se incubaron a 25° C en oscuridad, y se observaron diariamente.

### **3.2.3.3 Método del agar enriquecido con adición de extractos acuosos y metanólicos**

Los extractos utilizados fueron los mismos que para el método de difusión en agar. Sin embargo, en base a los resultados obtenidos, se consideró oportuno reducir su número. Finalmente se seleccionaron 5 extractos metanólicos (melocotón, albaricoque, paraguayo, ciruela y cereza) y 2 extractos acuosos (nectarina y ciruela).

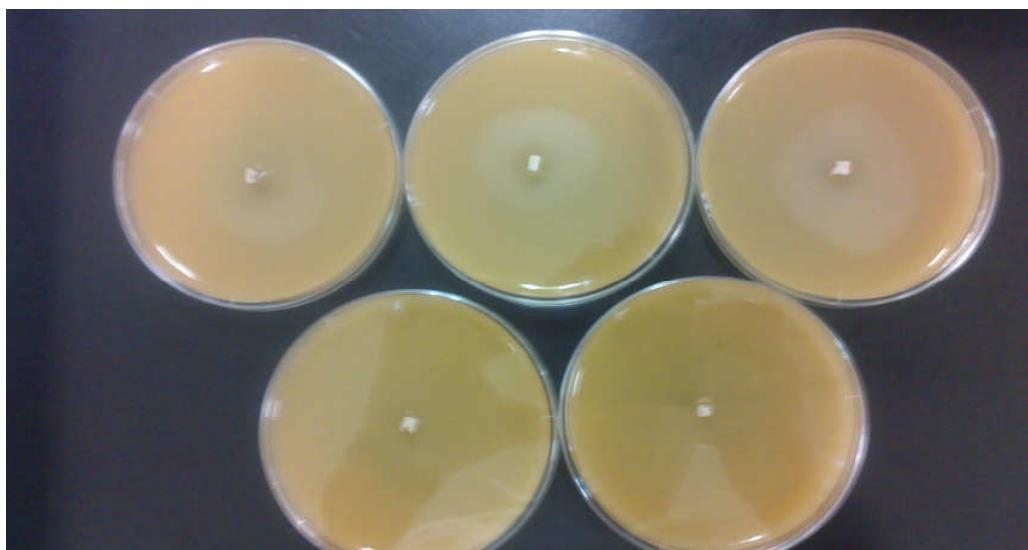
Además se incluyeron dos controles, el control negativo (agar enriquecido sin extractos) y control con metanol, con el fin de demostrar que no es el metanol el que inhibe el crecimiento del moho. Se realizaron 5 réplicas de cada tratamiento y cada control.

#### Preparación del agar enriquecido con los extractos procedentes de frutos del aclarero.

El medio agarado utilizado fue ZMPDA-E. Una vez esterilizado y atemperado, se procedió a añadir el extracto a una concentración final del 4%. Este medio se denominará en lo sucesivo ZMPDA-E+Ex.

#### Siembra en botón de *M. laxa*

Una vez solidificado el agar, se procedió a la siembra de *M. laxa*. Para ello, se utilizó una placa de PDA con crecimiento manifiesto de *M. laxa*. Con la ayuda de un bisturí y pinzas estériles, se cortaron pequeños cuadrados de cultivo de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, que se situaron en el centro de las placas con el medio ZMPDA-E+Ex (Imagen 3.10). Una vez sembradas, fueron incubadas en oscuridad a 25° C.



**Imagen 3.10:** Siembra en botón de *M. laxa* sobre medio ZMPDA-E+Ex.

La inhibición del crecimiento del moho respecto al control se evaluó diariamente hasta que en las placas control el microorganismo fitopatógeno ocupaba toda la superficie.

Se pudo observar que el agar ZMPDA-E+Ex perdía viabilidad rápidamente (se deshidrataba y resquebrajaba quedando inutilizado a los pocos días). Por tanto, se decidió repetir el experimental con el mismo medio privado del zumo de melocotón PDA-E+Ex. La concentración final del extracto también fue del 4%.

#### **3.2.3.4 Método del agar enriquecido con adición de aceites esenciales**

Se seleccionaron los aceites que mejores resultados habían dado en el método por difusión en agar (melocotón y cereza).

##### Preparación del agar enriquecido con los extractos procedentes de frutos del aclareo.

El medio agarado consistió en PDA enriquecido con un 0,1% de extracto de levadura y 0,1% de caseína (PDA-E), al que se le añadió una concentración del 2% del aceite esencial a testar, quedando el medio denominado como PDA-E+A.E.

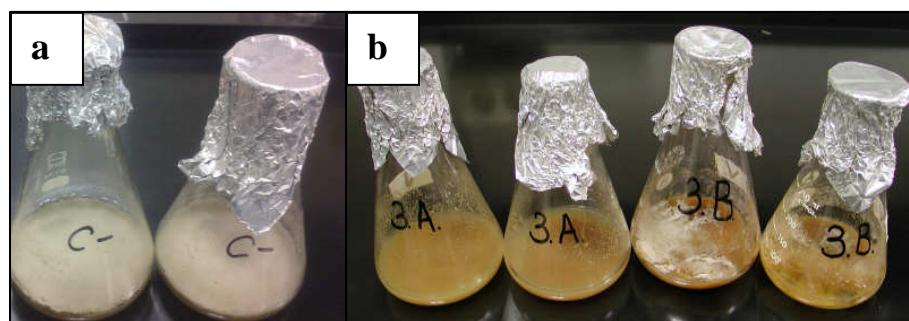
Al igual que en el ensayo anterior, se sembró *M.laxa* en botón en el centro de la placa y éstas fueron incubadas a 25° C. El experimento se realizó por duplicado.

### **3.2.4 Actividad antifúngica *in vitro* en medio líquido**

#### **3.2.4.1. Medio líquido enriquecido con adición de extractos acuosos y metanólicos**

En esta fase, se valoró la actividad antifúngica de los 12 extractos obtenidos (acuosos y metanólicos) frente a *M. laxa*, en medio de cultivo líquido que posibilita un contacto más íntimo entre el extracto y el moho.

Como medio líquido se utilizó el caldo ZMCZB-E y la suspensión esporal de *M. laxa* se preparó del mismo modo que en ensayos anteriores. Los tratamientos se llevaron a cabo por duplicado en matraces de 250 mL con un volumen de 50 mL de ZMCZ-E. A aquellos matraces utilizados para el tratamiento, se les añadió 1 mL del extracto y 1 mL de la suspensión esporal de *M. laxa* y tras su homogeneización, se incubaron a 25° C durante 10 días (Imagen 3.11). Transcurrido ese tiempo, se procedió a su filtración con papel Whatman nº4.



**Imagen 3.11:** Matraces con caldo ZMCZB-E inoculados con *M. laxa* e incubados a 25° C / 10 días;

(a): sin adición de extractos (control); (b): con 1 mL de extracto metanólico de melocotón.

Todos los papeles Whatman nº4 se desecaron en estufa a 80° C durante 48 h y por diferencia de pesada, comparando con los controles (caldo ZMZCB-E inoculado con *M. laxa* sin extracto), se determinó la actividad antifúngica o el porcentaje de inhibición de cada extracto.

#### **3.2.4.2. Medio líquido enriquecido con adición de aceites esenciales**

Con el mismo objetivo se repitió la experiencia en este caso con los aceites esenciales procedentes de los frutos del aclareo.

La escasa cantidad disponible de albaricoque del aclareo, solo permitió llevar a cabo el estudio con aceites esenciales de melocotón y cereza.

El medio líquido utilizado fue caldo Czapek enriquecido con un 0,1% de extracto de levadura y un 0,1% de caseína (CZB-E). Los aceites esenciales se añadieron a matraces de 250 mL con un volumen de 50 mL de CZB-E y a una concentración del 2% (CZB-E+A.E.).

La metodología seguida fue idéntica a la descrita en el apartado anterior.

### **3.2.5. Actividad antifúngica *in vivo* en melocotones**

Tras la determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro*, se valoró dicha actividad sobre melocotones de calidad comercial. En este caso, se decidió aplicar el aceite esencial procedente de melocotones del aclareo. Los mohos testados en este experimento fueron *M. laxa* y *M. fructicola*.

La preparación de los inóculos fúngicos y la descontaminación de la superficie de los melocotones, se efectuó como se ha señalado en apartados anteriores. A continuación, se realizaron dos pequeñas incisiones en la epidermis de la zona peduncular con una punta de micropipeta estéril de 1 mm de profundidad. Estas incisiones fueron inoculadas con 15 µL de la suspensión esporal.

Tras mantener los melocotones inoculados durante 2 horas a temperatura ambiente y en cabina de flujo laminar para favorecer la implantación del moho, se aplicó el tratamiento inyectando 15 µL de aceite esencial de melocotón en cada incisión.

Se dejó también un lote control de melocotones inoculados, pero sin tratamiento con el aceite esencial.

Todos los frutos fueron mantenidos en estufa a 25º C y se hizo un seguimiento diario del porcentaje de incisiones infectadas y diámetro de la lesión.

### 3.2.6. Tablas resumen

La tabla 3.3 resume los medios empleados, métodos ensayados, extractos acuosos y metanólicos utilizados y mohos testados en este apartado.

Las tablas 3.4 y 3.5 resumen todos los ensayos realizados con los aceites esenciales procedentes de frutos del aclareo y su actividad frente a los mohos testados.

**Tabla 3.3:** Tabla resumen de los ensayos realizados para determinar la actividad antifúngica de extractos acuosos y metanólicos procedentes de frutos de aclareo.

Medio	Método de determinación de la actividad	Extracto acuoso (Ac.) o metanólico (Met.)	Concentración en el medio	Moho testado (inóculo)
<b>ENsayos IN VITRO</b>				
Agar PDA	Difusión en agar (disco)	Melocotón Ac.	–	<i>M. laxa</i> <i>M. fructicola</i> <i>A. alternata</i> (suspensión esporal homogeneizada con asa de Drigalski)
		Melocotón Met.	–	
		Nectarina Ac.	–	
		Nectarina Met.	–	
		Albaricoque Ac.	–	
		Albaricoque Met.	–	
		Paraguayo Ac.	–	
		Paraguayo Met.	–	
		Ciruela Ac.	–	
		Ciruela Met.	–	
		Cereza Ac.	–	
		Cereza Met.	–	
Agar PDA-E+Ex.	Adición de extractos en medio sólido	Melocotón Met.	4%	<i>M. laxa</i> (botón)
		Albaricoque Met.	4%	
		Paraguayo Met.	4%	
		Ciruela Met.	4%	
		Cereza Met.	4%	
		Nectarina Ac.	4%	
		Ciruela Ac.	4%	
Caldo ZMCZB-E+Ex.	Adición de extractos en medio líquido	Melocotón Met.	2%	<i>M. laxa</i> (suspensión esporal)
		Albaricoque Met.	2%	
		Paraguayo Met.	2%	
		Ciruela Met.	2%	
		Cereza Met.	2%	
		Nectarina Ac.	2%	
		Ciruela Ac.	2%	

**Tabla 3.4:** Tabla resumen de los ensayos realizados para determinar la actividad antifúngica de aceites esenciales (A.E.) procedentes de frutos de aclareo con el método de difusión en agar.

Medio	Método de determinación de la actividad	NºEnsayo/A.E.	Concentración (baño termostático)	Moho testado (suspensión esporal + asa de Drigalski)
<b>ENSAYOS IN VITRO</b>				
Agar PDA	Difusión en agar (disco)	1. A.E.M.	–	<i>M. laxa</i> <i>M. fructicola</i>
		2. A.E.M	1 hora	<i>M. laxa</i> <i>M. fructicola</i>
		3. A.E.M.	2 horas	<i>M. laxa</i> <i>M. fructicola</i> <i>P. expansum</i> <i>R. stolonifer</i> <i>A. alternata</i>
		4. A.E.M	4 horas	<i>M. laxa</i> <i>M. fructicola</i>
		5. A.E.M.	50%	<i>M. laxa</i> <i>M. fructicola</i> <i>P. expansum</i> <i>R. stolonifer</i> <i>A. alternata</i>
		6. A.E.M.	25%	
			50%	<i>M. laxa</i>
			75%	
		7. A.E.N	40%	<i>M. laxa</i> <i>M. fructicola</i> <i>P. expansum</i> <i>R. stolonifer</i> <i>A. alternata</i>
		8. A.E.N.	25%	
			50%	<i>M. laxa</i>
			75%	<i>M. fructicola</i>
		9. A.E.P.	25%	
			50%	<i>M. laxa</i>
			75%	<i>M. fructicola</i>
		10. A.E.C	25%	
			50%	<i>M. laxa</i>
			75%	<i>M. fructicola</i>
		11. A.E.A.	25%	
			50%	<i>M. laxa</i>
			75%	<i>M. fructicola</i>
		12.A.E.C-M	25%	
			50%	<i>M. laxa</i>
			75%	<i>M. fructicola</i>

**Tabla 3.5:** Tabla resumen de los ensayos realizados para determinar la actividad antifúngica de aceites esenciales procedentes de frutos del aclareo.

Medio	Método de determinación de la actividad	Aceite esencial procedente de:	Concentración en el medio	Moho testado (inóculo)
<b>ENSAYOS IN VITRO</b>				
Agar PDA-E+A.E.	Adición de aceites en medio sólido	Melocotón	2%	<i>M. laxa</i> <i>M. fructicola</i> (botón)
		Cereza	2%	<i>M. laxa</i> <i>M. fructicola</i> (botón)
Caldo CZB-E+A.E.	Adición de aceites en medio líquido	Melocotón	2%	<i>M. laxa</i> <i>M. fructicola</i> (suspensión esporal)
		Cereza	2%	<i>M. laxa</i> <i>M. fructicola</i> (suspensión esporal)
<b>ENSAYOS IN VIVO</b>				
Melocotón Comercial	Inoculación superficial	Melocotón	–	<i>M. laxa</i> <i>M. fructicola</i> (suspensión esporal)

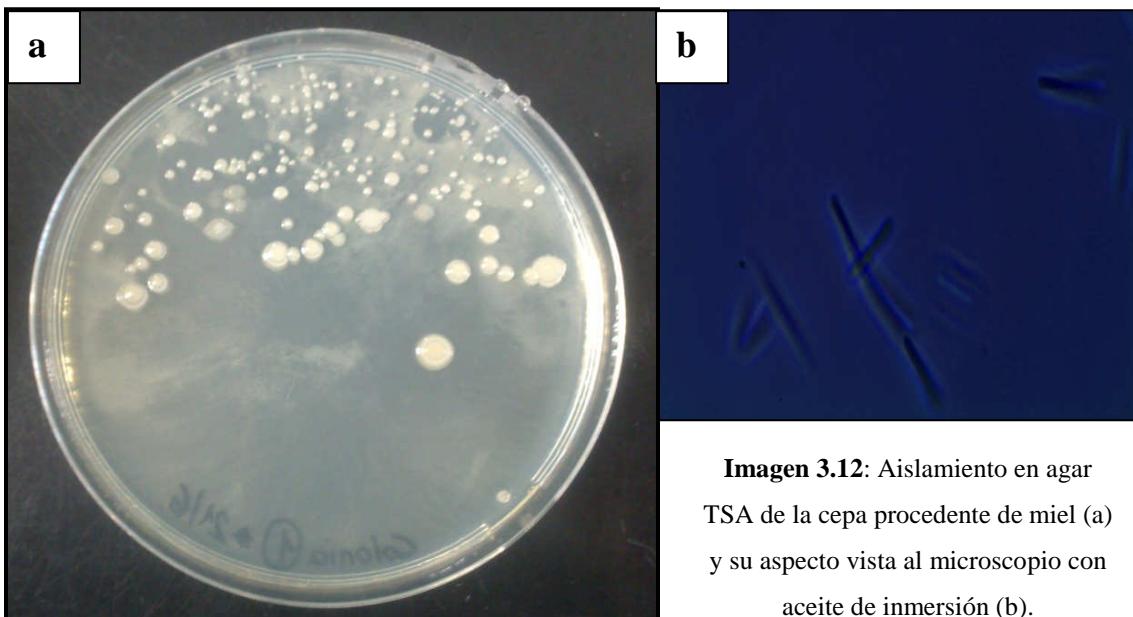
### **3.3. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE UNA CEPA BACTERIANA DE *PAENIBACILLUS POLYMYXA* AISLADA DE MIEL**

Se realizó un experimento de biocontrol utilizando una cepa bacteriana aislada durante un análisis microbiológico rutinario de distintas muestras de miel. En las placas de agar PCA utilizadas para el recuento de la microbiota total, se había observado cómo algunas colonias con apariencia bacteriana producían una inhibición del crecimiento de las colonias de mohos presentes; por este motivo, se procedió a su aislamiento e identificación.

Para determinar su actividad frente a *M. laxa* y *M. fructicola* se utilizó el método de inhibición en agar, muy similar al método de difusión en agar, pero en este caso depositando directamente el microorganismo inhibidor sobre placas de agar PDA previamente inoculadas con el moho a testar. Tras este ensayo *in vitro* se procedió a realizar un ensayo *in vivo* para determinar la acción inhibitoria de esta cepa sobre el crecimiento de ambas especie de *Monilinia* en melocotones inoculados. El proceso seguido para la identificación de la cepa bacteriana así como los resultados de los ensayos de inhibición se detallan a continuación.

#### **3.3.1. Identificación de la cepa microbiana aislada**

Tras su aislamiento en agar TSA mediante siembra por agotamiento e incubación a 30° C durante 24 horas en condiciones de aerobiosis, se procedió a su observación al microscopio (1000X). Se apreciaron las siguientes características: bacilos grandes móviles, con espora central o subterminal deformante. La tinción Gram dio como resultado una bacteria Gram + y la prueba del hidróxido potásico (KOH) negativa. La imagen 2.12 nos muestra el aspecto de las colonias de dicha cepa en agar TSA (a) y bajo observación microscópica (b). Debido a la elevada movilidad de los bacilos no fue posible tomar una imagen más nítida.



**Imagen 3.12:** Aislamiento en agar TSA de la cepa procedente de miel (a) y su aspecto vista al microscopio con aceite de inmersión (b).

Así mismo, esta cepa fue incubada a 37° C, donde tras 5 días, no se observó crecimiento alguno, descartando por tanto su poder patógeno en una supuesta infección alimentaria del consumidor.

Todas estas características demostraban que la cepa pertenecía al Gº *Bacillus* o géneros afines. Por ello se procedió a su identificación mediante el sistema miniaturizado API 50 CHB (Biomerieux), constituida por 50 carbohidratos y que está diseñada para la identificación de *Bacillus* o especies afines (bacterias esporuladas aer-anaerobias facultativas). El código numérico obtenido de la lectura de las 50 pruebas bioquímicas, se introdujo en el sistema informatizado Apiweb (Biomerieux); dicho sistema identificó la cepa con un porcentaje de identificación del 96,9% (muy buena identificación) como ***Paenibacillus polymyxa***. Sabemos por la bibliografía existente que muchas cepas de esta especie son capaces de producir un antibiótico conocido como polimixina.

Una vez identificada bioquímicamente se envió a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) donde la técnica de PCR confirmó nuestro resultado.

### **3.3.2. Actividad antifúngica *in vitro* en medio sólido**

#### **3.3.2.1. Método de difusión en agar**

Esta cepa de *P. polymyxa* fue sembrada en tubos conteniendo caldo Brain Heart Infusion (BHI) que se incubaron a 30° C durante 24 horas en régimen aeróbico.

Las placas de PDA se inocularon con 0,2 mL de la suspensión de esporas de *M. laxa* y *M. fructicola* que fue extendida con asa de Drigalski. A continuación, se sembró *P. polymyxa* con un asa de siembra y trazando una línea vertical en el centro de la placa. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 25° C.

### **3.3.3. Actividad antifúngica *in vivo* en melocotones**

Tras la determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro*, se testó la actividad antifúngica de *P. polymyxa* sobre melocotones de calidad comercial. Los mohos testados fueron los mismos señalados anteriormente.

La preparación del inóculo fúngico y la descontaminación de la superficie de los melocotones también se hizo de la misma manera. A continuación, se realizaron dos pequeñas incisiones en la epidermis de la zona peduncular con una punta de micropipeta estéril de 1 mm de profundidad. Las incisiones realizadas fueron inoculadas con 15 µL de la suspensión esporal.

Tras mantener los melocotones inoculados durante 2 horas a temperatura ambiente y en cabina de flujo laminar, se aplicó el tratamiento inyectando 15 µL de la suspensión bacteriana (Imagen 3.13)

Además se añadió un lote control de melocotones inoculados, pero sin tratamiento alguno.

Todos los frutos fueron conservados en estufa a 25° C y se hizo un seguimiento diario del porcentaje de incisiones infectadas y diámetro de la lesión.



**Imagen 3.13:** Aspecto de los melocotones comerciales inoculados primero con conidios de *M. laxa* y tratados después con bacterias pertenecientes a la especie *P. polymyxa*.

### **3.3.4. Tabla resumen**

La tabla 3.6 muestra los ensayos realizados con la cepa de *P. polymyxa* y su actividad frente a *Monilinia* spp.

**Tabla 3.6:** Tabla resumen de la actividad antifúngica de una cepa bacterinana de *P. polymyxa* frente a *Monilinia* spp.

Medio	Método de determinación de la actividad	Microorganismo	Concentración	Moho testado (inóculo)
<b>ENSAYOS IN VITRO</b>				
Agar PDA	Difusión en agar (asa de siembra)	<i>P. polymyxa</i>	-	<i>M. laxa</i> <i>M. fructicola</i> (suspensión esporal homogeneizada con asa de Drigalski)
<b>ENSAYOS IN VIVO</b>				
Melocotón comercial	Inoculación superficial	<i>P. polymyxa</i>	-	<i>M. laxa</i> <i>M. fructicola</i> (suspensión esporal)

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **4.1. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ENZIMAS PROCEDENTES DE *PENICILLIUM PURPUROGENUM* FRENTE A *MONILINIA LAXA* Y *M. FRUCTICOLA***

### **4.1.1. Actividad antifúngica *in vitro* en medio sólido**

La actividad antifúngica *in vitro* de los extractos enzimáticos se determinó en medio sólido empleando el método de difusión en agar y método del agar enriquecido con adición de soluciones enzimáticas.

#### **4.1.1.1 Método de difusión en agar con soluciones enzimáticas**

Como ya se ha reseñado anteriormente este método nos informa de la existencia o no de sensibilidad por parte del microorganismo ante la sustancia o solución inhibidora. En función del diámetro del halo de inhibición detectado el microorganismo se puede clasificar como resistente, poco sensible, medianamente sensible o sensible.

La lectura de estos halos de inhibición se realizó diariamente y en ningún caso se obtuvo inhibición del crecimiento de ninguno de los cinco mohos estudiados.

Además, es importante señalar que se observó, en un número elevado de placas, una contaminación, aparentemente bacteriana, alrededor de los discos de celulosa. Por este motivo, y a pesar de que en el artículo de Melgarejo et al. (1996) no se contemplaba este paso, se procedió a esterilizar por filtración todas las soluciones enzimáticas con filtro de jeringa de 0,22 µm. Las soluciones enzimáticas obtenidas a partir de *L. ochroleuca* y laminarina proporcionada por Arvensis Agro S.A., no pudieron esterilizarse por filtración debido a la inmediata colmatación del filtro.

Por tanto, se repitió el experimental en este caso con las soluciones enzimáticas esterilizadas por filtración (las obtenidas a partir de paredes celulares de *M. laxa*, *M. fructicola*, *P. expansum*, *A. alternata* y *R. stolonifer*, laminarina Sigma-Aldrich y glucosa). Tampoco se observó ningún halo de inhibición del crecimiento de los mohos estudiados, aunque sí se consiguió eliminar la contaminación alrededor de los discos de celulosa impregnados en la solución enzimática.

#### 4.1.1.2 Método del agar enriquecido con adición de soluciones enzimáticas

En este ensayo se procedió a determinar la inhibición del crecimiento en un medio agarado enriquecido al que se le adicionaba 1 mL de las distintas soluciones enzimáticas. Para determinar la actividad antifúngica se medía el diámetro de las colonias de *M. laxa* tanto en las placas control como en las placas portadoras de las soluciones enzimáticas. Se ensayaron las soluciones enzimáticas obtenidas a partir de *M. laxa*, de *M. fructicola* y de Laminarina (Sigma).

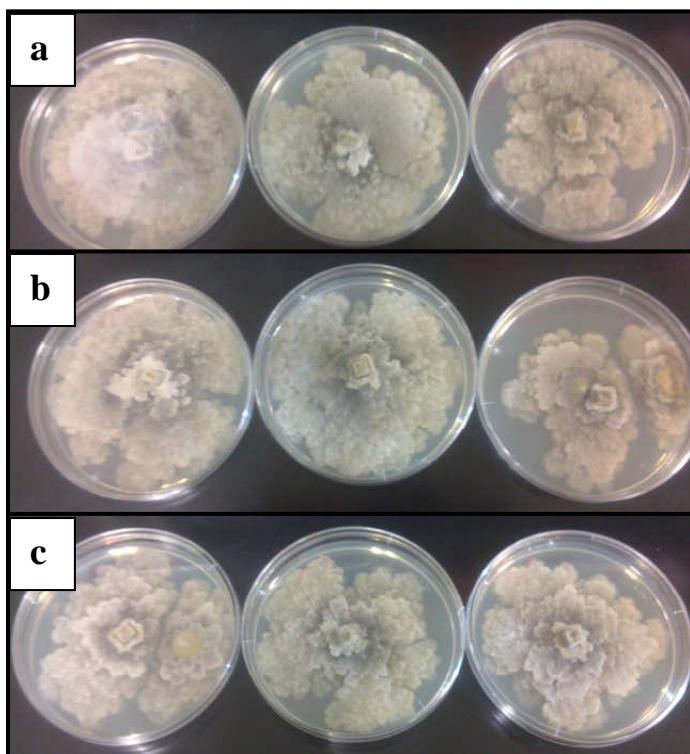
En el transcurso de este experimental observamos que en las placas de PDA-E a las que se les había adicionado las soluciones enzimáticas, pero que no habían sido inoculadas con microorganismos, aparecía un crecimiento fúngico en toda la superficie del agar. La razón estaba en que las soluciones enzimáticas no habían sido esterilizadas por filtración. Hubo por tanto que preparar nuevos extractos y someterlo a esterilización por filtración con filtro de jeringa de 0,22 µm.

La tabla 4.1 detalla el diámetro colonial de *M. laxa* tras 16 días de incubación a 25º C.

Como muestra la imagen 4.1., no se observó inhibición del crecimiento fúngico para ninguna de las tres soluciones. Sí que es cierto que en la réplica 3 del tratamiento con solución enzimática de *M. fructicola* podemos observar un menor crecimiento fúngico, pero no fue significativo, puesto que en sus dos réplicas el crecimiento fue total.

**Tabla 4.1:** Evolución del diámetro colonial de *M. laxa* en placas con agar patata dextrosa enriquecido (PDA-E) adicionado o no (control) con diferentes soluciones enzimáticas al 2% e incubadas a 25°C / 16 días.

Día de incubación	Diámetro colonial (mm)			
	Control	Sol. Enz. <i>M. laxa</i>	Sol. Enz. <i>M. fructicola</i>	Sol. Enz. Laminaria
5	19,3 ± 3,2	9,0 ± 0,0	11,0 ± 2,6	10,3 ± 0,6
6	22,7 ± 4,0	11,0 ± 1,0	12,7 ± 2,9	12,7 ± 0,6
7	27,0 ± 5,2	15,3 ± 2,5	14,3 ± 4,0	14,3 ± 1,2
8	42,0 ± 22,6	20,7 ± 1,5	21,3 ± 1,5	20,7 ± 0,6
9	36,7 ± 10,2	31,3 ± 1,2	27,3 ± 2,5	28,7 ± 1,5
10	43,7 ± 11,8	42,0 ± 6,1	43,0 ± 8,7	39,0 ± 4,4
12	48,3 ± 14,2	57,0 ± 5,3	50,0 ± 9,5	47,3 ± 4,6
13	51,7 ± 15,3	63,7 ± 5,3	58,0 ± 10,6	55,7 ± 7,5
14	64,7 ± 2,0	70,0 ± 4,4	66,0 ± 14,0	64,0 ± 3,6
15	66,7 ± 1,2	72,3 ± 4,2	74,0 ± 5,3	68,3 ± 3,8
16	68,3 ± 1,2	77,3 ± 2,3	76,7 ± 4,9	73,0 ± 2,0
% inhibición	–	0 %	0 %	0 %



**Imagen 4.1.:** Crecimiento de *M. laxa* sobre agar patata dextrosa enriquecido (PDA-E) y adicionado con soluciones enzimáticas de *M. laxa* (a), *M. fructicola* (b) y Laminarina Sigma (c) tras 16 días de incubación a 25° C

#### 4.1.2. Actividad antifúngica *in vitro* en medio líquido

##### 4.1.1.2.1. Medio líquido enriquecido con adición de soluciones enzimáticas

A pesar de no detectar ningún efecto inhibidor en medio sólido se procedió a determinar si existía algún tipo de actividad antimicrobiana en medio de cultivo líquido (ZMCZB-E), ya que de esta forma, el contacto de la solución inhibidora con el microorganismo es más íntimo. En este caso únicamente se estudió la actividad antifúngica de la solución enzimática obtenida a partir de *M. laxa* y de laminarina de Sigma-Aldrich y únicamente frente a *M. laxa*.

La tabla 4.2. nos muestra que el porcentaje de inhibición alcanzado en los ensayos conteniendo 1 mL de la solución enzimática obtenida a partir de laminarina fue del 25%, no mostrando diferencias significativas ( $p>0,05$ ) frente al control. Sin embargo, sí que fue significativa ( $p<0,05$ ) la inhibición obtenida con la **solución enzimática obtenida a partir de micelio de *M. laxa*** cuya inhibición fue del 35%.

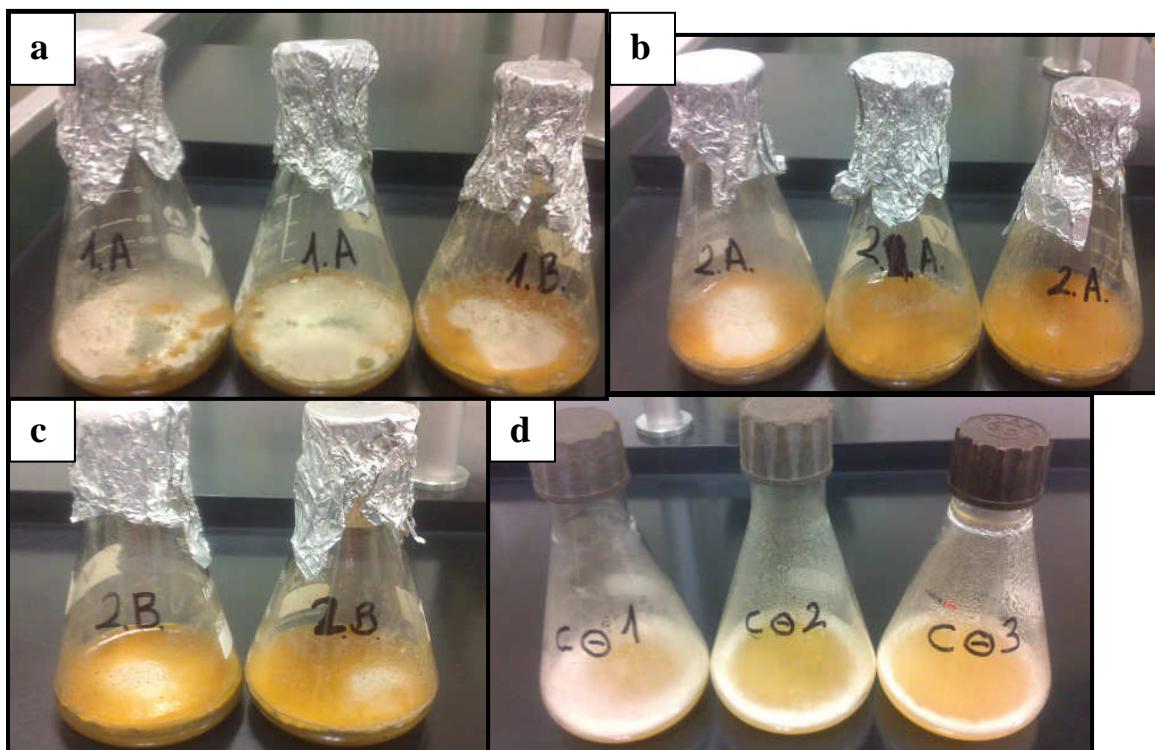
**Tabla 4.2.:** Peso del micelio seco obtenido en caldo ZMCZB-E adicionado con diferentes soluciones enzimáticas al 2%, inoculados con *M. laxa* e incubado a 25° C / 10 días. \*Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

Medio	Peso micelio seco (g)	% inhibición*
ZMCZB-E + S.E. Laminarina Sigma	1,5 ±	25 a
ZMCZB-E + S.E. <i>M. laxa</i>	1,3 ±	35 b
ZMCZB-E (Control)	2,0 ± 0,1	0,0 a

Se repitió el ensayo con 1 mL y 2 mL de extractos de las dos soluciones enzimáticas. Sorprendentemente, y a pesar de haber duplicado la concentración, no se observó ningún tipo de inhibición significativa (Tabla 4.3). Además, en las muestras tratadas con 1 mL de solución, se observó un mayor crecimiento del moho que en los controles negativos (Imagen 4.2).

**Tabla 4.3.:** Peso del micelio seco obtenido en caldo ZMCZB-E adicionado con diferentes soluciones enzimáticas al 2 y 4%, inoculados con *M. laxa* e incubado a 25° C / 10 días. \*Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

Medio	Volumen tto.(mL)	Peso micelio seco (g)	% inhibición*
ZMCZB-E + S.E. Laminarina Sigma	1	1,8 ±	0,0 a
	2	1,7 ±	2,5 a
ZMCZB-E + S.E. <i>M. laxa</i>	1	1,9 ± 0,1	0,0 a
	2	1,7 ± 0,2	4,9 a
ZMCZB-E (Control)	0	1,8 ± 0,1	0,0 a



**Imagen 4.2:** Crecimiento de *M. laxa* en medio líquido enriquecido (ZMCZB-E) adicionado con soluciones enzimáticas de Laminarina (Sigma-Aldrich) al 4% (1A) y al 2% (1B) (a); solución enzimática de *M. laxa* al 4% (b) y al 2% (c); y ZMCZB-E (Control) (d) incubado a 25° C / 10 días.

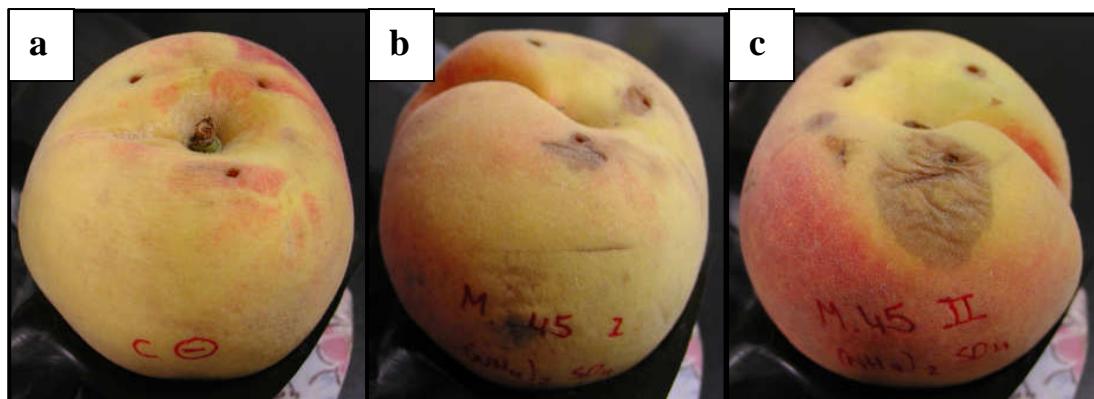
La razón de estos valores tan dispares respecto al ensayo anterior, podría ser la pérdida de la actividad enzimática por cuestión de tiempo y de inadecuada conservación. Las soluciones enzimáticas, una vez preparadas fueron empleadas para el primer ensayo y después, fueron guardadas en congelación a -18° C. Para ensayos posteriores, fueron descongeladas, atemperadas y nuevamente congeladas. Estas variaciones constantes de temperaturas pudieron hacer que se perdiera su actividad enzimática, lo que explicaría que incluso con el doble de concentración no consiguiera inhibir el crecimiento fúngico. Por la misma razón se pueden explicar los porcentajes de inhibición nulos en agar enriquecido con adición de las soluciones enzimáticas, puesto que cronológicamente, fue el último ensayo realizado con estas soluciones.

#### **4.1.3. Actividad antifúngica *in vivo* sobre melocotones y brotes de cerezo**

Se realizaron dos experimentos para determinar la posible aplicación práctica en la lucha contra *Monilinia* de los extractos enzimáticos obtenidos, una sobre melocotones ya recolectados (aplicación post-cosecha) y otra, en brotes de cerezo (aplicación pre-cosecha).

##### **4.1.3.1. Determinación de la actividad antifúngica en melocotones**

En la imagen 4.3 se puede observar el aspecto de los melocotones inoculados con la solución de esporas de *M. laxa* y posteriormente tratados con las soluciones enzimáticas obtenidas con paredes de *M. laxa* y con laminarina de Sigma tras 3 días de incubación. Diariamente se procedió a la medida del diámetro de la lesión alrededor de la incisión realizada para la inoculación, pero no se observó que ningún tratamiento inhibiera el crecimiento del moho.



**Imagen 4.3.:** Aspecto de melocotones comerciales inoculados con una suspensión esporal de *M. laxa*. (a): Control; (b): tratados con solución enzimática de Laminarina; (c): tratados con solución enzimática de *M. laxa*. Incubación a 25° C / 3 días.

##### **4.1.3.2. Determinación de la actividad antifúngica en brotes de cerezo**

La imagen 4.4 nos muestra el aspecto de los brotes de cerezo, una vez realizada la incisión y la inoculación con *M. laxa* (izquierda); posteriormente el brote era protegido con papel de aluminio para facilitar el crecimiento del moho (derecha).



**Imagen 4.4.** Detalle de la incisión realizada (izquierda) en un brote de cerezo en la que se inoculó una suspensión esporal de *M. laxa* y de otro brote protegido con papel de aluminio tras la inoculación (derecha).

En un principio se estableció una duración del experimento de 4 semanas con una periodicidad de aplicación del tratamiento antifúngico de 2 veces por semana. Sin embargo, a mitad del mismo, se decidió interrumpir la prueba ya que no se detectó crecimiento de *M. laxa* en ninguno de los brotes inoculados, invalidando por tanto cualquier resultado. Además, debemos tener en cuenta que el objetivo era obtener un tratamiento curativo y no profiláctico.

Tras reproducir fielmente los ensayos realizados por Larena y Melgarejo (1993 y 1996), observamos que nuestros resultados difieren totalmente de los suyos. Como ya se ha reseñado anteriormente, es posible que la actividad enzimática de las soluciones obtenidas, hayan perdido su potencial antifúngico debido a frecuentes variaciones de temperaturas.

#### **4.1.5. Determinación de la actividad de las soluciones enzimáticas**

En base a los malos resultados obtenidos, consideramos oportuno tratar de medir la actividad de las soluciones enzimáticas y compararlas con la actividad medida por Larena y Melgarejo (1996), para saber si el problema está en las propias soluciones, o por el contrario, no tienen efecto alguno sobre el desarrollo fúngico, pese a los resultados de sus estudios.

Para el cálculo de la actividad se utiliza la ecuación  $Y = MX + C$  (Figura 4.1)

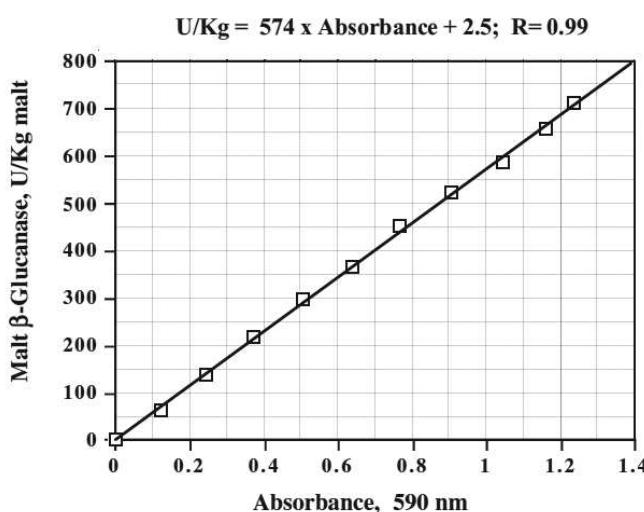
Donde:

$Y$  = actividad malta  $\beta$ -glucanasa (en U/kg de malta)

$M$  = pendiente de la recta de calibración

$X$  = absorbancia de la reacción a 590 nm

$C$  = punto de corte con el eje  $Y$



**Figura 4.1.** Curva estándar de la malta  $\beta$ -glucanasa en Azo barley glucan a pH 4,6 y 30°C durante 10 min, utilizando 3 ml de solución precipitante A

Establecida la recta de calibración, basta con introducir el valor de absorbancia obtenido en la lectura en el espectrofotómetro de la muestra problema, en la siguiente ecuación:

$$Y (\text{U/Kg}) = 574 \times \text{Absorbancia} + 2,5$$

**El resultado obtenido tras la lectura de absorbancia fue 0 en todos los duplicados de las soluciones enzimáticas,** a excepción de una réplica de la **solución obtenida a partir del micelio de *M. laxa***, que dio una lectura de **0,0375**. Al sustituir este valor en la ecuación mencionada:

$$Y = 574 \times 0,0375 + 2,5 = \mathbf{24,025 \text{ U/kg}}$$

Donde U es la unidad internacional de actividad enzimática y es igual a un micromol de equivalente de azúcar reducido a glucosa liberado por min a 30° C y pH 4,6.

Tras la conversión de U/kg a mU/mg para poder comparar nuestro resultado con los obtenidos por Larena y Melgarejo (1996), obtenemos una actividad enzimática de 0,024 mU/mg. Puesto que en dicho trabajo obtuvieron actividades enzimáticas de hasta 1500 mU/mg, consideramos que **la actividad enzimática obtenida es prácticamente inexistente**.

## **4.2. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE METABOLITOS PROCEDENTES DE FRUTOS DE ACLAREO FRENTE A *M. LAXA* Y *M. FRUCTICOLA***

En los experimentos llevados a cabo con extractos procedentes de frutos del aclareo se realizaron distintos tipos de pruebas para la determinación de la actividad antifúngica:

- Ensayos *in vitro*:

- Método de difusión en agar
- Adicción directa del extracto al medio de cultivo: sólido y líquido

- Ensayos *in vivo*:

- Inoculación en melocotones

Todos los experimentos se realizaron con extractos acuosos, extractos metanólicos y aceites esenciales obtenidos de distintos frutos de aclareo (cereza, ciruela, nectarina, paraguayo, albaricoque y melocotón), los cuales fueron testados frente a *M. laxa*, *M. fructicola* y en algunos casos con los aceites esenciales se realizaron también pruebas frente a *P. expansum*, *A. alternata* y *R. stolonifer*.

### **4.2.1. Actividad antifúngica *in vitro* en medio sólido**

#### **4.2.1.1. Método de difusión en agar con extractos acuosos y metanólicos**

La lectura de los halos de inhibición no reveló ninguna actividad antifúngica para este tipo de extractos. Únicamente, alrededor de los discos impregnados con el extracto mentaólico de albaricoque y cereza frente a *M. fructicola*, se detectaron pequeñas zonas sin crecimiento; sin embargo, no eran lo suficientemente grandes, simétricas y claras como para considerarlas de relevancia.

Esto podría explicarse si suponemos que es el metanol el que inhibe realmente el crecimiento fúngico. En el método de difusión en agar, los extractos son vertidos directamente sobre el disco de celulosa, por tanto es posible que se volatilice, demostrando que no se produce inhibición por los extractos, sino por el metanol.

#### 4.2.1.2 Método de difusión en agar con aceites esenciales

En este caso los aceites esenciales obtenidos se evaluaron frente a los cinco mohos utilizados en este estudio (*M. laxa*, *M. fructicola*, *P. expansum*, *A. alternata* y *R. stolonifer*). Dada la multitud de concentraciones probadas y la necesidad de ir modificando las condiciones de extracción del aceite hasta encontrar los óptimos se detalla a continuación el protocolo de extracción de cada experimento por separado presentando al final de este epígrafe un resumen de los resultados obtenidos.

##### **Ensayo 1: Aceite esencial obtenido de melocotón de aclareo mediante extracción en Soxtec, concentración en Turbovap y recuperación mediante raspado con espátula.**

*Microorganismos ensayados: M. laxa y M. fructicola*

*Impregnación de los discos de celulosa:* los discos de celulosa (6 mm de diámetro) estériles se impregnaron con 15 µL.

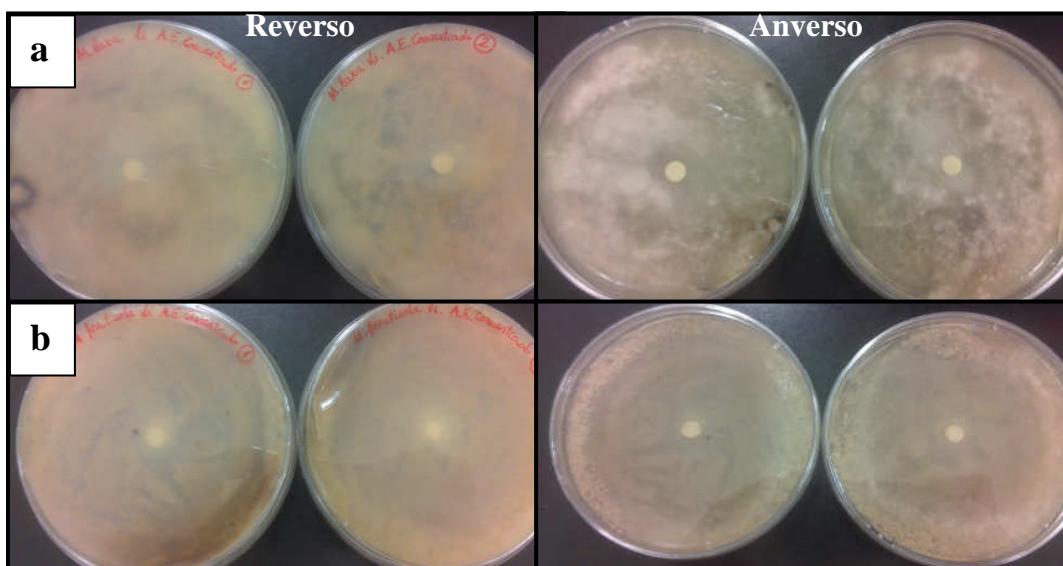
*Resultados:* No se observó inhibición alguna alrededor de los discos de celulosa impregnados. Además, se apreció en las placas un crecimiento microbiano no deseado, produciendo una contaminación.

##### **Ensayo 2: Aceite esencial obtenido de melocotón de aclareo mediante extracción con Soxtec, concentración en Turbovap y posterior concentración en baño termostático 65º C durante 1 hora**

*Microorganismos ensayados: M. laxa y M. fructicola*

*Impregnación de los discos de celulosa:* los discos de celulosa (6 mm de diámetro) estériles se impregnaron con 20 µL.

*Resultados:* No se observó ningún halo de inhibición, pero sí que se apreció una disminución en la densidad de crecimiento tanto de *M. laxa*, como de *M. fructicola* alrededor del disco (Imagen 4.5).



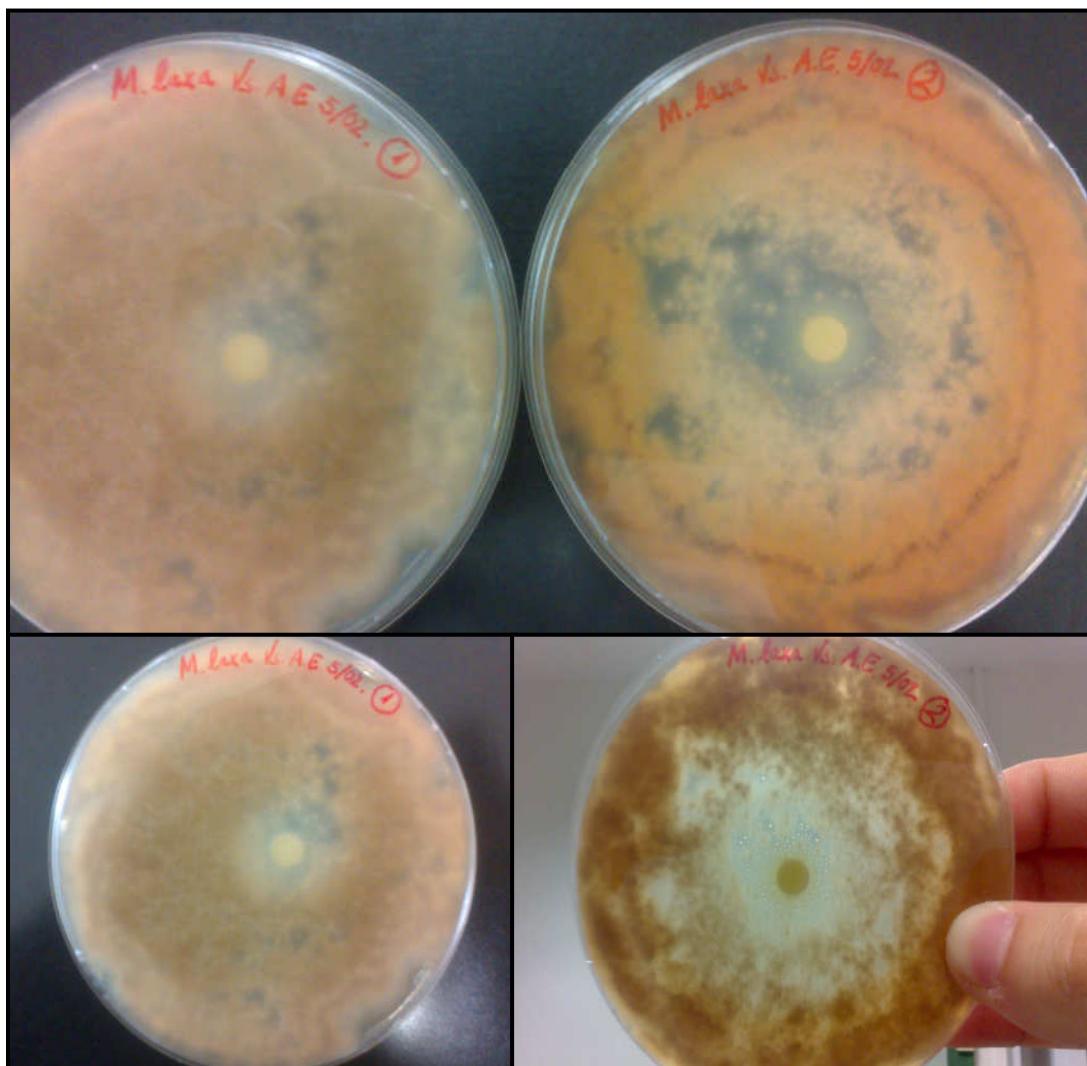
**Imagen 4.5:** Placas de PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* (a) y *M. fructicola* (b) e incubadas 8 días /25° C / aerobiosis; los discos de celulosa fueron impregnados con aceite esencial de melocotón de aclareo.

**Ensayo 3: Aceite esencial obtenido de melocotón de aclareo mediante extracción con Soxtec, concentración en Turbovap, homogeneización en agitador magnético y posterior concentración en baño termostático 65° C durante 2 horas**

*Microorganismos ensayados: M. laxa, M. fructicola, P. expansum, A. alternata y R. stolonifer*

*Impregnación de los discos de celulosa:* los discos de celulosa (6 mm de diámetro) estériles se impregnaron con 20 µL.

*Resultados:* Se pudo observar claramente un halo de inhibición de 22 mm de diámetro de *M. laxa* para una de las dos réplicas (placas de PDA en el lado derecho de la imagen 4.6). En la otra réplica la inhibición presentó un halo de 17 mm.



**Imagen 4.6:** Placas de PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 10 días / aerobiosis. Arriba: Aspecto del halo de inhibición producido por el aceite esencial de melocotón frente a *M. laxa* para las dos réplicas. Abajo: Detalle de cada réplica por separado. Los discos de celulosa fueron impregnados con aceite esencial de melocotón de aclareo.

Para el resto de mohos ensayados no se apreció inhibición, aunque sí que se pudo constatar, para *P. expansum* y *R. stolonifer*, una menor densidad de crecimiento fúngico alrededor del disco, tal y como muestran las imágenes tomadas tras 5 días de incubación a 25° C (Imagen 4.7)



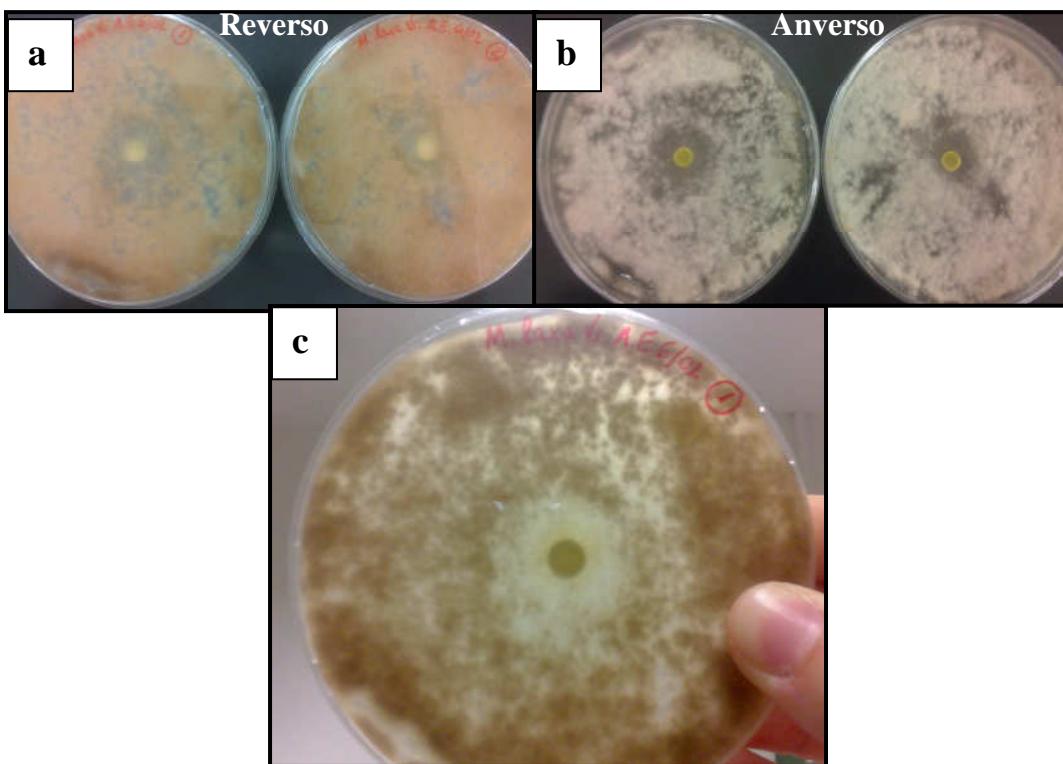
**Imagen 4.7:** Placas de PDA inoculadas superficialmente con *P. expansum* (izda.) y *R. stolonifer* (dcha.) e incubadas a 25° C / 5 días / aerobiosis. Los discos de celulosa fueron impregnados con aceite esencial de melocotón de aclareo.

**Ensayo 4: Aceite esencial obtenido de melocotón de aclareo mediante extracción con Soxtec, concentración en Turbovap, homogeneización en agitador magnético y posterior concentración en baño termostático 65° C durante 4 horas**

*Microorganismos ensayados: M. laxa y M. fructicola.*

*Impregnación de los discos de celulosa:* los discos de celulosa (6 mm de diámetro) estériles se impregnaron con 20 µL del aceite esencial.

*Resultados:* se observó al igual que en el ensayo nº3 inhibición del crecimiento de *M. laxa* con diámetros de 17 mm (réplica 1) y 15 mm (réplica 2) (Imagen 4.8). Tampoco se detectó inhibición del crecimiento de *M. fructicola*.



**Imagen 4.8:** Placas de PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 10 días / aerobiosis. (a): Reverso de ambas réplicas y (b): anverso. (c): Detalle de halo de inhibición. Los discos de celulosa fueron impregnados con aceite esencial de melocotón de aclareo.

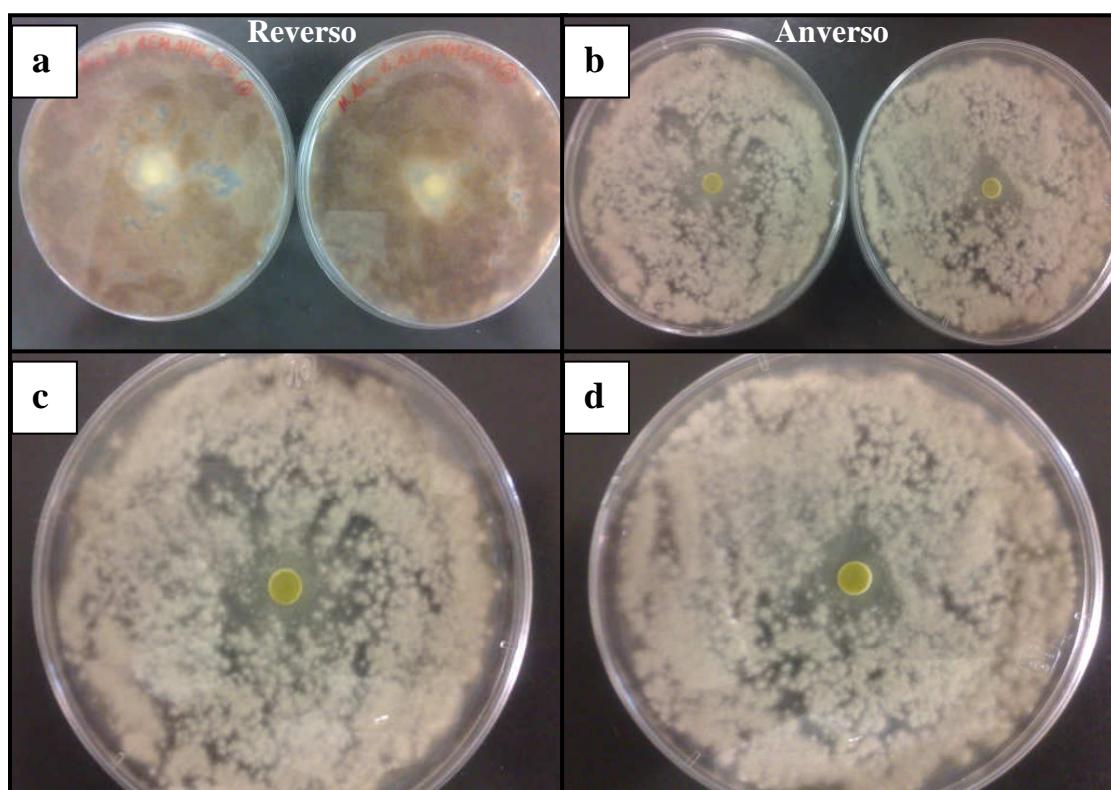
Como conclusión de este último ensayo, parece ser que el duplicar el tiempo de concentración del aceite esencial en baño termostático de 2 a 4 horas no supone un incremento de la actividad antifúngica.

**Ensayo 5: Aceite esencial obtenido de melocotón de aclareo mediante extracción con Soxtec, concentración en Turbovap, homogeneización en agitador magnético y posterior concentración en baño termostático 65° C hasta reducir su volumen un 50%**

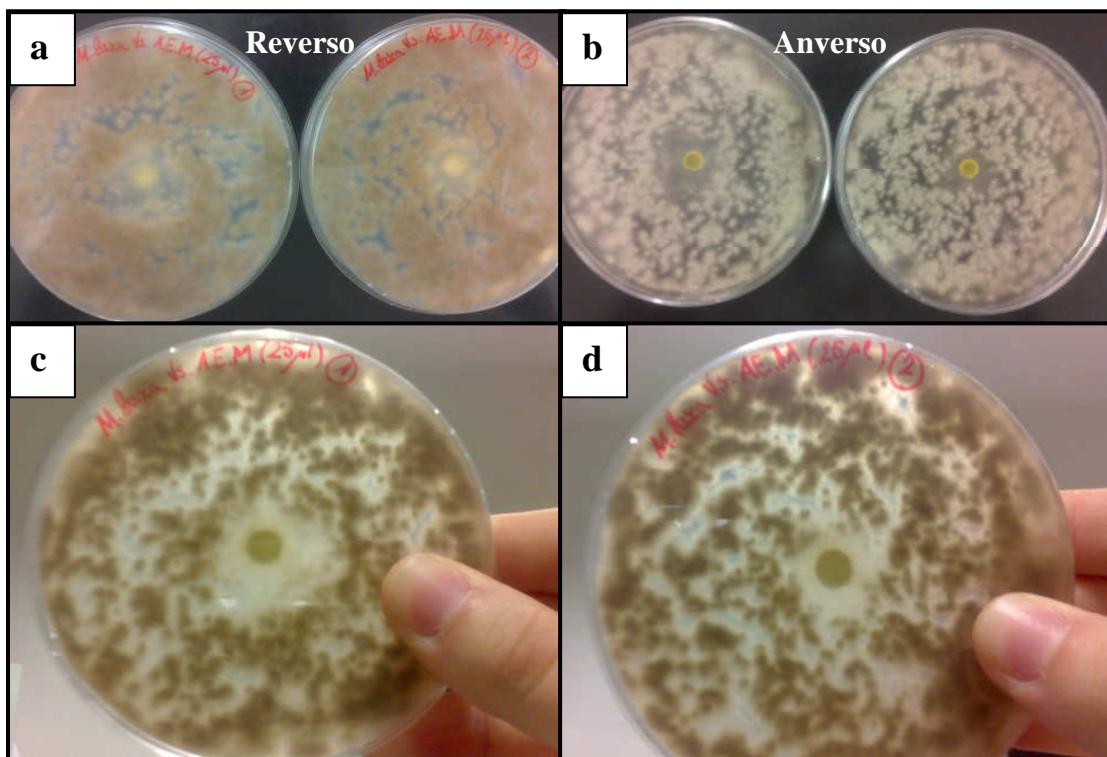
*Microorganismos ensayados:* *M. laxa*, *M. fructicola*, *P. expansum*, *A. alternata* y *R. stolonifer*

*Impregnación de los discos de celulosa:* se hizo una primera prueba impregnando los discos de celulosa con 20 µL. Debido a la densidad de la solución obtenida y con el fin de que difundiera de manera óptima alrededor del disco, se hizo una segunda prueba, sólo frente a *M. laxa* e impregnando los discos con 25 µL.

**Resultados:** Solo se observó inhibición frente a *M. laxa*, aunque los halos no fueron concéntricos. La imagen 4.9. nos muestra el primer ensayo realizado con *M. laxa* donde el disco se impregnó con 20 µL. Los halos de inhibición en este caso fueron de 14 y 12 mm, respectivamente. La imagen siguiente (4.10) recoge el segundo ensayo con los discos impregnados con 25 µL; en este caso los halos de inhibición fueron de 14 y 13 mm de diámetro. No se encontraron por tanto diferencias entre impregnar los discos con 20 ó con 25 µL.



**Imagen 4.9:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 10 días / aerobiosis. (a): Reverso de ambas réplicas y (b): anverso; (c): detalle halo inhibición réplica 1 y (d): réplica 2. Los discos de celulosa fueron impregnados con 20 µL de aceite esencial de melocotón de aclarero.



**Imagen 4.10:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 10 días / aerobiosis. (a): Reverso de ambas réplicas y (b): anverso; (c): detalle halo inhibición réplica 1 y (d): réplica 2. Los discos de celulosa fueron impregnados con 25  $\mu$ L de aceite esencial de melocotón de aclareo.

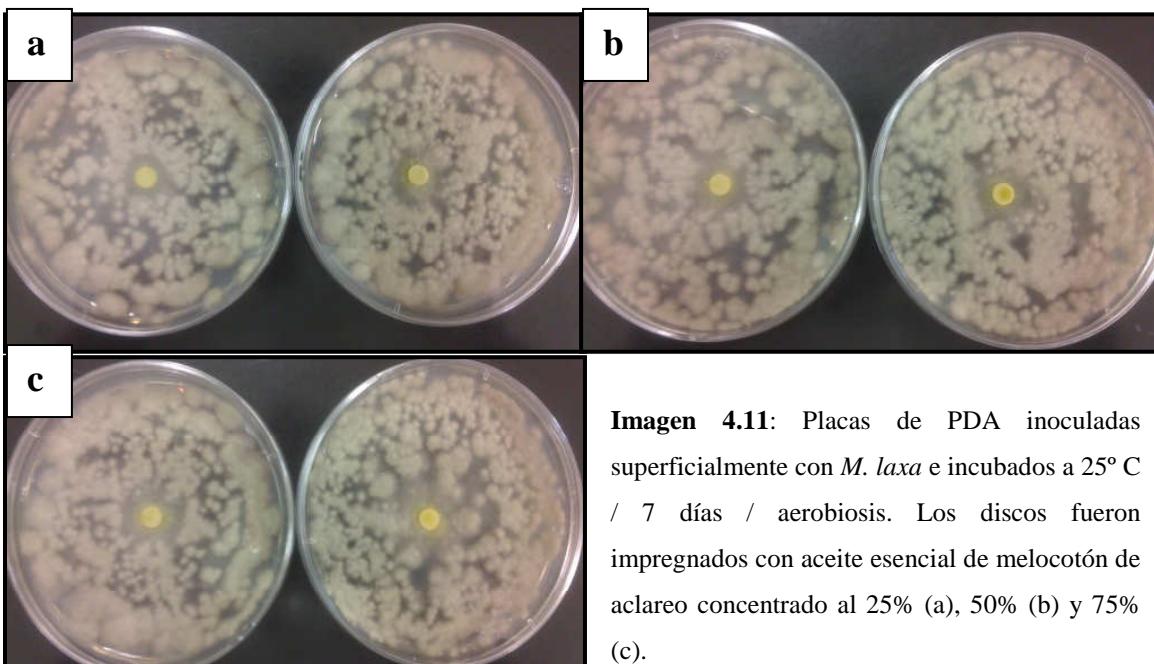
Hasta ahora, *M. laxa* es la única especie que ha resultado ser sensible o inhibida por el aceite esencial de melocotón; sí que es cierto, que depende del tipo de extracto (acuoso, metanólico o aceite esencial) y del tipo de extracción y concentración. Por otra parte, el aumentar el volumen de aceite al impregnar los discos, tampoco supuso ninguna mejora en cuanto a la inhibición del crecimiento fúngico.

**Ensayo 6: Aceite esencial obtenido de melocotón de aclareo mediante extracción con Soxtec, concentración primero con Turbovap, segundo con Temblock hasta pesada constante, homogeneización con agitador magnético y posterior concentración en baño termostático 65° C hasta un 25, 50 y 75%.**

*Microorganismos ensayados: M. laxa*

*Impregnación de los discos de celulosa:* los discos de celulosa (6 mm de diámetro) estériles se impregnaron con 25  $\mu$ L de aceite.

**Resultados:** Tres concentraciones de aceite esencial inhibieron el crecimiento de *M. laxa* alrededor del disco. Los halos no fueron ni muy manifiestos ni muy definidos pero suficientes para considerar la presencia de inhibición. Además podemos observar (Imagen 4.11) que no hay mucha diferencia entre concentrar los aceites al 25% (halos de 12 y 14 mm de diámetro) o, al 50 % ( 13 y 14 mm de diámetro) o, al 75% (ligeramente mayores con 15 y 17 mm).



**Imagen 4.11:** Placas de PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubados a 25° C / 7 días / aerobiosis. Los discos fueron impregnados con aceite esencial de melocotón de aclareo concentrado al 25% (a), 50% (b) y 75% (c).

**Ensayo 7: Aceite esencial obtenido de nectarina de aclareo mediante extracción con Soxtec, concentrado primero con Turbovap, segundo con Temblock hasta pesada constante, homogeneización con agitador magnético y posterior concentración en baño termostático 65° C hasta un 40%.**

*Microorganismos ensayados y método de siembra:* *M. laxa*, *M. fructicola*, *P. expansum*, *A. alternata* y *R. stolonifer*

*Impregnación de los discos de celulosa:* los discos de celulosa (6 mm de diámetro) estériles se impregnaron con 25 µL.

**Resultados:** No se aprecia ningún halo de inhibición sobre los microorganismos testados; parece observarse una menor densidad de crecimiento en los ensayos con *M. laxa*, *M. fructicola* y *R. stolonifer*.

**Ensayo 8: Aceite esencial obtenido de nectarina de aclareo mediante extracción con Soxtec, concentrado primero con Turbovap, segundo con Tembloc hasta pesada constante, homogeneización con agitador magnético y posterior concentración en baño termostático 65° C hasta un 25, 50 y 75%**

*Microorganismos ensayados: M. laxa*

*Impregnación de los discos de celulosa:* los discos de celulosa (6 mm de diámetro) estériles se impregnaron con 25 µL.

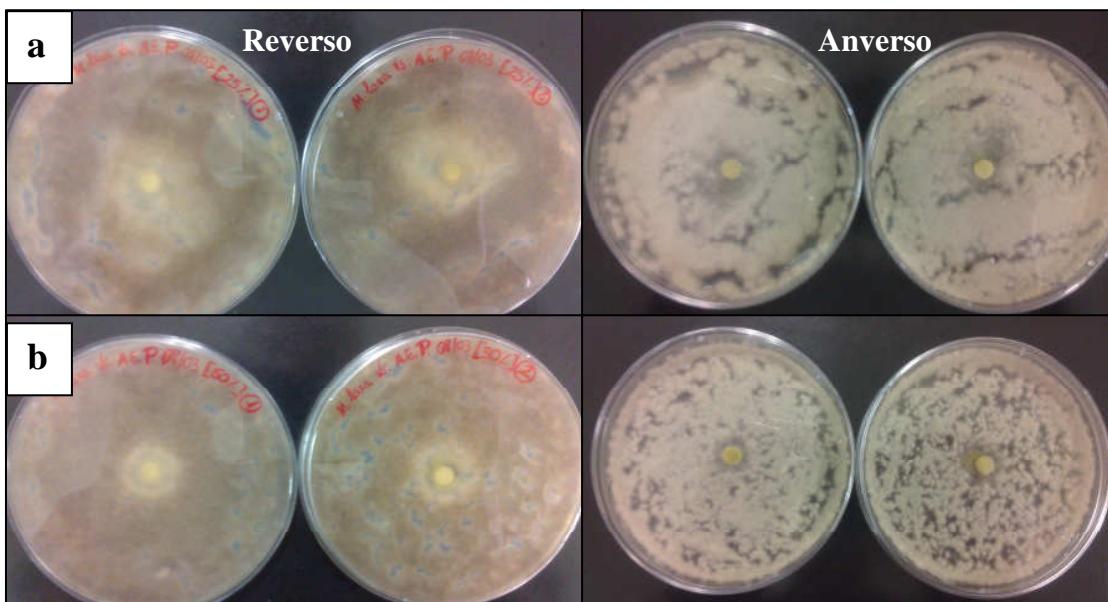
*Resultados:* No se apreció inhibición en ningún caso. Solamente se detectó una menor densidad de crecimiento micelial de *M. laxa* para la concentración del 50%.

**Ensayo 9: Aceite esencial obtenido de paraguayo de aclareo mediante extracción con Soxtec, concentrado primero con Turbovap, segundo con Tembloc hasta pesada constante, homogeneización con agitador magnético y posterior concentración en baño termostático 65° C hasta un 25, 50 y 75%**

*Microorganismos ensayados: M. laxa y M. fructicola*

*Impregnación de los discos de celulosa:* los discos de celulosa (6 mm de diámetro) estériles se impregnaron con 25 µL.

*Resultados:* No se aprecia ningún halo de inhibición significativo; solo pudimos distinguir una pequeña zona de inhibición alrededor del disco en el caso de los aceites concentrados al 25% y 50% frente a *M. laxa* (Imagen 4.12).



**Imagen 4.12:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 9 días / aerobiosis. Los discos fueron impregnados con aceite esencial de paraguayo de aclareo concentrado al 25% (a) y al 50% (b).

**Ensayo 10: Aceite esencial obtenido de cereza de aclareo mediante extracción con Soxtec, concentrado primero con Turbovap, segundo con Temblock hasta pesada constante, homogeneización con agitador magnético y posterior concentración en baño termostático 65° C hasta un 25, 50 y 75%**

*Microorganismos ensayados: M. laxa y M. fructicola*

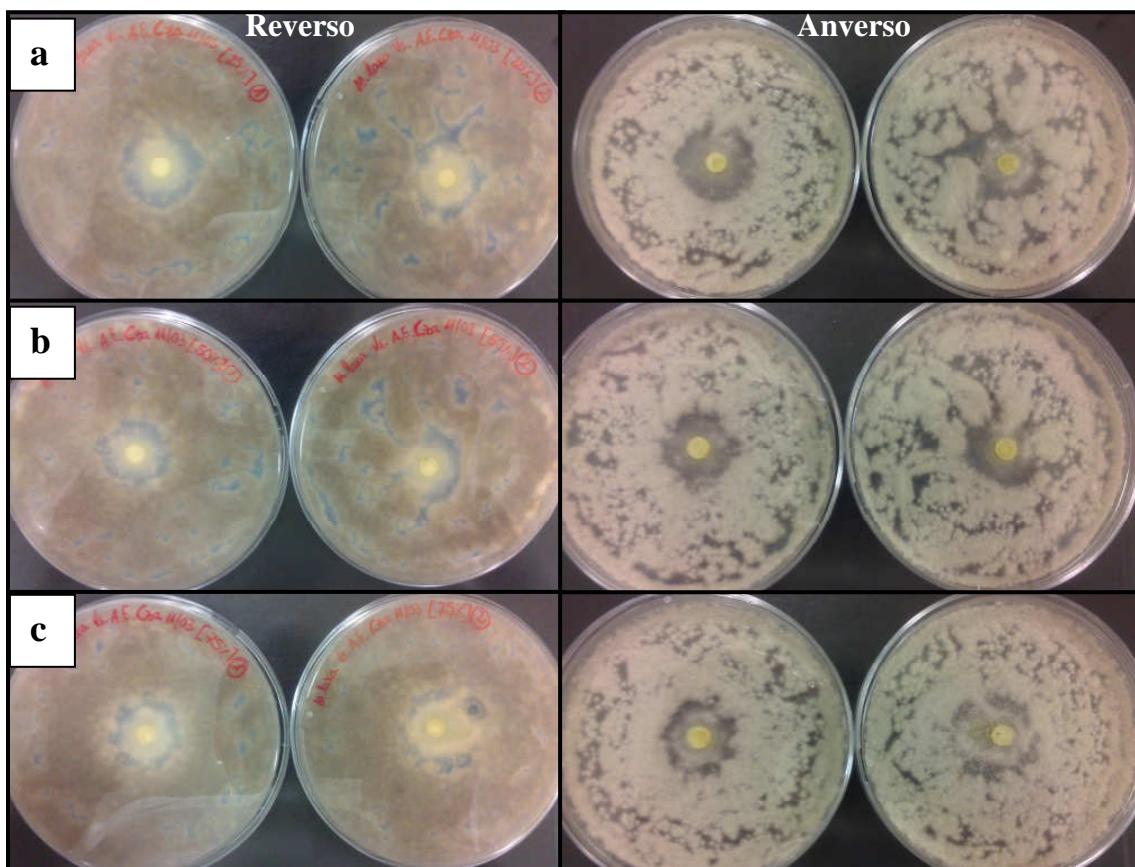
*Impregnación de los discos de celulosa:* los discos de celulosa (6 mm de diámetro) estériles se impregnaron con 25 µL.

*Resultados:* se obtuvieron halos de inhibición frente a ambas especies y con las tres concentraciones de aceite esencial de cereza ensayadas.

Los halos de inhibición obtenidos frente a *M. laxa*, aunque no alcanzan un gran diámetro, son más definidos que los obtenidos hasta ahora con otros aceites esenciales (Imagen 4.13). Los halos correspondientes a la concentración del 25% son de 17 mm para ambas réplicas. Para la concentración del 50% los diámetros medidos fueron de 15 y 13 mm y para la del 75% 15 mm en ambas réplicas.

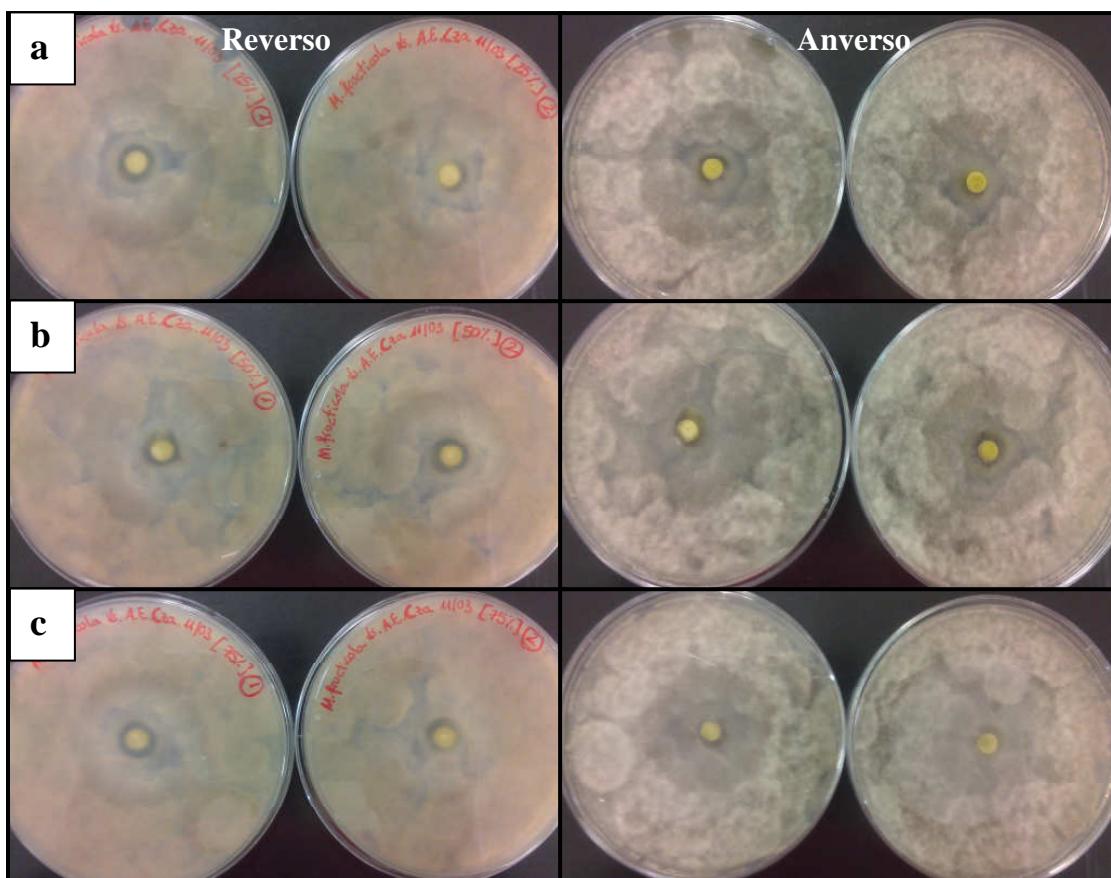
En el caso de *M. fructicola* la inhibición fue mucho más enérgica con la casi total ausencia de crecimiento micelial alrededor de los discos (Imagen 4.14). Los diámetros

de los halos fueron de 35 y 24 mm, cuando la concentración del aceite fue del 25%; con la del 50% los halos fueron de 30 y 23 mm; y con la del 75% fueron de 32 y 22 mm.



**Imagen 4.13:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 7 días / aerobiosis. Los discos fueron impregnados con aceite esencial de cereza de aclareo concentrado al 25% (a); al 50% (b); y al 75% (c).

Parece ser por tanto que el que determina el grado de inhibición, es el tipo de fruto de aclareo del que procede el aceite y no el grado de concentración. Así como el aceite esencial de melocotón y el de cereza producen inhibición de *M. laxa*, cuantificada como poco o medianamente sensible, no conseguimos tal efecto con el de paraguayo, considerando el moho como resistente a este aceite esencial.



**Imagen 4.14:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. fructicola* e incubadas a 25° C / 7 días / aerobiosis. Los discos fueron impregnados con aceite esencial de cereza de aclareo concentrado al 25% (a); al 50% (b); y al 75% (c).

El aceite esencial de cereza es el único, hasta ahora, que ha conseguido una inhibición significativa del crecimiento micelial de *M. fructicola*, considerándola como medianamente sensible frente a este aceite.

**Ensayo 11: Aceite esencial obtenido de albaricoque de aclareo mediante extracción con Soxtec, concentrado primero con Turbovap, segundo con Temblock hasta pesada constante, homogeneización con agitador magnético y posterior concentración en baño termostático 65° C hasta un 25, 50 y 75%**

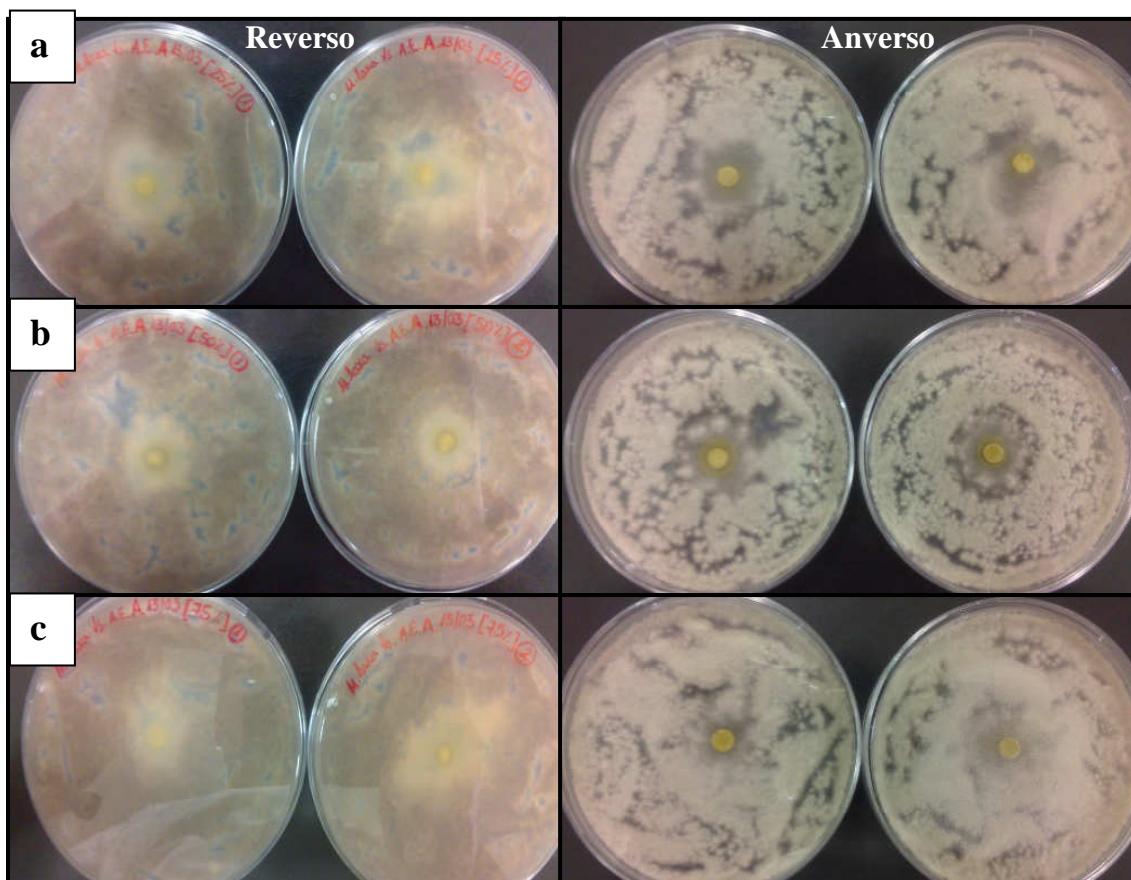
*Microorganismos ensayados y método de siembra: M. laxa y M. fructicola*

*Impregnación de los discos de celulosa:* los discos de celulosa (6 mm de diámetro) estériles se impregnaron con 25 µL.

*Resultados:* se obtuvo inhibición del crecimiento en todos los ensayos realizados. En el caso de *M. laxa* (Imagen 4.15) los halos de inhibición de crecimiento fueron de 14 mm

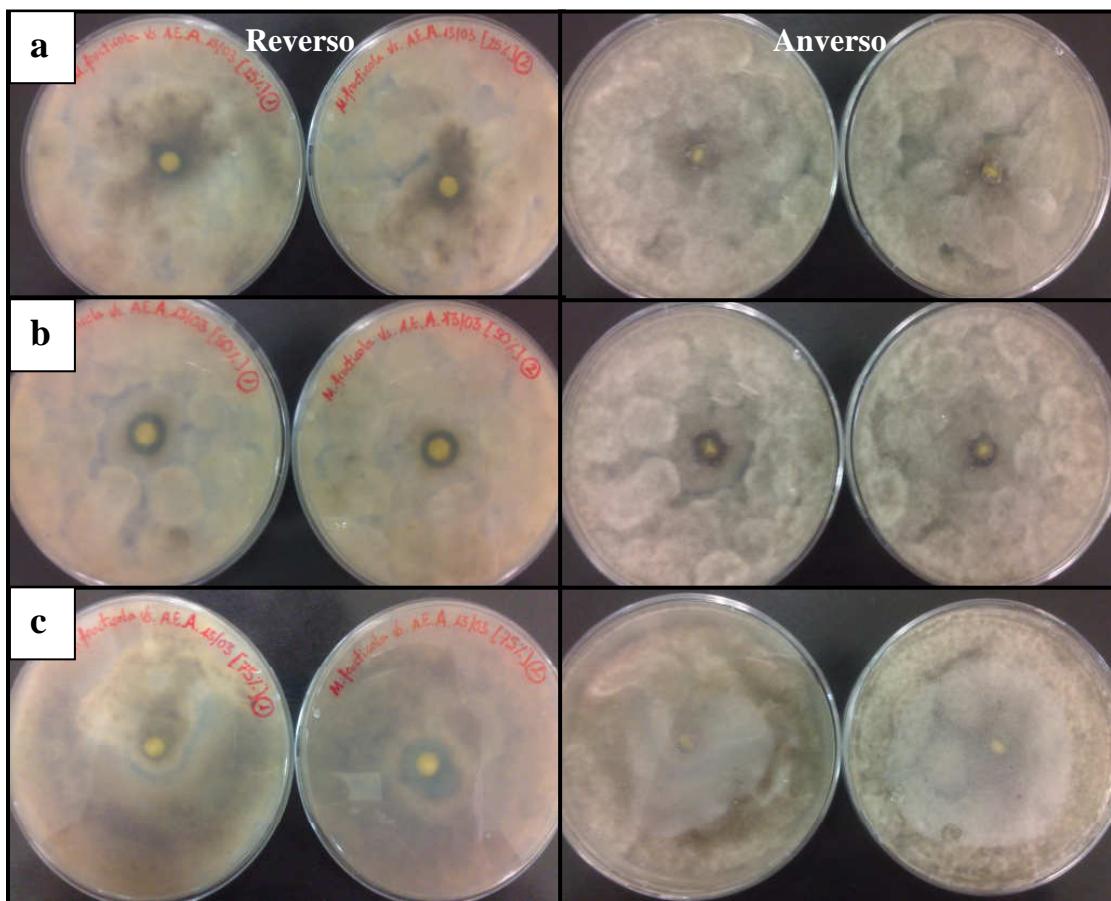
en ambas réplicas para la concentración del 25%, 16 y 15 mm para el 50% y 12 y 14 para el aceite al 75%.

También se observó disminución del crecimiento del micelio de *M. fructicola* alrededor de los discos para la concentración del 50%, siendo los diámetros medidos de 19 y 21 mm (Imagen 4.16).



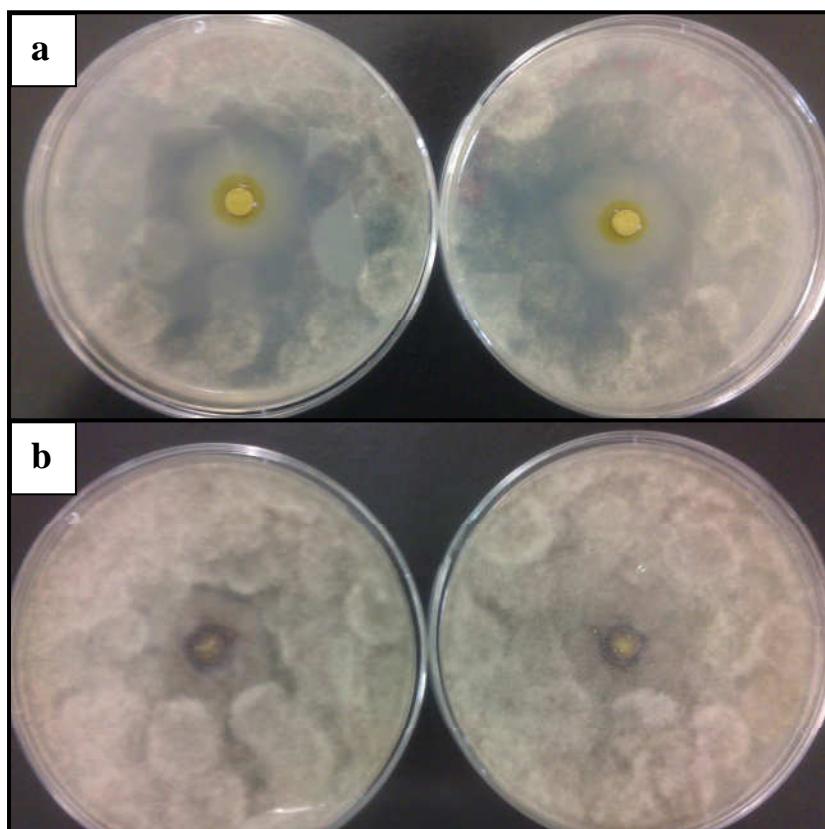
**Imagen 4.15:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 7 días / aerobiosis. Los discos fueron impregnados con aceite esencial de albaricoque de aclareo concentrado al 25% (a); al 50% (b); y al 75% (c).

En este ensayo se ha podido comprobar claramente cómo el grado de concentración del aceite no ha sido determinante en la inhibición de *M. laxa*. La mayor concentración, la del 75%, apenas ha mostrado potencial antifúngico, comparado con las concentraciones inferiores. Sin embargo, este hecho, también se podría explicar con que a mayor concentración del aceite esencial, mayor dificultad a la hora de difundir en el medio agarado.



**Imagen 4.16:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. fructicola* e incubadas a 25° C / 7 días / aerobiosis. Los discos fueron impregnados con aceite esencial de albaricoque de aclareo concentrado al 25% (a); al 50% (b); y al 75% (c).

También cabe destacar, el retraso en el crecimiento de *M. fructicola* en el entorno próximo del disco. El ejemplo gráfico más claro, lo encontramos en la concentración del aceite esencial al 50%, puesto que a los 4 días de incubación, solo se observa crecimiento fúngico en la periferia de la placa, es decir, en las zonas más alejadas de la misma. A los 7 días comienza a crecer *M. fructicola* en zonas más próximas al disco de celulosa (Imagen 4.17).



**Imagen 4.17:** Placas de PDA inoculadas superficialmente con *M. fructicola* e incubadas a 25° C / aerobiosis / 4 días (a) y 7 días (b). Discos impregnados con aceite esencial de albaricoque de aclareo al 50%.

Pese a que las inhibiciones obtenidas con los aceites esenciales no son especialmente enérgicas, sí que parece existir un retraso en el crecimiento fúngico, lo cual podría tener una utilidad de notable importancia de cara al control de la podredumbre marrón en post-cosecha.

**Ensayo 12: Aceite esencial obtenido de ciruela de aclareo mediante extracción con Soxtec, concentrado primero con Turbovap, segundo con Tembloc hasta pesada constante, homogeneización con agitador magnético y posterior concentración en baño termostático 65° C hasta un 25, 50 y 75%**

*Microorganismos ensayados: M. laxa y M. fructicola*

*Impregnación de los discos de celulosa:* los discos de celulosa (6 mm de diámetro) estériles se impregnaron con 25 µL.

**Resultados:** No se observó ningún halo de inhibición; solo se aprecia un menor desarrollo fúngico alrededor de los discos, tanto para *M. laxa*, como para *M. fructicola*,

El aceite esencial de ciruela de aclareo obtenido de acuerdo a este ensayo, no parece tener potencial antifúngico frente a *M. laxa* y *M. fructicola* en ensayo efectuado en medio agarado, considerando ambas especies como resistentes frente a este aceite.

**Ensayo 13: Aceite esencial obtenido de cereza y melocotón de aclareo mediante extracción con Soxtec, concentrado primero con Turbovap, segundo con Tembloc hasta pesada constante, homogeneización con agitador magnético y posterior concentración en baño termostático 65º C hasta un 25, 50 y 75%**

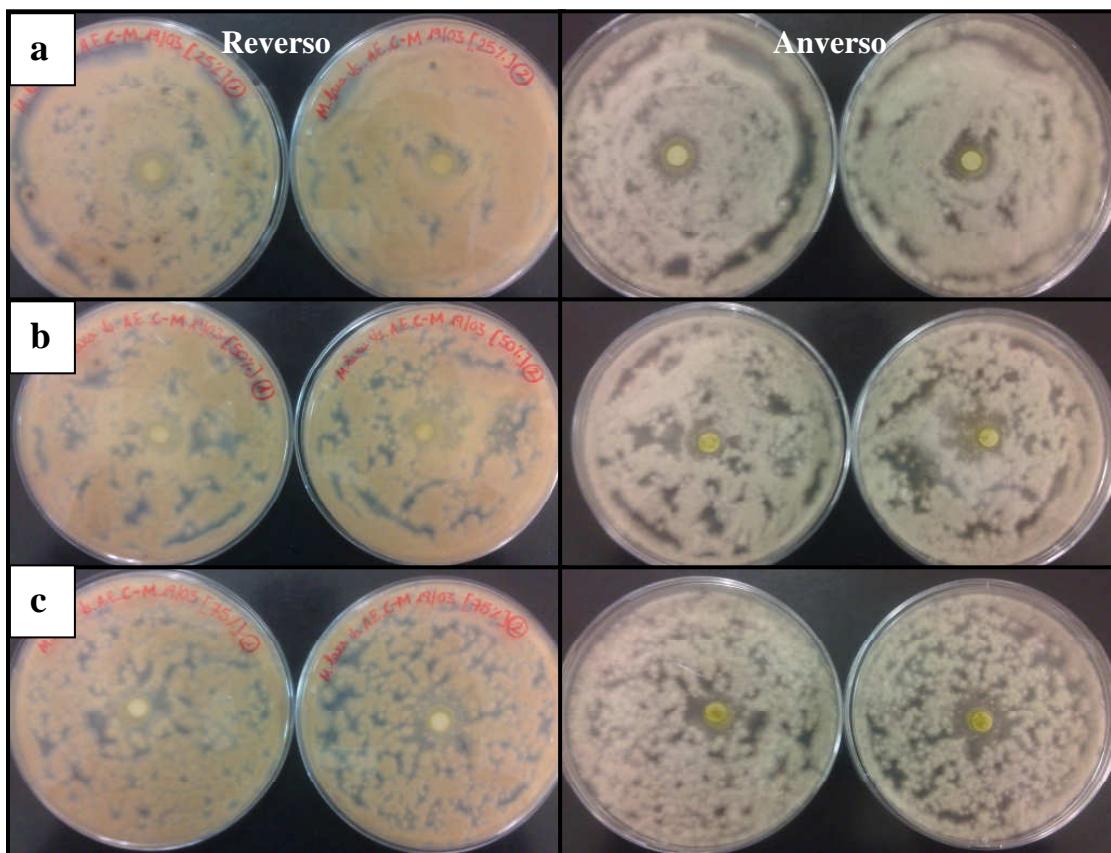
**Mezcla de aceites esenciales de cereza y melocotón**

*Microorganismos ensayados: M. laxa y M. fructicola*

*Impregnación de los discos de celulosa:* los discos de celulosa (6 mm de diámetro) estériles se impregnaron con 25 µL.

**Resultados:** se observaron resultados positivos para ambos mohos, pero especialmente para *M. fructicola*; el aceite con una concentración del 25% obtuvo una manifiesta zona de inhibición bastante evidente de 35 mm de diámetro para una de las dos réplicas, pero no para la otra. Para las placas de aceite concentrado al 50%, presentó un diámetro de 20 mm, pero nuevamente solo en una de las dos réplicas.

Frente a *M. laxa*, se observaron nuevamente actividades antimicrobianas similares a las obtenidas con anteriores aceites. Para la concentración del 25%, se observaron halos de inhibición de 14 mm para ambas réplicas; para la concentración del 50% fueron de 12 y 13 mm; y para la del 75% los halos de inhibición fueron de 12 y 14 mm. (Imagen 4.18)

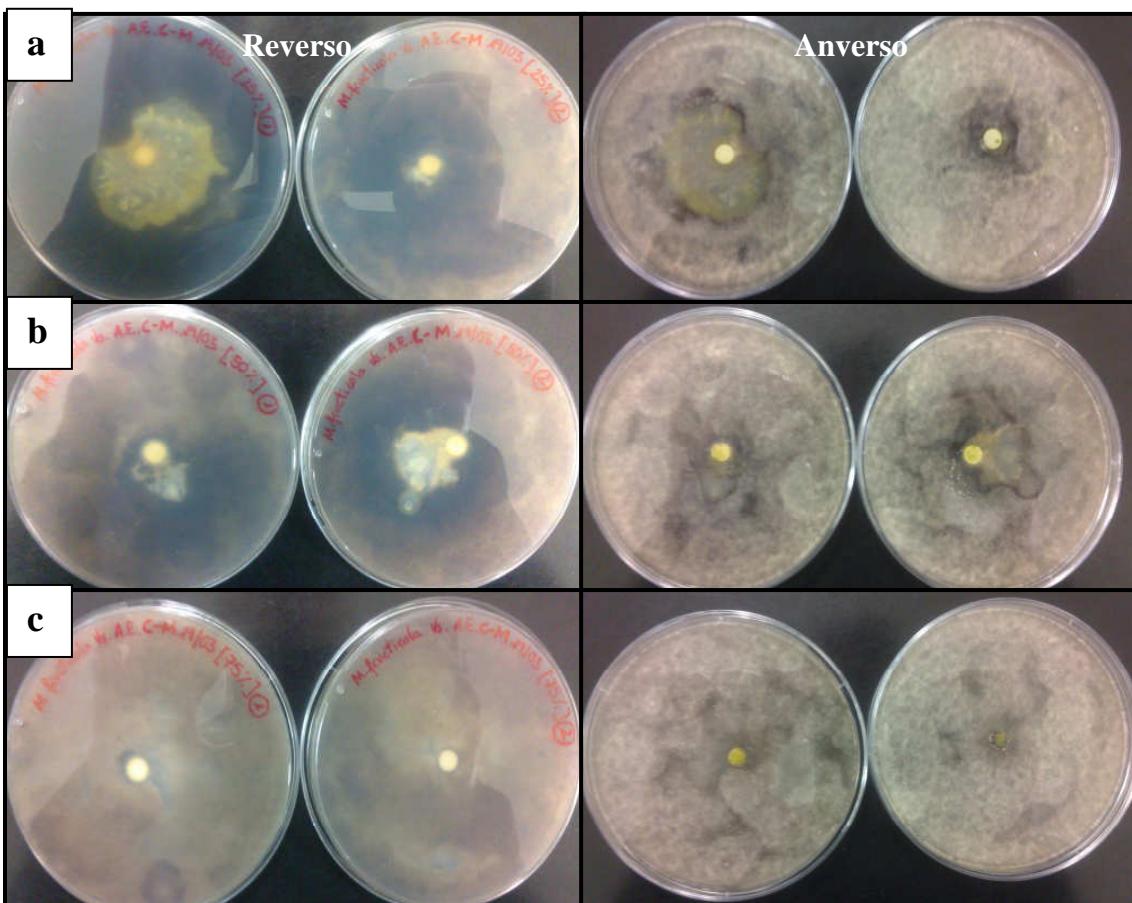


**Imagen 4.18:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 7 días / aerobiosis. Los discos fueron impregnados con aceite esencial de cereza-melocotón de aclareo concentrado al 25% (a); al 50% (b); y al 75% (c).

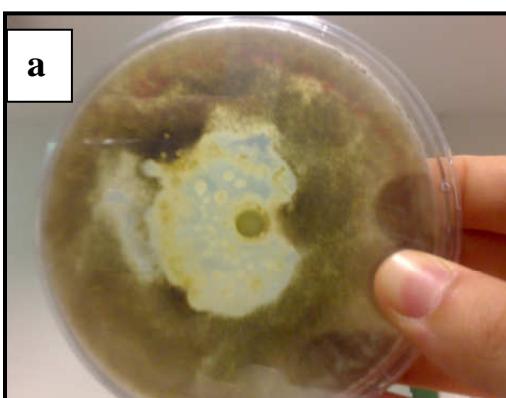
Se han obtenido halos de inhibición similares para las tres concentraciones, considerando por tanto a la especie *M. laxa* como poco sensible frente a este aceite compuesto por cereza y melocotón de aclareo.

En las imágenes 4.19 y 4.20 se puede observar la actividad antimicrobiana del aceite esencial cereza-melocotón frente a *M. fructicola*.

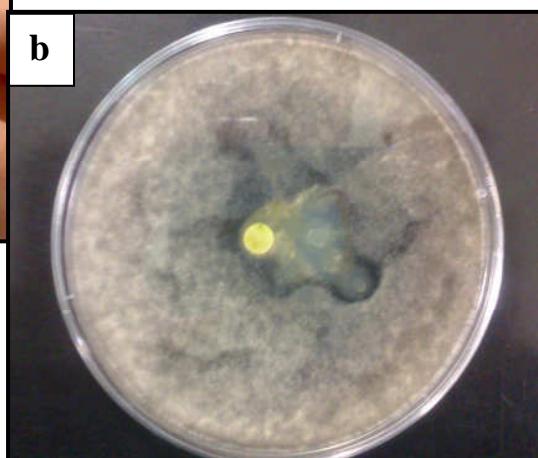
Los halos de inhibición obtenidos para la concentración del 25 y 50% nos indican una clara actividad antifúngica de este aceite esencial compuesto; sin embargo, no se cumple este potencial ni para sus réplicas, ni para su concentración al 75%.



**Imagen 4.19:** Placas PDA inoculadas superficialmente con *M. fructicola* e incubadas a 25° C / 7 días / aerobiosis. Los discos fueron impregnados con aceite esencial de cereza-melocotón de aclareo concentrado al 25% (a); al 50% (b); y al 75% (c).



**Imagen 4.20:** Detalle de los halos de inhibición del A.E.Cereza-Melocotón al 25% (a) y al 50% (b) frente a *M. fructicola*.





#### 4. Resultados y discusión

**Tabla 4.4:** Tabla resumen de los aceites esenciales extraídos de melocotón de aclareo y su actividad antifúngica frente a *M. laxa* y/o *M. fructicola* medida según Davidson y Parish, (1989) como: (R) Resistente; (P.S.): Poco Sensible; (M.S.): Medianamente Sensible; y (S): Sensible.

Frutos de aclareo	Nº Ensayo	Concentración	Diámetro	Diámetro	Proceso concentración del aceite esencial
			Inhibición (mm) <i>M. laxa</i>	Inhibición (mm) <i>M. fructicola</i>	
Melocotón	1		0 (R)	0 (R)	A.E. concentrado en Turbovap; recuperado con espátula; resuspendido con agua y Tween20; sin concentrar.
	2		0 (R)	0 (R)	A.E. concentrado en Turbovap; recuperado con espátula; resuspendido con agua y Tween20; concentrado 1 hora.
	3		19,5 (M.S.)	0 (R)	A.E. concentrado en Turbovap; prehumedecido con agua; rascado con espátula y recuperado con micropipeta; resuspendido con agua y Tween20; homogeneizado con agitador; concentrado 2 horas.
	4		16 (M.S.)	0 (R)	A.E. concentrado en Turbovap; prehumedecido con agua; rascado con espátula y recuperado con micropipeta; resuspendido con agua y Tween20; homogeneizado con agitador; concentrado 4 horas.
	5	50 % (20 µL)	13 (P.S.)	0 (R)	A.E. concentrado en Turbovap; prehumedecido con agua; rascado con espátula y recuperado con micropipeta; resuspendido con agua y Tween20; homogeneizado con agitador; concentrado un 50%
		50% (25 µL)	13,5 (P.S.)	0 (R)	
	6	25 %	13 (P.S.)	-	A.E. concentrado en Tembloc; resuspendido con agua y Tween20; homogeneizado con agitador; concentrado un 25, 50 y 75%.
		50 %	13,5 (P.S.)	-	
		75%	16 (M.S.)	-	

**Tabla 4.5:** Tabla resumen de los aceites esenciales extraídos de nectarina, paraguayo, cereza, albaricoque y una mezcla de cereza y melocotón de aclareo y su actividad antifúngica frente a *M. laxa* y/o *M. fructicola* medida según Davidson y Parish, (1989) como: (R) Resistente; (P.S.): Poco Sensible; (M.S.): Medianamente Sensible; y (S): Sensible.

Frutos de aclareo	Nº Ensayo	Concentración	Diámetro	Diámetro	Proceso concentración del aceite esencial
			<i>M. laxa</i>	<i>M. fructicola</i>	
Nectarina	7	40%	0 (R)	0 (R)	A.E. concentrado en Tembloc; resuspendido con agua y Tween20; homogeneizado con agitador; concentrado un 25, 50 y 75%.
	8	25%	0 (R)	-	A.E. concentrado en Tembloc; resuspendido con agua y Tween20; homogeneizado con agitador; concentrado un 25, 50 y 75%.
		50%	0 (R)	-	
		75%	0 (R)	-	
Paraguayo	9	25%	0 (R)	0 (R)	A.E. concentrado en Tembloc; resuspendido con agua y Tween20; homogeneizado con agitador; concentrado un 25, 50 y 75%.
		50%	0 (R)	0 (R)	
		75%	0 (R)	0 (R)	
Cereza	10	25%	17 (M.S.)	24,5 (M.S.)	A.E. concentrado en Tembloc; resuspendido con agua y Tween20; homogeneizado con agitador; concentrado un 25, 50 y 75%.
		50%	14 (P.S.)	26,5 (M.S.)	
		75%	15 (P.S.)	27 (M.S.)	
Albaricoque	11	25%	14 (P.S.)	0 (R)	A.E. concentrado en Tembloc; resuspendido con agua y Tween20; homogeneizado con agitador; concentrado un 25, 50 y 75%.
		50%	15,5 (P.S.)	20 (M.S.)	
		75%	13 (P.S.)	0 (R)	
Ciruela	12	25%	0 (R)	0 (R)	A.E. concentrado en Tembloc; resuspendido con agua y Tween20; homogeneizado con agitador; concentrado un 25, 50 y 75%.
		50%	0 (R)	0 (R)	
		75%	0 (R)	0 (R)	
Cereza-Melocotón	13	25%	14 (P.S.)	33 (S)	A.E. concentrado en Tembloc; resuspendido con agua y Tween20; homogeneizado con agitador; concentrado un 25, 50 y 75%.
		50%	12,5 (P.S.)	20 (M.S.)	
		75%	13 (P.S.)	0 (R)	

#### **4.2.1.3. Método del agar enriquecido con adición de extractos acuosos y metanólicos**

En un primer ensayo se utilizó un medio agarado enriquecido con adición de extractos acuosos y metanólicos, y con zumo de melocotón (ZMPDA-E+Ex.) para facilitar la esporulación del moho. Sin embargo, la inclusión del zumo provocó la rápida deshidratación del medio durante la incubación invalidando los resultados.

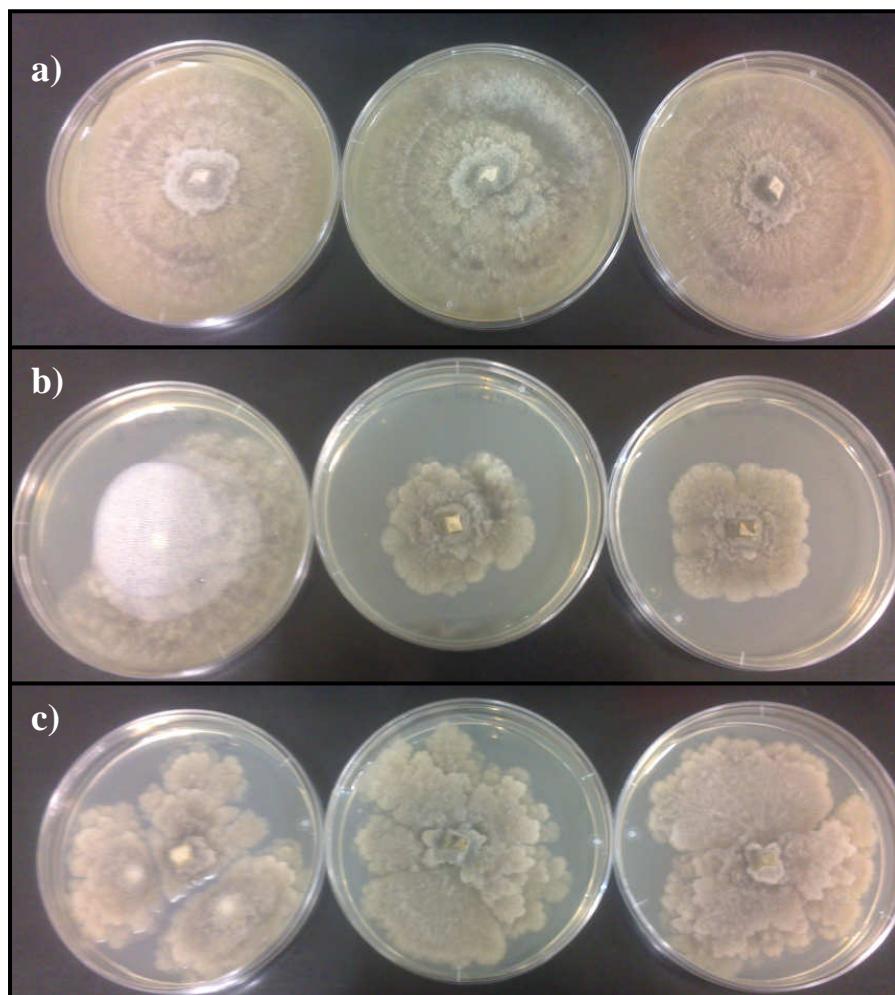
Un segundo ensayo se realizó con extractos acuosos de ciruela y nectarina y metanólicos de albaricoque, cereza, ciruela, melocotón y paraguayo. El crecimiento fúngico se midió diariamente estando prevista la finalización del ensayo cuando en las placas control el moho alcanzara la periferia de las mismas (85 mm). La imagen 4.21 nos muestra el crecimiento del moho en este ensayo.

En la tabla 4.6 se exponen los resultados obtenidos. Como se puede observar en las placas control, el moho no llega a alcanzar la periferia, quedándose estancado en el día 16 con una media de 68,3 mm. En algunos tratamientos el crecimiento fúngico sí que alcanzó la periferia, es decir, los 85 mm de diámetro. No se detectó por tanto ninguna inhibición del crecimiento de *M. laxa* en este ensayo aunque si observamos que en los primeros días de incubación, el crecimiento fúngico en las placas control fue mayor que en las placas tratadas. Sin embargo, con el paso de los días, el crecimiento de *M. laxa* en los medios enriquecidos se aceleró, llegando a extenderse completamente.

En base a los resultados obtenidos, indicar que no es que se ha generado un efecto antifúngico, sino que parece ser todo lo contrario: la adición de extractos acuosos y metanólicos al medio PDA-E potencia el crecimiento de *M. laxa* a excepción del extracto metanólico de melocotón.

**Tabla 4.6:** Evolución del diámetro colonial de *M. laxa* sembrada en placas PDA-E de 85 mm de diámetro adicionando extractos acuosos y metanólicos procedentes de frutos de aclareo e incubados a 25° C / 16 días.

Tiempo de incubación	Diamáetro colonial de <i>M. laxa</i> (mm)								
	Control +	Control Metanol	Albaricoque Metanólico	Cereza Metanólico	Ciruela Acuoso	Ciruela Metanólico	Melocotón Metanólico	Nectarina Acuoso	Paraguayo Metanólico
Día 5	19,3 ± 3,2	-	9,3 ± 0,6	8,3 ± 1,5	28 ± 2	9,7 ± 3,8	8,3 ± 0,6	24 ± 1	13 ± 1
Día 6	22,7 ± 4,0	6,7 ± 0,6	12 ± 1	11,7 ± 2,1	38 ± 3	13,3 ± 4,0	10,7 ± 0,6	30,7 ± 2,1	14,7 ± 0,6
Día 7	27 ± 5,2	8,7 ± 0,6	16,3 ± 1,5	13,7 ± 1,5	47 ± 2	17,7 ± 4,6	12 ± 1	36,7 ± 5,0	19 ± 1
Día 8	42 ± 22,6	10,3 ± 0,6	22,3 ± 2,5	13,7 ± 2,9	59 ± 4	23,3 ± 6,6	13,7 ± 1,2	42,3 ± 4,5	24 ± 1
Día 9	36,7 ± 10,2	15 ± 2	29 ± 3	27,3 ± 2,3	67,3 ± 3,2	30,7 ± 10,7	17,3 ± 2,5	46,3 ± 3,1	31 ± 2
Día 10	43,7 ± 11,8	21,3 ± 4,2	39 ± 3	35,7 ± 3,8	72,3 ± 1,2	41 ± 14	23,3 ± 2,3	51,7 ± 6,8	42,3 ± 3,1
Día 12	48,3 ± 14,2	31 ± 8,9	52,3 ± 4,2	50,7 ± 4,0	79,3 ± 3,8	54,7 ± 15,0	32,3 ± 4,0	62 ± 4	58,7 ± 7,1
Día 13	51,7 ± 15,3	37 ± 9,6	60 ± 3,6	60,7 ± 4,6	85 ± 0	65,3 ± 17,1	41,3 ± 7,5	68 ± 7,9	67,3 ± 4,6
Día 14	64,7 ± 2,1	43 ± 12,2	69,7 ± 5,0	71 ± 4	85 ± 0	71 ± 12,2	49 ± 7	71,7 ± 6,4	79,7 ± 3,5
Día 15	66,7 ± 1,2	47,7 ± 13,3	80,3 ± 4,5	80,7 ± 4,4	85 ± 0	78 ± 6,6	57,7 ± 7,2	73,3 ± 5,8	85 ± 0
Día 16	68,3 ± 1,2	52,3 ± 15,3	84 ± 1,7	85 ± 0	85 ± 0	82,7 ± 3,2	67,7 ± 6,4	76,3 ± 4,9	85 ± 0
% INHIBICIÓN	-	23,4	0	0	0	0	1,0	0	0



**Imagen 4.21:** Placas de PDA-E adicionadas de extracto metanólico de paraguayo (a), de metanol (b), y sin extracto ni metanol, inoculadas superficialmente en botón con *M. laxa* e incubadas a 25° C / 16 días / aerobiosis

Al igual que en el método de difusión en agar, los escasos porcentajes de inhibición obtenidos empleando los extractos acuosos y metanólicos podría deberse a la progresiva volatilización del metanol del medio agarado. De este modo se explicaría el retraso en el crecimiento fúngico los primeros días, y su exponencial desarrollo una vez el metanol se volatilizaba.

#### 4.2.3.4. Método del agar enriquecido con adición de aceites esenciales

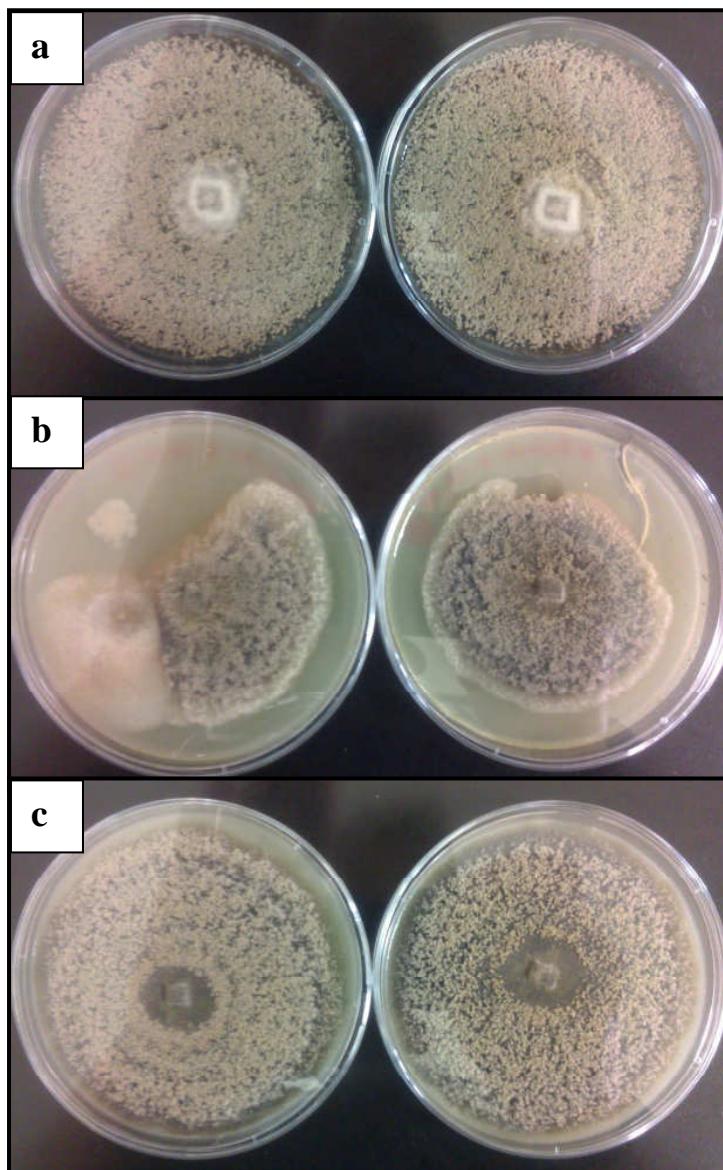
En este caso, al medio agarado enriquecido se le adicionaron aceites esenciales de los dos frutos (cereza y melocotón) que mayor potencial antifúngico habían mostrado en el ensayo de difusión en agar.

La tabla 4.7 recoge los diámetros coloniales de *M. laxa* y *M. fructicola* durante los 15 días del ensayo. El aceite esencial de cereza no demostró potencial inhibitorio sobre ninguno de los dos mohos. Incluso parece ser que posibilita un crecimiento más rápido de *M. laxa* ya que este moho alcanza el 100 % de crecimiento en el 10º día, 3 días antes que las placas control la presencia del aceite. Por el contrario, el aceite esencial de melocotón sí que produjo una ligera inhibición ya que mientras los controles en ambas especies alcanzaron su máximo crecimiento (85mm), las placas enriquecidas adicionadas con este aceite consiguieron como máximo un diámetro de 65 mm para *M. laxa* y 45,5 mm para *M. fructicola* (Imagen 4.22).

**Tabla 4.7:** Evolución del diámetro colonial de *M. laxa* y *M. fructicola* sembradas superficialmente en botón en placas de PDA-E sin adición (control) o con adición de aceites esenciales de melocotón y cereza de aclareo al 2% e incubadas a 25° C / 15 días.

Tiempo de incubación 25° C	Diámetro colonial de <i>Monilinia</i> spp.					
	<i>M. laxa</i>			<i>M. fructicola</i>		
	Control	A.E. Melocotón	A.E. Cereza	Control	A.E. Melocotón	A.E. Cereza
Día 3	<b>10,0 ± 1,4</b>	12,5 ± 0,7	15,0 ± 0	—	—	—
Día 4	<b>15,0 ± 5,7</b>	17,5 ± 0,1	21,5 ± 0,7	—	—	—
Día 5	<b>22,5 ± 12,0</b>	24,5 ± 0,7	29,0 ± 1,4	<b>15,5 ± 0,7</b>	—	—
Día 6	<b>28,0 ± 14,1</b>	32,5 ± 0,7	38,5 ± 0,7	<b>33,5 ± 0,7</b>	10,0 ± 2,8	15,5 ± 0,7
Día 7	<b>36,0 ± 15,6</b>	40,5 ± 0,7	47,0 ± 1,4	<b>49,0 ± 0</b>	20,0 ± 2,8	30,5 ± 0,7
Día 8	<b>72,5 ± 0,7</b>	60,5 ± 6,4	75,5 ± 0,7	<b>85,0 ± 0</b>	<b>45,5 ± 4,9</b>	74,0 ± 0
Día 9	<b>76,5 ± 2,1</b>	63,5 ± 4,9	83 ± 0	<b>85,0 ± 0</b>	53,5 ± 4,9	81,5 ± 2,1
Día 10	<b>79 ± 1,4</b>	65,0 ± 7,1	85 ± 0	<b>85 ± 0</b>	62,5 ± 3,5	85 ± 0
Día 11	<b>81 ± 1,4</b>	65,0 ± 7,1	85 ± 0	<b>85 ± 0</b>	62,5 ± 3,5	85 ± 0
Día 12	<b>83 ± 0</b>	65,0 ± 7,1	85 ± 0	<b>85 ± 0</b>	62,5 ± 3,5	85 ± 0
Día 13	<b>85 ± 0</b>	<b>65,0 ± 7,1</b>	85 ± 0	<b>85 ± 0</b>	62,5 ± 3,5	85 ± 0
Día 14	<b>85 ± 0</b>	65,0 ± 7,1	85 ± 0	<b>85 ± 0</b>	62,5 ± 3,5	85 ± 0
Día 15	<b>85 ± 0</b>	65,0 ± 7,1	85 ± 0	<b>85 ± 0</b>	62,5 ± 3,5	85 ± 0
% inhibición	0	23,5	0	0	46,5	0

Nuevamente el aceite esencial de melocotón de aclareo produce inhibición en el crecimiento de *Monilinia* spp. confirmando así, su posible actividad antifúngica. Sin embargo, el aceite esencial de cereza no ha mostrado tales efectos inhibitorios, discrepando así con los resultados obtenidos empleando el método de difusión en agar.



**Imagen 4.22:** Placas de PDA-E sin adición (a, control) o con adición de aceites esenciales de melocotón (b) y cereza (c) al 2% e inoculadas superficialmente en botón con *M. fructicola* e incubadas a 25° C / 13 días / aerobiosis.

#### **4.2.4. Actividad antifúngica *in vitro* en medio líquido**

El siguiente paso, al igual que en el caso de los extractos enzimáticos, fue determinar la actividad antifúngica en medio líquido y favoreciendo así el contacto entre la sustancias inhibidora y el moho.

#### 4.2.4.1. Medio líquido enriquecido con adición de extractos acuosos y metanólicos

En un primer ensayo se determinó la actividad antifúngica de todos los extractos acuosos y metanólicos añadiendo 1 mL de extracto al medio de cultivo líquido (50 mL). El porcentaje de inhibición obtenido, medido como disminución del peso del extracto seco en comparación con el lote control, se muestra en la tabla 4.8.

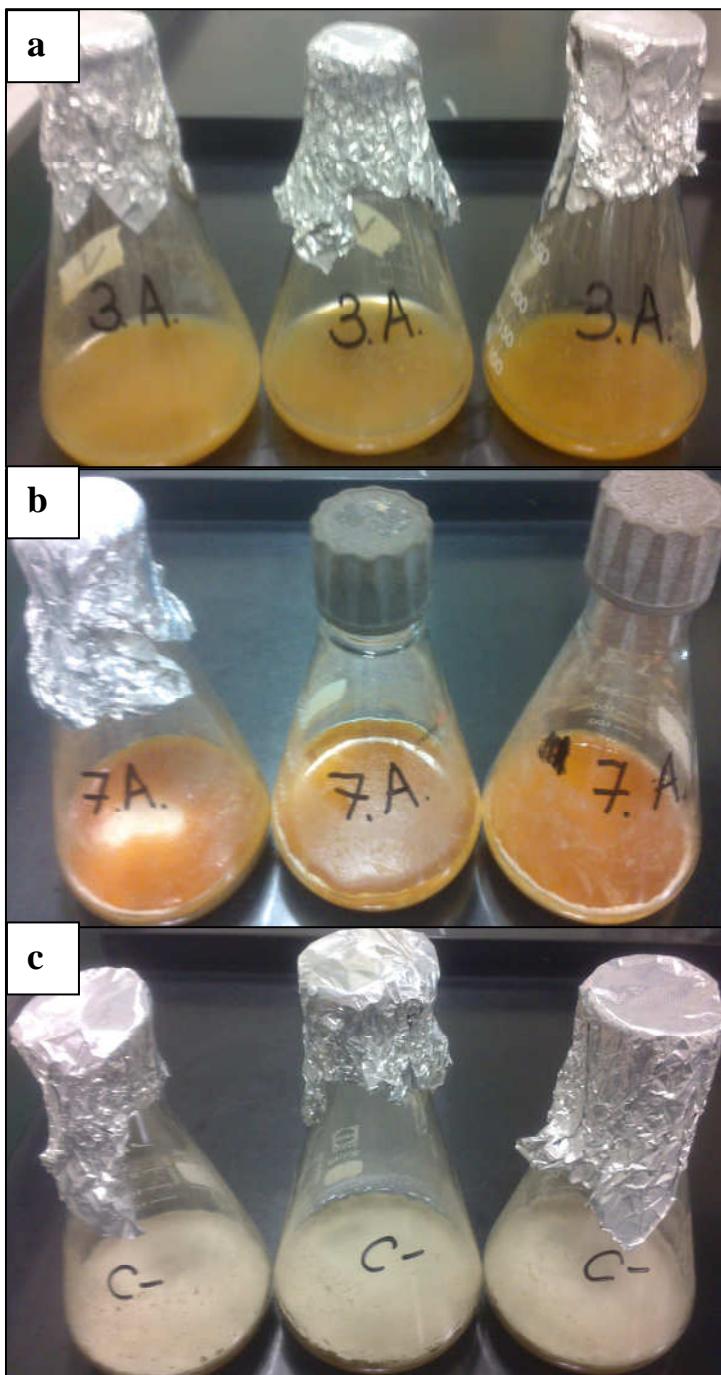
**Tabla 4.8:** Inhibición del crecimiento de *M. laxa* inoculada en medio ZMCZB-E con adición de extractos acuosos y metanólicos procedentes de diferentes frutos de aclareo al 2% y tras incubación a 25° C / 10 días

Tratamiento	Peso micelio seco (g)	% inhibición
<b>Melocotón acuoso</b>	1,2 ± 0,6	<b>37,8</b>
<b>Melocotón metanólico</b>	1,2 ± 0,1	<b>42,6</b>
<b>Nectarina acuoso</b>	1,2 ± 0,7	<b>42,1</b>
<b>Nectarina metanólico</b>	1,0 ± 0,3	<b>52,1</b>
<b>Albaricoque acuoso</b>	1,4 ± 0,4	<b>32,2</b>
<b>Albaricoque metanólico</b>	1,0 ± 0,1	<b>49,2</b>
<b>Paraguayo acuoso</b>	1,4 ± 0,2	<b>28,0</b>
<b>Paraguayo metanólico</b>	1,0 ± 0,3	<b>52,2</b>
<b>Ciruela Acuoso</b>	1,2 ± 0,3	<b>42,1</b>
<b>Ciruela Metanólico</b>	0,7 ± 0,1	<b>65,2</b>
<b>Cereza Acuoso</b>	1,4 ± 0,4	<b>27,6</b>
<b>Cereza Metanólico</b>	0,6 ± 0,1	<b>69,2</b>
<b>Control <i>M. laxa</i></b>	<b>2,0 ± 0,3</b>	–

Podemos observar que el peso del micelio seco obtenido difiere notablemente de unos extractos a otros. Los extractos que mayor potencial antimicrobiano han sido los extractos metanólicos y especialmente, los de cereza, ciruela, paraguayo y nectarina. En un segundo plano estarían los extractos metanólicos de melocotón y albaricoque y los acuosos de nectarina y ciruela. Al aplicar un análisis de varianza de una vía se comprueba que todos los extractos han producido una inhibición significativa del crecimiento de *M. laxa* excepto los extractos acuosos de albaricoque, paraguayo y cereza. Aplicando un análisis t-student no se observan diferencias estadísticas ( $p>0,05$ ) entre la inhibición obtenida por los extractos acuosos frente a los metanólicos.

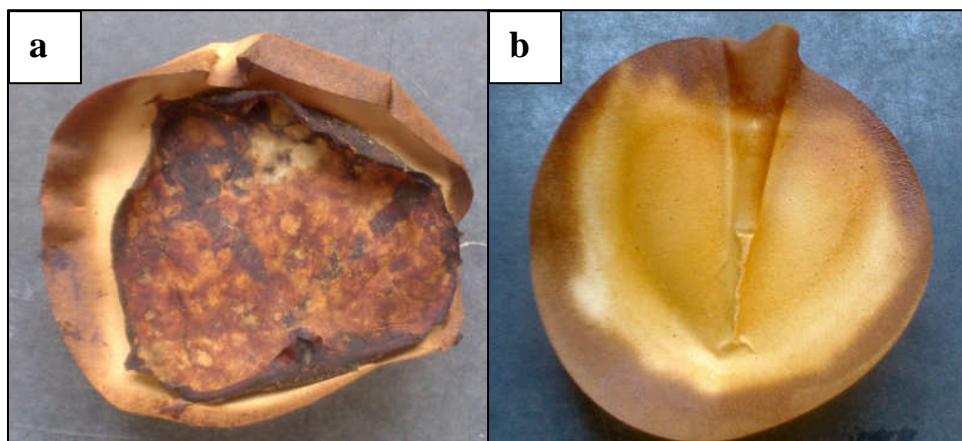
Comparando los resultados obtenidos en este ensayo con los obtenidos en el medio sólido, observamos una discrepancia total entre ambos. La causa en el ensayo en medio sólido, puede residir en la volatilización del metanol del medio agarado, siendo este compuesto, el principal responsable de la inhibición de crecimiento colonial de *M. laxa* (Control metanol 23,4%). En los ensayos en medio líquido, todos los matraces fueron tapados con papel de aluminio, creando unas condiciones de anaerobiosis, donde no se produjo tal volatilización.

Por otra parte, la búsqueda necesaria de un modo de cuantificación en el ensayo en medio líquido (cuantificación por pesada) empleando un caldo de cultivo compuesto por zumo de melocotón natural, puede encaminarnos hacia resultados falsos. Cabe destacar, que en algunos matraces se observó claramente la presencia masiva de crecimiento micelial sobre la superficie del medio líquido, mientras que en otros, la ausencia era evidente (Imagen 4.23). De este modo, los datos por pesada de papeles de filtro desecados, puede falsear los resultados, ya que el papel puede recoger otros compuestos típicos del zumo de melocotón, y no únicamente el micelio crecido sobre medio líquido. Por tanto, la única manera de determinar si hubo crecimiento micelial era bajo su observación.



**Imagen 4.23:** Aspecto de matraces con caldo ZMCZB-E inoculados con *M. laxa* y adicionados de distintos extractos de frutos de aclareo e incubados a 25° C / 10 días.  
 (a): ausencia de micelio; (b): ligera presencia de micelio;  
 (c): notable presencia de micelio.

La imagen 4.24 muestra el aspecto de los papeles de filtro a través de los cuales se realizó la filtración del contenido de los matraces tras 10 días de incubación. La imagen es suficientemente clara como para apreciar en qué matraces hubo crecimiento fúngico, pese a que los resultados por pesada indicasen lo contrario.



**Imagen 4.24:** Papel de filtro tras haber sido desecado en estufa a 80° C durante 48 horas. (a) Presencia notable de micelio fúngico; (b) ausencia de micelio fúngico seco sobre papel de filtro.

#### 4.2.4.2. Medio líquido enriquecido con adición de aceites esenciales

En la tabla 4.9 se detallan los resultados obtenidos en la valoración de la actividad antifúngica en medio líquido de los aceites esenciales obtenidos de frutos de aclareo. Solo se evaluó la eficacia de los dos aceites que mejores resultados habían obtenido en los métodos de determinación de la actividad antifúngica realizados en medio sólido, el aceite esencial de melocotón y el de cereza. En el caso de *M. laxa* tanto el aceite esencial de cereza como el de melocotón consiguen una inhibición significativa de su crecimiento, con un 36,3 y un 55 %, respectivamente. En *M. fructicola*, la inhibición generada por el aceite esencial de melocotón es incluso mayor (62%); el aceite esencial de cereza parece no tener efecto alguno (porcentaje de inhibición de 6,9%).

**Tabla 4.9:** Inhibición del crecimiento de *Monilinia* spp. incubada en medio CZB-E y con adición de aceites esenciales procedentes de frutos de aclareo al 2% y tras incubación a 25° C / 10 días

Microorganismo	Tratamiento	Peso micelio seco (g)	% inhibición
<i>M. laxa</i>	A.E. Melocotón	0,17 ± 0,04	<b>55,0</b>
	A.E. Cereza	0,24 ± 0,15	<b>36,3</b>
	Control <i>M. laxa</i>	0,38 ± 0,03	-
<i>M. fructicola</i>	A.E. Melocotón	0,19 ± 0,05	<b>62,0</b>
	A.E. Cereza	0,46 ± 0,02	<b>7,0</b>
	Control <i>M. fructicola</i>	0,50 ± 0,04	-

Comparando estos resultados con el ensayo en medio sólido, de nuevo, es el aceite esencial de melocotón el que demuestra un mayor potencial inhibitorio especialmente si el ensayo se realiza en medio líquido y frente a ambas cepas fúngicas.

A diferencia de lo obtenido en el ensayo con medios de cultivo sólidos, el aceite esencial de cereza demuestra poseer cierto potencial inhibitorio de *M. laxa*.

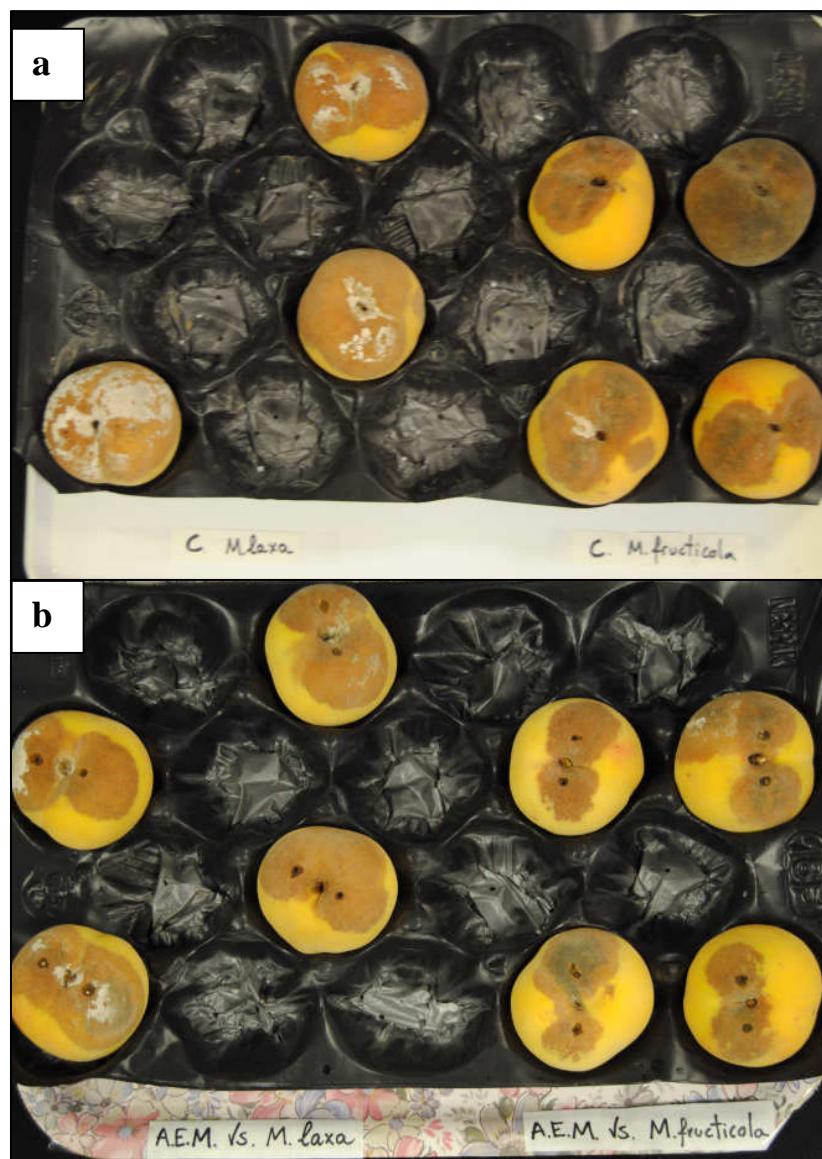
En este caso, al ser el medio líquido CZB-E sin zumo de melocotón añadido, los resultados no fueron falseados por compuestos típicos del zumo de melocotón que pudieran quedar retenidos en el papel de filtro, como en los ensayos de medio líquido con adición de extractos acuosos y metanólicos. Otra vez más, el aceite esencial de melocotón, ha conseguido porcentajes de inhibición importantes, confirmando así su posible actividad antifúngica.

#### 4.3.2. Actividad antifúngica *in vivo* en melocotones

En melocotones comerciales inoculados con *M. laxa* y *M. fructicola* y posteriormente tratados con aceite esencial de melocotón, no se apreció inhibición alguna. El crecimiento fúngico fue más intenso cuando el micelio invadía la zona

calicílica, en el entorno de las incisiones realizadas. Esto ocurrió en el lote control inoculado con *M. laxa* tras 4 días de incubación y tras 5 días de incubación para *M. fructicola*.

En el caso de melocotones inoculados con las cepas fúngicas y tratados con aceite esencial de melocotón, alcanzaron su máxima tasa de crecimiento fúngico un día después que los controles (Imagen 4.25)



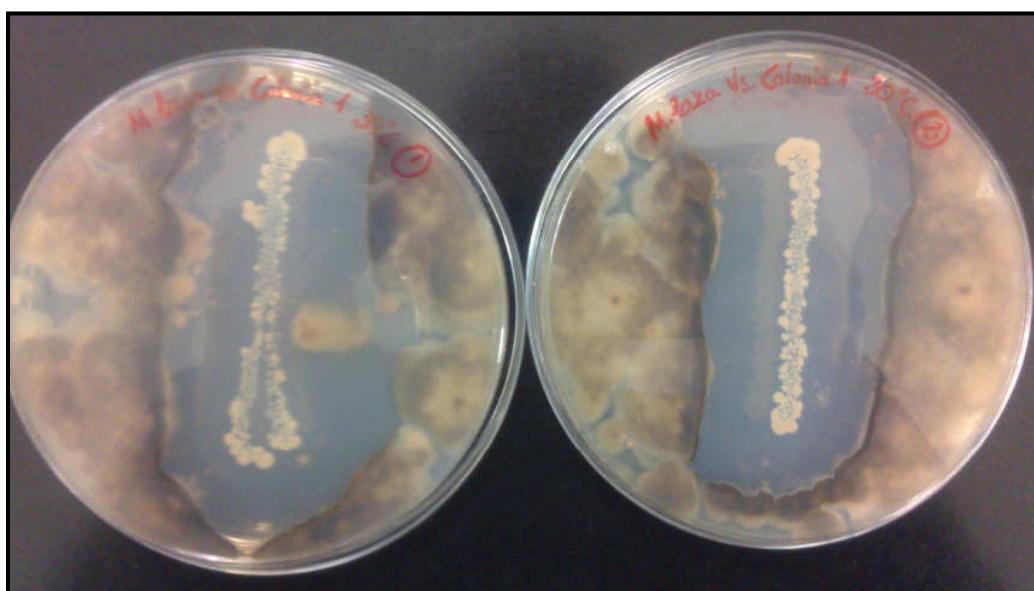
**Imagen 4.25:** Aspecto de los melocotones inoculados con *Monilinia* spp. (a) y con *Monilinia* spp. + aceite esencial de melocotón (b) e incubados a 25° C / 4 días.

## **4.3. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE UNA CEPA BACTERIANA DE *PAENIBACILLUS POLYMYXA* AISLADA DE MIEL**

### **4.3.1. Actividad antifúngica *in vitro* en medio sólido**

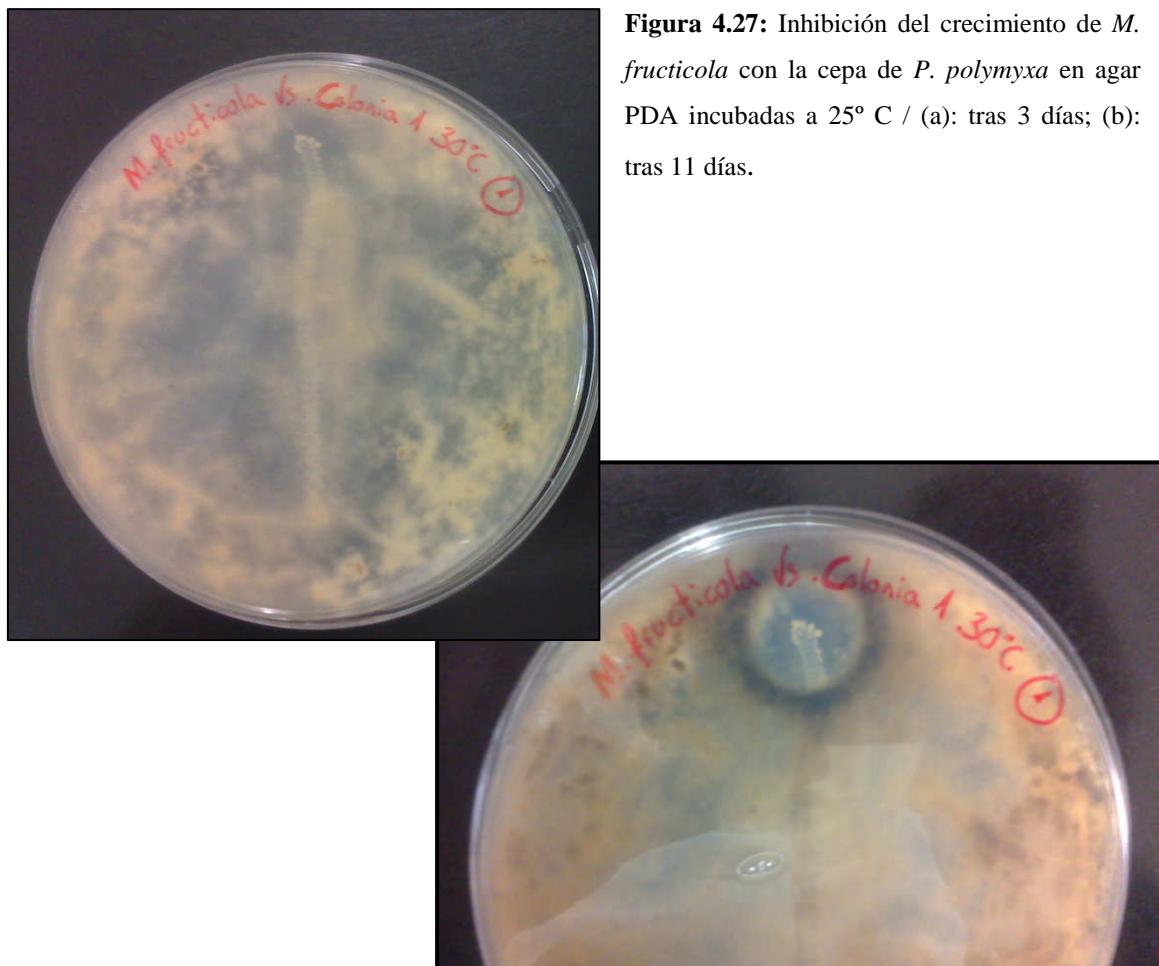
#### **4.3.1.1. Método de difusión en agar**

Las imágenes 4.26 y 4.27 nos muestran la notable inhibición ejercida por la cepa de *P. polymyxa* sobre los mohos *M. laxa* y *M. fructicola* en medio sólido.



**Imagen 4.26:** Placas de PDA sembradas superficialmente con *M. laxa* y en línea con *P. polymyxa* e incubadas a 30° C / 10 días / aerobiosis.

En *M. fructicola* el efecto inhibidor no fue tan elevado. La imagen 4.27, efectuada tras 11 días de incubación, nos muestra inhibición del crecimiento del moho, solo en los extremos de la línea de crecimiento de la bacteria; en dichas zonas donde la concentración bacteriana es mayor.



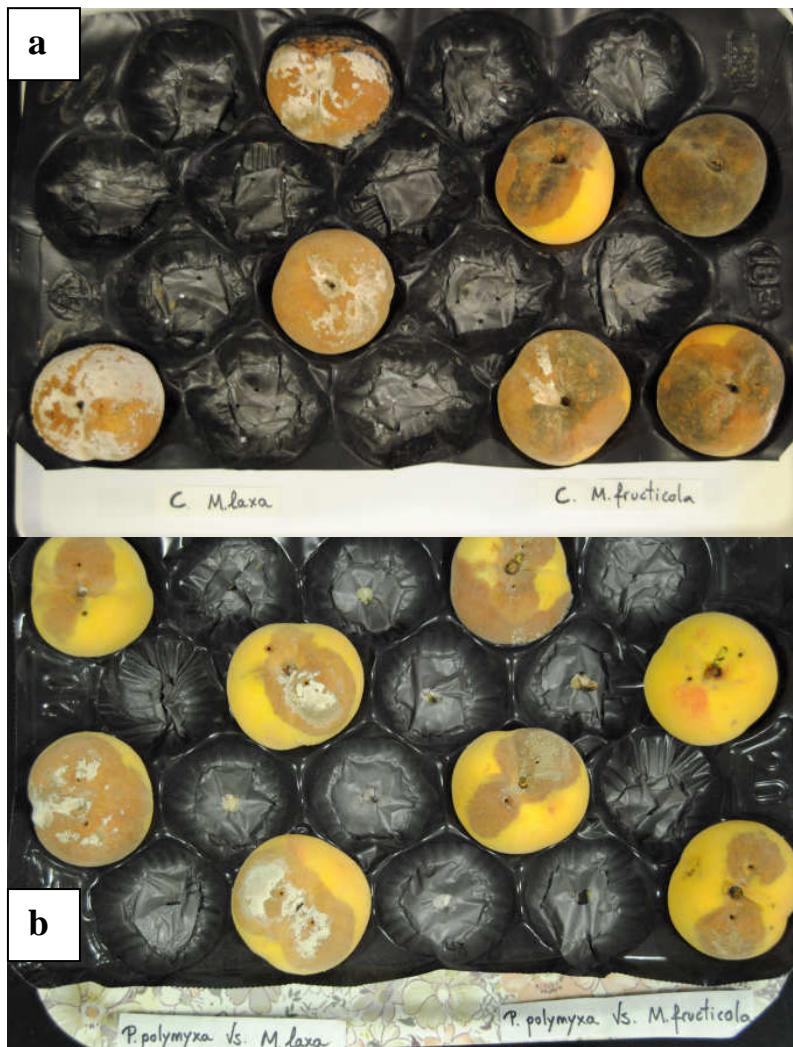
**Figura 4.27:** Inhibición del crecimiento de *M. fructicola* con la cepa de *P. polymyxa* en agar PDA incubadas a 25° C / (a): tras 3 días; (b): tras 11 días.

#### 4.3.2. Actividad antifúngica *in vivo* en melocotones

El estudio de los melocotones inoculados con *M. laxa* y *M. fructicola* y posteriormente tratados con la cepa de *P. polymyxa*, no evidenció efecto antimicrobiano alguno (Imagen 4.28). El crecimiento fúngico fue muy notable cuando el micelio vegetativo se extendió en torno a la zona calicíclica entre las incisiones practicadas.

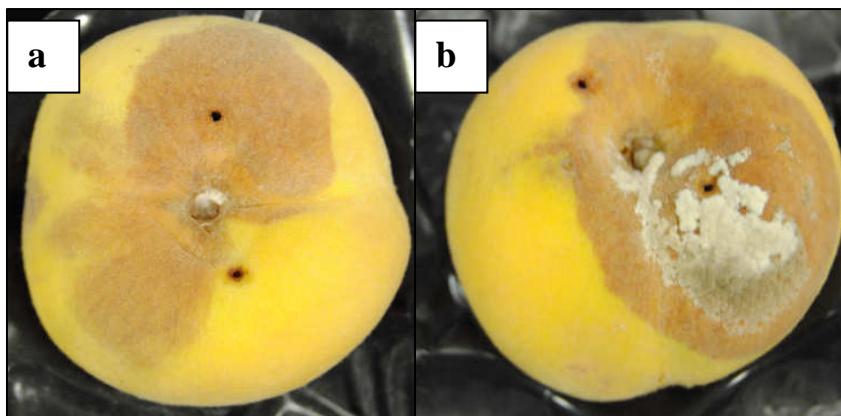
Esto ocurrió en el lote control tras 4 días de incubación en los melocotones contaminados con *M. laxa* y tras 5 días de incubación en los contaminados con *M. fructicola*.

Sin embargo, la clara inhibición establecida en el estudio *in vitro*, no ha tenido su continuidad en el ensayo sobre melocotones. Sí que parece haberse producido una ralentización en el crecimiento de los mohos y un retraso en el biodeterioro. Además en dos de las incisiones practicadas, tardó mucho tiempo en aparecer el biodeterioro. (Imagen 4.29).



**Imagen 4.28:** Aspecto de los melocotones inoculados con *Monilinia* spp. (a) y con *Monilinia* spp. + *P. polymyxa* (b) e incubados a 25° C / 4 días.

Como habíamos señalado, dos de las incisiones inoculadas con *M. laxa* no han presentado crecimiento fúngico a su alrededor. La imagen 4.29. muestra un detalle con mayor claridad.



**Imagen 4.29:** Detalle de incisiones inoculadas con *M. laxa* + *P. polymyxa* e incubadas a 25° C / 4 días.

En todo proyecto de investigación hay una necesidad y casi obligación de llevar a cabo ensayos *in vivo*. En definitiva, son los que más valor añadido ofrecen a este tipo de experimentación, con lo cual, los resultados *in vivo* ofrecidos en este trabajo, no son muy optimistas.

El estudio de aceites esenciales procedentes de frutos de aclareo es algo novedoso y no hay bibliografía disponible para poder consultar y comparar. Los resultados *in vitro* obtenidos en el presente proyecto con estos aceites esenciales no son para nada despreciables. En mi opinión, futuras investigaciones sobre estos compuestos podrían ofrecer nuevas alternativas a los tratamientos de hoy en día en el tratamiento de las frutas en post-cosecha.

Así mismo, la cepa de *Paenibacillus polymyxa*, también debería ser objeto de estudio. Como ya hemos visto, hay diversos trabajos que integran varios métodos de control obteniendo muy buenos resultados. Esta cepa bacteriana, podría ser un microorganismo antagonista que en combinación con otros métodos, ofrezca una importante actividad antifúngica.

## **5. CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES

### PRIMERA

Los extractos enzimáticos obtenidos de distintos substratos nutricionales (glucosa, pared celular de diferentes especies de mohos y tres extractos diferentes del alga *Laminarina* spp.) inoculados con *Penicillium purpurogenum* no han demostrado actividad antifúngica frente a ninguno de los mohos ensayados (*Monilinia laxa* y *Monilinia fructicola*). Solo se detectó una inhibición ligera ( $\approx 25\%$ ) del crecimiento de *M. laxa* en medio líquido, pero que desaparece en ensayos posteriores.

### SEGUNDA

No se han podido reproducir con éxito los estudios de Larena y Melgarejo que demuestran la inactivación de *M. laxa* por exoenzimas generados por *P. purpurogenum*, a pesar de haber seguido con detalle todas las instrucciones reseñadas por estos autores y de haber utilizado la misma cepa de *P. purpurogenum*.

### TERCERA

A pesar del elevado contenido en compuestos fenólicos de los frutos inmaduros del aclareo, sus extractos acuosos y metanolícos carecen de potencial antifúngico frente a *Monilinia*; incluso parece potenciar su crecimiento.

### CUARTA

Los aceites esenciales obtenidos de diferentes frutos de aclareo (melocotón, nectarina, albaricoque, ciruela y cereza) carecen, en general, de antibiosis frente a *Monilinia* spp. siguiendo la metodología de difusión en agar. Solamente el procedente de melocotón parece tener cierto efecto, quedando confirmado en ensayos en medio líquido, mostrando una reducción del crecimiento del 55%.

### QUINTA

Cuando la determinación del potencial antifúngico de los aceites esenciales obtenida de frutos de aclareo se lleva a cabo en medios de cultivo líquidos, se evidencia una mayor actividad antimicrobiana. Es probable que el contacto más directo entre esporas fúngicas y aceites esenciales favorezca o potencie la antibiosis de éstos.

## **SEXTA**

Los aceites esenciales que han presentado un mayor potencial antimicrobiano in vitro han sido los procedentes de melocotón, cereza y albaricoque. Parece ser que dicha actividad antifúngica está más ligada al tipo de fruto que a la concentración.

## **SÉPTIMA**

Cuando la valoración de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se traslada a melocotones comerciales, se observa que ninguno de ellos es capaz de inhibir la podredumbre marrón. Quizás el traumatismo tan manifiesto, como son las incisiones efectuadas en la zona calíclica de los melocotones, impide o contrarresta la acción de cualquier agente antimicrobiano.

## **OCTAVA**

La cepa de *Paenibacillus polymyxa* utilizada en este estudio ha demostrado un manifiesto potencial antifúngico in vitro frente a *M. laxa*, pero que no se vió reflejado cuando el estudio se efectuó directamente sobre melocotones.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, H., Rezaei, K. and Rashidi, L. (2008). Extraction of essential oils from the seeds of pomegranate using organic solvents and supercritical CO<sub>2</sub>. Journal of the American Oil Chemists' Society 85, 83-89.
- Adams, M.R., Hartley, A.D., Cox, L.J. (1989). Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. Food Microbiology 6, 69-77.
- Adaskaveg, J.E., Förster, H., Gubler, W.D., Teviotdale, B.L. and Thompson, D.F. (2006). Reduced-risk fungicides help manage brown rot and other fungal diseases of stone fruit. California Agriculture 59, 109-114.
- Agrios G.N. 1999. Fitopatología. 3º Edición. Editorial Limusa, México, D.F.
- Ahmadi, H., Biasi, W.V., Mitcham, E.J. (1999). Control of brown rot decay of nectarines with 15%carbon dioxide atmospheres. Journal of American Society for Horticultural Sciences 124, 708–712.
- Barkai-Golan, R. and Philips, D.J. (1991). Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control (Rev.). Plant Disease 75, 1085-1089.
- Birla, S., Wang, J., Tang, J., Tiwari, G. (2008). Characterization of radio frequency heating of fresh fruits influenced by dielectric properties. Journal of Food Engineering 89, 390-398.
- Boletín Fitosanitario de Avisos e Informaciones (2012). Centro de Protección Vegetal, Gobierno de Aragón.
- Bosshard, E., Hilber-Bodmer, M., Scharer, H.J., Bunter, M., and Duffy, B. (2006). First report of the quarantine brown rot pathogen Monilinia fructicola on imported stone fruits in Switzerland 1. Plant Disease 90, 1554.
- CABI online. Consultado en Julio de 2013 en:  
<http://www.cabi.org/isc/default.aspx?site=144&page=4066>

- Caccioni, D. and Guizzardi, M. (1994). Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components. *Journal of Essential Oil Research* 6, 173-179.
- Campbell, R. (1989). Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University. Cambridge, United Kingdom.
- Cañamás, T.P., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Anguera, M. and Teixidó, N. (2008). Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest applications of biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2: Part II. Effectiveness of different cell formulations. *Postharvest Biology and Technology* 49, 96-106.
- Casals, C., Teixidó, N., Viñas, I., Silvera, E., Lamarca, N. and Usall, J. (2010). Combination of hot water, *Bacillus subtilis* CPA-8 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. *European Journal of Plant Pathology* 128, 51-63.
- Casals, C., Viñas, I., Landl, A., Picouet, P., Torres, R. and Usall, J. (2010). Application of radio frequency heating to control brown rot on peaches and nectarines. *Postharvest Biology and Technology* 58, 218-224.
- Cavallito, C.J. and Bailey, J.H. (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum* I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *Journal American Chemical Society* 66, 1950-1955.
- Celli G.B., Pereira-Netto, A.B. and Beta, T. (2011). Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. *Food Research International* 44, 2442-2451.
- Cook, R.J. and Baker, K.F. (1983). The nature and practice of biological control. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U.S.A.
- Couey, H.M. 1989. Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pests of fruits. American Society for Horticultural Science. 24, 198-202.

- Crossa-Raynaud, P. and Audergon, J. (1987). Apricot rootstocks. In: Rootstocks for fruit crops, Rom and Carlson. Ed. Wiley, New York. 295-320.
- Dao, T., Bensoussan, M., Gervais, P. and Dantigny, P. (2008). Inactivation of conidia of *Penicillium chrysogenum*, *P. digitatum* and *P. italicum* by ethanol solutions and vapours. International Journal of Food Microbiology 122, 68-73.
- Davidson, P.M. and Parish, M.E. (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. Food Technology 43, 148-155.
- De Cal, A. y Melgarejo, P. (2000). Momificado de los frutales de hueso (*Monilia* spp.). Enfermedades de los frutales de pepita y hueso. Monografías SEF.
- Dirección General de Tecnología Agraria (2006). Gobierno de Aragón.
- Droby, S., Chalutz, E., Horev, B., Cohen, L., Gaba, V., Wilson, C.L. and Wisniewski, M. (1993). Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mould decay caused by *Penicillium digitatum*. Plant Pathology 42, 418-424.
- Duchoslava, J., Siruckova, I., Zapletalova, E., Navratil, M., and Safarova, D. (2007). First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on various stone and pome fruits in Czech Republic. Plant disease, 91, 907.
- Earnshaw, R.G., Appleyard, J., Hurst, R.M. (1995). Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. International Journal of Food Microbiology 28, 197-219.
- Eikani, M.H., Golmohammad, F. and Homami, S.S. (2012). Extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using superheated hexane. Food and Bioproducts Processing 90, 32-36.
- El Rancaguino online. Consultado en Mayo 2013 en:  
<http://www.elrancaguino.cl/rancaguino/noticias.php?cod=5052>
- Elmer, P.A.G., Gaunt, R.E. (1993) Effect of frequency of dicarboximide applications on resistant populations of *Monilinia fructicola* and brown rot in New Zealand orchards. Crop Protection 12, 83-88.

Facultad de Agronomía. Departamento de Protección Vegetal. Consultado en Marzo de 2013 en: <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/proyectos/Monilinia>

Fálder Rivero, A. (2003). Enciclopedia de los alimentos. Distribución y consumo. Julio-Agosto. Consultado en Agosto 2013 en: [http://www.mercasa.es/files/multimedios/1292603156\\_DYC\\_2003\\_69\\_115\\_132.pdf](http://www.mercasa.es/files/multimedios/1292603156_DYC_2003_69_115_132.pdf)

Falik, E., Grinberg, S., Gambourg, M., Klein, J.D., Lurie, S.(1996). Prestorage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit. Plant Pathology 45, 92-97.

Förster, H., Driever G.F., Thompson, D.C., Adaskaveg, J.E. (2007). Postharvest decay management for stone fruit crops in California using the “reduced-risk” fungicides fludioxonil and fenhexamid. Plant disease 91, 209-215.

Galán, L.C. (2003). Tesis doctoral: Desarrollo de métodos rápidos para verificar la eficacia fungicida de sustancias desinfectantes. 45-49.

Gangneux J.P., Noussair, L., Bouakline, A., Roux, N., Lacroix, C. and Derouin, F. (2004). Experimental assessment of disinfection procedures for eradication of *Aspergillus fumigatus* in food. Blood 104, 2000-2002.

Gonçalves, F.P., Martins, M.C., Silva Junior, G.J., Lourenço, S.A. and Amorim, L. (2010). Postharvest control of brown rot and Rhizopus rot in plums and nectarines using carnauba wax. Postharvest Biology and Technology 58, 211-217.

González-Aguilar, G.A., Cruz, R., Báez, R. (1999). Storage quality of bell Peppers pretreated with hot water and polyethylene packaging. Journal of Food Quality 22 , 287-299.

Goula, A.M. (2013). Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil- Kinetic modelling. Journal of Food Engineering 117 (4), 492-498.

Guijarro, B., Melgarejo, P., Torres, R., Lamarca, N., Usall, J., De Cal, A. Effects of different biological formulations of *Penicillium* frequentants on brown rot of peaches. Biological Control. Volume 42, Issue 1, July 2007. Pages 86-96.

- Hassani, A., Fathi, Z., Ghosta, Y., Abdollahi, A., Meshkatalasadat, M.H. and Marandi, R.J. (2012). Evaluation of plant essential oils for control of postharvest brown and gray mold rots on apricot. *Journal of Food Safety* 32, 94-101.
- Heaton, J.B. (1972). Improved brown rot control in stone fruit. *Queens Agricultural Journal* 600.
- Himathongkham, S., Riemann, H., Ernst, R. (1999). Efficacy of disinfection of shell eggs externally contaminated with *Salmonella enteriditis*. Implications for egg testing. *International Journal of Food Microbiology* 49, 161-167.
- Holb, I.J. and Kunz, S. (2013). Integrated control of brown rot blossom blight by combining approved chemical control options with *Aureobasidium pullulans* in organic cherry production. *Crop Protection* 54, 114-120.
- Hong, C., Holtz, B.A., Morgan, D.P., Michailides, T.J., 1997. Significance of thinned fruit as a source of the secondary inoculum of *Monilinia fructicola* in California nectarine orchards. *Plant Disease*. 81, 519–524.
- Invasive Species Compendium. CABI (2013).  
<http://www.cabi.org/isc/default.aspx?site=144&page=4066>
- Janisiewicz, W., Jurick II, W.M., Vico, I., Peter, K.A. and Jeffrey, S.B. (2013). Culturable bacteria from plum fruit surfaces and their potential for controlling brown rot after harvest. *Postharvest Biology and Technology* 76, 145-151.
- Janisiewicz, W.J. and Korsten, L. (2002). Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40, 411-441.
- Karabulut, O.A. and Baykal, N. (2004). Integrated control of postharvest diseases of peaches with a yeast antagonist, hot water and modified atmosphere packaging. *Crop Protection* 23, 431-435.
- Karabulut, O.A., Smilanick, J.L., Crisosto C.H. and Palou, L. (2010). Control of brown rot of stone fruits by brief heated water immersion treatments. *Crop Protection* 29, 903-906.

- Klein, J.D., Conway, W.S., Whitaker, B.D., Sams, C.E. (1997). Botrytis cienrea decay in apples is inhibited by postharvest heat and calcium treatments. *Journal of American Society in Horticultural Science* 122, 91-94.
- Kurtzman, C.P. and Droby, S. (2001). *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Systematic and Applied Microbiology* 24, 395-399.
- Larena, I. and Melgarejo, P. (1993). The lytic enzymatic complexo f *Penicillium purpurogenum* and its effects on *Monilinia laxa*. *Mycological Research Journal* 97, 105-110.
- Larena, I. and Melgarejo, P. (1996). Biological Control of *Monilinia laxa* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by a lytic enzyme-producing *Penicillium purpurogenum*. *Biological Control* 6, 361-367.
- Larena, I., Torres, R., De Cal, A., Liñán, M., Melgarejo, P., Domenichini, P., Bellini, A., Mandrin, J.F., Ochoa de Eribe, X., Usall, J. (2005). Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. *Biological Control* 32, 305-310.
- Lazar-Baker, E.E., Hetherington, S.D., Ku, V.V. and Newman, S.M. (2011). Evaluation of commercial essential oil samples on the growth of postharvest pathogen *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey. *Letters in Applied Microbiology* 52, 227-232.
- Legan, J.D. (1993). Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *International Biodeterioration and Biodegradation* 32, 33-53.
- Lichou, J., Myrin, J.F., Breniaux, D., Mercier, V., Giauque, P., Desbrus, D., Blanc, P., Bellauau, E. (2002). Une nouvelle moniliose. *Phytoma* 547, 22-25.
- Lozano, C., Cambra, M., y Aguado, A.M. (2012) Centro de Protección Vegetal. Gobierno de Aragón. Vida rural, Febrero, 25-29.
- Lu, J.Y., Stevens, C., Yakubu, P., Loretan, A. and Eakin, D. (1988). Gamma, electron beam and ultraviolet radiation on control of storage rots and quality of Walla Walla Onions. *Journal of Food Processing and Preservation* 12, 53-62.

- Luksiene, Z., Danilcenko, H., Taraseviciene, Z., Anusevicius, Z., Maroziene, A. and Nivinskas, H. (2007). New approach to the decontamination of germinated wheat from microfungi: effects of aminolevulinic acid. International Journal of Food Microbiology 116, 153-158.
- Lurie, S., 1998. Postharvest heat treatments. Postharvest Biology and Technology 14, 257-269.
- Lurie, S., Klein, J.D. (1992). Calcium and heat treatment to improve storability of “Anna” apple. Horticultural Science 27, 36-39.
- Margosan, D.A., Smilanick, J.L., Henson, D.J. (1997). Combination of hot water and ethanol to control postharvest decay of peaches and nectarines. Plant Disease 81, 1405-1409.
- Margosan, D.A., Smilanick, J.L., Simmons, G.F. and Henson, D.J.(1997). Combination of hot water and ethanol to control postharvest decay of peaches and nectarines. Plant Disease 81, 1405-1409.
- Mari, M., Martini, C., Guidarelli, M. and Neri, F. (2012). Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains. Biological Control 60, 132-140.
- Martínez-Navarrete, N., Camacho, M.M. and Lahuerta J.M. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas. Actividad Dietética 12, 64-68.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M.J. and Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 50, 5-18.
- Mason, T.L. and Wasserman, B.P. (1987). Inactivation of red beet betaglucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. Phytochemistry 26, 2197-2202.
- McDonell, G., Russell, A.D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. American Society for Microbiology. Clinical Microbiology Reviews 12, 147-179.

- Melgarejo, P. and Mateo-Sagasta, E. (1986). Destructive morphological changes induced in *Monilinia laxa* by *Penicillium purpurogenum*. *Transactions of the British Mycological Society* 86, 343-346.
- Melgarejo, P., Carrillo, R. and Mateo-Sagasta, E. (1985). Mycoflora of peach twigs and flowers and its possible significance in biological control of *Monilinia laxa*. *Transactions of the British Mycological Society* 85, 313-317.
- Melgarejo, P., Carrillo, R. and Sagasta, E. (1986). Potential for biological control of *Monilinia laxa* in peach twigs. *Crop Protection* 5, 422-426.
- Melgarejo, P., De Cal, A. and Mateo-Sagasta, E. (1989). Effects of *Penicillium* frequentants and two of its antibiotics on production of stroma by *Monilinia laxa* in culture. *Canadian Journal of Botany* 67, 83-87.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2012). Consultado durante los meses Marzo-Octubre de 2013 en: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/esyrce/>
- Neri, F., Mari, M., Brigati, S. and Bertolini, P. (2007). Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling *Monilinia laxa* in stone fruits. *Plant Disease* 91, 30-35.
- Noronha, E.F. and Ulhoa, C.J. (1996). Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* 42, 1039-1044.
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Fons, E. and Viñas, I. (2002). Post-harvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden Delicious apples. *Journal of Applied Microbiology* 92, 247-255.
- Ogawa, J.M. (1995). Compendium of Stone Fruits Diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.

- Ogawa, J.M. and English, H. (1991). Fungal Diseases of Stone Fruits. Diseases of Temperature Zone Tree Fruit and Nut Crops. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 3345.
- Ogawa, J.M., Zehr, E.I., Biggs, A.R. (1995). Brown rot. Compendium of stone fruit diseases. 7-10. APS Press, St. Paul. Minnesota, USA.
- Ongena, M. and Jaques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology 16, 115-125.
- 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. American Phytopathological Society. Plant Disease 85, 371-376.
- Penrose, L.J.; Tarran, J.; Wong, A.L. (1976) First record of *Sclerotinia laxa* in New South Wales: differentiation from *S. fructicola* by cultural characteristics and electrophoresis. Australian Journal of Agricultural Research 27, 547-556.
- Pests and Diseases Image Library (PADIL). Consultado en Agosto 2013 en: <http://old.padil.gov.au/pbt/index.php?q=node/15&pbtID=79>
- Petroczy, M., and Palkovics, L. (2006). First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on imported peach in Hungary. Plant Disease 90, 375.
- Plantwise online. Consultado en Julio 2013, en: [www.plantwise.org](http://www.plantwise.org)
- Plaza, P., Usall, J., Smilanick, J.L., Lamarca, N. and Viñas, I. (2004). Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and curing treatments to control established infections of *Penicillium digitatum* on lemons. Journal of Food Protection 67, 781-786.
- Protección Vegetal de Aragón, (2012). Gobierno de Aragón.
- Pusey, P.L. and Wilson, C.L. (1984). Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. Plant Disease 68, 753-756.
- Qin, G., Tian, S. and Xu, Y. (2004). Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. Postharvest Biology and Technology 31, 51-58.

- Redondo, D., Arias, E., Oria, R. and Venturini, M.E. (2012.a) El aclareo: ¿una nueva fuente de compuestos de interés nutricional? X Simposio Nacional y VII Ibérico sobre maduración y post-cosecha. Lérida (España). 1-4 Octubre 2012, 209-214.
- Redondo, D., Venturini, M.E., Oria, E. and Arias, E. (2012.b) Actividad antioxidante de los frutos procedentes del aclareo de la ciruela. X Simposio Nacional y VII Ibérico sobre maduración y post-cosecha. Lérida, (España). 1-4 Octubre 2012, 545-550.
- Rodrigo, J. y Herrero, M. (2000) Cuajados erráticos en albaricoquero. Polinización y calidad de flor. Institución Fernando el Católico. Excelentísima Diputación de Zaragoza, España.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30, 3875-3883.
- Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Consultado en Agosto de 2013 en:  
<http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/monilinia-fructicola>
- Seymour S. Block. (2001). Disinfection, Sterilization and Preservation. 5th edition. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA.
- Sisquella, M., Casals, C., Viñas, I., Teixidó, N. and Usall, J. (2013). Combination of peracetic acid and hot water treatment to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. *Postharvest Biology and Technology* 83, 1-8.
- Sisquella, M., Viñas, I., Picouet, P., Torres, R., Usall, J. (2014). Effect of host and *Monilinia* spp. Variables on the efficacy of radio frequency treatment on peaches. *Postharvest Biology and Technology* 87, 6-12.
- Sisquella, M., Viñas, I., Teixidó, N., Picouet, P., Usall, J. (2013). Continuous microwave treatment to control postharvest brown rot in stone fruit. *Postharvest Biology and Technology* 86, 1-7.
- Smith, I.M., Mcnamara, D.G., Scott, P.R., Harris, K.M. (1992). EPPO Quarantine Pests for Europe. CAB International. Oxford, U.K.
- Sommer, N.F., Fortlage, R.J., Buckley, P.M., Maxie, E.C. (1967). Radiation-heat synergism for inactivation of market disease fungi of stone fruits. *Phytopathology* 57, 428-433.

- Spadoni, A., Fiorella, N., Bertolini, P., Mari, M. (2013). Control of *Monilinia* rots on fruit naturally infected by hot water treatment on commercials trials. *Postharvest Biology and Technology* 86 280-284.
- Terry, L.A. and Joyce, D.C. (2004). Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology* 32, 1-13.
- University of Delaware. College of Agriculture & Natural Resources. Consultado en Agosto de 2013 en: <http://extension.udel.edu/ornamentals/tag/monolinia-blight/>
- Usall y De Cal (2000). Podredumbre de los frutos causada por *Monilinia* spp. En Montesinos et al., (edit.) *Enfermedades de los frutales de pepita y hueso: 91-92*. SEF-Mundi-Prensa. 147 pp.
- Usall, J., Teixidó, N., Torres, R., Ochoa de Eribe, X. and Viñas I. (2001). Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 21, 147-156.
- Van Leeuwen, G.C.M., Holb, I.J. and Jeger, M.J. (2002). Factors affecting mummification and sporulation of pome fruit infected by *Monilinia fructigena* in Dutch orchards. *Plant Pathology* 51, 787-793.
- Venturini, M.E. (2004). Alternativas a los tratamientos poscosecha en manzana Golden Delicious. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria.
- Venturini, M.E., Rivera, C.S., González, C. and Blanco, D. (2008). Antimicrobiological activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains. *Journal of Food Protection* 71, 1701-1706.
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N. and Sanchis, V. (1998). Biological control of major postharvest on apple with *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology* 40, 9-16.
- Wilson, C.L. and Wisniewski, M.E. (1994). *Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. Theory and Practice*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, U.S.A.

Wisniewski, M., Droby, S., Chalutz, E. and Eilam, Y. (1995). Effects of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* in vitro and on the biocontrol activity of *Candida oleophila*. *Plant Pathology* 44, 1016-1024.

Yáñez-Mendizábal, V., Zeriouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., De Vicente, A., Pérez-García, A. and Teixidó, N. (2012). Biological control of peach brown rot (*Monilinia spp.*) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like kipopeptides. *European Journal of Plant Pathology* 132, 609-619.

Zhang, S. and Farber, J.M. (1996). The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiology* 13, 311-321.