

Universitat de Lleida
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària

**AVALUACIÓ DE SISTEMES ALTERNATIUS ALS FUNGICIDES
SINTÈTICS PER AL CONTROL DE LES PODRIDURES
VERDA I BLAVA EN POSTCOLLITA DE CÍTRICS**

Memòria presentada per
Lluís Palou Vall
per optar al grau de doctor

Directors:
Dra. Inmaculada Viñas Almenar
Dr. Josep Usall i Rodié

Lleida, gener de 2002

Capítol 6

Effect of Gaseous Ozone Exposure on the Development of Green and Blue Molds on Cold Stored Citrus Fruit

L. Palou¹, J.L. Smilanick², C.H. Crisosto¹, M. Mansour³

¹*Dept. of Pomology, University of California, Davis. Kearney Agricultural Center, Parlier, CA*

²*Horticultural Crops Research Laboratory, USDA-ARS, Fresno, CA*

³*College of Agriculture, Menofiya University, Shebin El-Kom, Egypt*

Referència: *Plant Dis.* 85: 632-638 (2001).

Abstract

The effects of gaseous ozone exposure on in vitro growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* and development of postharvest green and blue molds on artificially inoculated citrus fruit were evaluated. Valencia oranges were continuously exposed to 0.3 ± 0.05 ppm (vol/vol) ozone at 5°C for 4 weeks. Eureka lemons were exposed to an intermittent day-night ozone cycle (0.3 ± 0.01 ppm ozone only at night) in a commercial cold storage room at 4.5°C for 9 weeks. Both oranges and lemons were continuously exposed to 1.0 ± 0.05 ppm ozone at 10°C in an export container for 2 weeks. Exposure to ozone did not reduce final incidence of green or blue mold, although incidence of both diseases was delayed about 1 week and infections developed more slowly under ozone. Sporulation was prevented or reduced by gaseous ozone without noticeable ozone phytotoxicity to the fruit. A synergistic effect between ozone exposure and low temperature was observed for prevention of sporulation. The proliferation of spores of fungicide-resistant strains of these pathogens, which often develop during storage, may be delayed, presumably prolonging the useful life of postharvest fungicides. In vitro radial growth of *P. italicum*, but not of *P. digitatum*, during a 5-day incubation period at 20°C was significantly reduced by a previous 0.3 ± 0.05 ppm ozone exposure at 5°C for 4 days. Inoculum density did not influence the effect of gaseous ozone on decay incidence or severity on oranges exposed to 0.3 ± 0.05 ppm ozone at 20°C for 1 week. Susceptibility of oranges to decay was not affected by a previous continuous exposure to 0.3 ± 0.05 ppm ozone at 20°C for 1 week. A corona discharge ozone generator was effective in abating ethylene in an empty export container.

Additional keyword: postharvest decay

Introduction

Postharvest green mold, caused by *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., and postharvest blue mold, caused by *Penicillium italicum* Wehmer, are among the most economically important postharvest diseases of citrus worldwide (8). Blue mold is especially important on citrus fruit kept under cold storage for long time periods (30). In California, Valencia oranges for preparation of fresh juice are held at temperatures from 3 to 5°C. Currently, both diseases are mainly controlled by application of the fungicides imazalil, sodium ortho-phenyl phenate or thiabendazole (8). Alternative methods are needed because the widespread use of these chemicals in commercial packinghouses has led to the proliferation of resistant strains of the pathogens (4,7). Furthermore, concerns about human health risks and the protection of the environment associated with fungicide residues (5,18) have increased the need for alternatives to fungicide usage.

In 1997, ozone, the triatomic form of oxygen (O₃), was recognized as being generally safe (GRAS) for food contact applications in the United States (10,29). Since that time, interest in developing ozone applications in the food industry has increased, although some regulatory issues about ozone use for this purpose have not been resolved. Currently, a Food Additive Petition has been submitted to the US Food and Drug Administration (US-FDA) that would allow ozone to be used in food contact applications. The current Threshold Limit Value-Short Term Exposure Limit (TLV-STEL) established by the US Occupational Safety and Health Administration (US-OSHA) for ozone is 0.3 ppm. This is the level to which healthy individuals can be exposed for 15 min without suffering from irritation or other acute effects. Exposures at this level should not be repeated more than four times per day. Once citrus fruit are stored at low temperature, only a few brief tasks are needed to be done within the storage rooms so that workers do not exceed the US-OSHA TLV-STEL. However, concentrations could be higher in export containers, which can stay closed for longer periods of time. Other exposure designs include generation of ozone in day-night cycles to minimize workers' exposure to ozone (23).

Currently, ozone can be readily and economically generated on site. For the postharvest treatment of fresh fruit and vegetables, ozone can be used as a relatively brief prestorage or storage treatment in air or water, or as a continuous or intermittent atmosphere throughout the storage period. Both procedures have recently attracted considerable commercial interest, especially because of the lack of residues on the produce and the possibilities opened by the new regulations.

Effects of ozone in the air of storage rooms on fungal decay, and/or commodity storage potential and quality, have been examined for a variety of fruits and vegetables. There are numerous reports on both the benefits (3,16,17,23) and the lack of benefits (2,20,22,25,26) of ozone. However, early studies involving continuous ozone exposure as a storage treatment were probably conducted before efficient ozone generators and reliable means to control and measure ozone concentrations were available. In 1936, Klotz (15) reported that ozone was unsatisfactory for control of green and blue molds on artificially inoculated navel oranges. Hopkins and Loucks (13) reported in 1949 an increase in stem-end rot, green mold, and some fruit pitting on oranges subjected to high ozone concentrations for several minutes to 4 h. In 1968, Harding (11) concluded that storage of lemons and oranges under 1.0 ppm ozone effectively prevented sporulation of green mold on infected fruit, and moderately reduced the incidence of green mold. Jin et al. (14) reported in 1989 that storage of Wenzhou mandarins under discharge products greatly delayed the process of senescence of fruit without damaging the fruit. Recently, García et al. (9) reported no differences in quality parameters between oranges stored at 5°C for 1 month in air or 0.1 ppm ozone.

The objectives of this work were to evaluate the effect of continuous gaseous ozone exposure at 0.3 or 1.0 ppm, or an intermittent exposure at 0.3 ppm (day-night cycle), on the development of *P. digitatum* and *P. italicum* in vitro and on artificially inoculated citrus fruit stored at low temperature. The ability of an ozone generator to abate ethylene levels (6) was also investigated.

Materials and methods

Fruit. Oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), cv. Valencia, or lemons (*Citrus limon* (L.) Burm.) cv. Eureka, from commercial orchards in the San Joaquin Valley (California), were selected from field bins after harvest, randomized, and used in the experiments before any commercial postharvest treatments were applied.

Inoculum. *P. digitatum* isolate PDM-1 and *P. italicum* isolate PIM-7, were grown on PDA in petri dishes at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for 7 to 10 days. Five milliliters of 0.05% (wt/vol) Triton X-100 in sterile water were added to each dish and spores were rubbed from the agar surface with a sterile glass rod. This high-density spore suspension was passed through two layers of cheesecloth, measured with a hemacytometer, and diluted with sterile water to achieve the desired inoculum density.

Continuous exposure to 0.3 ppm ozone. A 90-W corona discharge ozone generator (AgroCare™, Model Oxtomcav XEE-245, Agroquality International, LLC, Bridgewater, NJ) was installed in a 66.6 m³ cold storage room and set to maintain 0.3 ± 0.05 ppm (vol/vol) ozone at $5 \pm 1^\circ\text{C}$ and $90 \pm 5\%$ relative humidity (RH). The unit released ozone through a perforated 38.1-mm diameter polyvinyl chloride (PVC) tube anchored to the ceiling of the room. The ozone concentration in the room was controlled and continuously monitored by a UV absorption ozone analyzer (Model IN-2000-1, INUSA Inc., Needham, MA) with a minimum detection limit of 0.01 ppm. Air from the ozonated cold storage room was pumped through a Teflon tube to the analyzer, which was located in an adjacent room. As a control, similar environmental conditions of temperature and RH were set in an ambient air atmosphere cold storage room. Ozone levels in this control room were periodically assessed with either a heated metal oxide ozone sensor (Model 21-Z, Eco Sensors Inc., Santa Fe, NM), with a minimum detection limit of 0.02 ppm, or a gas sampling pump (Sensidyne Model 800, Clearwater, FL) with detection tube no. 18L and a minimum detection limit of 0.025 ppm. No measurable ozone was detected by either method during the entire storage period. Temperature and RH were continuously monitored in both rooms during the experiments. The desired RH was maintained in both rooms by an air-assisted low-pressure RH system, equipped with a computer-controlled humidity transmitter (Model HMD20VB, Vaisala Inc., Helsinki, Finland).

(i) *In vitro* mycelial growth. High-density spore suspensions of *P. digitatum* and *P. italicum* were prepared as described above and poured into sterile Erlenmeyer flasks with 50 ml of PDA at 45°C. The agar medium containing spores was quickly poured into empty sterile petri dishes and allowed to solidify. Cylinders of medium (4.2 mm diameter) were cut with a sterile cork borer and each one placed on the agar surface in the center of a PDA petri dish. Six petri dishes per pathogen were prepared. Three partially open plates per pathogen (replicates) were held in both the ozone and the control rooms. After 4 days of exposure, the petri dishes from both rooms were covered with the lids and placed in an incubation chamber at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ and $90 \pm 5\%$ RH for an additional 5-day period. Colony diameter and presence of spores were

recorded daily. The experiment was conducted twice. In the second experiment, five replicates per pathogen were used.

(ii) *Disease development.* Valencia oranges were inoculated with 10^6 spores ml^{-1} of *P. digitatum* or *P. italicum* by briefly immersing a stainless steel rod with a probe tip (1 mm wide by 2 mm in length) into the spore suspension and wounding each fruit once on the equator. The wound penetrated the albedo tissue but not the juice sacs, simulating natural inoculation. Inoculated fruit were placed on plastic cavity trays on open wooden trays that assured adequate gas contact. About 24 h after inoculation, five trays (replicates) of 18 oranges each were stored for 4 weeks in the ozone room, and five trays in the control room. Disease incidence and severity (lesion diameter), as well as external disease appearance, were recorded weekly. The experiment was conducted twice.

(iii) *Inoculum density and fruit susceptibility.* Environmental conditions in both the ozone and the control rooms were maintained at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ and $90 \pm 5\%$ RH. Selected and randomized Valencia oranges were separated into two groups. Fruit in the first group were inoculated with 10^4 , 10^5 and 10^6 spores ml^{-1} of *P. digitatum* or *P. italicum*, as previously described. Fruit in the second group were not inoculated. For each treatment (combination of pathogen and inoculum density), half of fruit in each group were held for 7 days in the ozone room and half in the control room. Each treatment was applied to four trays (replicates) of 18 oranges each. Decay incidence and severity of inoculated fruit were recorded after 4 and 7 days of storage. After 7 days of storage, all fruit from both rooms were removed. In order to evaluate the possible effect of ozone exposure on the susceptibility of fruit to decay, fruit in the second group were then inoculated with 10^4 , 10^5 and 10^6 spores ml^{-1} of *P. digitatum* or *P. italicum* and incubated for 7 days in the control room. Green and blue molds incidence and severity were determined after 4 and 7 incubation days. The experiment was conducted twice.

Intermittent exposure to 0.3 ppm ozone in a day-night cycle. A concentration of 0.3 ± 0.01 ppm ozone was generated at night in a 226 m^3 commercial storage room. No ozone was generated during the day. The gas was generated with a water-cooled, corona discharge generator (Model CD-7, Del Industries, San Luis Obispo, CA) that produced 7 g h^{-1} of ozone at its maximum setting. The unit incorporated an oxygen concentration and air drier so the $3.5\text{-liter min}^{-1}$ output was composed of about 2% ozone with the balance being oxygen. The generator, located in an adjacent nonozonated room, was operated with a timer on a 12 h cycle. Ozone concentration in the ozone room was continuously monitored with an UV ozone analyzer (Model LC-400, PCI Wedeco Environmental Technologies Inc., New York, NY) with a minimum detection limit of 0.001 ppm. This monitor was located in the same room as the generator. Air from the ozonated cold storage room was pumped through a Teflon™ tube to the analyzer. The ozonated commercial storage room was maintained at $4.5 \pm 1^\circ\text{C}$ and high RH. Temperature was monitored with thermocouples connected to a data-logger. Control fruit were stored in a room of 30 m^3 maintained at a similar temperature and high humidity. Ozone levels in this control room were periodically measured with the ozone sensor previously described. No ozone was detected during the storage period.

Eureka lemons were inoculated by injection of 100 fruit with 10^5 spores of *P. italicum* 1.5 cm deep into the juice sacs. The fruit were randomly placed into four open boxes of 25 fruit each. Two of the boxes were placed in the ozonated storage room and two boxes were placed in the control room. The fruit were examined weekly. Sporulation was recorded for each fruit at each observation with an index from 0 to 5. Numbers 1, 2, 3, 4, and 5, respectively, indicated 1 to 20%, 21 to 40%, 41 to 60%, 61 to 80%, and >80% of the fruit surface covered with spores. The experiment was conducted twice; the fruit were stored for 8 and 9 weeks in the first and second experiments, respectively.

Continuous exposure to 1.0 ppm ozone. An ozone generator (Oxtomcav XEE-245) was installed in a 59.78 m^3 refrigerated export container (Hyundai, Seoul, Korea, ID No. DFIU-320472-1). Ozone was released through 19-mm diameter perforated distribution PVC tubes placed in the T-channels of the container floor. Ozone concentration in the container was maintained to 1.0 ± 0.05 ppm at $10 \pm 1^\circ\text{C}$ and continuously monitored with an UV ozone analyzer (IN-2000-1) located outside the container. Eureka lemons, inoculated 24 h before with 10^5 and 10^6 spores ml^{-1} , and Valencia oranges, inoculated with 10^6 spores ml^{-1} of *P. digitatum* and *P. italicum*, were placed in plastic cavity trays on open wooden trays and stored in the container for 2 weeks. For each pathogen and inoculum density, four trays (replicates) with 25 lemons each and four trays with 20 oranges each were used. As a control treatment, inoculated fruit were stored in a standard cold room at the same temperature. Ozone levels in this control room were periodically measured with the ozone sensor previously described. No ozone was

detected during the storage period. Decay incidence and fruit sporulation were evaluated after 7 and 14 days of storage.

Ability to abate ethylene in an export container. The 59.78 m³ export container and the ozone equipment described above were used in these trials. The temperature in the container was set to $0 \pm 1^\circ\text{C}$ and the drain holes and air exchange vents were closed. The empty container was then vented and closed, and the initial ozone and ethylene levels determined. Ethylene from a gas cylinder was then introduced into the container. A pressure regulator and a rotometer (Model FM-1000, Matheson, Montgomeryville, PA) were used for controlling the flow of ethylene. When the ethylene concentration reached approximately 3.8 ppm, the ozone generator was turned on. Ethylene and ozone concentrations were measured hourly for a period of 5 h, and again after 24 h. Five relative ozone levels, designated as control (generator switched off), and levels 1, 2, 3, and 4, were generated by different generator settings. Ethylene was measured by removing air from the ozone sample loop and then injecting the samples into a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (Carle AGC-211, EG&G Chandler Engineering, Tulsa, OK).

Statistical analysis. For the *in vitro* tests, linear regression lines were fit to the radial growth values during the 5-day incubation period at 20°C. Slopes of the lines were compared with a two-tailed Student's *t* test ($P = 0.05$). Severity data (lesion diameter), the sporulation index, and the arcsine of the square root of the proportion of decayed fruit were analyzed with analyses of variance (SAS Institute Inc., Cary, NC). Mean comparisons were performed by Fisher's protected least significant difference (LSD) test ($P = 0.05$).

Results

Continuous exposure to 0.3 ppm ozone. (i) *In vitro* mycelial growth. None of the pathogen cultures exposed to 0.3 ppm ozone or to ambient air exhibited visible growth during the 4-day exposure period at 5°C. Radial growth of *P. italicum* during the 5-day incubation period at 20°C was significantly reduced by the previous 0.3 ppm ozone exposure at 5°C for 4 days (Fig. 1). In contrast, no differences in colony diameter were found for *P. digitatum* previously exposed to 0.3 ppm ozone. Pathogen sporulation was not affected by the previous 0.3 ppm ozone exposure. Spores of both *P. digitatum* and *P. italicum* were observed after a 2-day incubation period at 20°C in plates previously exposed to either ozonated or ambient air atmospheres.

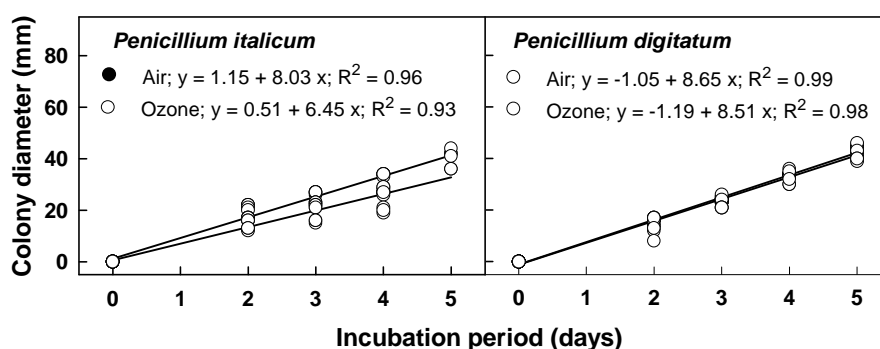


Fig. 1. Regression lines for the *in vitro* growth of *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum* during a 5-day incubation period at 20°C after 4 days of continuous exposure at 5°C to ambient air or 0.3 ppm ozone.

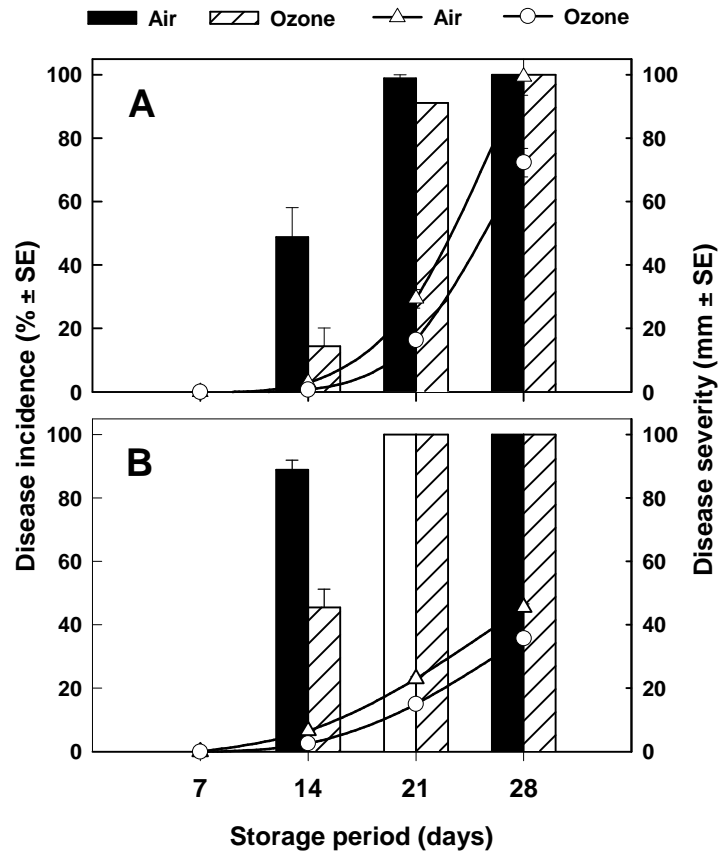


Fig. 2. Green (A) and blue (B) molds incidence (bars) and severity (lines) on artificially inoculated Valencia oranges continuously exposed for 4 weeks at 5°C and 90% RH to ambient air or 0.3 ppm ozone.

(ii) *Disease development.* The incidence of both green and blue molds was significantly lower after 14 storage days at 5°C, but not after 21 or 28 days, on inoculated oranges exposed to 0.3 ppm ozone than on fruit exposed to ambient air (Fig. 2). Disease severity was also significantly lower under ozone after 21 days storage at 5°C. The differences in lesion diameter after 28 days reached about 30 mm for green mold and 10 mm for blue mold (Fig. 2). Continuous exposure to 0.3 ppm ozone affected external mycelial growth and sporulation of both pathogens. While powdery masses of olive green or blue spores were observed on decayed fruit exposed to ambient air, irregularly distributed masses of white mycelia that did not develop conidia were observed under 0.3 ppm ozone. Both species resumed normal surface growth and sporulated on samples of decayed fruit from the ozone room that were incubated at 20°C and 90% RH for 2 days. Ozone exposure did not noticeably injure the fruit.

(iii) *Inoculum density and fruit susceptibility.* For both green and blue molds, and at all three inoculum densities tested, there were no significant differences in incidence or severity between oranges exposed to 0.3 ppm ozone or to ambient air (Fig. 3). Both pathogens developed normal disease symptomatology and sporulated after 1 week storage under 0.3 ppm ozone at 20°C. Ozone exposure for 1 week at 20°C before inoculation did not affect susceptibility of oranges to either green or blue mold (Fig. 4). Even at the lowest spore concentration of 10^4 spores ml⁻¹, disease incidence and severity were not significantly different on fruit previously exposed to 0.3 ppm ozone.

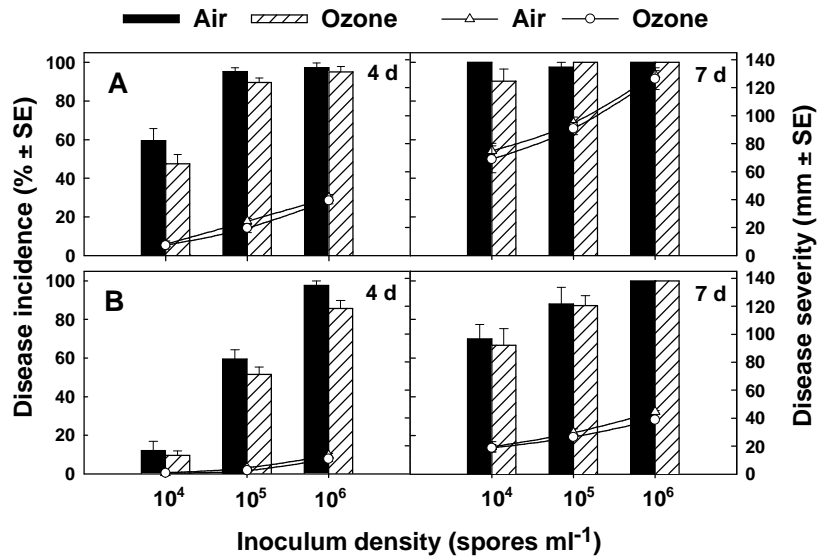


Fig. 3. Influence of inoculum density on the incidence (bars) and severity (lines) of green (A) and blue (B) molds on Valencia oranges exposed for 4 or 7 days at 20°C and 90% RH to ambient air or 0.3 ppm ozone.

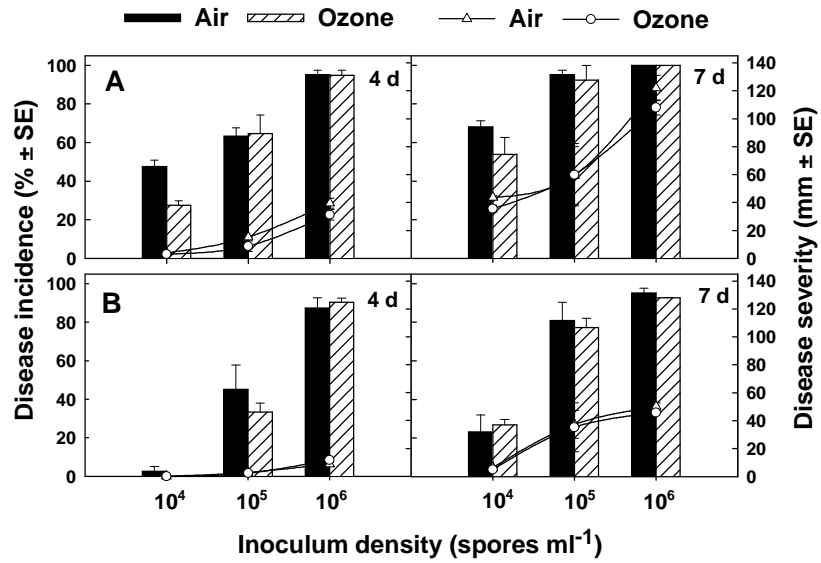


Fig. 4. Influence of continuous ozone exposure on the susceptibility of oranges to infection. Shown are green (**A**) and blue (**B**) molds incidence (bars) and severity (lines) on Valencia oranges exposed for 7 days at 20°C and 90% RH to ambient air or 0.3 ppm ozone, then artificially inoculated with different inoculum densities and incubated for 4 or 7 days at 20°C and 90% RH in an ambient air atmosphere.

Intermittent exposure to 0.3 ppm ozone in a day-night cycle. In a commercial citrus storage, the incidence of blue mold on artificially inoculated lemons was delayed, but not reduced, by a day-night ozone cycle. After 3 weeks of storage at 4.5°C, it was about 15% and 50% on ozone-exposed and control fruit, respectively. However, it was 100% for both treatments after 7 weeks of storage (Fig. 5A). In contrast, the sporulation of blue mold-infected lemons was greatly reduced by a day-night ozone cycle. A mean sporulation rating of about 0.5 and 1.1 was observed among control fruit after 7 and 9 weeks of storage, respectively, while the rating among ozone-exposed lemons was 0.0 and 0.4, respectively (Fig. 5B). None of the fruit appeared injured by the ozone treatment.

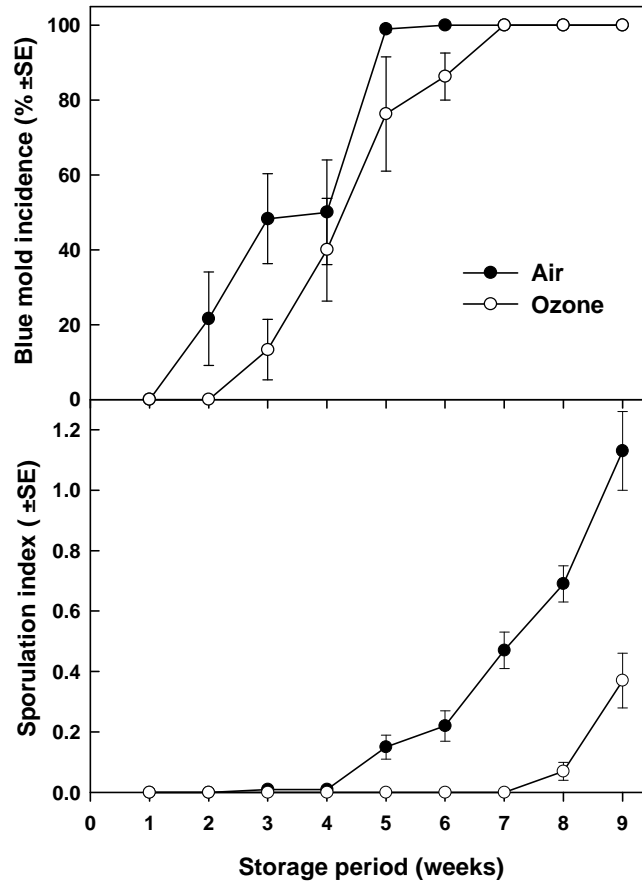


Fig. 5. Incidence of blue mold and sporulation among Eureka lemons artificially inoculated with *Penicillium italicum* and stored in a commercial storage room for 9 weeks at 4.5°C in an ambient air atmosphere or in a day-night ozone cycle (intermittent exposure to 0.3 ppm ozone for 12 h).

Continuous exposure to 1.0 ppm ozone. Decay incidence on lemons and oranges inoculated with 10^6 spores ml^{-1} of *P. digitatum* or *P. italicum* was significantly lower among fruit exposed to 1.0 ppm ozone than among control fruit after 1 week of storage at 10°C, but not after 2 weeks of storage (Table 1). Green mold incidence on lemons inoculated with 10^5 spores ml^{-1} was significantly lower among fruit exposed to 1.0 ppm ozone than among control fruit after either 1 or 2 weeks of storage. No significant differences were found for blue mold incidence on lemons inoculated with 10^5 spores ml^{-1} (Table 1). Sporulation of both fungi at both inoculum densities was suppressed by ozone exposure. In every test, no surface injuries were observed on the fruit skin.

Table 1. Influence of continuous exposure to ambient air or to 1.0 ppm ozone on decay incidence on artificially inoculated Eureka lemons and Valencia oranges stored at 10°C in a 59.78 m^3 export container

Fruit	Pathogen	Treatment	Decay incidence (%) ^x			
			1×10^5 y		1×10^6	
			7 d ^z	14 d	7 d	14 d
Eureka lemons	<i>P. digitatum</i>	Air	21 a	99 a	96 a	100 a
		Ozone	2 b	71 b	26 b	95 a
	<i>P. italicum</i>	Air	17 a	95 a	91 a	100 a

		Ozone	12 a	89 a	33 b	92 a
Valencia oranges	<i>P. digitatum</i>	Air	-	-	95 a	100 a
		Ozone	-	-	32 b	94 a
	<i>P. italicum</i>	Air	-	-	94 a	100 a
		Ozone	-	-	28 b	99 a

^x For each pathogen, values within columns followed by unlike letters are different according to a Fisher's Protected LSD test ($P = 0.05$) applied after an analysis of variance of the arcsine of the square root of the proportion of infected fruits. Non-transformed data are shown.

^y Inoculum density (spores ml⁻¹).

^z Storage period (days).

Ability to abate ethylene in an export container. Ethylene concentration within the container decreased only slightly over the test period (0.035 ppm h⁻¹) when the ozone generator was off (control, Table 2). The ozone generator reduced the ethylene level within the container, with the rate of reduction increasing as the generator setting was increased. At its highest settings (levels 3 and 4), the ozone generator reduced the ethylene level in the container at a rate of 0.145 ppm h⁻¹, compared to 0.035 ppm h⁻¹ for the control (Table 2). Ozone concentrations in the container increased from the 0.0 ppm ambient level (control) to 0.2, 0.5, 1.3 and 2.1 ppm for settings 1, 2, 3 and 4, respectively after 5 h (Fig. 6). After 24 h, the ozone concentration in the container reached levels of 0.3, 1.0, and 3.9 ppm for settings 1, 2, and 3, respectively (Table 2). The ozone concentration exceeded the range of the analyzer (10.0 ppm) after 24 h with level 4.

Table 2. Rate of ethylene reduction and concentration of ozone and ethylene resulting from the use of an ozone generator (Oxtomcav XEE-245) in an empty 59.78 m³ export container over a 24 h period after introducing an initial concentration of 3.8 ppm of ethylene

Treatment	Ethylene reduction (ppm h ⁻¹)	Concentration after 24 h	
		Ozone (ppm)	Ethylene (ppm)
Control ^x	0.035	0.0	3.0
Generator Level 1	0.073	0.3	2.0
Generator Level 2	0.109	1.0	0.8
Generator Level 3	0.145	3.9	0.2
Generator Level 4	0.145	>10.0 ^y	0.0

^x Generator off.

^y Concentration exceeded the range of the analyzer.

Discussion

In the in vitro tests, ozone neither killed all the spores nor adversely affected germination ability. Since the spores were located not only on the surface but also inside the agar cylinder, direct gas contact with all spores was probably not achieved. Similarly, Klotz (15) observed that ozone gas only partially inhibited the germination and growth of *P. digitatum* and *P. italicum* on agar, and that the cultures resumed their usual rapid rate of growth when they were removed from the ozone chamber, even after 3 weeks exposure. Hibben and Stotzky (12) concluded that spore sensitivity to the oxidizing action of ozone depended on the fungal species, spore morphology, substrate, moisture, and ozone dosage. Spore

morphology could play some role on the differential activity of ozone against *P. digitatum* and *P. italicum* that was observed in our tests. No growth was noticed on the culture plates held in ambient air. Therefore, the lack of radial growth during exposure to 0.3 ppm ozone at 5°C was due primarily to the low temperature and not to the presence of ozone. A longer exposure period was not used because in preliminary tests the PDA medium in the open culture dishes dried extensively.

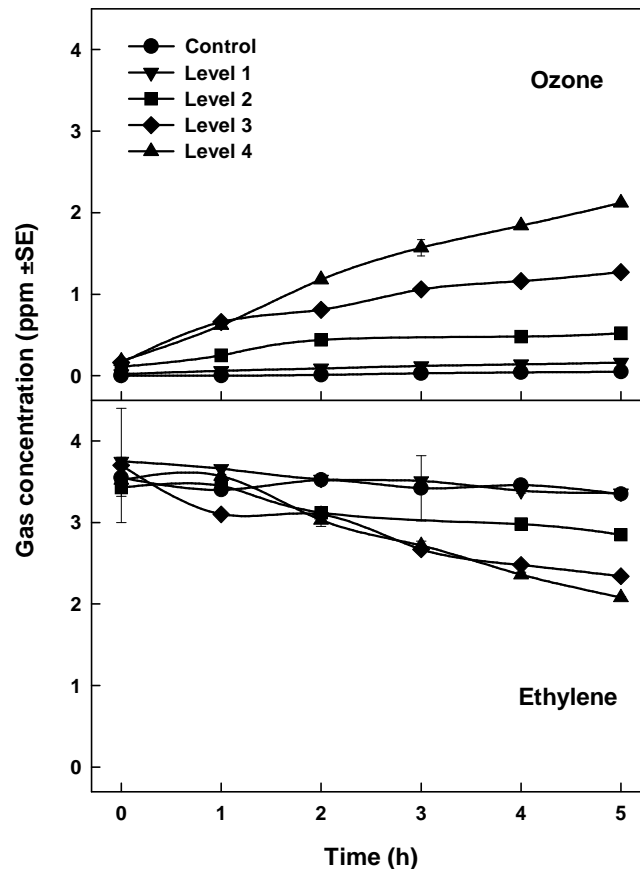


Fig. 6. Ozone and ethylene concentrations during a 5-h period resulting from the use of an ozone generator (Oxtomcav XEE-245) in an empty 59.78 m³ export container having an initial concentration of 3.8 ppm of ethylene.

In all experiments, exposure to gaseous ozone delayed the incidence of both green and blue molds on wound-inoculated oranges or lemons about 1 week. However, ozone was unable to control decay. Infections developed more slowly under ozone, but disease incidence at the end of the storage period was not reduced. Furthermore, we found no influence of inoculum density on the effect of ozone on both decay incidence and severity. The inability of ozone to control pathogens in wounds has been observed on naturally inoculated Valencia oranges (13) and artificially inoculated navel oranges (15) stored in an ozone atmosphere, and on artificially inoculated Valencia oranges treated with ozonated water (24).

Likewise, ozone treatment did not control postharvest wound-infections on apples (22), pears (27), peaches (25,26), or other commodities (19,25,26). Apparently, fungal structures within wounds remain protected from the oxidizing effect of ozone because of limited ozone penetration, reduced ozone concentration as it reacts with fruit tissue or extracellular biochemicals, and/or the presence of antioxidants in the fruit. Some of these factors could also explain the failure of other strong oxidants,

such as chlorine and chlorine dioxide, in controlling infections within inoculated wounds (1,8,28). Since *Penicillium* molds are initiated by infections in wounds on the fruit surface, the efficacy of ozone in controlling green and blue molds cannot be predicted by the toxicity of ozone against free spores and hyphae. Therefore, ozone could not be a substitute for the synthetic fungicides that are currently applied on citrus fruit packinglines.

In our tests, despite the inability to control decay, ozone gas inhibited the normal aerial growth of the mycelia and greatly reduced sporulation from lesions among infected fruit once lesions developed. This was accomplished either with a continuous 0.3 or 1.0 ppm ozone exposure or with a 0.3 ppm day-night cycle. Harding (11) similarly observed control of sporulation and some control of decay by *Penicillium* molds on citrus fruit with continuous exposure to ozone at 1.0 ppm for 15 days. We and Harding (11) observed that sporulation was only suppressed as long as ozone was present; lesions sporulated quickly when infected fruit were removed from the ozone atmosphere. The reduction of spore production has commercial value because stored fruit are usually treated with fungicides; if resistance develops among these pathogens, the ozone would reduce proliferation of resistant spores and presumably would prolong the useful life of postharvest fungicides. Furthermore, *Penicillium* spores that are produced from stored fruit are a significant source of contamination for healthy adjacent fruit, and for packages, walls, and floors of rooms. Storage under ozone could greatly reduce the load of airborne pathogenic spores. Schomer and McColloch (22) reported a strong reduction in spore load when apple storage rooms were ozonated. The contamination that can occur on packingline brushes and belts when citrus fruit are re-processed and packaged would also be reduced if infected fruit did not present sporulating lesions. The lack of sporulation, however, may make it more difficult for culling crews to see and remove infected fruit.

To be an effective anti-sporulant, ozone must penetrate into bins or boxes where fruit are stored. Harding (11) obtained good results with open boxes, whereas ozone penetration into cartons with small vents was unsatisfactory. We noticed that ozone was barely able to go through the plastic cavity trays used in some experiments. In tests not reported here, we obtained good suppression of sporulation on oranges stored in large plastic field bins that had large vents. The small storage boxes used for lemons are similarly well vented.

The susceptibility of Valencia oranges to decay was not affected by continuous exposure to 0.3 ppm ozone. Since the fruit were exposed to ozone and then wounded and inoculated, this result suggests that the gas did not produce any mechanical damage to the albedo cells. Jin et al. (14) concluded that fruit senescence was delayed on Wenzhou mandarins exposed to ozone and negative ions, the respiratory intensity was lowered and the ethylene release rate decreased. Removal of ethylene in storage rooms or containers could delay fruit senescence and extend its postharvest life. We and other workers (6,21) found corona discharge ozone generators to be effective in reducing ethylene.

Ozone concentration in a storage room is dependent on the environmental conditions and on the fruit load. Ozone concentration rapidly decreases when temperature, humidity, or fruit load increases. Our results showed a synergistic effect between ozone and low temperature. While sporulation was effectively inhibited by a concentration of 0.3 ppm ozone at 5°C, it was not when the temperature was set at 20°C. Ozone-generating technology today is accurate and reliable enough to provide and hold the desired ozone concentration in any storage room with use of correct equipment. Once the produce are stored at low temperature, only a few tasks taking a short time are required inside the storage rooms. The 0.3 ppm US-OSHA TLV-STEL concentration should minimize safety concerns of workers and regulators about ozone use, and minimize the risk of injury to stored products. Exposure in a day-night cycle, in which no workers would be normally exposed to ozone, although brief entry would remain feasible and safe, may also be an alternative.

Acknowledgements

We thank the Electric Power Research Institute (EPRI; Palo Alto, CA) for financial support. We also thank Agroquality International, LLC (Bridgewater, NJ) and Del Industries (San Luis Obispo, CA) for providing ozone equipment and technical assistance; Advanced Packinghouse Systems (Fresno, CA) for allowing us to use their citrus storage facilities, and Dole Inc. (Bakersfield, CA) for providing the export container.

Literature cited

1. Adaskaveg, J. E. 1995. Postharvest sanitation to reduce decay of perishable commodities. *Perishables Handling* 82:21-25.
2. Baker, C. E. 1933. The effect of ozone upon apples in cold storage. *Ice Refrig.* 84:402-404.
3. Barth, M. M., Zhou, C., Mercier, J., and Payne, F. A. 1995. Ozone storage effects on anthocyanin content and fungal growth in blackberries. *J. Food Sci.* 60:1286-1288.
4. Bus, V. G., Bongers, A. J., and Risse, L. A. 1991. Occurrence of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazalil on citrus fruit from different geographic origins. *Plant Dis.* 75:1098-1100.
5. Dezman, D. J., Nagy, S., and Brown, G. E. 1986. Postharvest fungal decay control chemicals: treatments and residues in citrus fruits. *Residue Rev.* 97:37-92.
6. Dickson, R. G., Law, S. E., Kays, S. J., and Eiteman, M. A. 1992. Abatement of ethylene by ozone treatment in controlled atmosphere storage of fruits and vegetables. Pages 1-9 in: *Proc. Int. Winter Meet. Amer. Soc. Agric. Engin.* December 15-18, Nashville, TN.
7. Eckert, J. W. 1990. Impact of fungicide resistance on citrus fruit decay control. Pages 286-302 in: *Managing Resistance to Agrochemicals. From Fundamental Research to Practical Strategies.* M. B. Green, H. M. Le Baron, and W. K. Moberg, eds. Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 421, Washington, D.C.
8. Eckert, J. W., and Eaks, I. L. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. Pages 179-260 in: *The Citrus Industry.* Vol. 5. W. Reuter, E. C. Calavan, and G. E. Carman, eds. University of California Press, Berkeley, CA.
9. García, J. M., Castellano, J. M., Nadas, A., and Olías, J. M. 1998. Effect of ozone on citrus storage. Pages 237-241 in: *Proc. COST 914-COST 915. Workshop: Non Conventional Methods for the Control of Postharvest Disease and Microbial Spoilage.* October 9-11, Bologna, Italy.
10. Graham, D. M., Pariza, M., Glaze, W. H., Newell, G. W., Erdman, J. W., and Borzelleca, J. F. 1997. Use of ozone for food processing. *Food Technol.* 51:72-76.
11. Harding, P. R., Jr. 1968. Effect of ozone on *Penicillium* mold decay and sporulation. *Plant Dis. Rep.* 52:245-247.
12. Hibben, C. R., and Stotzky, G. 1969. Effects of ozone on the germination of fungus spores. *Can. J. Microbiol.* 15:1187-1196.
13. Hopkins, E. F., and Loucks, K. W. 1949. Has ozone any value in the treatment of citrus fruit for decay? *Citrus Ind.* 30:5-7, 22.
14. Jin, L., Xiaoyu, W., Honglin, Y., Zonggan, Y., Jiaxun, W., and Yaguang, L. 1989. Influence of discharge products on post-harvest physiology of fruit. Pages 1-4 in: *Proc. Int. Symp. High Voltage Engin., 6th.*
15. Klotz, L. J. 1936. Nitrogen trichloride and other gases as fungicides. *Hilgardia* 10:27-52.
16. Krause, C. R., and Weidensaul, T. C. 1977. Effects of ozone on the sporulation, germination and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 68:195-198.
17. Liew, C. L., and Prange, R. K. 1994. Effect of ozone and storage temperature on postharvest diseases and physiology of carrots (*Daucus carota* L.). *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 119:563-567.
18. National Research Council. 1993. *Pesticides in the Diets of Infants and Children.* National Academy Press, Washington, D.C.
19. Ogawa, J. M., Feliciano, A. J., and Manji, B. T. 1990. Evaluation of ozone as a disinfectant in postharvest dump tank treatments for tomato. (Abst.) *Phytopathology* 80:1020.
20. Pérez, A. G., Sanz, C., Ríos, J. J., Olías, R., and Olías, J. M. 1999. Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. *J. Agric. Food Chem.* 47:1652-1656.
21. Rice, R. G., Farquhar, W., and Bollyky, L. J. 1982. Review of the application of ozone for increasing storage time for perishable foods. *Ozone Sci. Eng.* 4:147-163.
22. Schomer, H. A., and McColloch, L. P. 1948. Ozone in relation to storage of apples. *USDA Circular* 765:1-23.
23. Shimizu, Y., Makino, H., Sato, J., and Iwamoto, S. 1982. Prevention of the rotting of grapes (Kyoho) in cold storage with the use of ozone. *Res. Bull. Aichi-ken Agric. Res. Cent.* 14:225-238.
24. Smilanick, J. L., Crisosto, C. H., and Mlikota, F. 1999. Postharvest use of ozone on fresh fruit. *Perishables Handling* 99:10-14.
25. Spalding, D. H. 1966. Appearance and decay of strawberries, peaches, and lettuce treated with ozone. *ARS-USDA Marketing Res. Rep.* 756.

26. Spalding, D. H. 1968. Effects of ozone atmospheres on spoilage of fruits and vegetables after harvest. ARS-USDA Marketing Res. Rep. 801.
27. Spotts, R. A., and Cervantes, L. A. 1992. Effect of ozonated water on postharvest pathogens of pear in laboratory and packinghouse tests. *Plant Dis.* 76:256-259.
28. Spotts, R. A., and Peters, B. B. 1980. Chlorine and chlorine dioxide for control of d'Anjou pear decay. *Plant Dis.* 64:1095-1097.
29. U.S. Food and Drug Administration. 1997. Substances generally recognized as safe, proposed rule. *Federal Register* 62:18937-18964.
30. Whiteside, J. O., Garnsey, S. M., and Timmer, L. W., eds. 1988. *Compendium of Citrus Diseases*. 2nd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Capítol 7

Evaluación de Microorganismos Antagónicos para el Control Biológico de las Podredumbres Verde y Azul
en Post-cosecha de Cítricos

L. Palou, J. Usall, N. Teixidó, I. Viñas

Àrea de Postcollita, CeRTA, Centre UdL-IRTA, Lleida

Referència: *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* Enviat per a publicació.

Resumen

Se evaluó mediante pruebas de efectividad *in vivo* en naranjas y mandarinas clementinas la capacidad antagonista de 212 bacterias y levaduras contra el hongo *Penicillium digitatum*, causante de la podredumbre verde de los cítricos. Solamente con tres de los microorganismos ensayados (1,4%) se alcanzó un porcentaje de reducción del número de frutos podridos respecto al control igual o superior al 50% tras 7 días de almacenamiento a 20°C. En pruebas de efectividad a nivel secundario, la cepa CPA-2 de la bacteria *Pantoea agglomerans*, aplicada por pulverización a las concentraciones de 4×10^7 ufc ml⁻¹ y 2×10^8 ufc ml⁻¹ unas 2 h después de la inoculación del patógeno, se mostró altamente eficaz en el control de las podredumbres verde y azul en mandarinas Clementines almacenadas a 20°C durante 7 días. La bacteria se multiplicó y mantuvo sus poblaciones en la superficie de las mandarinas, tanto en frutos incubados a 20°C durante 14 días como en frutos almacenados a 3,5°C durante 60 días.

Palabras clave adicionales: biocontrol, mandarina clementina, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Pantoea agglomerans*

Summary

In vivo primary screenings on oranges and clementine mandarins were conducted to test the antagonistic activity of 212 bacteria and yeasts against *Penicillium digitatum*, causal fungus of postharvest citrus green mold. Only three of the potential antagonists tested (1.4%) inhibited green mold by 50% or more compared to the control fruit after 7 days of incubation at 20°C. In secondary screenings, the strain CPA-2 of the bacterium *Pantoea agglomerans*, sprayed onto the fruit at 4×10^7 cfu ml⁻¹ or 2×10^8 cfu ml⁻¹ about 2h after the inoculation of the pathogen, effectively controlled both green and blue molds on Clementines mandarins stored at 20°C for 7 days. The bacterium was able to grow and keep its populations on the surface of mandarins, either in fruits incubated at 20°C for 14 days or in fruits held at 3,5°C for 60 days.

Additional key words: biocontrol, clementine mandarin, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Pantoea agglomerans*

Introducción

Entre los posibles sistemas alternativos al uso de los fungicidas sintéticos para el control de enfermedades en post-cosecha de cítricos, el control biológico, y concretamente la utilización de microorganismos antagonistas, se presenta como uno de los más interesantes para ser implementado a nivel comercial en España en un futuro más o menos próximo. Algunas de las ventajas de este sistema, en comparación con otros sistemas alternativos físicos o químicos, son su seguridad, su persistencia, su insignificante efecto en el balance ecológico y su compatibilidad con otros métodos de control (Viñas, 1997). Por otro lado, el almacenamiento en frío de los frutos cítricos, ya sea en cámaras frigoríficas o en contenedores de exportación, favorece las posibilidades de aplicación de agentes antagonistas, puesto que la fruta se encuentra en condiciones ambientales controladas (Wisniewski y Wilson, 1992; Usall *et al.*, 1996). La capacidad de control de distintas bacterias, levaduras y hongos filamentosos se ha constatado repetidamente durante los últimos años en pruebas de laboratorio y en ensayos a menor o mayor escala llevados a cabo en la mayoría de los principales países productores de cítricos, como son EE UU (Wilson y Chalutz, 1989; Smilanick y Denis-Arrue, 1992; Bull *et al.*, 1997), Israel (Chalutz y Wilson, 1991; Droby *et al.*, 1993; Droby *et al.*, 1998), Suráfrica (McGuire, 1994; McGuire y Hagenmaier, 1996), Australia (Huang *et al.*, 1992, 1995) o Italia (Arras, 1993, 1996). Actualmente sólo existen dos productos disponibles comercialmente para su utilización en post-cosecha de cítricos y ambos han sido registrados en EE UU por la Environmental Protection Agency (EPA): el Bio-Save[®] 1000, formulado con la cepa ESC-10 de la bacteria *Pseudomonas syringae* Van Hall por la empresa EcoScience (Longwood, FL, EE UU), y el Aspire[®], formulado con la cepa I-182 de la levadura *Candida oleophila* Montrocher por la

empresa Ecogen (Langhorne, PA, EE UU). No obstante, otros antagonistas han sido ya patentados, aunque no registrados, y otros ya se han ensayado a nivel semicomercial o comercial, por lo que se esperan más formulados disponibles en el mercado en un futuro próximo (Droby, 2000). En España, a principios de los 90, trabajos realizados en el IATA (CSIC) de Valencia demostraron la capacidad antagonista del hongo filamentoso *Trichoderma viride* contra diversos patógenos importantes en post-recolección de cítricos (Díaz y Vila, 1990; Díaz *et al.*, 1993). El presente trabajo se inició en Lleida en 1995, cuando nuestro grupo, especializado en el control biológico de las enfermedades de post-cosecha de la fruta de pepita, se integró en un programa de investigación concertada para el establecimiento y el impulso de la producción integrada de cítricos en Catalunya. La extraordinaria importancia económica de las enfermedades de post-recolección obliga a utilizar métodos de control altamente eficaces. Por desgracia, tal eficacia sólo se consigue actualmente con la aplicación en las centrales citrícolas de fungicidas sintéticos. En el contexto de la producción integrada, esto choca frontalmente con su objetivo básico que es la obtención de fruta de calidad con sistemas de cultivo que preserven al máximo el medio ambiente y la salud humana. ¿Qué sentido tiene minimizar las aplicaciones de pesticidas en campo si en post-cosecha, que es cuando más próxima está la fruta al consumidor, se siguen aplicando productos químicos sintéticos de forma indiscriminada? Por ello, y por otros motivos importantes como la aparición de patógenos resistentes a los fungicidas (Holmes y Eckert, 1999) y la de enfermedades iatrogénicas (Griffiths, 1981), resulta prioritaria la búsqueda y la implementación de métodos de control de enfermedades sustitutivos que permitan al sector citrícola ofrecer al consumidor productos de alta calidad, calidad no entendida solamente como un requisito comercial u organoléptico sino también como un requisito ecológico.

Los objetivos de este trabajo fueron la evaluación *in vivo* de la capacidad antagonista de bacterias y levaduras contra los patógenos *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., y *Penicillium italicum* Wehmer, causantes respectivamente de las podredumbres verde y azul, que son las enfermedades de post-cosecha de cítricos de mayor importancia económica tanto en España (Tuset, 1987) como en el resto del mundo (Eckert y Eaks, 1989). Se presentan resultados obtenidos con la cepa CPA-2 de la bacteria antagonista *Pantoea agglomerans* (Beijerinck) Gavini *et al.*

Material y métodos

Aislamiento, purificación y conservación de los posibles antagonistas. Durante tres campañas consecutivas se aislaron bacterias y levaduras de varias fuentes mediante distintas técnicas. La más sencilla fue el aislamiento directo de microorganismos crecidos en placas Petri con medio Patata Dextrosa Agar (PDA) utilizadas para muestrear la contaminación fúngica en campos de mandarina y en centrales citrícolas. Éstos se seleccionaron en base a varios criterios (Smilanick, 1994): los que presentaban cierto poder inhibitorio del crecimiento de hongos *in vitro* (halos de inhibición en las propias placas), los que se diferenciaban morfológicamente y presentaban un crecimiento vigoroso y, finalmente, otros se seleccionaban también al azar.

Otros microorganismos epifíticos se aislaron de la superficie de mandarinas no tratadas en post-cosecha mediante el siguiente procedimiento (adaptado de Janisiewicz (1987)): cada fruto se colocaba en un recipiente con solución tampón fosfato (pH 6,5) y se sometía a 10 min de agitación rotatoria a 150 rpm; seguidamente se separaba la corteza en condiciones de esterilidad, se colocaba en un erlenmeyer con 200 ml de agua estéril y se sometía a un baño de ultrasonidos durante otros 10 min. Esta operación permitía el desprendimiento de los microorganismos adheridos a la superficie. Finalmente, 0,1 ml de la suspensión resultante se colocaban en una placa Petri con medio "Nutrient Yeast Dextrose Agar" (NYDA) y se repartían homogéneamente con una asa de Drigalsky.

Dado que se ha demostrado la actividad antagonista de microorganismos endofíticos (Mari y Guizzardi, 1998), se aislaron también microorganismos presentes en el albedo del fruto. Para ello, porciones de corteza se machacaban en morteros estériles añadiendo pequeñas cantidades de solución tampón fosfato estéril. Del extracto obtenido se añadían 0,5 ml a un tubo con 4,5 ml de tampón y 0,1 ml de esta suspensión se repartían en placas con medio NYDA. Se realizó un banco de diluciones y cada una de las diluciones se sembraba también en placas con NYDA.

Todos los microorganismos aislados se incubaban en placas Petri con medio NYDA a 25°C durante 2 o 3 días y se purificaban mediante resiembras sucesivas por agotamiento. Los aislados puros se sembraban en dos tubos con NYDA y tras 2 o 3 días de incubación, uno se conservaba en frigorífico a 4°C para su

preservación y el otro se sembraba periódicamente para disponer de cultivo joven para su utilización en los ensayos.

También se evaluó la capacidad antagonica contra *P. digitatum* y *P. italicum* de levaduras y bacterias pertenecientes a la Colección de Cultivos de la Unitat de Patologia del Àrea de Postcollita del Centre UdL-IRTA que habían sido previamente seleccionadas para el control biológico de *P. expansum* en fruta de pepita.

Frutos. Se utilizaron naranjas (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), cvs. Washington Navel, Navelate y Valencia Late, y mandarinas clementinas (*Citrus reticulata* Blanco), cv. Clementine (sinónimo: Clementina de Nules), cosechadas maduras y enviadas directamente al laboratorio antes de recibir cualquier tipo de tratamiento en post-cosecha. Su procedencia eran plantaciones comerciales ubicadas en la zona citrícola del sur de Tarragona (comarcas del Baix Ebre y Montsià). Hasta su utilización en los ensayos, los frutos se mantuvieron en cámara frigorífica a 5°C y 90% de humedad relativa (HR), en ningún caso durante un periodo de tiempo superior a los 15 días. El día anterior al del ensayo eran seleccionados, lavados con agua corriente, desinfectados superficialmente durante 1 min en un baño al 0,5% de hipoclorito sódico, aclarados con agua y dejados secar en las condiciones ambientales del laboratorio hasta el día siguiente.

Selección, preparación e inoculación de los patógenos. Una serie de cepas de *P. digitatum* y *P. italicum*, aisladas de frutos podridos recogidos en centrales citrícolas de la zona de Tarragona y convenientemente purificadas, identificadas y clasificadas, fueron sometidas a pruebas previas de patogenicidad *in vivo*, seleccionándose aquellas con mayor capacidad para producir podredumbre. Estas cepas se incubaban en PDA a 25°C durante un periodo de 7 a 10 días. Mediante una cámara Thoma[®] se titulaba una suspensión de esporas en agua estéril con “tween 80” y se diluía hasta obtener la concentración deseada. Con una micropipeta se inoculaban 25 µl de esta suspensión en una incisión de aproximadamente 5 mm de longitud, 1 mm de anchura y 2 mm de profundidad, practicada previamente en la zona ecuatorial de cada fruto. Esta incisión profundizaba en el albedo sin llegar a la pulpa y se aseguraban así las condiciones óptimas de infección (Green, 1932).

Pruebas de efectividad a nivel primario. Esta metodología se empleó para identificar rápidamente y de forma sencilla entre las bacterias y levaduras aisladas aquellas con capacidad antagonica contra *P. digitatum*. Los microorganismos a evaluar se sembraron en placas con medio NYDA y se incubaron a 25°C durante 48 h. Se preparó una solución muy concentrada de cada posible antagonista introduciendo en un tubo de ensayo con 4,5 ml de solución tampón fosfato estéril tres asas de Kolle de microorganismo y mezclando el contenido en un agitador. Los microorganismos con los que no se obtenía una suspensión homogénea se desechaban. Los microorganismos se ensayaron sobre mandarinas Clementines o sobre naranjas Washington Navel, Navelate o Valencia Late (según el tipo de fruta disponible en cada momento de la temporada citrícola). A los frutos, colocados en alveolos plásticos e inoculados unas 2 h antes con 1×10^6 esporas ml⁻¹ de *P. digitatum* tal como se ha descrito anteriormente, se les aplicaban en la misma incisión 50 µl de la suspensión concentrada del antagonista potencial. La unidad de muestra era de un fruto y cada tratamiento se aplicaba a cinco repeticiones. Tras 7 días de incubación a 20°C y 90% HR se determinaba la incidencia de la podredumbre verde comparándola con la incidencia en los frutos del tratamiento control, en los cuales se habían inoculado 50 µl de agua destilada estéril. Los microorganismos con los cuales se obtenía un porcentaje de reducción del número de frutos podridos respecto al control superior al 50% eran evaluados de nuevo y, si se repetían estos resultados, eran seleccionados para ser evaluados en ensayos de efectividad a nivel secundario. Un total de 212 bacterias y levaduras fueron ensayadas durante tres campañas consecutivas.

Pruebas de efectividad a nivel secundario. Estas pruebas se realizaron para determinar las concentraciones de los antagonistas eficaces en el control de distintas concentraciones de los patógenos. Se describe la metodología utilizada para la evaluación de la efectividad de la cepa CPA-2 de la bacteria antagonista *P. agglomerans* en mandarinas Clementines. La bacteria se cultivó a 30°C en un fermentador con 6 l de medio “Nutrient Yeast Dextrose Broth” (NYDB, medio NYDA sin agar) durante 24 h y se centrifugó a 6.981 g durante 10 min. Se eliminó la fracción líquida y la sedimentada se disolvió en una solución 0,05 M de tampón fosfato estéril. A partir de esta suspensión se obtuvieron las de las concentraciones deseadas, 4×10^7 unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc ml⁻¹) y 2×10^8 ufc ml⁻¹, ajustando el volumen según una curva estándar obtenida midiendo transmitancias a 420 nm con un espectrofotómetro. Las mandarinas, colocadas en alveolos plásticos e inoculadas unas 2 h antes con 25 µl de una suspensión de 1×10^5 o 1×10^6 esporas ml⁻¹ de *P. digitatum* o de *P. italicum*, se pulverizaron uniformemente durante 5 s con una suspensión del antagonista a la concentración deseada. Los frutos

de los tratamientos de control se pulverizaron con agua destilada estéril. La unidad de muestra fue de cinco frutos y cada tratamiento se aplicó a cuatro repeticiones. Una vez secos, los frutos se incubaron a 20°C y 90% HR durante 7 días, transcurridos los cuales se contabilizó el número de frutos podridos. El ensayo se repitió dos veces.

Dinámica poblacional. Se determinaron las poblaciones de *P. agglomerans* CPA-2 a lo largo del tiempo en mandarinas Clemenules sumergidas durante 1 min a temperatura ambiente ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) en una solución acuosa que contenía 2×10^8 ufc ml^{-1} de la bacteria. En la corteza de las mandarinas tratadas se había previamente practicado una incisión de 5 mm de longitud, 1 mm de anchura y 2 mm de profundidad, pero no se habían inoculado con ningún patógeno. Las poblaciones bacterianas se determinaron a los 0, 1, 2, 3, 7, 10 y 14 días de incubación a 20°C y a los 0, 7, 14, 30 y 60 días de conservación frigorífica a 3,5°C. En cada una de las evaluaciones se tomaron cuatro repeticiones de cinco mandarinas cada una. De cada fruto se cortaron con un sacabocados estéril 16 porciones de corteza de 1,45 cm^2 de diámetro, una de las porciones incluyendo la incisión realizada antes del tratamiento. Las porciones se colocaron en un frasco con 100 ml de tampón fosfato, se agitaron a 150 rpm durante 20 min en un agitador orbital y se sometieron a un baño de ultrasonidos durante otros 10 min. Con la suspensión resultante se realizó un banco de diluciones (cada suspensión 10 veces más diluida que la anterior) y cada suspensión se sembró en placas Petri con medio NYDA. Transcurridas 24 h de incubación en la oscuridad a 25°C, se contó el número de colonias bacterianas en cada placa y se calculó el número de colonias por cm^2 de superficie del fruto.

Análisis estadístico. A los datos transformados al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción de frutos podridos se les aplicó el análisis de la varianza utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE UU). La separación de medias se realizó mediante la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (MDS) protegida de Fisher ($p = 0,05$). A las poblaciones de *P. agglomerans* CPA-2 en la superficie de las mandarinas se les aplicó la transformación logarítmica.

Resultados

Pruebas de efectividad a nivel primario. Únicamente tres de los 212 aislados ensayados (1,4%) superó el umbral impuesto de reducir en más de un 50% el número de frutos podridos respecto al control en dos ensayos primarios diferentes. En este artículo se presentan resultados obtenidos con la cepa CPA-2 de la bacteria *P. agglomerans*. Con los otros dos antagonistas continúan los trabajos de laboratorio.

Pruebas de efectividad a nivel secundario. *P. agglomerans* CPA-2 (previamente clasificada como *Erwinia herbicola* (Lohnis) Dye), había sido aislada de la superficie de una manzana Golden Delicious en nuestro laboratorio y sobre ella se ha tramitado una solicitud de patente en España (Viñas *et al.*, 1999). *P. agglomerans* CPA-2, aplicada por pulverización a las concentraciones de 4×10^7 y 2×10^8 ufc ml^{-1} , controló significativamente las podredumbres verde y azul en mandarinas Clemenules previamente inoculadas con 1×10^5 o 1×10^6 esporas ml^{-1} de *P. digitatum* o de *P. italicum* e incubadas a 20°C durante 7 días (Fig. 1). La concentración de antagonista de 2×10^8 ufc ml^{-1} fue significativamente superior a la de 4×10^7 ufc ml^{-1} únicamente en el caso de las mandarinas inoculadas con la densidad alta de *P. italicum*. A la densidad de patógeno baja, el antagonista controló la podredumbre azul (55% de reducción respecto al control con 4×10^7 ufc ml^{-1} de antagonista y 70% de reducción con 2×10^8 ufc ml^{-1}) de forma más eficaz que la podredumbre verde (40 y 60 % de reducción respectivamente) (Fig. 1).

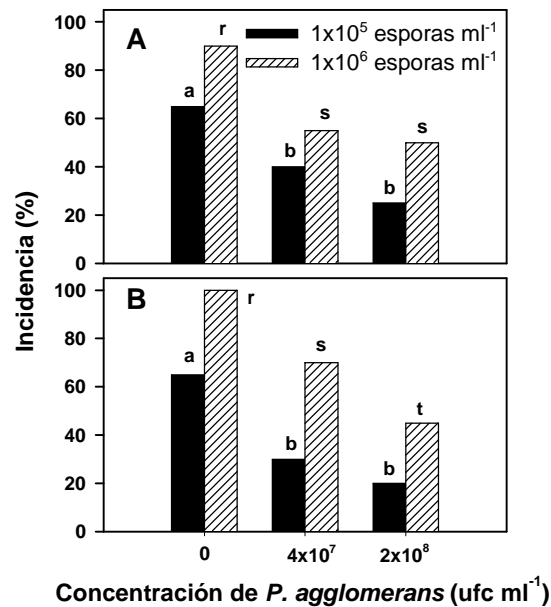


Fig. 1. Incidencia de las podredumbres verde (A) y azul (B) en mandarinas Clemenules inoculadas con 1×10^5 o 1×10^6 esporas ml^{-1} de *Penicillium digitatum* o *P. italicum* respectivamente, pulverizadas con el antagonista *Pantoea agglomerans* CPA-2 a diferentes concentraciones e incubadas durante 7 días a 20°C y 90% HR. Para cada densidad de inóculo, las columnas con letras distintas son significativamente diferentes según la prueba de la Mínima Diferencia Significativa protegida de Fisher aplicada después de un análisis de la varianza al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción de frutos podridos ($p = 0,05$). Se presentan las medias no transformadas.

Dinámica poblacional. La población de *P. agglomerans* CPA-2 en la superficie de las mandarinas aumentó aproximadamente 10 veces durante las primeras 24 h de incubación a 20°C . Luego disminuyó lentamente de las aproximadamente 60.000 ufc cm^{-2} que se contabilizaron a los 3 días de incubación hasta las 10.000 ufc cm^{-2} que se contabilizaron a los 14 días (Fig. 2A). Las poblaciones de la bacteria fueron inferiores en frutos almacenados a $3,5^\circ\text{C}$, pero se mantuvieron aproximadamente entre 1.000 y 5.000 ufc cm^{-2} durante los 30 primeros días de almacenamiento. A los 60 días de conservación frigorífica la población contabilizada estaba alrededor de las 600 ufc cm^{-2} (Fig. 2B).

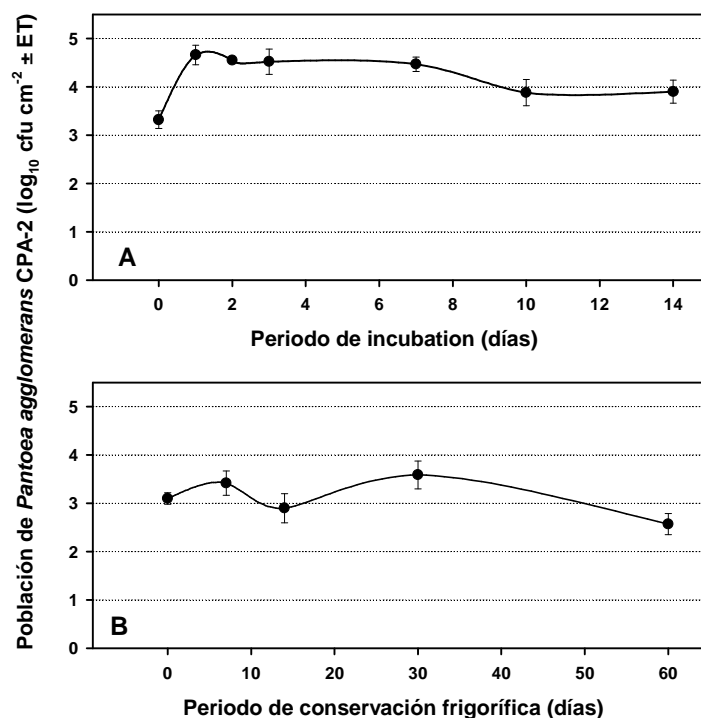


Fig. 2. Dinámica poblacional de *Pantoea agglomerans* CPA-2 en mandarinas Clemenules heridas artificialmente en la corteza, sumergidas por 1 min en una suspensión a temperatura ambiente ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) de 2×10^8 ufc ml^{-1} de *P. agglomerans* CPA-2 e incubadas a 20°C y 90% HR durante 14 días (A) o almacenadas en frío normal a $3,5^\circ\text{C}$ y 98% HR durante 60 días (B).

Discusión

Tan sólo con el 1,4% de los microorganismos ensayados en las pruebas de efectividad *in vivo* a nivel primario se obtuvo un porcentaje de reducción del número de frutos podridos con respecto a los controles superior al 50%. Se utilizaron pruebas *in vivo* por las ventajas que presentan respecto a las pruebas *in vitro*. Según Smilanick (1994), las más importantes son por un lado que, a parte de la capacidad de control, también permiten ensayar la capacidad de supervivencia del antagonista potencial sobre el huésped y, por otro lado, que se ensayan modos de acción distintos de la antibiosis. En este trabajo, las condiciones de experimentación se establecieron en base a un criterio muy conservador; se empleó una concentración de patógeno alta (1×10^6 esporas ml^{-1}) y la aplicación de los antagonistas potenciales se realizó siempre con posterioridad a la del patógeno. Con ello se simulaban las condiciones reales en las que la mayor parte de las infecciones de *Penicillium* spp. en frutos cítricos tienen lugar antes de que se realicen los tratamientos post-cosecha en las centrales. Este procedimiento aseguró la selección únicamente de aquellos microorganismos capaces de controlar la enfermedad en las condiciones más desfavorables. Bajo condiciones de experimentación considerablemente menos restrictivas (concentración de patógeno de 1×10^4 esporas ml^{-1} y aplicación de éste con posterioridad a la de los antagonistas), Wilson y Chalutz (1989) seleccionaron únicamente dos levaduras y dos bacterias entre los 122 microorganismos que testaron (3,3%) *in vivo* contra *P. digitatum* y *P. italicum*. Esto demuestra que la gran mayoría de las bacterias y levaduras presentes de forma natural en los cítricos tienen, aplicados como tratamiento de post-cosecha, una nula o escasa capacidad para controlar las podredumbres verde y azul. Por este motivo, cuando se pretende encontrar antagonistas efectivos es necesario ensayar un gran número de antagonistas potenciales.

La cepa CPA-2 de *P. agglomerans* es un aislado patentado con capacidad antagónica contra los principales patógenos de la fruta de pepita (Viñas *et al.*, 1999). El presente trabajo demuestra que también resulta eficaz en el control biológico de las podredumbres verde y azul de los cítricos. Este es un resultado importante porque posibilita la ampliación del espectro de acción del antagonista a otros sistemas huésped-patógeno de importancia económica. Además, se demuestra la capacidad de la bacteria para crecer y mantener sus poblaciones incluso en condiciones de conservación frigorífica, aspecto esencial a tener en cuenta de cara a las posibilidades de implementación comercial del tratamiento de biocontrol. A partir de los resultados satisfactorios obtenidos en los ensayos de efectividad a nivel secundario con mandarinas es necesario generalizar las investigaciones a otras especies de cítricos y contrastar la eficacia en ensayos a una escala mayor y en unas condiciones cada vez más próximas a las comerciales. Otras pruebas adicionales resultan necesarias para comparar la eficacia del antagonista con la de los principales fungicidas de post-cosecha, comprobar su compatibilidad con otros tratamientos de post-cosecha, sean o no fungicidas, y determinar la forma y el momento de aplicación óptimos (Usall *et al.*, 1996). Paralelamente deben realizarse estudios sobre los riesgos de su aplicación, tanto para el hombre como para el medio ambiente. También es importante, aunque complejo, llegar a establecer el mecanismo de acción del antagonista, pues ello contribuirá a la optimización de los métodos y los momentos de aplicación y al desarrollo de formulaciones apropiadas (Droby y Chalutz, 1994). La comercialización final del producto biológico requiere otra serie de investigaciones imprescindibles como son (Bowers, 1982): el estudio de la estabilidad genética del agente antagonista; la evaluación de su potencial para una producción masiva y económica; la determinación de la formulación más adecuada, con los adyuvantes que optimicen la eficacia, estabilidad, longevidad, seguridad y manejo del producto; y los estudios de mercado potencial y de costes de implementación. Todo este largo y costoso proceso requiere de una estrecha colaboración entre los centros de investigación y la industria dedicada a la protección de vegetales en post-cosecha que, hoy en día, ante las exigencias del mercado y la creciente presión legislativa, ya ha asumido la necesidad económica de involucrarse fuertemente en la obtención y distribución de productos biológicos.

Actualmente, tras la comercialización de la llamada primera generación de fungicidas biológicos de post-cosecha y la constatación de que difícilmente pueden alcanzar por sí solos los niveles de control de los

fungicidas sintéticos se ha entrado en una fase que va más allá de la obtención de antagonistas efectivos (Droby, 2000). Distintas vías de investigación están abiertas con el objetivo de aumentar la eficacia de los antagonistas e incrementar los beneficios derivados de su utilización. Las más importantes son la evaluación de la capacidad antagonista de mezclas de distintos microorganismos (Janisiewicz, 1988), la mejora de la efectividad de los antagonistas mediante la adición de determinados nutrientes (El-Ghaouth *et al.*, 2000a; El-Ghaouth *et al.*, 2000b), la combinación en post-cosecha del control biológico con otros sistemas físicos y/o químicos (McGuire, 1994; Huang *et al.*, 1995; Stevens *et al.*, 1997; Usall *et al.*, 1999; Teixidó *et al.*, 2001), la aplicación de antagonistas en campo para el control biológico de enfermedades de post-cosecha (Teixidó *et al.*, 1998; Benbow y Sugar, 1999), y la manipulación genética de los antagonistas (Schena *et al.*, 1999).

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación de la CIRIT (Generalitat de Catalunya) y del Grup Exportador de Cítrics del Baix Ebre i Montsià, así como la colaboración de M. Carme Cerdà.

Referencias bibliográficas

- ARRAS G., 1993. Inhibition of postharvest fungal pathogens by *Bacillus subtilis* strains isolated from citrus fruit. *Adv. Hort. Sci.* 7, 123-127.
- ARRAS G., 1996. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharvest Biol. Technol.* 8, 191-198.
- BENBOW J.M., SUGAR D., 1999. Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. *Plant. Dis.* 83, 839-844.
- BOWERS R.C., 1982. Commercialization of microbial biological control agents. En: *Biological Control of Weeds with Plant Pathogens*. Charudattan R., Walker H.L. eds. John Wiley & Sons, New York, EE UU.
- BULL C.T., STACK J.P., SMILANICK J.L., 1997. *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue molds of citrus. *Biol. Control* 8, 81-88.
- CHALUTZ E., WILSON C.L., 1991. Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Dis.* 74, 134-137.
- DÍAZ M.A., VILA R., 1990. Biological control of *Penicillium digitatum* by *Trichoderma viride* on postharvest citrus fruits. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 179-184.
- DÍAZ M.A., CERVERA V., LUIS G., VILA R., 1993. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Geotrichum candidum* through action of *Trichoderma viride* and commercial fungicides. *Microbiol. Alim. Nutr.* 11, 425-428.
- DROBY S., COHEN L., WEISS B., WISNIEWSKI M., 2001. Microbial control of postharvest diseases of fruits and vegetables - current status and future outlook. *Acta Hort.* 553: 371-376.
- DROBY S., CHALUTZ E., 1994. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. En: *Biological Control of Postharvest Diseases: Theory and Practice*. Wilson, C.L., Wisniewski M.E. eds. CRC Press, Boca Raton, FL, EE UU. pp. 63-75.
- DROBY S., COHEN L., DAUS A., WEISS B., HOREV B., CHALUTZ E., KATZ H., KERENTZUR M., SACHNAI A., 1998. Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biol. Control.* 12, 97-101.
- DROBY S., HOFSTEIN R., WILSON C.L., WISNIEWSKI M., FRIDLINDER B., COHEN L., WEISS B., DAUS A., TIMAR D., CHALUTZ E., 1993. Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruits. *Biol. Control* 3, 47-52.
- ECKERT J.W., EAKS I.L., 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. En: *The Citrus Industry*. Vol. 5. Reuter W., Calavan E.C., Carman G.E. eds. University of California Press, Berkeley, CA, EE UU. pp. 179-260.
- EL-GHAOUTH A., SMILANICK J.L., WILSON C.L., 2000a. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 19, 103-110.
- EL-GHAOUTH A., SMILANICK J.L., WISNIEWSKI M., WILSON C.L., 2000b. Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. *Plant. Dis.* 84, 249-253.
- GREEN F.M., 1932. The infection of oranges by *Penicillium*. *J. Pomol. Hort. Sci.* 10, 184-215.

- GRIFFITHS E., 1981. Iatrogenic plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 19, 69-82.
- HOLMES G.J., ECKERT J.W., 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* 89, 716-721.
- HUANG Y., DEVERALL B.J., MORRIS S.C., 1995. Postharvest control of green mould on oranges by a strain of *Pseudomonas glathei* and enhancement of its biocontrol by a heat treatment. *Postharvest Biol. Technol.* 5, 129-137.
- HUANG Y., WILD B.L., MORRIS S.C., 1992. Postharvest biological control of *Penicillium digitatum* decay on citrus fruit by *Bacillus pumilus*. *Ann. Appl. Biol.* 120, 367-372.
- JANISIEWICZ W.J., 1987. Postharvest biological control of blue-mold on apples. *Phytopathology* 77, 481-485.
- JANISIEWICZ W.J., 1988. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonistic mixtures. *Phytopathology* 78, 194-198.
- MARI M., GUIZZARDI M., 1998. The postharvest phase: emerging technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica* 26, 59-66.
- McGUIRE R.G., 1994. Application of *Candida guilliermondii* in commercial citrus coatings for biocontrol of *Penicillium digitatum* on grapefruits. *Biol. Control* 4, 1-7.
- McGUIRE R.G., HAGENMAIER R.D., 1996. Shellac coatings for grapefruits that favor biological control of *Penicillium digitatum* by *Candida oleophila*. *Biol. Control* 7, 100-106.
- SCHENA L., IPPOLITO A., ZAHAVI T., COHEN L., NIGRO F., DROBY S., 1999. Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biol. Technol.* 17, 189-199.
- SMILANICK J.L., 1994. Strategies for the isolation and testing of biocontrol agents. En: *En: Biological Control of Postharvest Diseases: Theory and Practice*. Wilson C.L., Wisniewski M.E. eds. CRC Press, Boca Raton, FL, EE UU. pp. 25-42.
- SMILANICK J.L., DENIS-ARRUE R., 1992. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Dis.* 76, 481-485.
- STEVENS C., KHAN V.A., LU J.Y., WILSON C.L., PUSEY P.L., IGWEBBE E.C.K., KABWE K., MAFOLO Y., LIU J., CHALUTZ E., DROBY S., 1997. Integration of ultraviolet (UV-C) light with yeast treatment for control of postharvest storage rots of fruits and vegetables. *Biol. Control* 10, 98-103.
- TEIXIDÓ N., USALL J., PALOU L., ASENSIO A., NUNES C., VIÑAS I., 2001. Improving biocontrol of green and blue molds of oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. *Eur. J. Plant Pathol.* En prensa.
- TEIXIDÓ N., VIÑAS I., USALL J., MAGAN N., 1998. Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopathology* 88, 960-964.
- TUSET J.J., 1987. Podredumbres de los frutos cítricos. *Conselleria d'Agricultura i Pesca. Generalitat Valenciana*. Valencia. 206 pp.
- USALL J., PONS J., PALOU L., VIÑAS I., SMILANICK J.L., 1999. Alternativas a los productos químicos de síntesis en post-cosecha de cítricos en España y EE UU. *Phytoma-España* 110, 58-64.
- USALL J., TEIXIDÓ N., NUNES C., VIÑAS I., 1996. Los tratamientos de biocontrol. Una alternativa real. *Fruticultura Profesional* 82, 39-53.
- VIÑAS I., 1997. Control biológico de las principales enfermedades fúngicas post-cosecha. *Phytoma-España* 90, 78-81.
- VIÑAS I., USALL J., NUNES C., TEIXIDÓ N., 1999. Nueva cepa de la bacteria *Pantoea agglomerans* (Beijerinck, 1998) Gavini, Mergaert, Beji, Mielcareck, Izard, Kersters y De Ley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de frutas. Solicitud P9900612. Oficina Española de Patentes y Marcas. Madrid.
- WILSON C.L., CHALUTZ E., 1989. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Sci. Hortic.* 40, 105-112.
- WISNIEWSKI M., WILSON C.L., 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *HortScience* 27, 94-98.

Capítol 8

Improving Control of Green and Blue Molds of Oranges by Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and Sodium Bicarbonate

N. Teixidó, J. Usall, L. Palou, A. Asensio, C. Nunes, I. Viñas

Àrea de Postcollita, CeRTA, Centre UdL-IRTA, Lleida

Referència: *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 685-694 (2001).

Abstract

The potential of using *Pantoea agglomerans* (strain CPA-2) alone, or in combination with sodium bicarbonate or carbonate solutions for control of *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold) on oranges was investigated under ambient (20°C) and cold storage (3°C) conditions. *P. agglomerans* effectively controlled both pathogens on oranges at 2×10^8 cfu ml⁻¹. The biocontrol agent was found to be at room temperature, completely tolerant to 2% sodium bicarbonate, although its Culturability was reduced by >1000-fold after 30 minutes in 2% sodium carbonate. The efficacy of *P. agglomerans* for control of green mold was improved significantly when combined with sodium bicarbonate treatment, resulting in complete and 97.6% reduction of decay incidence at 3°C and 20°C, respectively when compared to untreated controls. Satisfactory results were also obtained with the combined treatment for control of blue mold when compared to untreated controls. This antagonist grew well inside wounds on oranges at both 20°C and 3°C. In contrast, it showed a reduced growth on the surface of intact fruit. Sodium bicarbonate at 2% concentration did not noticeably affect antagonist population development. Thus, use of bicarbonate treatment at 2% followed by the antagonist *P. agglomerans* CPA-2 could be an alternative to chemicals for control of postharvest diseases on oranges.

Keywords: Biological control, citrus, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, postharvest diseases, sodium carbonate

Introduction

Post-harvest green and blue molds of citrus, caused by *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. and *Penicillium italicum* Wehmer, respectively, are responsible for severe economic losses worldwide (Bancroft et al., 1984; Eckert and Eaks, 1989). Currently these post-harvest diseases are controlled by chemical treatments such as ortho-phenil phenate, imazalil and thiabendazol. However, the use of chemicals is becoming increasingly restricted because of concerns about environment and health as well as the development of resistance to these fungicides among fungal pathogens (Díaz and Vila, 1988; Eckert, 1990; Bus et al., 1991; Eckert et al., 1994). Therefore, there is a need to develop new and effective methods to control post-harvest diseases that pose no harm to human health and the environment, and accepted as safe by the general public.

Biological control using microbial antagonists has received a great deal of attention as a promising alternative to chemicals. Many organisms, such as *Pseudomonas* spp. (Huang, et al., 1991; 1993; 1995; Smilanick and Denis-Arrue, 1992), *Bacillus* spp., (Singh and Deverall, 1984; Arras and D'hallewin, 1994), *Debaryomyces hansenii* (Chalutz and Wilson, 1990), *Pichia guilliermondii* (Droby et al., 1993) and *Trichoderma viride* (De Matos, 1983) have been isolated to protect wounds from post-harvest pathogens on citrus fruits. One yeast and two bacterial products are currently commercially available in USA. *Candida oleophila* strain I-182 was registered during 1995 (US-EPA registration no 55638-29) as ASPIRE™ by Ecogen Inc. (Langhorne, PA) for the biological control of post-harvest diseases of pome and citrus fruits (Chand-Goyal et al., 1998). At the same time *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 were registered (US-EPA registration no 64296-7) as BIOSAVE-10™ and BIOSAVE-11™ by EcoScience Corp., (Orlando), FL (Bull et al., 1997) for the same purpose.

Recent studies at the University of Lleida, Catalonia, Spain have demonstrated that the strain CPA-2 of *Pantoea agglomerans*, previously classified as *Erwinia herbicola*, isolated from the apple surface, is an effective antagonist to the major fungal pathogens of apples and pears (Viñas et al. 1999). Generally, biological control agents have a relatively narrow spectrum of activity compared to fungicides (Janisiewicz and Bors, 1995). It is thus particularly important to find antagonists with a broader spectrum in terms of both hosts and pathogen control range. Recently, interest has been given to potential of combining microbial biocontrol agents with other chemical components for enhancing control of post-harvest diseases of pome, stone and citrus fruits.

Carbonic acid salts are common food additives allowed with no restrictions for many applications by European and North American regulations (Lindsay, 1985; Multon, 1988). The antimicrobial activity of these chemicals has been described *in vitro* (Marloth, 1931; Corral et al. 1988) and in a wide range of substrates as well. Sodium Bicarbonate (NaHCO₃) and Sodium Carbonate (Na₂CO₃) have been

demonstrated to reduce the incidence of postharvest decay on citrus fruits (Barger, 1928; Fawcett, 1936; Houck, 1965; Klotz, 1973; and Smilanick et al., 1997). The inhibitory activity of carbonate and bicarbonate solutions against *Penicillium* spp. is however low, and generally only fungistatic (Marloth, 1931; Hwang and Klotz, 1938).

Sodium Carbonate and Bicarbonate have disposal issues that have to be taken into account due to the large amount of sodium and the high pH of these solutions. Depending on the kind of soil and the pH of water, some problems could appear. However, Sodium Bicarbonate offers a real advantage to Sodium Carbonate. An equivalent-weight solution of Sodium Bicarbonate has a lower pH and less sodium than a similar solution of Sodium Carbonate. Equimolar amounts of Sodium Bicarbonate contain 27.4% sodium compared to 43.4% sodium in Sodium Carbonate (Smilanick et al., 1999).

In the near future, the preferred alternative to chemical treatments will be probably a combination of different methods. In fact, Smilanick et al. (1999) found that the effectiveness of sodium bicarbonate and carbonate was significantly improved when these treatments were followed by the fungicide imazalil or *P. syringae* ESC-10. The combination of bicarbonate or carbonate with *P. syringae* overcame significant shortcomings of either of these treatments alone.

This study reports: (a) the efficacy of *P. agglomerans* (strain CPA-2) for the control of *P. digitatum* and *P. italicum* rots on oranges; (b) the potential for improving the efficacy by combination with Sodium bicarbonate or carbonate treatments when stored under ambient conditions (20°C) or in cold storage (3°C), and (c) determination of the population dynamics of the biocontrol agent in wounded and non-wounded fruits.

Materials and methods

Fruits. Valencia oranges used in all experiments were grown in Baix Ebre and Montsià areas in Tarragona (Catalonia, Spain) following standard cultural practices. Fruits were selected from field bins after harvest before any commercial post-harvest treatments were applied. Oranges were used following harvest or after a short storage period at 3°C (no longer than 2 weeks). Before each experiment the oranges were dipped in a NaOCl 0.5% solution for 1 minute, rinsed with water, allowed to air-dry at room temperature and randomised.

Pathogens. *P. digitatum* PDM-1 and *P. italicum* PIM-1 were isolated from decayed oranges and maintained on potato dextrose agar medium (PDA; 200 ml of extract from boiled potatoes, 20 g of dextrose, 20 g of agar and 800 ml of water). These are the most virulent isolates of the University of Lleida-IRTA culture collection and to maintain virulence, they were periodically grown on wounded citrus fruits and reisolated. A conidial suspension was prepared by adding 10 ml of sterile water with 0.01% of tween 80 over the surface of 10-day-old cultures grown on PDA and rubbing the surface with a sterile glass rod. The cells were counted in a haemocytometer and diluted to a concentration of 10^5 or 10^6 spores ml⁻¹. This is a recommended concentration for the evaluation of postharvest treatments to control green and blue molds (Eckert and Brown, 1986a). In all the experiments each pathogen was tested separately.

Antagonist. *P. agglomerans* strain CPA-2 was obtained from the UdL-IRTA Centre, Catalonia, Spain. It was originally isolated from apple surface (cv. Golden Delicious). Stock cultures were stored at 5°C and were subcultured on nutrient yeast dextrose agar (NYDA; 8 g of nutrient broth, 5 g of yeast extract, 10 g of dextrose, 20 g of agar and 1000 ml of water). For long-term storage CRIO-BILLES AEB 400100 (AES Laboratory, Combourg, France) at -80°C were used. Bacterial suspensions for efficacy and population assays were prepared from bacteria grown in a 6-liter bench-top fermenter at 30°C in NYDB medium (NYDA medium without agar). Cells were harvested at the beginning of the stationary phase (24h) by centrifugation at 6981 g for 10 min. The cell paste was resuspended in 0.05 M phosphate buffer to the desired concentration.

Biocontrol of blue-mold and green-mold with *P. agglomerans*. Surface-sterilized oranges were wounded with a steel scalpel by making an injury 2 mm deep by 1 mm wide by 5 mm long on the equator of each fruit. The shallow wounds penetrated the albedo tissue but not the juice sacs to simulate natural infection. A 25 µl aqueous suspension of *P. digitatum* or *P. italicum* at 1×10^5 or 1×10^6 spores ml⁻¹, was applied to each wound, followed by inoculation with 20 µl of the appropriate concentration of a suspension of *P. agglomerans* CPA-2. The antagonist concentrations were adjusted to 4×10^7 and 2×10^8 cfu ml⁻¹ according to a standard curve obtained spectrophotometrically by measuring transmittance at 420 nm (CECIL CE 1020). Five oranges constituted a single replicate, each treatment was repeated four

times and the experiment was carried out twice. Treated oranges were incubated at 20°C and 90% relative humidity (RH). Data were recorded as the percentage of decayed fruits after 7 days incubation.

Compatibility of *P. agglomerans* with sodium bicarbonate and carbonate solutions. One millilitre of sodium bicarbonate or sodium carbonate solutions at concentrations ten times the required, was transferred to glass test tubes with 9 ml of *P. agglomerans* at a known concentration (10^7 cfu ml⁻¹). The final required concentration for the sodium salts was 2%. After incubation for 30 minutes at 25 °C, suspensions ten-fold were few times diluted in 0.05 M phosphate buffer (pH 7) and plated on Petri dishes with NYDA medium. A control with bacterial cells in water was also tested. The plates were incubated at 25 °C in the dark for 24 h and colonies were counted. The test was repeated twice.

Combining *P. agglomerans* and sodium bicarbonate. Four treatments and two different storage conditions were tested in this set of experiments. The treatments applied to pathogen inoculated fruits were: (1) control (water); (2) *P. agglomerans* CPA-2; (3) sodium bicarbonate; and (4) sodium bicarbonate + *P. agglomerans* CPA-2. Treated fruits were stored for 14 days at 20°C and 90% RH or 60 days at 3°C and 98% RH (long-term cold storage).

Valencia oranges were wounded and inoculated with *P. digitatum* or *P. italicum* at 10^6 spores ml⁻¹, as described above about 2 h before treatments were applied. Control treatment consisted of dipping pathogen inoculated oranges in water for 1 minute. Antagonist treatment was applied by dipping oranges for 1 minute in an aqueous solution containing 2×10^8 cfu ml⁻¹ of *P. agglomerans*. Based on the results of previous research with sodium bicarbonate against green (Smilanick et al., 1999; Palou et al., 1999) and blue (Palou et al., 2000) molds, a concentration of 2% sodium bicarbonate and a 150-seconds immersion period were chosen for the sodium bicarbonate treatment. Finally, bicarbonate and antagonist treatment were combined by first dipping fruits in 2% sodium bicarbonate for 150 s and, after allowing to air-dry at room temperature, by dipping fruit in 2×10^8 cfu ml⁻¹ *P. agglomerans* suspension for 1 minute. For each storage condition, each treatment was applied to three replicates of 20 oranges each. Fruits were stored in trays. Decayed fruits were recorded after 7 and 14 days storage at 20°C and after 30 and 60 days of cold storage.

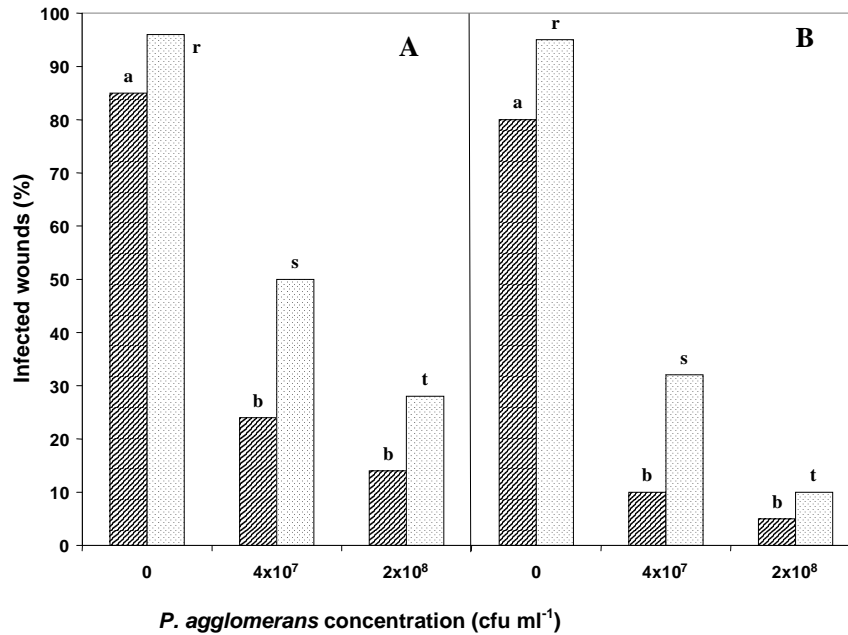
Population dynamics on the orange surface. The populations of *P. agglomerans* CPA-2 were monitored on wounded and unwounded oranges. Wounded and unwounded fruits were treated with *P. agglomerans* or sodium bicarbonate followed by *P. agglomerans*, respectively, as described in efficacy trials. Fruits were incubated at 20°C and 90% RH, and in long-term cold storage at 3°C and 98% RH. Bacterial populations were monitored after 0, 1, 2, 3, 7, 10 and 15 days on fruits stored at 20°C, and after 3, 7, 15, 30, 45 and 60 days on fruit in cold storage. Four oranges constituted each replicate and twenty-five pieces of peel surface of 2.5 cm² from each orange were removed with a cork borer (100 pieces of peel per replicate). In the case of wounded fruits, wounds were included in one of the removed segments of peel. Peel surface segments were shaken in 100 ml sterile phosphate buffer (pH 7) on a rotatory shaker for 20 minutes at 150 rpm and then sonicated for 10 minutes in an ultrasound bath. This final step was used to improve detachment of the antagonist from the orange surface.

Serial 10-fold dilutions of the washings were made with 0.05M phosphate buffer and plated on NYDA medium. After incubation at 25°C in the dark for 24 h, the colonies were counted and their number per cm² of fruit surface were calculated for each sample. There were four replicates per treatment.

Statistical analysis. Effects of treatments on the incidence of green and blue molds were analysed using an analysis of variance on data transformed to the arcsine of the square root of the proportion of infected fruits. This transformation was used to improve homogeneity of variances. Statistical significance was judged at the level $P < 0.05$ and least significant difference (LSD) procedure used for means separation. No statistical differences were found between experimental replications; therefore the results from both different experiments were pooled.

P. agglomerans populations on orange surface (cfu/cm²) were log transformed to improve homogeneity of variances (Parbery et al., 1981) and plotted in figures where standard errors are shown for each sampling date.

Fig. 1. Incidence of green and blue mold on Valencia late oranges wounded with 10^5 (10^6) spores ml⁻¹ of *P. digitatum* or *P. italicum* respectively, followed by treatment with different concentrations of *P. agglomerans*



concentrations of *P. agglomerans* after 7 days incubation at 20°C and 90% RH. Within pathogen concentrations, columns with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) according to the least significant difference test (LSD).

Results

Biocontrol with *P. agglomerans*. The antagonistic bacteria, *P. agglomerans* CPA-2 strongly inhibited development of *P. italicum* and *P. digitatum* on wounded oranges artificially inoculated at both concentrations tested (Figure 1). The efficacy of 4×10^7 and 2×10^8 cfu ml⁻¹ of *P. agglomerans* was not statistically different when the concentration of pathogens used was 10^5 cfu ml⁻¹, with percentages of infected wound reductions $>70\%$ and $>85\%$ for green and blue mold respectively.

When antagonistic biocontrol concentrations were increased from 4×10^7 to 2×10^8 cfu ml⁻¹, the efficacy against both pathogens at 10^6 cfu ml⁻¹ was significantly increased achieving reductions in incidences of *P. digitatum* and *P. italicum* of about 71% and 89% respectively.

Compatibility of *P. agglomerans* with sodium bicarbonate and carbonate solutions. Culturability of *P. agglomerans* was not reduced after 30 minutes immersion in a 2% sodium bicarbonate solution compared to the control (water) (Table 1). However, bacterial Culturability was reduced more than 1000-fold by 2% sodium carbonate solution.

Table 1. Effect of the immersion in sodium bicarbonate and carbonate solutions for 30 minutes on the microbial Culturability of *P. agglomerans* CPA-2.

SOLUTION	CFU ml ⁻¹	Standard error
Water	9.15×10^6	1.7×10^5
Sodium bicarbonate 2%	9.9×10^6	5.7×10^5
Sodium carbonate 2%	$< 1 \times 10^4$	-

CFU; Colony Forming Units

Limit of detection = 1×10^4 CFU ml⁻¹

(-); Not possible to calculate Standard Error

Enhancement of biocontrol by *P. agglomerans* with Sodium Bicarbonate. At 20°C, all the assayed treatments (antagonist CPA-2, sodium bicarbonate solution and the combination) significantly decreased decay incidence either on fruits inoculated with *P. digitatum* or *P. italicum*, after 7 or 14 days incubation (Figure 2). After 7 days at 20°C no significant differences were found on green mold incidence on oranges treated with *P. agglomerans* and Sodium Bicarbonate separately (30% of rotted fruits) This incidence represents a decay reduction of 57%. Efficacy was significantly improved when the treatments were combined resulting in 97.6% of decay reduction (1.7% decayed fruits). Similar results were obtained after 14 days incubation. No significant differences among treatments were found for the incidence of blue mold after 7 days incubation and all treatments reduced decay by more than 57% (38.3%, 26.7% and 21.7% decay incidence for the antagonist, Sodium Bicarbonate and the combination treatments, respectively).

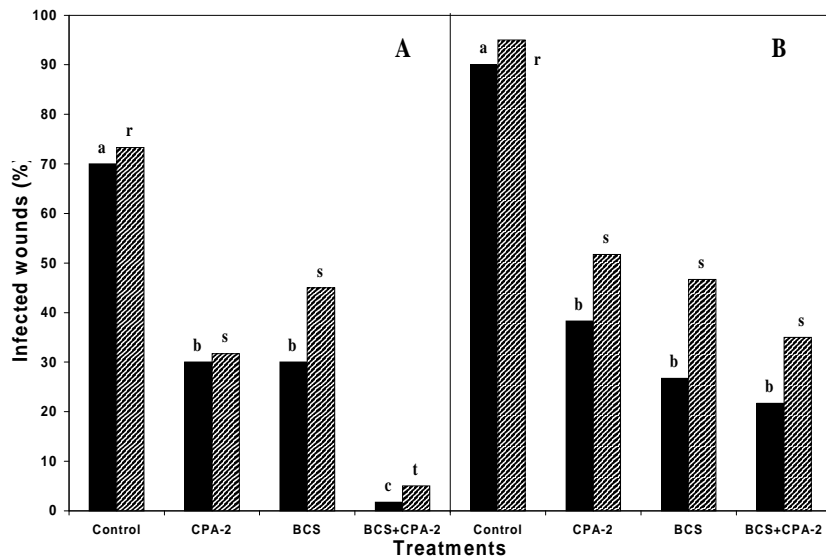


Fig. 2. Incidence of green mold (A) and blue mold (B) on wounded Valencia late oranges inoculated with 10^6 spores ml^{-1} of *P. digitatum* or *P. italicum* respectively, followed by treatment with water (control prove), *P. agglomerans* (CPA-2), sodium bicarbonate (BCS) and the combination of sodium bicarbonate and *P. agglomerans* ((BCS+CPA-2), after 7 (■) and 14 (▨) days incubation at 20°C and 90% RH. Within times of incubation, columns with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) according to the least significant difference test (LSD).

Under cold storage conditions (3°C) the incidence of *P. digitatum* was lower than that of *P. italicum*, with rot incidences of 18% and 52% after 30 and 60 days, (Figure 3). All treatments significantly inhibited *P. digitatum* decay. However, the best treatments were sodium bicarbonate alone, and in combination with the antagonist, where complete (100%) control was achieved after 30 days in cold storage. *P. agglomerans* CPA-2 did not control *P. italicum* under cold storage conditions. The best results were obtained with the combination of sodium bicarbonate and *P. agglomerans*, that controlled blue mold significantly better than each treatment alone, after 30 and 60 days at 3°C. This combined treatment showed a decay incidence of 13% after 30 days in cold storage conditions, that represents a reduction of 81% of blue mold when compared with untreated control.

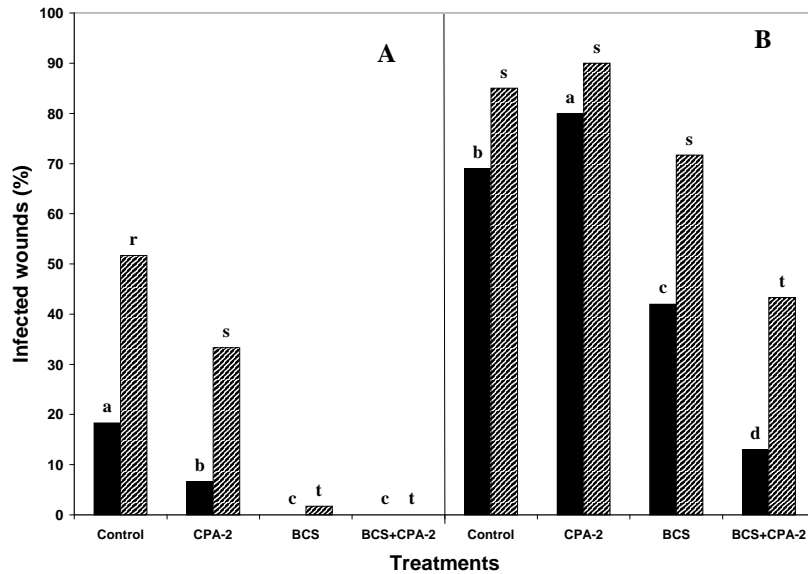


Fig. 3. Incidence of green mold (A) and blue mold (B) on wounded Valencia late oranges inoculated with 10^6 spores ml^{-1} of *P. digitatum* or *P. italicum* respectively, followed by treatment with water (control prove), *P. agglomerans* (CPA-2), sodium bicarbonate (BCS) and the combination of sodium bicarbonate and *P. agglomerans* (BCS+CPA-2), after 30 (■) and 60 (▨) days incubation at 3°C and 98% RH. Within times of incubation, columns with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) according to the least significant difference test (LSD).

Population dynamics on the orange surface. Initial populations of *P. agglomerans* CPA-2 on wounded oranges were larger than on unwounded ones in 20°C and 3°C storage conditions (Figure 4). The patterns of growth of *P. agglomerans* were similar, whether applied alone or in combination with sodium bicarbonate.

P. agglomerans populations increased approximately 18-fold on the surface of wounded oranges stored at 20°C during the first 24 hours. After this the population remained stable until the end of the assay (15 days). These results were identical for the antagonist treatment alone, or when combined with sodium bicarbonate. The pattern on unwounded fruits at 20°C was very similar, but the population levels were lower.

On wounded and unwounded fruits stored at 3°C, populations decreased approximately 4-fold during the first three days. Then, *P. agglomerans* populations strongly increased on wounded fruits and reached a maximum after 45 days of storage. In contrast, on unwounded oranges population increased slower than wounded ones after the first three days and remained stable until the end of the experiment.

Discussion

This study has demonstrated that *P. agglomerans* CPA-2 which is an effective antagonist to the major postharvest pathogens of pome fruits (Viñas et al. 1999) could also be used on oranges to control *P. digitatum* and *P. italicum*.

Efficacy trials with *P. agglomerans* CPA-2 on artificially wounded and inoculated oranges showed good biocontrol potential against both green and blue molds. The concentration of the antagonist needed to obtain satisfactory disease control (2×10^8 cfu ml⁻¹) was lower than the recommended for the commercial available product BIOSAVE, and consequently low enough to be considered viable for commercial use.

The exact mechanism by which *P. agglomerans* CPA-2 reduces decay is not clear. It has been reported that *E. herbicola*, at present classified as *P. agglomerans*, inhibits other plant pathogens by producing acid conditions (Riggle and Klos, 1972; Beer et al., 1984), preemptive colonisation (Wilson et al., 1992; Kearns and Hale, 1996), inducing plant defence (Slade and Tiffin, 1984), parasitism (Brik et al., 1998), competition by nutrients (Goodman, 1967), production of herbicolin (Ishimaru et al., 1988) or antibiotics (Vanneste et al., 1992; Kearns and Hale, 1996).

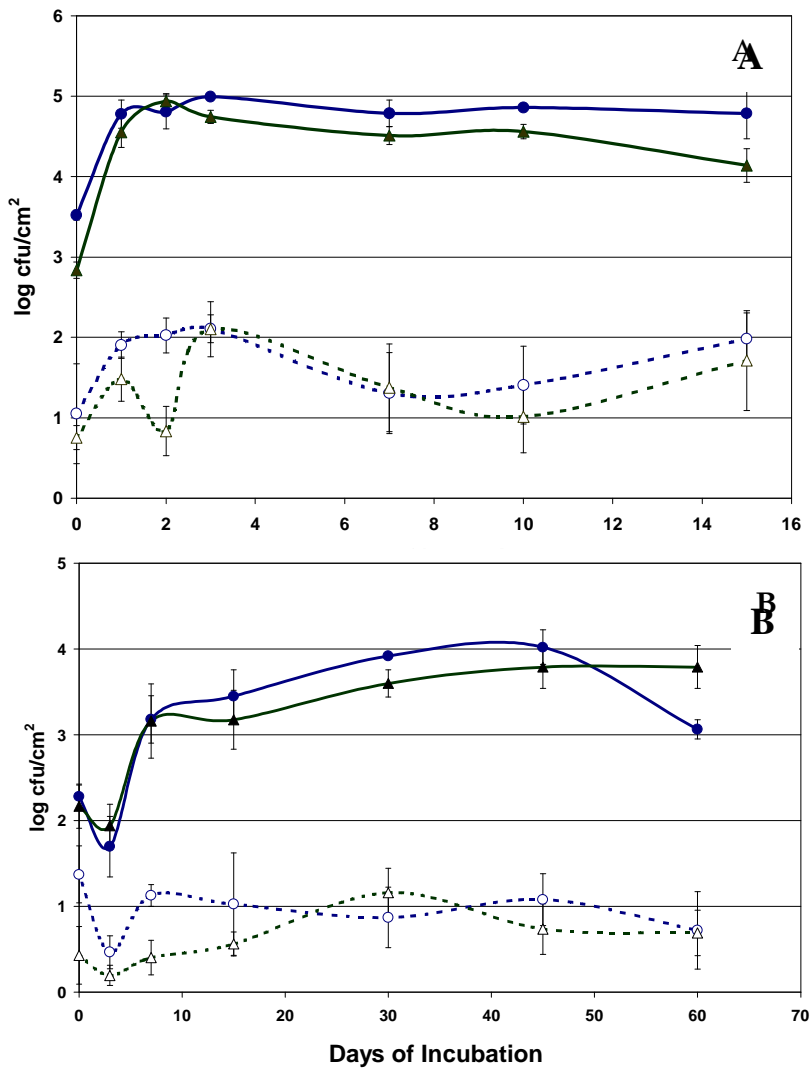


Fig. 4. Population dynamics of *P. agglomerans* CPA-2 on wounded (closed symbols) and unwounded (open symbols) oranges treated with *P. agglomerans* CPA-2 (●, ○) or the combination of sodium bicarbonate and *P. agglomerans* CPA-2 (▲, △) and incubated at 20°C and 90% RH (A) and 3°C and 98% RH (B). Points represent the means of four replications and vertical bars indicate standard errors of the means. Limit of detection: 4 CFU x cm^{-2} .

In precedent studies (C. Nunes unpubl.), we found that killed cells of *P. agglomerans* CPA-2 and its culture filtrate had no antagonistic activity against artificially inoculated pathogens. This would suggest that antibiosis is not a mechanism of biocontrol of this strain, but further research needs to be conducted to clarify this point.

Biocontrol agents are poor eradicants of pathogens on citrus and are usually incapable of controlling green mold when fruits are inoculated at least 24 h before treatment (Smilanick and Denis-Arrue, 1992). Control of green and blue molds after inoculation is important because most infections occur through wounds inflicted during or just after harvest (Powell, 1908; Green, 1932; Fawcett, 1936).

Recent work showed that sodium carbonate and sodium bicarbonate solutions, used in a correct way, are as effective as common synthetic fungicides to control green mold on lemons (Smilanick et al., 1995) and oranges (Smilanick et al., 1997; Smilanick et al., 1999). Similar effectiveness was reported against blue mold on oranges (Palou et al., 2000). However, carbonates are poor eradicants and not kill spores (Marloth, 1931). Their inhibitory action is not very persistent, and they do not provide protection of the fruit from re-infection after treatment. Biocontrol antagonists, which residues can persist for long periods, may accomplish this task (Smilanick et al., 1999). A combination between our antagonist and these mentioned carbonate treatments could be a reliable solution to control postharvest diseases on citrus.

P. agglomerans CPA-2 is totally tolerant and compatible with sodium bicarbonate solution at 2% on the contrary that with sodium carbonate solution. Differences of pH (pH 8.3 to 8.6 for sodium bicarbonate and 11.3 to 11.5 for sodium carbonate) could explain the different effect of these solutions on the antagonist. Our studies continued with this first combination and results were really promising.

Excellent control of green mold after storage at 3°C and 20°C, was obtained with the combination of treatments. Furthermore, at 20°C, the combination of antagonist with sodium bicarbonate provided significantly better green mold control than these treatments applied separately.

Blue mold incidence after long-term cold storage (3°C and 98% RH) was higher than green mold incidence. These results are in agreement with earlier studies indicating that *P. digitatum* is the most economically important postharvest disease of citrus around the world (Eckert and Brown, 1986b), however, on citrus kept in cold storage for long periods, frequently blue mold prevails because it grows better than green mold below 10°C (Whiteside et al., 1988).

P. agglomerans grew well in wounds on oranges, while it had a limited growth on the surface of the fruit. In fact, the Culturability of the biocontrol agent just after treatment is lower on unwounded fruits than on wounded ones. Bull et al. (1997) found that *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survived poorly on the surface of lemons and oranges but were able to effectively colonize wounds and significantly control green and blue molds. Similar results have been found on apples with yeasts as antagonists by Lima et al. (1998) and Usall et al. (in press). These results suggest that our antagonist grows effectively only in wound sites, which are the point of entry of both studied pathogens. This aspect may be advantageous because, once applied, the biocontrol agent could survive in the microenvironment where it is necessary to prevent disease and decrease to non-detectable or very low concentrations on fruit surface.

The antagonist grew well at 20°C and 3°C. This indicates excellent adaptation of the strain CPA-2 to cold storage temperatures, which is an important feature for postharvest biocontrol agents (Wisniewski and Wilson, 1992). The antagonist only was tolerant to sodium bicarbonate, but was not affected by salt residues inside rind wounds.

Although our experiments showed that *P. agglomerans* was effective to control blue and green mold under laboratory conditions and that its efficacy could be really improved by a combined treatment with sodium bicarbonate, full-scale commercial evaluation is needed as the next step to demonstrate the value of these treatments to the citrus industry. Strain CPA-2 of *P. agglomerans* could be used as effectively on citrus fruits as on pome fruits and the spectrum of activity may be broadened with future research.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Naresh Magan from Cranfield University for his valuable discussion and advice, and the Grup Exportador de Cítrics del Baix Ebre-Montsià (Tarragona, Catalonia, Spain) and Spanish government FEDER funds (2FD97-0492) for their financial support.

References

- Arras G and D'hallewin G (1994) *In vitro* and *in vivo* control of *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea* in citrus fruit by *Bacillus subtilis* strains. *Agriculture Mediterranean* 124: 56-61.
- Bancroft MC, Gardner PD, Eckert JW and Baritelle JL (1984) Comparison of decay control strategies in California lemon packinghouses. *Plant Disease* 68: 24-28.
- Barger WR (1928) Sodium bi-carbonate as a citrus fruit disinfectant. *California Citrograph* 13: 164-174.
- Beer S, Rundle JR and Wodzinski RS (1984) Interaction between *Erwinia amylovora* and *Erwinia herbicola* *in vitro* in immature pear fruits and in apple blossoms. *Acta Horticulturae* 151: 203-204.
- Brik H, Dyki B and Sobiczewski P (1998) Antagonistic effect of *Erwinia herbicola* on *in vitro* spore germination and germ tube elongation of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Biocontrol* 43: 97-106.
- Bull CT, Stack JP and Smilanick JL (1997) *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue molds of citrus. *Biological Control* 8: 81-88.
- Bus VG, Bongers AJ and Risse LA (1991) Occurrence of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazalil on citrus fruit from different geographic origins. *Plant Disease* 75: 1098-1100.
- Chalutz E and Wilson CL (1990) Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Disease* 74: 134-137.
- Chand-Goyal T, Eckert JW, Droby S and Atkinson K (1998) A method for studying the population dynamics of *Candida oleophila* on oranges in the grove, using a selective isolation medium and PCR technique. *Microbiological Research* 153: 265-270.
- Corral LG., Post LS, and Montville TJ 1988. Antimicrobial activity of sodium bicarbonate. *Journal of Food Science* 53: 981-982.
- De Matos AP (1983) Chemical and microbiological factors influencing the infection of lemons by *Geotrichum candidum* and *Penicillium digitatum*. PhD dissertation. University of California, Riverside, CA.
- Díaz MA and Vila R (1988) El problema de la resistencia a los fungicidas: referencia a la situación en los almacenes españoles de comercialización de cítricos. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 28: 151-158.
- Droby S, Hofstein R, Wilson CL, Wisniewski M, Fridlender B, Cohen L, Weiss B, Daus A, Timar D and Chalutz E (1993) Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agent of postharvest disease of citrus fruit. *Biological Control* 3: 47-52.
- Eckert JW (1990) Impact of fungicide resistance on citrus fruit decay control. In: *Managing resistance to agrochemicals*. (pp 286) American Chemical Society. Washington DC.
- Eckert JW and Brown GE (1986a) Evaluation of postharvest treatments for citrus fruits. In: Hickey KD (ed.) *Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens*. (pp. 92-97) American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN.
- Eckert JW, and Brown GE (1986b). Postharvest citrus diseases and their control. In: Wardowski WF; Nagy S and Grierson W (ed.). *Fresh Citrus Fruits*. Van Nostrand Reinhold Company Inc. New York, USA.(pp. 315-360).
- Eckert JW and Eaks IL (1989) Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. In: Calavan EC and Carman GE (ed.) *The citrus industry*. Vol.4 (pp. 179-269) University of California Press. Berkeley.
- Eckert JW, Sievert JR and Ratnayake M (1994) Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant Disease* 78: 971-974.
- Fawcett HS (1936) *Citrus diseases and their control*. Second Edition. McGraw Hill, New York.
- Goodman RN (1967) Protection of apple stem tissue against *Erwinia amylovora* by avirulent strains and three other bacterial species. *Phytopathology* 57: 22-24.
- Green FM (1932) The infection of oranges by *Penicillium*. *Journal of Pomology and Horticultural Sciences* 10: 184-215.
- Houck LG (1965) *Penicillium* development in lemons treated with 2,6-dichloro-4-nitroaniline. *Plant Disease Report* 49: 715-719.
- Huang Y, Deverall BJ and Morris SC (1991) Promotion of infection of orange fruit by *Penicillium digitatum* with strain of *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* 81: 615-618.

- Huang Y, Deverall BJ, Morris SC and Wild BL (1993) Biocontrol of postharvest orange diseases by a strain of *Pseudomonas cepacia* under semi-commercial conditions. *Postharvest Biology and Technology* 3: 293-304.
- Huang Y, Deverall BJ and Morris SC (1995) Postharvest control of green mould on oranges by a strain of *Pseudomonas glathei* and enhancement of its biocontrol by heat treatment. *Postharvest Biology and Technology* 5: 129-137.
- Hwang L and Klotz LJ (1938) The toxic effect of certain chemical solutions on spores of *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. *Hilgardia* 12: 1-38.
- Ishimaru CA, Klos EJ and Brubaker RR (1988) Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. *Phytopathology* 78: 746-750.
- Janisiewicz WJ and Bors B (1995) Development of microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. *Applied Environmental Microbiology* 61: 3261-3267.
- Kearns LP and Hale CN (1996) Partial characterization of an inhibitory strain of *Erwinia herbicola* with potential as biocontrol agent to *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Journal of Applied Bacteriology* 81: 369-374.
- Klotz LJ (1973) *Color Handbook of citrus diseases*. University of California, Berkeley.
- Lima G, De Curtis F, Castoria R and De Cicco V (1998) Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. *Biocontrol Science and Technology* 8: 257-267.
- Lindsay RC (1985) Food additives. In: Fennema OR (ed.) *Food Chemistry*. Marcel Decker Inc. New York, USA (632 pp.).
- Marloth RH (1931) The influence of hydrogen-ion concentration and of sodium bicarbonate and related substances on *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. *Phytopathology* 21: 169-198.
- Multon JL (1988) Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias. Editorial Acirbia. Zaragoza, Spain (680 pp.).
- Palou L, Usall J, Aguilar MJ, Pons J and Viñas I (1999) Control de la podredumbre verde de los cítricos mediante baños con agua caliente y carbonatos sódicos. *Levante Agrícola* 348: 412-421.
- Palou L, Smilanick JL, Usall J and Viñas I (2000) Control of postharvest blue mold of oranges by sodium carbonate and sodium bicarbonate. *Phytopathology* 90: S58 (abstract).
- Parbery IH, Brown VJ and Bofinger VJ (1981) Statistical methods in the analysis of phylloplane populations. In: Blakeman JP (ed.) *Microbial ecology of the phylloplane*. Academic Press Inc., London.
- Powell GH (1908) The decay of oranges while in transit from California. *Bur Plant Ind U S Dep Agric Bull* 123.
- Riggle JH and Klos EJ (1972) Relationship of *Erwinia herbicola* to *Erwinia amylovora*. *Canadian Journal of Botany* 50: 1077-1083.
- Singh V and Deverall BJ (1984) *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Transactions of British Mycological Society* 83: 487-490.
- Slade MB and Tiffin AI (1984) Biochemical and serological characterization of *Erwinia*. *Methods in Microbiology* 15: 227-293.
- Smilanick JL and Denis-Arrue R (1992) Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Disease* 76: 481-485.
- Smilanick JL, Mackey BE, Reese R, Usall J and Margosan DA (1997) Influence of concentration of soda ash, temperature, and immersion period on the control of postharvest green mold of oranges. *Plant Disease* 81: 379-382.
- Smilanick JL, Margosan DA and Henson DJ (1995) Evaluation of heated solutions of sulfur dioxide, ethanol, and hydrogen peroxide to control postharvest green mold of lemons. *Plant Disease*. 79: 742-747.
- Smilanick JL, Margosan DA., Mlikota F, Usall J and Michael IF (1999) Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Disease* 83: 139-145.
- Usall, J, Teixidó N, Torres R, Ochoa de Eribe, X and Viñas I (in press) Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*.
- Vanneste JL, Yu J and Beer SV (1992). Role of antibiotic production by *Erwinia herbicola*-eh252 in biological control of *Erwinia amylovora*. *Journal of Bacteriology* 174: 2785-2796.

- Viñas I, Usall J, Nunes C and Teixidó N (1999) Nueva cepa de la bacteria *Pantoea agglomerans* (Beijerinck, 1998) Gavini, Mergaert, Beji, Mielcareck, Izard, Kerstersy De Ley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de frutas. Solicitud P9900612. Oficina Española de Patentes y Marcas.
- Whiteside JO, Garnsey SM and Timmer LW (ed.) (1988) Compendium of citrus diseases. 2nd ed. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN.
- Wilson M, Epton H and Sigeo DC (1992). Interaction between *Erwinia herbicola* and *Erwinia amylovora* on the stigma of Hawthorn blossoms. *Phytopathology* 82: 914-918.
- Wisniewski ME and Wilson CL (1992) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *Hortscience* 27: 94-98.

Discussió General

Micoflora en camps i centrals cítriques

L'objectiu principal d'aquest treball de tesi doctoral era contribuir a fer possible la substitució dels fungicides sintètics emprats per al control de les malalties de postcollita dels fruits cítrics per mètodes de control menys perillosos per a la salut humana i més respectuosos amb el medi ambient. Per assolir aquest objectiu feia falta conèixer prèviament quines són les malalties de major impacte econòmic i calia caracteritzar els aspectes epidemiològics que determinen la seva incidència. A nivell global, el macroclima és el factor bàsic que influeix en aquests aspectes, essent a les zones amb estius molt plujosos on es presenta una major incidència de malalties de postcollita. Així mateix, les malalties predominants no són les mateixes en les zones més humides que en les més seques (Eckert i Eaks, 1989). No obstant això, a nivell local, l'espectre de malalties importants i el nivell de pèrdues que poden ocasionar venen determinats en darrera instància per les condicions climatològiques específiques de cada zona productora concreta i per altres condicionants locals que, com les característiques de les plantacions, el maneig dels fruits o les característiques de la tecnologia de postcollita, influeixen en la qualitat final dels fruits (Arpaia, 1994). Així doncs, la recerca va endegar-se amb la caracterització de les poblacions fúngiques presents als camps i a les centrals de la zona cítrica de Tarragona, on la mandarina clementina, i concretament la varietat "Clemenules", és el conreu cítric de major importància econòmica.

Per a l'estudi de camps es van mostrejar durant dues campanyes consecutives la flora fúngica de l'ambient i de la superfície dels fruits en camps comercials de mandariner "Clemenules" representatius de tota la zona productora. Van diferenciar-se tres zones, Benifallet, Amposta i Alcanar (de nord a sud), i cada campanya van realitzar-se dues determinacions a cada camp, la primera de setembre a desembre i la segona de gener a març. També va mostrejar-se un camp de producció biològica. Pel que fa a les centrals, va mostrejar-se durant dues campanyes consecutives la micoflora de l'ambient i de la superfície d'equips, instal·lacions i infraestructures en vuit magatzems distribuïts per tota la zona. Cada campanya van dur-se a terme tres mostres durant el període de processament de les clementines. Addicionalment, va estudiar-se la presència en cinc centrals de la zona de soques de *Penicillium* spp. resistents als fungicides tiabendazol i imazalil. Per aquest estudi van mostrejar-se l'ambient i les superfícies amb plaques amb medi PDA al qual s'havia afegit la dosi de resistència del fungicida corresponent.

L'estudi de camps va posar de manifest una forta dependència entre la població fúngica total i les condicions microclimatològiques. D'una banda, la població fúngica total, tant l'ambiental com l'epífita dels fruits, va presentar una gran variabilitat en funció de la campanya, l'època de mostreig i el camp, però, d'altra banda, el nombre total de colònies fúngiques comptabilitzat en cada mostreig de cada camp va correlacionar-se positiva i fortament amb els valors de temperatura, precipitació i humitat relativa mitjos que s'havien donat localment en l'època d'aquell mostreig (valors obtinguts, en cada cas, de l'observatori meteorològic més proper al camp considerat). L'anàlisi de les interaccions significatives entre els factors campanya, mostreig i camp va indicar que, només amb l'excepció de la primera campanya a la zona d'Alcanar, la micoflora epífita total va disminuir significativament en el segon mostreig respecte al primer en tots els camps les dues campanyes. El mateix va observar-se la primera campanya respecte a la micoflora ambiental total. El nombre mig de colònies fúngiques per placa aïllades el primer i segon mostres de la superfície dels fruits va ser de 157 i 99 respectivament. Aquesta diferència encara va ser més gran en el cas de la micoflora ambiental: 90 i 16 ufc/placa el primer i segon mostres respectivament. No obstant, l'anàlisi no va indicar l'existència de condicions que predisposessin de manera especial alguna de les tres zones considerades a presentar nivells de població fúngica més alts que les altres. Les diferències entre camps van resultar significatives, però sempre van variar en funció de la campanya i el mostreig. Els nivells de micoflora ambiental, però no els de micoflora epífita, van resultar superiors al camp de producció biològica que als camps comercials.

L'evolució de les condicions meteorològiques al llarg del període de recol·lecció va influir no només en la quantitat sinó també en la composició de la flora fúngica. Tot i que amb independència de la campanya, el mostreig i el camp, el gènere *Cladosporium* va ser l'aïllat més freqüentment tant a l'ambient com a la superfície dels fruits, la seva freqüència, positiva i fortament correlacionada amb la micoflora total ($r > 0,9$), va disminuir en el segon mostreig respecte al primer: la seva freqüència relativa va passar del 90 al 80% en el cas de la micoflora epífita de les mandarines i del 72 al 33% en el cas de la micoflora ambiental. No obstant, malgrat la seva gran abundància i que l'espècie *Cladosporium herbarum* és l'agent

causal de la podridura verd-grisosa dels fruits cítrics, aquesta és una malaltia de molt poca incidència (Tuset, 1987) i *Cladosporium* no és un gènere patògen dels cítrics econòmicament important. Altres treballs també assenyalen a *Cladosporium* com un dels gèneres més freqüents en magatzems de cítrics (Díaz i Vila, 1987, 1988) o en camps de fruita dolça (Usall i Viñas, 1989; Teixidó *et al.*, 1999).

Entre els patògens de postcollita amb importància econòmica que van aïllar-se als camps destaquen *Penicillium* i *Rhizopus*. Altres gèneres aïllats foren *Alternaria*, *Fusarium*, *Epicoccum* o *Humicola*. *Rhizopus* no va trobar-se a l'ambient, però sí de forma generalitzada a la superfície dels fruits. La seva freqüència, no molt elevada, va augmentar en el segon mostreig del 2,0 al 4,7% de plaques amb presència i va ser significativament més alta en fruits de la part baixa dels arbres que de la part alta. Amb l'excepció de *Mucor*, que també va aïllar-se més freqüentment en fruits de la part baixa dels arbres que de la part alta, la freqüència de la resta de gèneres aïllats no va variar significativament entre altures i cares de l'arbre. Contràriament a la de *Cladosporium* i similarment a la de la resta de gèneres fúngics aïllats, la freqüència del gènere *Penicillium* va ser a tots els camps comparativament més alta quan el període de recollecció de "Clemenules" ja estava avançat (freqüències relatives mitges de 25,9 i 8,4% a l'ambient i a la superfície dels fruits respectivament) que a principis de campanya (0,6 i 1,2% respectivament). Les poblacions de *Penicillium*, tant a l'ambient com a la superfície dels fruits, van correlacionar-se negativament amb la temperatura. La presència al camp de patògens de postcollita com *P. digitatum* i *P. italicum* contrasta amb el que s'ha observat en altres casos importants com per exemple el de *P. expansum*, causant de la podridura blava de la fruita dolça, el qual pràcticament no es troba al camp durant el període previ a la recollecció i infecta els fruits només a les centrals (Usall i Viñas, 1989). En el cas de *P. digitatum* alguns autors han constatat que pot causar podridura al camp mateix (Roth, 1967).

A les centrals, la flora fúngica també va variar en funció de la campanya, el mostreig i la central, donant idea, d'una banda, de la influència que sobre la micoflora present a les centrals van tenir les condicions meteorològiques i les poblacions fúngiques de camp, i, d'una altra, de la influència del disseny dels magatzems i dels diferents sistemes de processament dels fruits. Malgrat l'heterogeneïtat, l'elevat nombre de centrals i cambres frigorífiques mostrejades durant l'estudi va permetre treure conclusions estadístiques relatives al conjunt de la zona productora. A l'igual que als camps, *Cladosporium* va ésser, tant a l'ambient com a les superfícies d'equips, instal·lacions i infraestructures, el gènere fúngic més freqüent a l'inici del període d'activitat a les centrals (freqüència relativa mitja del 50-60% en el primer mostreig), però la seva freqüència va anar disminuint al llarg de la campanya. En el segon mostreig, *Penicillium* va esdevenir el gènere més freqüent a l'ambient de totes les zones de les centrals (mitja del 51% de les colònies aïllades), i en el tercer mostreig va ser el gènere més freqüent tant a l'ambient (mitja del 65% de les colònies aïllades) com a les superfícies de les centrals (mitja del 48%). Aquesta acumulació d'espores de *Penicillium* van ser especialment important a les superfícies de les línies de confecció i a l'ambient i a les superfícies de les cambres frigorífiques. Així doncs, i tenint en compte la manca de patogenicitat del gènere *Cladosporium*, es pot concloure que, entre les possibles malalties de postcollita, les que presenten una major incidència potencial i, en conseqüència, poden causar les pèrdues econòmiques més importants al sector cítricol de l'àrea de Tarragona són les podridures verda i blava, causades respectivament per *P. digitatum* i *P. italicum*. D'altra banda va resultar important, per la seva perillositat quan la fruita no es conserva en fred, la presència generalitzada de *Rhizopus*, especialment a l'ambient de les zones de recepció i confecció de la fruita (16-17% de plaques amb presència) i a les superfícies dels envasos i de les línies de confecció (35-55% de plaques amb presència). En general, la població de *Rhizopus* a les superfícies va mantenir-se més o menys constant al llarg de la campanya de processament de les mandarines.

La distribució dels principals gèneres fúngics aïllats i la seva evolució quantitativa va resultar similar a l'observada per Díaz i Vila (1987, 1988) en cambres frigorífiques i de desverdiment de centrals cítriques valencianes. Els resultats suggereixen que l'origen de la contaminació fúngica de les centrals, i particularment la de *P. digitatum* i *P. italicum*, es troba, en les nostres condicions, majoritàriament a la fruita procedent del camp. Els elevats nivells de micoflora en general i de *Penicillium* en particular que van trobar-se als magatzems i l'increment d'aquests nivells que va detectar-se a la majoria de zones a mesura que avançava la campanya, van constituir un clar indicador de què, en general, les tasques de neteja i desinfecció portades a terme a les centrals eren insuficients i/o inadequades. També va constatar-se la manca d'una separació efectiva entre zones "brutes", o zones de rebuda i tractament de la fruita arribada del camp, i zones "netes", o zones de tractament i emmagatzematge de la fruita ja confeccionada. Per exemple, en el tercer mostreig, la freqüència absoluta de *Penicillium* a l'ambient de les zones de recepció, confecció i cambres frigorífiques va ser de 23, 14 i 23 ufc/placa respectivament.

L'estudi de la presència i quantificació de soques de *Penicillium* spp. resistents va indicar que el 33% de les soques del gènere *Penicillium* aïllades de l'ambient de les cinc centrals mostrejades eren resistents al fungicida tiabendazol i el 5% a l'imazalil; de les aïllades de les superfícies van resultar resistents el 35 i el 20% respectivament. Mentre que la quantitat d'espores resistents de *Penicillium* spp. present a l'ambient no va ser significativament diferent entre zones de la central, a les parets de les cambres frigorífiques se'n van localitzar menys que a la resta de superfícies. Van trobar-se soques tant de *P. digitatum* com de *P. italicum* resistents a ambdós fungicides, però la seva freqüència va ser baixa en comparació amb la d'altres espècies de *Penicillium* resistents. No obstant, aquesta freqüència podria fàcilment incrementar-se els pròxims anys ja que, degut a la manca d'alternatives contrastades, no es preveu una disminució de la pressió de selecció que suposa la utilització comercial continuada d'aquestes matèries actives. Diversos treballs, majoritàriament realitzats a Califòrnia, han posat de manifest l'extraordinària importància econòmica de l'establiment de programes destinats a combatre la proliferació de soques resistents de *Penicillium* spp. a les centrals cítriques (Bancroft *et al.*, 1984; Gardner *et al.*, 1986). En aquest contexte, encara cobra més importància el desenvolupament de sistemes alternatius per al control de les podridures verda i blava.

Control de les podridures verda i blava amb aigua calenta i carbonats

Un cop establerta la preponderància de les poblacions de *P. digitatum* i *P. italicum* entre la micoflora patogènica present als camps i a les centrals de la zona, i confirmada l'existència a les centrals de soques d'aquestes espècies resistents als fungicides imazalil i tiabendazol, el treball de tesi va enfocar-se cap a la recerca de sistemes alternatius per al control de les podridures verda i blava. A més a més, aquestes podridures són les principals malalties causants de pèrdues econòmiques en postcollita de cítrics a tota l'àrea mediterrània (Pratella *et al.*, 1969; Gutter, 1977; Tuset, 1987).

Entre els possibles sistemes alternatius físics i químics, va posar-se especial èmfasi en l'estudi de l'aigua calenta, de les solucions de carbonat i bicarbonat sòdic i de la integració dels dos tipus de mètodes per tractar-se de tractaments de tecnologia simple, de fàcil disponibilitat i de baix cost. De fet, la utilització dels carbonats havia estat general a Califòrnia des dels anys 30 fins que van ésser desplaçats pels fungicides sintètics (Eckert i Eaks, 1989). No era d'estranyar, doncs, que en els darrers anys, davant la necessitat d'implementar nous sistemes de control, fos d'interès revisar el paper d'aquests tractaments com a sistemes alternatius i aprofundir en el seu estudi. Aquestes investigacions van ésser endegades recentment pel Dr. Smilanick i el seu grup a Califòrnia, amb la determinació de l'efectivitat d'immersions de curta durada en solucions de carbonat sòdic i bicarbonat sòdic per al control de la podridura verda en llimones i taronges (Smilanick *et al.*, 1995, 1997a, 1999). En el present treball es va seguir aquesta línia de recerca avaluant l'impacte dels tractaments contra la podridura blava en taronges i mandarines clementines. A més, per primera vegada van estudiar-se els efectes combinats d'aquests tractaments i la conservació frigorífica prolongada en el control de les podridures verda i blava en taronges i clementines. Algunes de les experiències van realitzar-se en col.laboració amb el Dr. Smilanick a les instal.lacions de l'Horticultural Crops Research Laboratory (ARS-USDA) de Fresno (Califòrnia).

Banyos de 150 s en aigua calenta van resultar efectius per al control de la podridura blava a temperatures massa properes a les que resulten fitotòxiques per excés de calor (50-55°C). Banyos de 150 s a 50°C no van controlar satisfactòriament ni la podridura verda ni la podridura blava en mandarines clementines. Aquests resultats, similars als obtinguts per altres investigadors (Smoot i Melvin, 1963; Barkai-Golan i Apelbaum, 1991; Tuset *et al.*, 1996; Smilanick *et al.*, 1997a), i altres aspectes com la poca persistència, impideixen que, tot i els seus clars avantatges, els tractaments amb aigua calenta puguin implementar-se exitosament a nivell comercial.

Banyos de 150 s en solucions al 2 o 3% de carbonat o bicarbonat sòdic a temperatura ambient van controlar satisfactòriament la podridura blava en taronges. La capacitat de control d'aquests tractaments, amb una reducció de la incidència de la malaltia respecte als controls sempre superior al 60%, va ser similar a la que van mostrar contra la podridura verda en anteriors treballs (Smilanick *et al.*, 1995, 1997a, 1999). L'escalfament de les solucions de carbonat sòdic a temperatures moderades (45°C) va incrementar la seva efectivitat fins a superar el 90% de reducció de la malaltia, observant-se un sinergisme entre els efectes del control físic (calor) i del control químic (carbonat sòdic). Aquest sinergisme, observat també a l'escalfar solucions de fungicides sintètics (Barkai-Golan i Apelbaum, 1991; Schirra i Mulas, 1995; Smilanick *et al.*, 1997b), possibilita el control a temperatures més baixes que les necessàries per controlar amb aigua calenta sola, la qual cosa és important per minimitzar els riscos de danys a la pell deguts a un

excés de calor. L'efectivitat de les solucions de bicarbonat sòdic a temperatura ambient i de les solucions de carbonat sòdic escalfades a 45°C va resultar, a l'igual que en el cas de l'aigua calenta, inferior en mandarines clementines que en taronges (el percentatge de reducció respecte als controls va ser entre un 10 i un 20% inferior). Els tractaments amb aigua calenta i carbonats sòdics també van controlar de forma efectiva la podridura verda en taronges i mandarines clementines conservades a 3°C durant 2 mesos. L'efectivitat va ser molt elevada durant els primers 21 dies d'emmagatzemament en fred, però a partir d'aquí va anar declinant. En aquests assajos, el control de la podridura blava no va resultar tant efectiu, presumiblement perquè *P. italicum* està millor adaptat que *P. digitatum* al creixement a temperatures baixes (Whiteside *et al.*, 1993). En taronges, al cap de 60 dies de conservació frigorífica i quan la incidència als controls era del 100%, mentre que la incidència de la podridura verda en fruits tractats amb aigua calenta a 45°C, carbonat sòdic a 45°C i bicarbonat sòdic a 20°C era del 60, 22 i 32% respectivament, la de la podridura blava era del 76, 56 i 38% respectivament.

En el conjunt de les experiències va constatar-se que l'acció antifúngica dels tractaments amb aigua calenta, carbonat sòdic i bicarbonat sòdic no era fungicida sinó fungistàtica i no molt persistent. Això va quedar evidenciat pel fet que la incidència de les malalties va augmentar quan el període d'incubació a 20°C de la fruita tractada es va allargar de 7 a 14 dies o, com s'ha indicat, a mesura que transcorria el període de conservació frigorífica. A més, espores de *P. italicum* recuperades del punt d'inoculació de fruits tractats, justament després dels tractaments o bé al cap de 7 dies d'incubació a 20°C, van sembrar-se en plaques Petri amb medi PDA i van desenvolupar colònies. Altres investigacions també il·lustren aquest punt: els banys de curta durada en aigua calenta (Dettori *et al.*, 1996) o en carbonats (Hwang i Klotz, 1938) no van matar les espores de *P. digitatum* que s'hi van exposar directament.

Els assajos amb carbonats contra *P. italicum* van posar de manifest que l'efectivitat dels tractaments depenia de factors tecnològics que, com la concentració de les sals, la temperatura de les solucions o el temps d'immersió, determinen la major o menor presència de residus dels productes sobre els fruits. El mode d'acció és complex i diferent *in vitro* i *in vivo*; hi juguen un paper la toxicitat de les espècies iòniques implicades, el pH de les solucions i sobretot les interaccions amb olis essencials i/o constituents de l'albedo que es produeixen als punts d'infecció i que fan variar la toxicitat inicial de les sals. Estudis anteriors indicaven que el pH per ell mateix no podia ser responsable de l'activitat tòxica (Hwang i Klotz, 1938; Homma *et al.*, 1981) i que l'espècie catiònica implicada jugava un paper important en la major o menor capacitat de control. Es va treballar amb sals sòdiques perquè ja s'havia demostrat que en assajos *in vivo* contra les podridures dels cítrics causades per *Penicillium*, les sals sòdiques són més efectives que les sals potàssiques o amòniques (Marloth, 1931; Smilanick *et al.*, 1999). No obstant, això no és així en el cas d'altres patògens vegetals o altres sistemes hoste-patogen. Per exemple, el bicarbonat amònic va resultar més tòxic *in vitro* contra *B. cinerea* que els bicarbonats sòdic i potàssic (Palmer *et al.*, 1997) i el bicarbonat potàssic va controlar millor les podridures grisa i negra dels pebrots que els bicarbonats sòdic i amònic (Fallik *et al.*, 1997). Per un altre costat, altres treballs atribueixen l'acció inhibidora principal de les solucions de carbonats a l'espècie aniònica. Marloth (1931) indica que l'ió bicarbonat podria interferir amb enzims extracel·lulars necessaris per a l'expansió de la membrana i de la paret cel·lular. Corral *et al.* (1988) també assenyalen a l'ió bicarbonat com a responsable de la inhibició *in vitro* de diversos microorganismes; indiquen que podria alterar la permeabilitat de la membrana cel·lular i/o desacoplar la fosforilació oxidativa. Altres mecanismes d'acció que s'han proposat a l'estudiar l'efecte dels carbonats contra distints patògens vegetals són canvis de potencial osmòtic i reducció de la turgència cel·lular que comportarien l'enfonsament de les hifes i l'encongiment de les espores (Ziv i Zitter, 1992; Fallik *et al.*, 1997), alliberament de diòxid de carboni, el qual directament pot exercir una acció inhibidora del creixement microbià (Daniels *et al.*, 1985), o canvis en el pH intracel·lular (DePasquale i Montville, 1990). La calor, per la seva banda, podria induir en fruits tractats la producció de substàncies conferidores de resistència al desenvolupament de les malalties, com polímers amb estructura similar a la lignina, fitoalexines com l'escoparona o l'escopoletina, o proteïnes com la quitinasa o la β -1,3 glucanasa (Schirra *et al.*, 2000; Ferguson *et al.*, 2000).

La resposta diferent de cada tipus de fruit cítric a les complexes interaccions que es produeixen en el punt d'infecció degudes a la presència del patogen i a l'acció del calor i dels carbonats podria explicar per què l'efectivitat dels tractaments va resultar inferior en mandarines clementines que en taronges o llimones. Un aspecte que de ben segur condiciona aquesta resposta és la susceptibilitat del fruit a la infecció i aquesta no només depèn de l'espècie de fruit cítric sinó també del cultivar (Eckert i Brown, 1986). Aparentment, la constitució de les mandarines "Clemenules" o característiques morfològiques, bioquímiques o fisiològiques diferencials de la seva pell (es tracta d'un fruit molt fràgil, amb la pell tova i

sovint bufada) podrien ser motiu d'una major susceptibilitat dels fruits d'aquest cultivar a les podridures causades per *Penicillium*. D'altra banda, en diverses experiències realitzades tant amb aigua calenta com amb carbonats va observar-se que, dintre de la mateixa espècie i cultivar, l'efectivitat dels tractaments també depenia directament de la susceptibilitat a la infecció de cada partida de fruits. En general, quan aquesta era més gran (indicat per una proporció més alta de fruits podrits als controls), l'efectivitat dels tractaments era més baixa. Això podria relacionar-se amb la condició fisiològica dels fruits, la qual influencia clarament la susceptibilitat. En aquest sentit, Schirra *et al.*, (1998) van demostrar que, en taronges, l'efecte dels tractaments amb aigua calenta sobre les malalties de postcollita, els danys per fred i les fitotoxicitats per excés de calor, variava significativament amb la data de collita.

Solucions a temperatura ambient de carbonat i de bicarbonat sòdic d'igual concentració van presentar una efectivitat similar, tant en taronges com en mandamines. No obstant, a diferència del que succeeix amb les solucions de carbonat, amb les solucions de bicarbonat no es pot aprofitar el sinergisme amb la calor perquè, en una hipotètica aplicació comercial, l'escalfament dels tancs que contenen la solució provocaria un increment bruscat de l'alliberament a l'atmosfera de diòxid de carboni, amb la conseqüent evolució de l'anió bicarbonat cap a àcid carbònic i l'increment del pH de la solució. La disminució de la concentració d'ió bicarbonat comportaria la pèrdua d'efectivitat de la solució, la qual s'hauria de renovar massa sovint. Malgrat això, els tractaments amb bicarbonat presenten altres avantatges respecte als tractaments amb carbonat. D'una banda, les solucions de bicarbonat contenen menys sodi, aspecte important des del punt de vista del tractament de residus i, d'altra banda, degut al seu pH inferior, les solucions de bicarbonat poden higienitzar-se mitjançant l'addició d'hipoclorit sòdic (Smilanick *et al.*, 1999). Un altre aspecte tecnològic important fa referència a què la fruita tractada amb carbonats o altres sals requereix un esbandit superficial amb aigua corrent per evitar taques i dessecacions de la pell, així com deposicions dels productes sobre els raspalls i corretjes de les línies de confecció. Els nostres resultats van indicar que quan aquest esbandit es realitza amb aigua a baixa pressió no influeix negativament sobre la capacitat de control. Una dificultat afegida a la possible implementació comercial dels tractaments amb carbonats és que a les nostres centrals els tractaments fungicides es realitzen amb dréixer o amb dutxa a la línia de confecció i, en general, no es disposa dels tancs adequats per a l'aplicació per immersió.

Tot i la bona capacitat de l'aigua calenta i del carbonat i bicarbonat sòdics per controlar infeccions incipients de *Penicillium*, va constatar-se que degut a la seva manca de persistència i d'activitat antiesporulant, aquests tractaments no podien igualar els nivells de protecció proporcionats pels fungicides de síntesi. Per intentar assolir aquests nivells caldria la integració d'aquests tractaments amb altres sistemes físics, químics i biològics complementaris de la seva acció. L'avaluació d'aquestes combinacions es presenta com un camp de recerca força interessant per a futures investigacions. A la part final d'aquest treball de tesi es va considerar la combinació de banys de curta durada en solucions de carbonats sòdics amb l'aplicació posterior d'agents de control biològic. Presumiblement, la llarga persistència que pot proporcionar el control biològic mitjançant microorganismes antagònics podria complementar satisfactòriament l'acció dels carbonats.

Control de les podridures verda i blava amb altres substàncies de baixa toxicitat

Paral·lelament a l'estudi amb els carbonats sòdics, es va intentar identificar altres additius alimentaris o substàncies de baixa toxicitat efectives en el control de les podridures verda i blava. Van assajar-se en proves d'efectivitat *in vivo* sencilles i ràpides distintes concentracions d'unes quaranta substàncies de famílies químiques molt diverses, majoritàriament sals sòdiques, potàssiques, càlciques i amòniques d'àcids inorgànics (clorurs, fosfats, molibdat, etc.) i orgànics (formats, acetats, propionats, sorbats, benzoats, citrats, lactats, tartrats, ascorbats, etc.). Les proves van realitzar-se *in vivo* (amb taronges) perquè s'ha demostrat que la toxicitat *in vitro* dels productes antifúngics pot variar substancialment quan són assajats sobre fruita inoculada artificialment (Hwang i Klotz, 1938; Wisniewski *et al.*, 1998; Smilanick *et al.*, 1999). A partir d'una solució mare esterilitzada per filtració, es preparaven solucions estèrils de cada substància a les concentracions que es volien assajar. A continuació s'aplicaven 50 µl de la solució a la mateixa incisió de la pell de les taronges en la que prèviament s'havia inoculat el patogen.

Van seleccionar-se aquelles substàncies i concentracions capaces de reduir la incidència de les malalties en un 50% o més respecte als controls. Aquestes van ser les següents: lactat càlcic, lactat sòdic, propionat sòdic, acetat sòdic, acetat potàssic, benzoat sòdic, benzoat potàssic, sorbat potàssic, molibdat sòdic i molibdat amònic. Amb aquestes substàncies van realitzar-se assajos a petita escala (s'utilitzaren de

40 a 125 fruits per tractament) que van consistir en banyar en solucions calentes durant un període curt de temps (120 o 150 s) fruita prèviament inoculada amb *P. digitatum* o *P. italicum*. Les solucions van escalfar-se a temperatures no fitotòxiques (40-53°C) per tal d'aprofitar el sinergisme amb el calor demostrat en els assajos amb carbonats i també posat de manifest per altres autors (Barkai-Golan i Apelbaum, 1991; Schirra i Mulas, 1995).

En aquests assajos, el sorbat potàssic, el benzoat sòdic i els molibdatos amònic i sòdic van ser els compostos d'efectivitat més elevada. Banys de 120 s en solucions 0,2 M de sorbat potàssic o benzoat sòdic a pH natural van reduir en més del 75% la incidència de la podridura verda en taronges i llimones. Barrejes d'aquestes sals entre elles o amb altres sals orgàniques no van millorar significativament l'efectivitat, la qual va resultar més alta en llimones que en taronges. La capacitat de control del sorbat potàssic ja havia estat observada per altres investigadors (Smoot i McCornack, 1978; Hall, 1988), així com la major efectivitat de les solucions calentes en comparació amb les solucions a temperatura ambient (Kitagawa i Kawada, 1984; Wild, 1987). Hall (1988) va trobar que l'efectivitat del benzoat sòdic en el control de la podridura verda era similar a la del sorbat potàssic. A part de la temperatura i la concentració, el pH també influeix sobre l'efectivitat de les solucions de sals orgàniques, ja que la seva activitat antimicrobiana és deguda primàriament a la forma no dissociada de l'àcid (Davidson, 1997). Trobant-se el pH natural de les solucions de sorbat potàssic i benzoat sòdic al voltant de 7,5 o 8, podria ser que un cop dintre de les microferides de la pell, on s'inicien les infeccions de *Penicillium*, la seva activitat inhibidora es veïa afavorida pel pH més baix de l'albedo del fruit (al voltant de 5 o 5,5 en el cas de taronges i llimones).

Les solucions calentes de molibdat amònic i de molibdat sòdic van resultar efectives en taronges contra les podridures verda i blava a concentracions molt baixes (1,0 i 24,2 mM, respectivament); concentracions superiors podien resultar fitotòxiques i tacar la pell dels fruits. En aquests assajos, la temperatura de les solucions va influir més sobre la capacitat de control que la concentració de les sals. A 48°C va observar-se un sinergisme entre els efectes de la temperatura i la concentració, però a 53°C les solucions de molibdat, tant sòdic com amònic, no van millorar significativament el control de les malalties respecte a l'aigua calenta sola. Ambdós molibdatos poden utilitzar-se com a adobs, tant d'aplicació al sòl com foliar. En el cas del molibdat amònic, a diferència del molibdat sòdic, alguns treballs ja havien indicat que presentava certa activitat antifúngica contra patògens vegetals (Singh i Khanna, 1969). En les nostres experiències, l'avantatge del molibdat amònic respecte al molibdat sòdic va ser que va resultar efectiu a concentracions considerablement més baixes. Altres investigacions en el nostre laboratori (Nunes *et al.*, 2001a) van demostrar que el molibdat amònic controla satisfactòriament les podridures causades per *P. expansum*, *B. cinerea* i *R. stolonifer* en pomes, probablement a l'interferir en el procés metabòlic de fosforilació/desfosforilació. D'altra banda, el molibdat amònic usat com a tractament complementari va millorar l'efectivitat de l'antagonista *Candida sake* CPA-1 en el biocontrol d'aquestes malalties de la fruita dolça (Nunes *et al.*, 2001b).

Malgrat la bona efectivitat dels tractaments amb sorbat potàssic, benzoat sòdic, molibdat amònic i molibdat sòdic, va comprovar-se que, a l'igual que els banys amb carbonats, no es tractava de tractaments fungicides, sinó fungistàtics i no massa persistents. En tots els casos, la incidència de les malalties en fruits tractats va ser més alta quan va avaluar-se al cap de 14 dies d'incubació a 20°C que quan va avaluar-se al cap de 7 dies. Així doncs, per aprofitar el potencial d'aquestes substàncies com a possibles components d'un programa de control de malalties lliure de fungicides sintètics, caldria continuar aquesta línia de recerca investigant la compatibilitat d'aquests tractaments amb altres mètodes que, com per exemple el control biològic, poguessin complementar la seva acció.

Efecte de la conservació frigorífica en atmosferes ozonitzades sobre el desenvolupament de les podridures verda i blava

Aquestes experiències van realitzar-se a l'UC Kearney Agricultural Center de Parlier (Califòrnia) i a les instal·lacions d'una central cítrica comercial de Fresno (Califòrnia). Els objectius principals eren avaluar l'efecte d'una exposició continuada o intermitent a concentracions de 0,3 o 1,0 ppm (v/v) d'ozó gasós sobre el desenvolupament de *P. digitatum* i *P. italicum* en fruits cítrics inoculats artificialment i conservats en fred durant 1 o 2 mesos. El nivell de 0,3 ppm correspon a la concentració màxima, establerta per l'administració dels EUA, a la qual un individu pot estar exposat al gas durant 15 min sense patir irritacions ni altres efectes nocius. Un nivell d'1,0 ppm podria resultar adequat per al tractament de fruits en contenidors d'exportació, els quals romanen tancats tot el temps que dura l'enviament al país de

destinació. La idea d'una exposició intermitent en cicles nit-dia va ser proposada per Shimizu *et al.* (1982) amb la intenció de minimitzar l'exposició al gas d'operaris i treballadors.

L'exposició continuada de taronges "Valencia Late" inoculades amb 1×10^6 espores ml^{-1} de *P. digitatum* o *P. italicum* a 0,3 ppm d'ozó durant 1 mes de conservació frigorífica a 5°C no va reduir la incidència final de les podridures verda i blava respecte a l'observada en fruits control emmagatzemats a la mateixa temperatura en una cambra sense ozó. No obstant, va retardar el desenvolupament de les malalties al voltant d'una setmana i va reduir el diàmetre de les lesions aproximadament en un 30%. A més, va inhibir el creixement aeri normal del miceli i l' esporulació dels patògens sense produir danys visibles a la pell dels fruits. Transcorreguts 28 dies d'emmagatzemament a 3°C, les taronges tractades amb ozó presentaven masses de miceli blanquinós sense conidis, distribuïdes irregularment per l'àrea de la lesió. Resultats similars van obtenir-se en experiències realitzades en una central comercial amb llimones. Llimones "Eureka" inoculades amb *P. italicum* i conservades durant 2 mesos a 4,5°C sota un cicle d'aplicació de 0,3 ppm d'ozó durant 12 h a la nit i no aplicació durant el dia, van desenvolupar la podridura però el patogen va créixer més lentament i la seva taxa d' esporulació es va veure significativament reduïda. El mateix va constatar-se amb taronges i llimones inoculades amb *P. digitatum* o *P. italicum* i exposades de forma contínua a 1,0 ppm d'ozó durant una conservació frigorífica de 15 dies a 10°C en un contenidor d'exportació.

És important destacar que el control de l' esporulació va ser conseqüència dels efectes combinats de l'ozó i de les baixes temperatures de conservació, ja que quan mostres de fruita inoculada es van emmagatzemar sota 0,3 ppm d'ozó a 20°C, van observar-se tant el creixement miceliar aeri com l' esporulació. A més a més, l'efecte va ser transitori i produït pel contacte directe amb el gas, com va demostrar el fet que el patogen va esporular normalment en fruita que va retirar-se de la cambra ozonitzada i va incubar-se 2 dies a 20°C. Harding (1968) també va observar un bon control de l' esporulació de *Penicillium* en fruits exposats continuament a 1 ppm d'ozó gasós durant 15 dies. Els resultats obtinguts coincideixen amb les observacions de Klotz (1936) i Hopkins i Loucks (1949) pel que fa a la incapacitat de l'ozó de controlar infeccions establertes en ferides superficials de la pell dels fruits cítrics. Igualment, altres investigadors han comprovat aquesta incapacitat treballant amb altres patògens de ferida i altres fruits com pomes, préssecs o raïm (Schomer i McColloch, 1948; Spalding, 1966, 1968). Per tant, els tractaments amb ozó no poden considerar-se en cap cas possibles substituïts dels tractaments amb fungicides sintètics que s'utilitzen avui dia a les centrals cítriques. Aparentment, les estructures fúngiques situades a l'interior de microferides de la pell romanen protegides de l'acció oxidant de l'ozó degut a l'escassa capacitat de penetració del gas, a la disminució de la seva concentració provocada per la seva reacció amb el teixit vegetal o amb substàncies químiques extracel·lulars, o a la presència al teixit del fruit de substàncies antioxidants. Alguns d'aquests factors també podrien explicar la incapacitat d'altres compostos antioxidants, com per exemple l'hipoclorit sòdic o el diòxid de clor, per controlar patògens de ferida (Spotts i Peters, 1980; Adaskaveg, 1995).

El control o la reducció de l' esporulació és un resultat important ja que pràcticament la totalitat de la fruita que es conserva en fred ha estat prèviament tractada amb fungicides i una proporció variable de les espores que es produeixen poden ser espores resistents. A nivell comercial, evitar la proliferació d'aquestes espores podria contribuir a allargar la vida útil dels fungicides sintètics encara disponibles. A més a més, la reducció de la càrrega d'espores present a l'ambient i a les superfícies de les centrals podria disminuir el grau de recontaminació dels fruits i contribuir a limitar la incidència de malalties. Assajos addicionals amb taronges van demostrar que l'exposició a 0,3 ppm d'ozó durant 7 dies a 20°C no va afectar la susceptibilitat dels fruits a la infecció per part de *P. digitatum* o *P. italicum*. D'altra banda, l'ozó va mostrar-se molt efectiu en la reducció dels nivells d'etilè presents en un contenidor frigorífic d'exportació.

Com a perspectiva de futur resultaria interessant avaluar l'aplicació d'ozó gasós durant la conservació frigorífica en combinació amb tractaments alternatius realitzats prèviament a la conservació, com per exemple tractaments físics amb calor o banys amb carbonat o bicarbonat sòdic, sorbat potàssic o altres substàncies de baixa toxicitat. Presumiblement, la conservació en una atmosfera ozonitzada podria complementar de manera efectiva la manca d'activitat antiesporulant d'aquests tractaments, la qual cosa podria ésser particularment útil en centrals amb problemes greus de proliferació de soques de *Penicillium* spp. resistents.

Control biològic de les podridures verda i blava

En el treball de tesi va posar-se especial èmfasi en el control biològic de les podridures verda i blava mitjançant l'aplicació en postcollita de microorganismes antagonics, concretament llevats i bacteris.

Per a la selecció dels possibles antagonistes van dissenyar-se proves *in vivo* d'efectivitat a nivell primari que permetessin identificar de manera ràpida i sencilla els candidats més efectius entre el gran nombre de microorganismes aïllats. La font principal de microorganismes va ser la flora epifita i endofita de taronges i mandarines recol·lectades en camps de la zona de Tarragona. Van realitzar-se proves *in vivo*, amb taronges i mandarines clementines, pels avantatges que presenten respecte a les proves *in vitro* (Smilanick, 1994). Només 3 dels 212 microorganismes assajats en aquestes proves (1,4%) van superar el llindar d'un 50% de reducció de la incidència de la malaltia respecte als controls, la qual cosa va confirmar que molt pocs dels microorganismes presents de forma natural als fruits cítrics tenen, aplicats com a tractament de postcollita, una certa capacitat antagonica. En els treballs de Wilson i Chalutz (1989) només el 3,3% dels llevats i bacteris avaluats *in vivo* contra *P. digitatum* i *P. italicum* van ésser seleccionats com a antagonistes potencials.

L'antagonista més efectiu va ser la soca CPA-2 del bacteri *Pantoea agglomerans* (prèviament classificat com *Erwinia herbicola*), que havia estat aïllada de la superfície de pomes "Golden Delicious" i que era efectiva en el control biològic de malalties importants de postcollita de la fruita dolça, com les podridures blava i grisa, causades respectivament per *P. expansum* i *B. cinerea* (Viñas *et al.*, 1999). Aquesta soca va assajar-se contra *P. digitatum* i *P. italicum* en taronges i mandarines clementines per determinar les concentracions d'antagonista efectives en el control de distintes concentracions dels patògens. Posteriorment van realitzar-se proves d'efectivitat en distintes condicions d'emmagatzemament dels fruits tractats, incloent la conservació frigorífica. A més, també va determinar-se la dinàmica poblacional del bacteri en fruits tractats i emmagatzemats tant a temperatura ambient com en condicions de fred.

En taronges i a la concentració de 2×10^8 ufc ml^{-1} , l'antagonista va mostrar una efectivitat força elevada inclús contra la densitat més alta dels patògens (1×10^6 espores ml^{-1}). Amb aquesta densitat d'inòcul fúngic, la reducció de la incidència de les podridures verda i blava transcorreguts 7 dies d'incubació a 20°C va ser concretament del 70 i 90% respectivament. L'únic cas en què el bacteri va mostrar-se inefectiu va ser en el control de la podridura blava en condicions de conservació frigorífica (3°C durant 1 o 2 mesos). En mandarines "Clemenules", la capacitat de control de la soca CPA-2 va resultar inferior que en taronges. Així, quan l'antagonista es va aplicar a la concentració de 2×10^8 ufc ml^{-1} en mandarines prèviament inoculades amb 1×10^6 espores ml^{-1} de *P. digitatum* o *P. italicum*, la reducció de la incidència de les podridures verda i blava al cap de 7 dies d'incubació a 20°C va ser del 60 i 70% respectivament. Aquesta efectivitat més baixa dels tractaments en el cas de les mandarines "Clemenules" també es va fer palesa en els treballs amb aigua calenta i carbonats sòdics i ja s'ha discutit anteriorment. En assajos de biocontrol preliminaris, tant amb taronges com amb mandarines, també es va observar que l'efectivitat de l'antagonista depenia de l'estat fisiològic dels fruits: la capacitat antagonica era inferior en fruits vells, en un estat de maduresa més avançat o prèviament sotmesos a un període llarg de conservació frigorífica.

Un cop aplicat, el bacteri es multiplicava i mantenia les seves poblacions en ferides de la pell, tant en fruits incubats a 20°C durant 14 dies com en fruits conservats a 3°C durant 60 dies. En canvi, les poblacions en fruits sense ferides van ser sensiblement inferiors, indicant una escassa capacitat de creixement a la superfície dels fruits. Aquesta característica, ja observada en altres agents de biocontrol (Bull *et al.*, 1997; Usall *et al.*, 2001), és una característica desitjable perquè així l'antagonista només prolifera allà on és realment requerit per exercir la seva activitat inhibidora. El mecanisme d'acció de la soca *P. agglomerans* CPA-2 és, de moment, desconegut, però la modificació de l'ambient en el punt d'infecció (Riggle i Klos, 1972), la competició pels nutrients (Goodman, 1967), el parasitisme (Brik *et al.*, 1998) o la producció d'antibiòtics (Kearns i Hale, 1996), són mecanismes que s'han proposat per explicar l'activitat de *P. agglomerans* com a agent de biocontrol contra distintes patògens vegetals.

Per tal de millorar el nivell d'efectivitat de l'antagonista, es va plantejar la seva combinació amb l'aplicació de carbonats. Recentment s'han encetat a tot el món nombroses línies de recerca amb l'objectiu d'integrar el control biològic amb altres mètodes de control i algunes d'aquestes línies contemplen la utilització dels carbonats (Wisniewski *et al.*, 1998; Smilanick *et al.*, 1999; Daus *et al.*, 2000). En assajos *in vitro*, *P. agglomerans* CPA-2 va resultar totalment compatible amb el bicarbonat sòdic, però no amb el carbonat sòdic. En taronges inoculades artificialment, la incidència tant de la podridura verda com de la blava es va veure significativament reduïda quan el tractament de biocontrol va complementar-se amb un tractament previ amb bicarbonat sòdic al 2%. El tractament combinat va

resultar especialment efectiu contra *P. digitatum* en taronges incubades a 20°C durant 7 dies (98% de reducció de la incidència de la malaltia respecte als controls) i contra *P. italicum* en fruits conservats a 3°C durant 1 mes (al voltant del 80% de reducció). El tractament amb bicarbonat sòdic no va afectar en cap cas la viabilitat de l'antagonista en les ferides de la pell i les dinàmiques poblacionals en fruits prèviament tractats amb bicarbonat no van diferir significativament de les observades en fruits tractats només amb l'antagonista.

A la vista dels resultats positius obtinguts fins ara al laboratori, pot considerar-se a la soca CPA-2 de *P. agglomerans* com un agent de control biològic força prometedor per al control de les malalties causades per *Penicillium* en postcollita de cítrics. Cal tenir present, a més, que també resulta efectiu contra patògens importants en postcollita de fruita dolça (Viñas *et al.*, 1999). La seva elevada capacitat antagònica, la seva tolerància a les baixes temperatures, la seva compatibilitat amb altres mètodes de control i el seu ampli espectre d'acció són característiques desitjables molt importants, que obren la porta a una possible implementació comercial de tractaments basats en l'aplicació d'aquest microorganisme antagònic. Els següents són estudis que es podrien realitzar en un futur per seguir valorant la seva idoneïtat com a tractament de postcollita: assajar la seva efectivitat en cítrics i fruita dolça a una escala més gran i en condicions comercials, avaluar noves possibilitats de combinació amb altres sistemes alternatius de control físics i/o químics, avaluar la seva efectivitat en altres sistemes hoste-patogen per ampliar el seu espectre d'activitat, estudiar més profundament el seu mecanisme d'acció i determinar la seva formulació comercial òptima.

Referències bibliogràfiques

- Adaskaveg, J.E. 1995. Postharvest sanitation to reduce decay of perishable commodities. *Perishables Handling Newslett.* 82:21-25.
- Arpaia, M.L. 1994. Preharvest factors influencing postharvest quality of tropical and subtropical fruit. *HortScience* 29: 982-985.
- Bancroft, M.N., Gardner, P.D., Eckert, J.W., Baritelle, J.L. 1984. Comparison of decay strategies in California lemon packinghouses. *Plant Dis.* 68: 24-28.
- Barkai-Golan, R., Apelbaum, A. 1991. Synergistic effects of heat and sodium o-phenyl phenate treatments to inactivate *Penicillium* spores and suppress decay in citrus fruits. *Trop. Sci.* 31: 229-233.
- Brik, H., Dyki, B., Sobiczewski, P. 1998. Antagonistic effect of *Erwinia herbicola* on in vitro spore germination and germ tube elongation of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Biocontrol* 43: 97-106.
- Bull, C.T., Stack, J.P., Smilanick, J.L. 1997. *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue molds of citrus. *Biol. Control* 8: 81-88.
- Corral, L.G., Post, L.S., Montville, T.J. 1988. Antimicrobial activity of sodium bicarbonate. *J. Food Sci.* 53: 981-982.
- Daniels, J.A., Krishnamurthi, R., Rizvi, S.H. 1985. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *J. Food Protect.* 48: 532-537.
- Daus, A., Weiss, B., Cohen, L., Shachnai, A., Porat, R., Droby, S. 2000. Integration of yeast biocontrol agents, hot water, and food additives for the control of postharvest diseases of citrus fruit. *Proc. Int. Soc. Citriculture Congress 2000*, 3-7 desembre, Orlando, FL, EUA . p. 165 (resum).
- Davidson, P.M. 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. A: *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.). American Society Microbiology Press, Washington D.C., EUA. pp. 520-556.
- DePasquale, D.A., Montville, T.J. 1990. Mechanism by which ammonium bicarbonate and ammonium sulfate inhibit mycotoxigenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3711-3717.
- Dettori, A., D'hallewin, G., Aggabio, M., Marceddu, S., Schirra, M. 1996. SEM studies on *Penicillium italicum* – 'Star Ruby' grapefruit interactions as affected by fruit hot water dipping. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 2: 1158-1163.
- Díaz, M.A., Vila, R. 1987. Estudio de flora fúngica presente en cámaras frigoríficas de conservación de frutos cítricos. *Alimentaria* 183: 77-82.
- Díaz, M.A., Vila, R. 1988. Evolución de la flora fúngica durante la desverdización en almacenes españoles de comercialización de cítricos. I. Flora presente en las cámaras de desverdización. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 28: 501-508.

- Eckert, J.W., Brown, G.E. 1986. Postharvest citrus diseases and their control. A: Fresh Citrus Fruits. Wardowski, W.F., Nagy, S., Grierson, W. (Eds.). AVI Publishing Co. Inc., Westport, CT, EUA. pp. 315-360.
- Eckert, J.W., Eaks, I.L. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. A: The Citrus Industry. Vol. 5. Reuter, W., Calavan, E.C., Carman, G.E. (Eds.). Pub. 3326, University of California Press, Berkeley, CA, EUA. pp. 179-260.
- El Ghaouth, A., Smilanick, J.L., Wilson, C.L. 2000. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 19: 103-110.
- Fallik, E., Grinberg, S., Ziv, O. 1997. Potassium bicarbonate reduces postharvest decay development on bell pepper fruits. *J. Hort. Sci.* 72: 35-41.
- Ferguson, I.B., Ben-Yehoshua, S., Mitcham E.J., McDonald, R.E., Lurie, S. 2000. Postharvest heat treatments: introduction and workshop summary. *Postharvest Biol Technol.* 21: 1-6.
- Gardner, P.D., Eckert, J.W., Baritelle, J.L., Bancroft, M.N. 1986. Management strategies for control of *Penicillium* decay in lemon packinghouses: economic benefits. *Crop Prot.* 5: 26-32.
- Goodman, R.N. 1967. Protection of apple stem tissue against *Erwinia amylovora* by avirulent strains and three other bacterial species. *Phytopathology* 57: 22-24.
- Gutter, Y. 1977. Problems of decay in marketing citrus fruits: strategy and solutions around the world. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1: 242-244.
- Hall, D.J. 1988. Comparative activity of selected food preservatives as citrus postharvest fungicides. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 101: 184-187
- Harding, P.R. Jr. 1968. Effect of ozone on *Penicillium* mold decay and sporulation. *Plant Dis. Rep.* 52: 245-247.
- Homma, Y., Arimoto, Y., Misato, T. 1981. Effects of emulsifiers and surfactants on the protective values of sodium bicarbonate. *J. Pestic. Sci.* 6: 145-153.
- Hopkins, E.F., Loucks, K.W. 1949. Has ozone any value in the treatment of citrus fruit for decay? *Citrus Ind.* 30: 5-7, 22.
- Hwang, L., Klotz, L.J. 1938. The toxic effect of certain chemical solutions on spores of *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. *Hilgardia* 12: 1-38.
- Kearns, L.P., Hale, C.N. 1996. Partial characterization of an inhibitory strain of *Erwinia herbicola* with potential as biocontrol agent to *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 369-374.
- Kitagawa, H., Kawada, K. 1984. Effect of sorbic acid and potassium sorbate on the control of sour rot of citrus fruits. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 97: 133-135.
- Klotz, L.J. 1936. Nitrogen trichloride and other gases as fungicides. *Hilgardia* 10: 27-52.
- Marloth, R.H. 1931. The influence of hydrogen-ion concentration and of sodium bicarbonate and related substances on *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. *Phytopathology* 21: 169-198.
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Ochoa de Eribe, X., Viñas, I. 2001a. Control of postharvest decay of apples by preharvest and postharvest application of ammonium molybdate. *Pest. Manag. Sci.* En premsa.
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Viñas, I. 2001b. Improvement of *Candida sake* biocontrol activity against postharvest decay by the addition of ammonium molybdate. *J. Appl. Microbiol.* En premsa.
- Palmer, C.L., Horst, R.K., Langhans, R.W. 1997. Use of bicarbonates to inhibit in vitro colony growth of *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 81: 1432-1438.
- Pratella, G.C., Tonini, G., Cessari, A. 1969. Postharvest disease problems of Italian citrus fruit. *Proc. First Int. Citrus Symp.* 3: 1317-1323.
- Riggle, J.H., Klos, E.J. 1972. Relationship of *Erwinia herbicola* to *Erwinia amylovora*. *Can. J. Bot.* 50: 1077-1083.
- Roth, G. 1967. Citrus fruit decay in South Africa caused by *Penicillium digitatum* Sacc. *Phytopathol. Z.* 58: 383-396.
- Schirra, M., D'Hallewin, G., Ben-Yehoshua, S., Fallik, E. 2000. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. *Postharvest Biol. Technol.* 21: 71-85.
- Schirra, M., D'hallewin, G., Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L. 1998. Seasonal susceptibility of Tarocco oranges to chilling injury as affected by hot water and thiabendazole postharvest dip treatments. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1177-1180.
- Schirra, M., Mulas, M. 1995. Improving storability of "Tarocco" oranges by postharvest hot-dip fungicide treatments. *Postharvest Biol. Technol.* 6: 129-138.
- Schomer, H.A., McColloch, L.P. 1948. Ozone in relation to storage of apples. *USDA Circular* 765.

- Shimizu, Y., Makinott, J., Sato, J., Iwamoto, S. 1982. Preventing rot of Kyoho grapes in cold storage with ozone. Res. Bull. Aichi Agric. Res. Cent. 14: 225-238.
- Singh, R.S., Khanna, R.N. 1969. Effect of certain inorganic chemicals on growth and spore germination of *Alternaria tenuis* Auct., the fungus causing core rot of mandarin oranges in India. Mycopath. Mycol. Appl. 37: 89-96.
- Smilanick, J.L. 1994. Strategies for the isolation and testing of biocontrol agents. A: Biological Control of Postharvest Diseases: Theory and Practice. Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL, EUA. pp. 25-42.
- Smilanick, J.L., Mackey, B.E., Reese, R., Usall, J., Margosan, D.A. 1997a. Influence of concentration of soda ash, temperature, and immersion period on the control of postharvest green mold of oranges. Plant Dis. 81: 379-382.
- Smilanick, J.L., Margosan, D.A., Henson, D.J. 1995. Evaluation of heated solutions of sulfur dioxide, ethanol, and hydrogen peroxide to control postharvest green mold of lemons. Plant Dis. 79: 742-747.
- Smilanick, J.L., Margosan, D.A., Mlikota, F., Usall, J., Michael, I.F. 1999. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. Plant Dis. 83: 139-145.
- Smilanick, J.L., Michael, I.F., Mansour, M.F., Mackey, B.E., Margosan, D.A., Flores, D., Weist, C.F. 1997b. Improved control of green mold of citrus with imazalil in warm water compared with its use in wax. Plant Dis. 81: 1299-1304.
- Smoot, J.J., McCornack, A.A. 1978. The use of potassium sorbate for citrus decay control. Proc. Fla. State Hort. Soc. 91: 119-122.
- Smoot, J.J., Melvin, C.F. 1963. Hot water as a control for decay of oranges. Proc. Fla. State Hort. Soc. 76: 322-327.
- Spalding, D.H. 1966. Appearance and decay of strawberries, peaches, and lettuce treated with ozone. ARS-USDA, Marketing Research Report 756.
- Spalding, D.H. 1968. Effects of ozone atmospheres on spoilage of fruits and vegetables after harvest. ARS-USDA, Marketing Research Report 801.
- Spotts, R.A., Peters, B.B. 1980. Chlorine and chlorine dioxide for control of d'Anjou pear decay. Plant Dis. 64:1095-1097.
- Teixidó, N., Usall, J., Magan, N., Viñas, I. 1999. Microbial population dynamics on Golden Delicious apples from bud to harvest and effect of fungicide applications. Ann. Appl. Biol. 134: 109-116.
- Tuset, J.J. 1987. Podredumbres de los Frutos Cítricos. Conselleria d'Agricultura i Pesca, Generalitat Valenciana, València, Espanya.
- Tuset, J.J., Hinarejos, C., Mira, J.L., Martínez-Jávega, J.M. 1996. Tratamientos térmicos a los frutos cítricos para el control de las enfermedades de la post-recolección. Levante Agrícola 337: 342-347.
- Usall, J., Teixidó, N., Torres, R., Ochoa de Eribe, X., Viñas, I. 2001. Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. Postharvest Biol. Technol. 21: 147-156.
- Usall, J., Viñas, I. 1989. Contaminació fúngica en pre-recol·lecció en pomes destinades a frigoconservació de la comarca del Segrià. Frut 4: 250-253.
- Viñas, I., Usall, J., Nunes, C., Teixidó, N. 1999. Nueva cepa de la bacteria *Pantoea agglomerans* (Beijerinck, 1998) Gavini, Mergaert, Beji, Mielcareck, Izard, Kerstersy De Ley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de frutas. Solicitud P9900612. Oficina Española de Patentes y Marcas, Madrid, Espanya.
- Whiteside, J.O., Garnsey, S.M., Timmer, L.W. (Eds.). 1993. Compendium of Citrus Diseases. 2a ed. APS Press, St. Paul, MN, EUA .
- Wild, B.L. 1987. Fungicidal activity of potassium sorbate against *Penicillium digitatum* as affected by thiabendazole and dip temperature. Sci. Hortic. 32: 41-47.
- Wilson, C.L., Chalutz, E. 1989. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. Sci. Hortic. 40: 105-112.
- Wisniewski, M.E., Droby, S., El Ghaouth, A., Wilson, C.L. 1998. The use of food additives to control postharvest decay and enhance biocontrol activity of yeast antagonists. Proc. Int. Congress Plant Pathol. 9-16 agost, Edinburg, Escòcia. Abstract 5.2.61 (resum).
- Ziv, O., Zitter, T.A. 1992. Effects of bicarbonate and film-forming polymers on cucurbit foliar diseases. Plant Dis. 76: 513-517.

Conclusions

Conclusions

1. *Cladosporium* és el gènere fúngic més abundant en camps de mandariner “Clemenules” de la zona citrícola de Tarragona durant tot el període de recol·lecció. La seva freqüència, correlacionada positivament amb la temperatura, la precipitació i la humitat relativa ambiental, va disminuir del 90 al 80% a la superfície dels fruits i del 72 al 33% a l’ambient en el període de desembre a febrer (segon mostreig) respecte al període de setembre a desembre (primer mostreig).
2. *Penicillium*, el gènere patogènic més important en postcollita, es troba present al camp durant tot el període de recol·lecció. La seva freqüència relativa va incrementar-se de l’1 al 8% a la superfície dels fruits i de l’1 al 26% a l’ambient al segon mostreig respecte al primer.
3. El gènere *Rhizopus*, patogen potencialment important en postcollita, no es troba present a l’ambient dels camps però sí sobre la pell dels fruits. El percentatge de plaques amb presència va ser del 2% al primer mostreig i del 5% al segon.
4. La micoflora epífita de les mandarines no és significativament diferent entre fruits situats a distintes altures o cares de l’arbre, amb l’excepció dels gèneres *Rhizopus* i *Mucor*, que són més abundants a la part baixa dels arbres que a l’alta.
5. La contaminació fúngica present a les centrals cítriques de la zona de Tarragona té majoritàriament el seu origen en la micoflora epífita dels fruits que arriben del camp.
6. *Cladosporium*, amb una freqüència relativa del 48% a l’ambient i del 61% a la superfície d’equips i instal·lacions, va ser el gènere fúngic més abundant a les centrals durant els mesos d’octubre i novembre (primer mostreig). *Penicillium*, amb freqüències relatives mitges del 65 i 48% respectivament, va ser el gènere més abundant en el període de desembre a febrer (segon i tercer mostresos). La seva població va anar augmentant al llarg de la campanya, particularment a les superfícies de les línies de confecció i a l’ambient i superfícies de les cambres frigorífiques.
7. La presència de *Rhizopus* a les centrals és generalitzada i es manté més o menys constant durant la campanya. La seva freqüència és especialment important als envasos i a les superfícies de les línies de confecció (35 i 55% de plaques amb presència respectivament).
8. Les tasques de neteja i desinfecció que es realitzen a les centrals són, en general, insuficients i/o inefectives per reduir satisfactoriament els nivells de contaminació fúngica.
9. El 33% de les soques de *Penicillium* spp. aïllades de l’ambient de les centrals i el 35% de les aïllades de les superfícies van ser resistents al fungicida tiabendazol. El 5 i el 20% respectivament van ser resistents a l’imazalil. Del total de soques de *Penicillium* spp. resistents al tiabendazol, el 15% van ser de *P. digitatum* i el 31% de *P. italicum*. De les resistents a l’imazalil, el 2% van ser de *P. digitatum* i el 6% de *P. italicum*.
10. Banys de 150 s en aigua calenta a 50-55°C són efectius en el control de la podridura blava, causada per *P. italicum*, en taronges inoculades artificialment i incubades a 20°C durant 7 dies. No obstant, en alguns casos aquestes temperatures resulten fitotòxiques per excés de calor.
11. Banys de 150 s en solucions a temperatura ambient de carbonat sòdic o de bicarbonat sòdic al 2 o 3% redueixen en un 50-70% la incidència de la podridura blava en taronges inoculades artificialment i incubades a 20°C durant 7 dies.
12. L’escalfament de les solucions de carbonat sòdic a 45°C incrementa la seva capacitat de reducció de la podridura blava en un 20-30% respecte a les solucions a temperatura ambient o a 35°C sense causar danys per calor a la pell de les taronges.
13. Banys de 150 s en aigua calenta a 45°C, carbonat sòdic al 3% a 45°C i bicarbonat sòdic al 3% a 20°C redueixen en un 88, 99 i 94% respectivament la incidència de la podridura verda i en un 73, 86 i 94% respectivament la de la podridura blava en taronges inoculades artificialment i emmagatzemades

a 3°C durant 21 dies. No obstant, l'efectivitat de tots tres tractaments va declinant a mesura que s'allarga el període de conservació en fred.

14. L'efectivitat dels tractaments amb aigua calenta, carbonat sòdic i bicarbonat sòdic en taronges i mandarines clementines inoculades artificialment i emmagatzemades a 3°C durant 2 mesos resulta entre un 10 i un 35% inferior contra la podridura blava que contra la podridura verda.
15. L'esbandit amb aigua a baixa pressió dels fruits cítrics tractats amb carbonat o bicarbonat sòdic no influeix negativament en la capacitat de control d'aquests tractaments.
16. L'efectivitat dels tractaments amb aigua calenta, carbonat sòdic i bicarbonat sòdic contra les podridures verda i blava resulta entre un 10 i un 20% inferior en mandarines clementines que en taronges.
17. Banys de 120 s en solucions aquoses calentes (40,6°C) de sorbat potàssic o benzoat sòdic 0,2 M a pH natural redueixen al voltant del 70% la incidència de la podridura verda en taronges inoculades artificialment i incubades a 20°C durant 7 dies. La reducció en llimones és superior al 80%. Barrejes d'aquestes sals entre elles o amb altres sals orgàniques no milloren significativament la capacitat de control.
18. Banys de 150 s en solucions 1,0 mM de molibdat amònic o 24,2 mM de molibdat sòdic escalfades a 48°C són efectius en el control de les podridures verda i blava en taronges inoculades artificialment i incubades a 20°C durant 7 dies. La immersió en solucions més concentrades resulta fitotòxica i taca la superfície de la fruita.
19. L'acció antifúngica dels tractaments amb aigua calenta, carbonat sòdic, bicarbonat sòdic, sorbat potàssic, benzoat sòdic, molibdat amònic i molibdat sòdic no és fungicida sinó fungistàtica i no molt persistent.
20. L'exposició continuada o intermitent a 0,3 o 1,0 ppm (v/v) d'ozó gasós de taronges i llimones inoculades artificialment durant la seva conservació frigorífica a 5°C inhibeix l'esperulació de *P. digitatum* i *P. italicum* sense produir fitotoxicitats visibles a la pell dels fruits. L'exposició al gas retarda el desenvolupament de les malalties però no redueix la seva incidència.
21. Només 3 dels 212 microorganismes assajats en proves d'efectivitat *in vivo* per al control biològic de la podridura verda en taronges i mandarines clementines van reduir la incidència de la malaltia respecte al control en un percentatge igual o superior al 50%.
22. La soca CPA-2 del bacteri *Pantoea agglomerans*, aplicada a la concentració de 2×10^8 ufc ml⁻¹, redueix la incidència de les podridures verda i blava en un 70 i 90% respectivament en taronges inoculades artificialment i incubades a 20°C durant 7 dies. No obstant, l'antagonista no controla la podridura blava en condicions de conservació frigorífica a 3°C.
23. L'efectivitat del biocontrol de *P. agglomerans* CPA-2 en mandarines clementines resulta entre un 10 i un 20% inferior a l'efectivitat en taronges.
24. *P. agglomerans* CPA-2 es multiplica i manté les seves poblacions en ferides de la pell, tant en fruits incubats a 20°C durant 14 dies com en fruits conservats a 3°C durant 60 dies. Per contra, el seu creixement sobre la superfície de fruits intactes és molt limitat.
25. La viabilitat, tant *in vitro* com *in vivo*, de *P. agglomerans* CPA-2 no es veu afectada pel contacte de les cèl·lules amb una solució al 2% de bicarbonat sòdic. En canvi, la viabilitat *in vitro* es veu reduïda més de 1000 vegades després del contacte amb una solució al 2% de carbonat sòdic.
26. La immersió en una solució a temperatura ambient de bicarbonat sòdic al 2% combinada amb l'aplicació de *P. agglomerans* CPA-2 a una concentració de 2×10^8 ufc ml⁻¹ incrementa en un 25-30%, respecte a cada un dels tractaments per separat, la capacitat de control de la podridura verda en taronges inoculades artificialment i incubades a 20°C durant 7 dies i en un 30-60% la de la podridura blava en taronges conservades a 3°C durant 1 mes.

Conclusiones

1. *Cladosporium* es el género fúngico más abundante en campos de mandarina “Clemenules” de la zona citrícola de Tarragona durante todo el periodo de recolección. Su frecuencia, correlacionada positivamente con la temperatura, la precipitación y la humedad relativa ambiental, disminuyó del 90 al 80% en la superficie de los frutos y del 72 al 33% en el ambiente en el periodo de diciembre a febrero (segundo muestreo) respecto al periodo de septiembre a diciembre (primer muestreo).
2. *Penicillium*, el género patogénico más importante en post-cosecha, se encuentra presente en el campo durante todo el periodo de recolección. Su frecuencia relativa se incrementó del 1 al 8% en la superficie de los frutos y del 1 al 26% en el ambiente en el segundo muestreo respecto al primero.
3. El género *Rhizopus*, patógeno potencialmente importante en post-cosecha, no se localiza en el ambiente de los campos pero sí sobre la piel de los frutos. El porcentaje de placas con presencia fue del 2% en el primer muestreo y del 5% en el segundo.
4. La micoflora epífita de las mandarinas no es significativamente diferente entre frutos situados en distintas alturas o caras del árbol, con la excepción de los géneros *Rhizopus* y *Mucor*, que abundan más en la parte baja de los árboles que en la alta.
5. La contaminación fúngica presente en las centrales citrícolas de la zona de Tarragona tiene mayoritariamente su origen en la micoflora epífita de los frutos llegados del campo.
6. *Cladosporium*, con una frecuencia relativa del 48% en el ambiente y del 61% en la superficie de equipos e instalaciones, fue el género fúngico más abundante en las centrales durante los meses de octubre y noviembre (primer muestreo). *Penicillium*, con frecuencias relativas medias del 65 y 48% respectivamente, fue el género más abundante en el periodo de diciembre a febrero (segundo y tercer muestreos). Su población fue aumentando a lo largo de la campaña, particularmente en las superficies de las líneas de confección y en el ambiente y las superficies de las cámaras frigoríficas.
7. La presencia de *Rhizopus* en las centrales es generalizada y se mantiene más o menos constante durante toda la campaña. Su frecuencia es especialmente importante en los envases y en las superficies de las líneas de confección (35 y 55% de placas con presencia respectivamente).
8. Las tareas de limpieza y desinfección que se realizan en las centrales son, en general, insuficientes y/o inefectivas para reducir satisfactoriamente los niveles de contaminación fúngica.
9. El 33% de las cepas de *Penicillium* spp. aisladas del ambiente de las centrales y el 35% de las aisladas de las superficies fueron resistentes al fungicida tiabendazol. El 5 y el 20% respectivamente fueron resistentes al imazalil. Del total de cepas de *Penicillium* spp. resistentes al tiabendazol, el 15% fueron de *P. digitatum* y el 31% de *P. italicum*. De las resistentes al imazalil, el 2% fueron de *P. digitatum* y el 6% de *P. italicum*.
10. Baños de 150 s en agua caliente a 50-55°C son efectivos en el control de la podredumbre azul, causada por *P. italicum*, en naranjas inoculadas artificialmente e incubadas a 20°C durante 7 días. No obstante, en algunos casos estas temperaturas resultan fitotóxicas por exceso de calor.
11. Baños de 150 s en soluciones a temperatura ambiente de carbonato sódico o de bicarbonato sódico al 2 o 3% reducen en un 50-70% la incidencia de la podredumbre azul en naranjas inoculadas artificialmente e incubadas a 20°C durante 7 días.
12. El calentamiento de las soluciones de carbonato sódico a 45°C incrementa su capacidad de reducción de la podredumbre azul en un 20-30% respecto a las soluciones a temperatura ambiente o a 35°C sin causar daños por calor en la piel de las naranjas.
13. Baños de 150 s en agua caliente a 45°C, carbonato sódico al 3% a 45°C y bicarbonato sódico al 3% a 20°C reducen en un 88, 99 y 94% respectivamente la incidencia de la podredumbre verde y en un 73, 86 y 94% respectivamente la de la podredumbre azul en naranjas inoculadas artificialmente y almacenadas a 3°C durante 21 días. No obstante, la efectividad de los tres tratamientos va disminuyendo a medida que se prolonga el periodo de conservación en frío.

14. La efectividad de los tratamientos con agua caliente, carbonato sódico y bicarbonato sódico en naranjas y mandarinas clementinas inoculadas artificialmente y almacenadas a 3°C durante 2 meses resulta entre un 10 y un 35% inferior contra la podredumbre azul que contra la podredumbre verde.
15. El aclarado con agua a baja presión de los frutos cítricos tratados con carbonato o bicarbonato sódico no influye negativamente en la capacidad de control de estos tratamientos.
16. La efectividad de los tratamientos con agua caliente, carbonato sódico y bicarbonato sódico contra las podredumbres verde y azul resulta entre un 10 y un 20% inferior en mandarinas clementinas que en naranjas.
17. Baños de 120 s en soluciones acuosas calientes (40,6°C) de sorbato potásico o benzoato sódico 0,2 M a pH natural reducen en un 70% la incidencia de la podredumbre verde en naranjas inoculadas artificialmente e incubadas a 20°C durante 7 días. La reducción en limones es superior al 80%. Mezclas de estas sales entre ellas o con otras sales orgánicas no mejoran significativamente la capacidad de control.
18. Baños de 150 s en soluciones 1,0 mM de molibdato amónico o 24,2 mM de molibdato sódico calentadas a 48°C son efectivos en el control de las podredumbres verde y azul en naranjas inoculadas artificialmente e incubadas a 20°C durante 7 días. La inmersión en soluciones más concentradas resulta fitotóxica y mancha la superficie de la fruta.
19. La acción antifúngica de los tratamientos con agua caliente, carbonato sódico, bicarbonato sódico, sorbato potásico, benzoato sódico, molibdato amónico y molibdato sódico no es fungicida sino fungistática y no muy persistente.
20. La exposición continuada o intermitente a 0,3 o 1,0 ppm (v/v) de ozono gaseoso de naranjas y limones inoculados artificialmente durante su conservación frigorífica a 5°C inhibe la esporulación de *P. digitatum* y *P. italicum* sin causar fitotoxicidades visibles en la piel de los frutos. La exposición al gas retrasa el desarrollo de las enfermedades pero no reduce su incidencia.
21. Únicamente 3 de los 212 microorganismos ensayados en pruebas de efectividad *in vivo* para el control biológico de la podredumbre verde en naranjas y mandarinas clementinas redujeron la incidencia de la enfermedad respecto al control en un porcentaje igual o superior al 50%.
22. La cepa CPA-2 de la bacteria *Pantoea agglomerans*, aplicada a la concentración de 2×10^8 ufc ml⁻¹, reduce la incidencia de las podredumbres verde y azul en un 70 y 90% respectivamente en naranjas inoculadas artificialmente e incubadas a 20°C durante 7 días. No obstante, el antagonista no controla la podredumbre azul en condiciones de conservación frigorífica a 3°C.
23. La efectividad del biocontrol de *P. agglomerans* CPA-2 en mandarinas clementinas resulta entre un 10 y un 20% inferior a su efectividad en naranjas.
24. *P. agglomerans* CPA-2 se multiplica y mantiene sus poblaciones en heridas de la piel, tanto en frutos incubados a 20°C durante 14 días como en frutos conservados a 3°C durante 60 días. Por contra, su crecimiento sobre la superficie de frutos intactos es muy limitado.
25. La viabilidad, tanto *in vitro* como *in vivo*, de *P. agglomerans* CPA-2 no se ve afectada por el contacto de las células con una solución al 2% de bicarbonato sódico. Por contra, su viabilidad *in vitro* se ve reducida más de 1000 veces después del contacto con una solución al 2% de carbonato sódico.
26. La inmersión en una solución a temperatura ambiente de bicarbonato sódico al 2% combinada con la aplicación de *P. agglomerans* CPA-2 a una concentración de 2×10^8 ufc ml⁻¹ incrementa en un 25-30%, respecto a cada uno de los tratamientos aplicados por separado, la capacidad de control de la podredumbre verde en naranjas inoculadas artificialmente e incubadas a 20°C durante 7 días y en un 30-60% la de la podredumbre azul en naranjas conservadas a 3°C durante 60 días.

Conclusions

1. *Cladosporium* is the fungal genus more frequently found in “Clemenules” mandarin orchards in Tarragona during the entire harvesting period. Its frequency, correlated positively with the temperature, rainfall and relative humidity, decreased from 90 to 80% in the environment and from 72 to 33% on the fruit surface in the period from December to February (second sampling) compared to the period from September to December (first sampling).
2. *Penicillium*, the most important postharvest pathogenic genus, is found in the orchards during the entire harvesting period. In the second sampling its frequency increased from 1 to 8% in the environment and from 1 to 26% on the fruit surface.
3. *Rhizopus*, a potentially important postharvest pathogen, is not found in the orchard environment but is found on the fruit surface. It was found in 2 and 5% of the plates in the first and the second samplings, respectively.
4. With the exception of *Rhizopus* and *Mucor*, which are more frequent on fruits located in the lower area in the tree canopy, mandarin epiphyte populations are not significantly different on fruits located at different heights and sides in the tree canopy.
5. Fungal contamination in Tarragona citrus packinghouses mainly originates in the epiphyte fungal populations present on the fruit arriving from the orchards.
6. *Cladosporium* was the fungal genus more frequently present in both the ambient (48%) and surfaces of equipment and facilities (61%) in citrus packinghouses in the period of October and November (first sampling). *Penicillium* was the most frequent genus in the period from December to February (second and third samplings). Its relative frequency was 65 and 48% in the ambient and on surfaces, respectively. Its population increased over the commercial season, particularly on the surfaces of packinglines and in the ambient and surfaces of cold storage rooms.
7. *Rhizopus* is commonly present in the packinghouses. Its population does not vary significantly during the season. Its frequency is especially high on the surfaces of bins and packinglines (presence in 35 and 55% of the plates, respectively).
8. In general, cleaning and disinfection tasks are insufficient and/or ineffective to reduce fungal contamination in the packinghouses.
9. Thirty-three percent of the strains of *Penicillium* spp. isolated from the ambient in the packinghouses and 35% of the strains isolated from the surfaces were thiabendazole-resistant strains. Five percent and 20% were imazalil-resistant strains, respectively. Fifteen percent of the thiabendazole-resistant *Penicillium* biotypes were identified as *P. digitatum* and 31% as *P. italicum*. Two percent of the imazalil-resistant *Penicillium* biotypes were identified as *P. digitatum* and 6% as *P. italicum*.
10. Immersion in water at 50-55°C for 150 s effectively controls citrus postharvest blue mold on artificially inoculated oranges incubated at 20°C for 7 days. However, these temperatures could cause heat damage to the fruit.
11. Immersion in 2 or 3% sodium carbonate or sodium bicarbonate solutions at room temperature for 150 s reduces from 50 to 70% the incidence of blue mold on artificially inoculated oranges incubated at 20°C for 7 days.
12. Heating sodium carbonate solutions to 45°C improves their effectiveness against blue mold from 20 to 30% compared to treatments at room temperature or 35°C. Heated solutions do not cause rind heat injury.
13. Immersion for 150 s in hot water at 45°C, 3% sodium carbonate at 45°C and 3% sodium bicarbonate at room temperature reduces the incidence of green mold by 88, 99 and 94%, respectively, and the incidence of blue mold by 73, 86 and 94%, respectively, on artificially inoculated oranges stored at 3°C for 21 days. The effectiveness of all three treatments, however, decreases when the cold storage period increases.

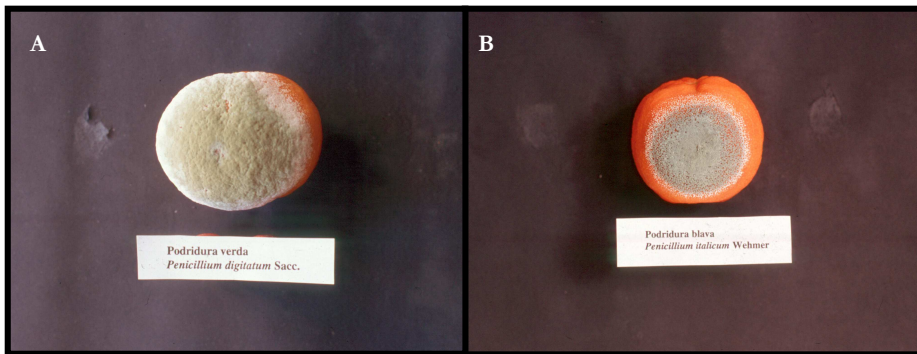
14. The effectiveness of hot water, sodium carbonate and sodium bicarbonate treatments on artificially inoculated oranges and clementine mandarins after storage at 3°C for 2 months is from 10 to 35% lower against green mold than against blue mold.
15. Rinsing sodium carbonate- or sodium bicarbonate-treated fruit with fresh water at low pressure does not negatively influence the effectiveness of the treatment.
16. The effectiveness of hot water, sodium carbonate and sodium bicarbonate treatments against green and blue molds is from 10 to 20% lower on clementine mandarins than on oranges.
17. Immersion in 0.2 M potassium sorbate or sodium benzoate aqueous solutions at 40.6°C and natural pH for 120 s reduces by 70% the incidence of green mold on artificially inoculated oranges incubated at 20°C for 7 days. On lemons, disease reduction is higher than 80%. Mixtures of these salts by themselves or with other organic salts do not significantly improve the effectiveness of the treatment.
18. Immersion in 1.0 mM ammonium molybdate or 24.2 mM sodium molybdate aqueous solutions at 48°C for 150 s effectively controls both green and blue molds on artificially inoculated oranges incubated at 20°C for 7 days. Treatments at higher concentrations can be phytotoxic and stain the surface of the fruit.
19. The antifungal activity of the treatments with hot water, sodium carbonate, sodium bicarbonate, potassium sorbate, sodium benzoate, ammonium molybdate and sodium molybdate is not fungicidal but fungistatic and not very persistent.
20. Continuous or intermittent exposure of artificially inoculated oranges and lemons to 0.3 or 1.0 ppm (v/v) ozone during cold storage at 5°C inhibits the sporulation of *P. digitatum* and *P. italicum* without causing noticeable ozone phytotoxicity to the fruit. Ozone exposure delays disease development but it does not reduce disease incidence.
21. Only 3 out of 212 microorganisms tested in *in vivo* effectiveness screenings for the biological control of green mold reduced decay incidence by 50% or more compared to the control fruit.
22. The strain CPA-2 of the bacterium *Pantoea agglomerans*, applied at a concentration of 2×10^8 cfu ml⁻¹, reduces the incidence of green and blue molds on artificially inoculated oranges incubated at 20°C for 7 days by 70 and 90%, respectively. The antagonist, however, does not control blue mold on fruit stored at 3°C.
23. The biocontrol effectiveness of *P. agglomerans* CPA-2 is from 10 to 20% lower on clementine mandarins than on oranges.
24. *P. agglomerans* CPA-2 is able to grow and maintain its populations inside rind wounds either on fruits incubated at 20°C for 14 days or on fruits held at 3°C for 60 days. The bacterium, on the contrary, shows a very limited growth on the surface of intact fruit.
25. The viability both *in vitro* and *in vivo* of *P. agglomerans* CPA-2 is not affected by the contact of cells with a 2% sodium bicarbonate solution. In contrast, its viability *in vitro* is reduced about 1000-fold by the contact of cells with a 2% sodium carbonate solution.
26. The immersion for 60 s in a 2% sodium bicarbonate solution combined with the application of *P. agglomerans* CPA-2 at a concentration of 2×10^8 cfu ml⁻¹ increases the control of green mold by each treatment from 25 to 30% on artificially inoculated oranges incubated at 20°C for 7 days, and the control of blue mold from 30 to 60% on oranges stored at 3°C for 30 days.

Altres publicacions derivades

Les següents són altres publicacions o comunicacions a congressos o simposis derivades totalment o en part dels treballs d'aquesta tesi doctoral:

- Palou, L., Crisosto, C.H., Smilanick, J.L., Adaskaveg, J.E., and Zoffoli, J.P. 2001. Evaluation of the effect of ozone exposure on decay development and fruit physiological behaviour. *Acta Hort.* 553: 429-430.
- Palou, L., Smilanick, J.L., Usall, J., and Viñas, I. 2001. Hot water and sodium carbonate to control postharvest green and blue molds of clementine mandarins. *Phytopathology* 91: S69 (Resum).
- Palou, L., Smilanick, J.L., Usall, J., and Viñas, I. 2000. Control of postharvest blue mold of oranges by sodium carbonate and sodium bicarbonate. *Phytopathology* 90: S58 (Resum).
- Teixidó, N., Usall, J., Nunes, C., Smilanick, J.L., Palou, L., and Viñas, I. 2000. Biological control of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on citrus fruits with *Pantoea agglomerans*. Proc. 9th Int. Soc. Citriculture Congress 2000: P405 (Resum).
- Usall, J., Teixidó, N., Palou, L., Pons, J., Muñoz, J.A., and Viñas, I. 2000. Combination of hot water and sodium carbonate treatments to control green and blue moulds on mandarins. Proc. 9th Int. Soc. Citriculture Congress 2000: P440 (Resum).
- Lamarca, N., Asensio, A., Palou, L., Muñoz, J.A., Usall, J., Teixidó, N., Viñas, I. 2000. Combinación de los tratamientos de agua caliente y bicarbonato sódico para el control de *P. digitatum* y *P. italicum* en cítricos. V Simposio Nacional y II Ibérico de Post-recolección de Frutos y Hortalizas. 21-23 septiembre, Puerto de la Cruz, Tenerife, Islas Canarias, España. Sección 3, póster 4 (Resum).
- Palou, L., Usall, J., Aguilar, M.J., Pons, J., Viñas, I. 1999. Control de la podredumbre verde de los cítricos mediante baños con agua caliente y carbonatos sódicos. *Levante Agrícola* 348: 412-421.
- Usall, J., Pons, J., Palou, L., Viñas, I., Smilanick, J.L. 1999. Alternativas a los productos químicos de síntesis en post-cosecha de cítricos en España y EE UU. *Phytoma España* 110: 58-64.
- Palou, L. 1999. Doenças de pós-colheita dos citrinos. *Frutas Legumes e Flores* 46: 50-51 (en portuguès).
- Usall, J., Palou, L., Aguilar, M. J., and Viñas, I. 1998. Hot water treatments for the control of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* in oranges. Proc. MADRID98-COST915: Physiological and Technological Aspects of Gaseous and Thermal-Treatments of Fresh Fruit and Vegetables. Madrid, Spain. En premsa.
- Palou, L., Usall, J., Cerdà, M.C., Viñas, I. 1997. Control de *Penicillium digitatum* Sacc. en post-recolección de cítricos mediante baños de bicarbonato sódico. *Phytoma España* 90: 195-196.
- Cerdà, M.C., Palou, L., Fons, E., Usall, J., Viñas, I. 1997. Determinación de la contaminación fúngica en líneas de cítricos para el establecimiento de puntos críticos de control. *Phytoma España* 90: 197-198.

Annex Fotogràfic



Fotografia 1. **A.** Podridura verda causada per *Penicillium digitatum* en mandarina clementina. **B.** Podridura blava causada per *Penicillium italicum* en mandarina clementina.



Fotografia 2. **A.** Podridura verda causada per *Penicillium digitatum* en taronja. **B.** Podridura blava causada per *Penicillium italicum* en taronja.



Fotografia 3. Inoculació de taronges amb una suspensió de 1×10^6 espores ml^{-1} de *Penicillium digitatum*.



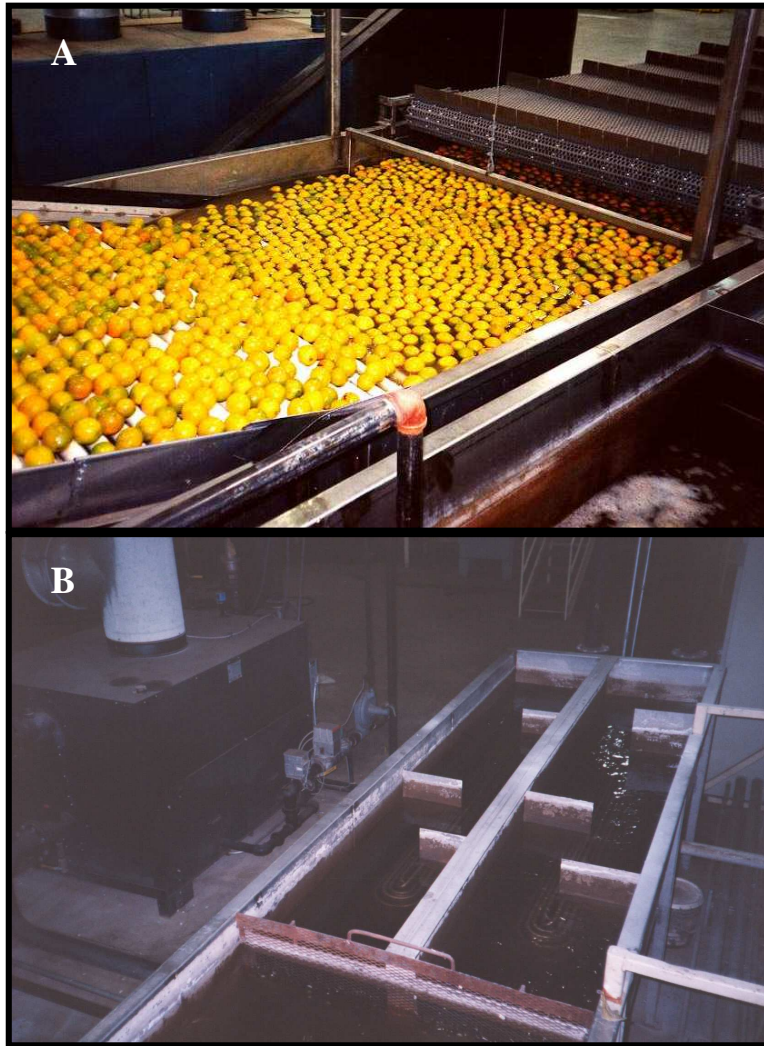
Fotografia 4. Banyadora d'acer inoxidable de 172 l de capacitat, amb resistència elèctrica de 9 kW i termostat, utilitzada per als assajos amb aigua calenta i solucions de carbonat o bicarbonat sòdic realitzats al Centre UdL-IRTA de Lleida.



Fotografia 5. Sistema de dotze tancs d'acer inoxidable de 22 l de capacitat utilitzat per als assajos amb aigua calenta i solucions de carbonats sòdics o altres additius alimentaris realitzats a l'Horticultural Crops Research Laboratory de Fresno (Califòrnia). Cada tanc està equipat amb un escalfador elèctric controlat per ordinador, un sensor de temperatura i un agitador mecànic accionat amb un motor elèctric.



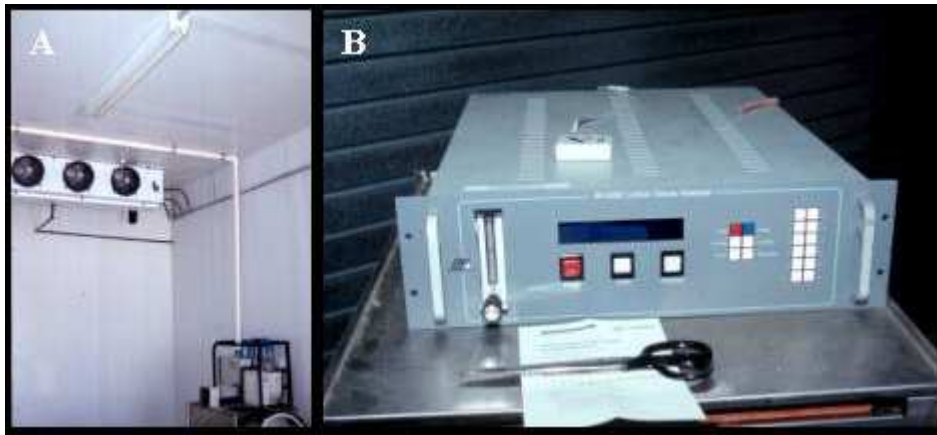
Fotografia 6. Tractament comercial de taronges amb una solució calenta de carbonat sòdic en una central citrícola de Califòrnia.



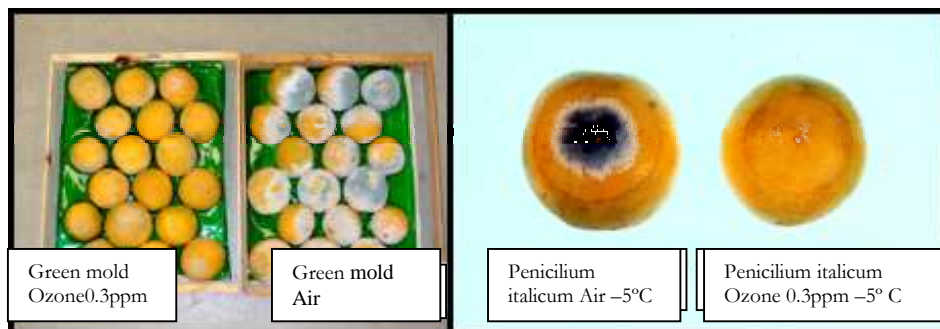
Fotografia 7. Tractament comercial de taronges amb una solució calenta de carbonat sòdic en una central citrícola de Califòrnia. **A.** Els fruits tractats arriben per flotació a la línia de confecció. **B.** Sistema de resistències elèctriques utilitzat per escalfar la solució.



Fotografia 8. Fitotoxicitat en mandarina clementina per excés de calor. Danys severos a la pell deguts a la immersió dels fruits en aigua a 65°C.



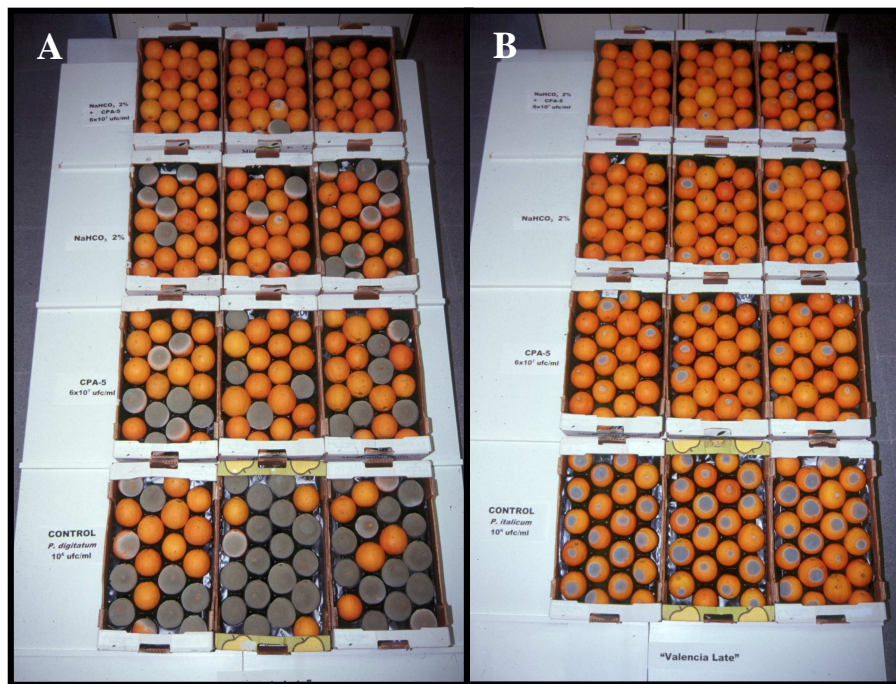
Fotografia 9. **A.** Generador d'ozó de 90 W instal·lat en una cambra frigorífica experimental de 66,6 m³ de capacitat. **B.** Analitzador d'ozó d'absorció ultraviolada.



Fotografia 10. Efecte de l'exposició contínua a 0,3 ppm d'ozó gasós sobre l'esperulació de *Penicillium digitatum* i *Penicillium italicum* en taronges inoculades artificialment i conservades a 5°C durant 1 mes.



Fotografia 11. A. Assaig a mitjana escala de la combinació de tractaments de control biològic amb bicarbonat sòdic. **B.** Detall del bany de taronges prèviament inoculades amb *Penicillium digitatum* en una suspensió de l'antagonista *Pantoea agglomerans* CPA-2.



Fotografia 12. Incidència de les podridures verda (A) i blava (B) després de 7 dies d'incubació a 20°C en taronges inoculades artificialment i tractades amb l'antagonista *Pantoea agglomerans* CPA-2, bicarbonat sòdic o una combinació d'ambdós tractaments.