

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

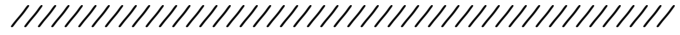
Directors:  
Dra. Inmaculada Viñas Almenar  
Dr. Josep Usall i Rodié

Lleida, gener de 2002

*A ma mare Bepeta  
i a mon pare Josep,  
a qui tot ho dec*

*Dolça Catalunya  
terra del meu cor  
qui de tu s'allunya*

*d'enyorança es mor*



*(...) Es sabido que en algunas zonas urbanas la densidad del aire es tal que sus habitantes lo introducen en fundas y lo exportan bajo la denominación de "morcillas". (...)*

*(...) En un lugar cercano al hotel pido e ingiero una hamburguesa. Es un conglomerado de fragmentos procedentes de varios animales. Un análisis somero me permite reconocer el buey, el asno, el dromedario, el elefante (asiático y africano), el mandril, el ñu y el megaterio. (...)*

Eduardo Mendoza  
Sin noticias de Gurb



## AGRAÏMENTS

*A la Inmaculada Viñas i al Josep Usall, no només per la seva excel·lent direcció i tutoria sinó també per la seva comprensió, recolzament i amistat.*

*Al Joe Smilanick, per compartir amb mi part dels seus coneixements i experiència, per la seva amabilitat i pel seu inestimable ajut. “Joe, I really appreciate your help, thank you for your friendship”.*

*Al Joan Pons, per la seva amistat, per facilitar-me el contacte directe amb el sector i per la seva col·laboració i ajut en els treballs de camp i centrals.*

*Als amics i companys del laboratori, la Carla, la Neus, la Maribel, l'Elena, l'Àngels, la Charo i el Xavier per les bones estones viscudes durant gairebé quatre anys. I també a la Carme, la Maria José i el Jose per la feina compartida. També als companys de laboratori a Fresno, la Núria i la Franka.*

*Al Carlos Crisosto per la seva comprensió com a cap meu durant l'època de redacció. “Carlos, gracias por tu amistad y por tu ayuda en la lucha contra la añoranza”.*

*A la CIRIT, Generalitat de Catalunya, per possibilitar econòmicament la realització de la tesi i la meva formació com a investigador.*

*Al Centre UdL-IRTA, l'USDA-ARS i la UC per possibilitar la realització dels treballs d'aquesta tesi.*

*Al Grup Exportador de Cítrics del Baix Ebre i Montsià, a la UE i a la CYCIT pel finançament rebut.*

*Finalment, a la meva família de Claravalls, Montblanc i Tornabous, i també a tot el grupat d'amics deixats a Catalunya, que tant haig enyorat durant les llargues hores de redacció a Califòrnia, però que al mateix temps tant m'han ajudat a suportar la llunyania.*





Els treballs d'aquesta tesi doctoral han estat realitzats majoritàriament al laboratori de Patologia de l'Àrea de Postcollita del Centre UdL-IRTA de Lleida. Algunes experiències dels capítols 3 i 5 van portar-se a terme a l'USDA-ARS Horticultural Crops Research Laboratory de Fresno (Califòrnia, EUA). Els treballs del capítol 6 van realitzar-se al F. Gordon Mitchell Postharvest Center del Kearney Agricultural Center (UC) de Parlier (Califòrnia, EUA).

Alguns treballs d'aquesta tesi doctoral ha rebut suport econòmic de la CIRIT, del Grup Exportador de Cítrics de les comarques del Baix Ebre i Montsià, de la UE i de la CICYT.



## ABREVIATURES

|        |   |
|--------|---|
| ARS    | “Agricultural Research Service”                     |
| CIRIT  | Comissió Interdepartamental de Recerca i Tecnologia |
| CICYT  | “Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología” |
| DOGC   | Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya        |
| EUA    | Estats Units d’Amèrica                              |
| GRAS   | “Generally recognized as safe”                      |
| HWB    | “Hot water brushing”                                |
| IRTA   | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries   |
| p/p    | Pes en pes  |
| p/v    | Pes en volum  |
| SOPP   | “Sodium Ortho Phenil Phenate”                       |
| UC     | “University of California”                          |
| UE     | Unió Europea  |
| US EPA | “United States Environmental Protection Agency”     |
| US FDA | “United States Food and Drug Administration”        |
| USDA   | “United States Department of Agriculture”           |
| v/v    | Volum en volum                                      |

# ÍNDEX

## Resums

|                 |   |
|-----------------|---|
| Català .....    | 3 |
| Castellano..... | 5 |
| English.....    | 7 |

## Introducció general

|   |    |
|---|----|
| 1. Malalties de postcollita dels fruits cítrics .....                   | 11 |
| 1.1. Classificació i descripció de les principals malalties .....       | 12 |
| 1.2. La podridura verda .....   | 15 |
| 1.3. La podridura blava .....   | 17 |
| 2. Control de les malalties de postcollita .....                        | 18 |
| 2.1. Estratègies generals de control .....                              | 18 |
| 2.2. Reduir la contaminació fúngica en precollita .....                 | 18 |
| 2.3. Mantenir o millorar la resistència dels fruits a la infecció ..... | 18 |
| 2.4. Reduir les poblacions dels patògens a les centrals cítriques ..... | 19 |
| 2.5. Tractaments antifúngics en postcollita .....                       | 21 |
| 2.2. Fungicides de síntesi .....  | 22 |
| 3. Problemàtica de la utilització de fungicides de síntesi .....        | 22 |
| 3.1. Soques dels patògens resistents als fungicides .....               | 22 |
| 3.2. Residus a la fruita .....  | 23 |
| 3.3. Malalties iatrogèniques .....                                      | 24 |
| 4. Sistemes de control alternatius als fungicides de síntesi .....      | 25 |
| 4.1. Sistemes físics .....  | 26 |
| 4.1.1. Conservació frigorífica .....                                    | 26 |
| 4.1.2. Conservació frigorífica en atmosferes controlades .....          | 26 |
| 4.1.2.1. Atmosferes controlades convencionals.....                      | 26 |
| 4.1.2.2. Atmosferes amb monòxid de carboni.....                         | 27 |
| 4.1.2.3. Atmosferes hipobàriques.....                                   | 28 |
| 4.1.3. Tractaments amb calor: curat i aigua calenta .....               | 28 |
| 4.1.4. Radiació ionitzant .....   | 31 |
| 4.1.5. Llum ultraviolada .....  | 32 |
| 4.2. Sistemes químics .....   | 33 |
| 4.2.1. Substàncies naturals .....                                       | 33 |
| 4.2.2. Conservants i additius alimentaris .....                         | 35 |
| 4.2.3. Ozó .....  | 37 |
| 4.2.4. Altres productes químics.....                                    | 38 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.3. Sistemes biològics .....  | 39  |
| 4.3.1. Control biològic .....  | 38  |
| 4.3.2. Obtenció de cultivars resistents .....  | 41  |
| 4.4 Integració de sistemes alternatius .....   | 42  |
| 5. Objectius .....   | 44  |
| 6. Referències bibliogràfiques .....   | 45  |
| <br>   |     |
| <b>Capítol 1</b> .....   | 57  |
| Micoflora epifita de los frutos y ambiental en campos de mandarino<br>'Clemenules' en Tarragona  |     |
| Referència: <i>Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.</i> 16: 257-272 (2001)  |     |
| <br>   |     |
| <b>Capítol 2</b> .....   | 79  |
| Micoflora en centrales cítricas de Tarragona   |     |
| Referència: <i>Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.</i> En premsa   |     |
| <br>   |     |
| <b>Capítol 3</b> .....   | 101 |
| Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water,<br>sodium carbonate, and sodium bicarbonate   |     |
| Referència: <i>Plant Dis.</i> 85: 371-376 (2001)   |     |
| <br>   |     |
| <b>Capítol 4</b> .....   | 121 |
| Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control<br>of postharvest green and blue molds of clementine mandarins   |     |
| Referència: <i>Postharvest Biol. Technol.</i> 24: 93-96 (2002) (Research Note)   |     |
| <br>   |     |
| <b>Capítol 5</b> .....   | 139 |
| Evaluation of food additives and low-toxicity compounds as alternative<br>chemicals for the control of <i>Penicillium digitatum</i> (Pers.: Fr.) Sacc.<br>and <i>Penicillium italicum</i> Wehmer on citrus fruit |     |
| Referència: <i>Pest Manag. Sci.</i> En premsa  |     |
| <br>   |     |
| <b>Capítol 6</b> .....   | 159 |
| Effect of gaseous ozone exposure on the development of green<br>and blue molds on cold stored citrus fruit   |     |
| Referència: <i>Plant Dis.</i> 85: 632-638 (2001)   |     |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Capítol 7</b> .....   | 179 |
| Evaluación de microorganismos antagónicos para el control biológico de las podredumbres verde y azul en post-cosecha de cítricos |     |
| Referència: <i>Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.</i> Enviat per a publicació   |     |
| <b>Capítol 8</b> .....   | 195 |
| Improving control of green and blue molds of oranges by combining <i>Pantoea agglomerans</i> (CPA-2) and sodium bicarbonate      |     |
| Referència: <i>Eur. J. Plant Pathol.</i> 107: 685-694 (2001)   |     |
| <b>Discussió general</b>   |     |
| 1. Micoflora en camps i centrals cítriques.....  | 217 |
| 2. Control de les podridures verda i blava amb aigua calenta i carbonats .....   | 221 |
| 3. Control de les podridures verda i blava amb altres substàncies de baixa toxicitat.....  | 226 |
| 4. Efecte de la conservació frigorífica en atmosferes ozonitzades sobre el desenvolupament de les podridures verda i blava ..... | 228 |
| 5. Control biològic de les podridures verda i blava .....  | 230 |
| 6. Referències bibliogràfiques.....  | 233 |
| <b>Conclusions</b>   |     |
| Català.....  | 239 |
| Castellano.....  | 243 |
| English.....   | 247 |
| <b>Altres publicacions derivades</b> .....   | 251 |
| <b>Annex fotogràfic</b> .....  | 255 |

# Resums

---

## Resum

Les pèrdues econòmiques ocasionades per les malalties de postcollita representen actualment un dels principals problemes de la citricultura mundial. En les nostres condicions mediterrànies destaca la incidència de les malalties ocasionades per patògens de ferida, especialment la podridura verda, causada per *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. i la podridura blava, causada per *P. italicum* Wehmer. Tradicionalment i també avui dia, el control d'aquestes malalties es realitza mitjançant tractaments en postcollita amb fungicides de síntesi. L'aplicació massiva i continuada d'aquests productes ha generat problemes greus com són la proliferació de soques dels patògens resistents als fungicides, la presència excessiva de residus als fruits amb el consegüent increment dels riscos per a la salut humana i el medi ambient, i l'aparició de malalties iatrogèniques. Davant aquesta situació, una de les prioritats màximes del sector citrícola és trobar i desenvolupar sistemes de control alternatius. Aquest ha estat l'objectiu bàsic del present treball de tesi doctoral. Després de caracteritzar la població fúngica ambiental i epífita dels fruits en camps de mandariner "Clemenules" representatius de la zona productora de Tarragona (Capítol 1) i quantificar la micoflora i les soques de *Penicillium* spp. resistents a fungicides presents a l'ambient i a la superfície d'equips i instal·lacions en centrals citrícoles de la zona (Capítol 2), s'han avaluat diversos mètodes físics, químics i biològics i també combinacions d'ells per al control en postcollita de les podridures verda i blava dels cítrics. Concretament, s'han estudiat amb profunditat els tractaments amb aigua calenta, carbonat sòdic i bicarbonat sòdic (Capítols 3 i 4), s'ha avaluat l'efectivitat d'un bon nombre d'altres additius alimentaris i substàncies de baixa toxicitat (Capítol 5) i s'ha determinat l'efecte de la conservació frigorífica en atmosferes ozonitzades (Capítol 6). Finalment, s'han aïllat, identificat i caracteritzat microorganismes antagonics efectius en el control biològic de les podridures verda i blava i s'ha assajat la seva combinació amb altres tractaments alternatius (Capítols 7 i 8). Entre les principals conclusions que s'han obtingut, destaca que el gènere *Penicillium* es troba present als camps de mandariner "Clemenules" durant tot el període de recol·lecció i que la fruita arribada del camp és la principal font de contaminació fúngica de les centrals citrícoles de la zona, en les quals existeixen soques tant de *P. digitatum* com de *P. italicum* resistents als fungicides tiabendazol i imazalil. Banys de curta durada en solucions de carbonat sòdic o bicarbonat sòdic al 2 o 3% són més efectius que l'aigua calenta sola per al control de les podridures verda i blava en taronges i mandarines clementines. Es tracta de tractaments sinèrgics amb la calor (45°C), l'acció dels quals és fungistàtica i no molt persistent. Altres tractaments efectius són banys en solucions calentes de sorbat potàssic, benzoat sòdic, molibdat amònic i molibdat sòdic. L'emmagatzemament en fred (5°C) en atmosferes ozonitzades (0,3 o 1,0 ppm d'ozó) no redueix la incidència de les podridures verda i blava en taronges i llimones, però retarda el seu desenvolupament i inhibeix l' esporulació dels patògens. La soca CPA-2 del bacteri *Pantoea agglomerans* és un antagonista efectiu en el control biològic de les podridures verda i blava en taronges i clementines. La seva acció es complementa satisfactòriament amb un tractament previ de bicarbonat sòdic al 2%.



## Resumen

Las pérdidas económicas ocasionadas por las enfermedades de post-cosecha representan actualmente uno de los principales problemas de la citricultura mundial. En nuestras condiciones mediterráneas destaca la incidencia de enfermedades causadas por patógenos de herida, especialmente la podredumbre verde, causada por *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. y la podredumbre azul, causada por *P. italicum* Wehmer. Tradicionalmente y también hoy en día, el control de estas enfermedades se realiza mediante tratamientos en post-cosecha con fungicidas de síntesis. La aplicación masiva y continuada de estos productos ha generado problemas graves como son la proliferación de cepas de los patógenos resistentes a los fungicidas, la excesiva presencia de residuos en los frutos, con el consecuente incremento de los riesgos para la salud humana y el medio ambiente, y la aparición de enfermedades iatrogénicas. Ante esta situación, una de las prioridades máximas del sector citrícola es encontrar y desarrollar sistemas de control alternativos. Este es el objetivo básico del presente trabajo de tesis doctoral. Después de caracterizar la población fúngica ambiental y epífita de los frutos en campos de mandarina “Clemenules” representativos de la zona productora de Tarragona (Capítulo 1) y cuantificar la micoflora y las cepas de *Penicillium* spp. resistentes a fungicidas presentes en el ambiente y en la superficie de equipos e instalaciones en centrales citrícolas de la zona (Capítulo 2), se han evaluado distintos métodos físicos, químicos y biológicos y también combinaciones de los mismos para el control en post-cosecha de las podredumbres verde y azul de los cítricos. Concretamente, se han estudiado en profundidad los tratamientos con agua caliente, carbonato sódico y bicarbonato sódico (Capítulos 3 y 4), se han evaluado un buen número de otros aditivos alimentarios y sustancias de baja toxicidad (Capítulo 5), y se ha determinado el efecto de la conservación frigorífica en atmósferas ozonizadas (Capítulo 6). Finalmente, se han aislado, identificado y caracterizado microorganismos antagonistas efectivos en el control biológico de las podredumbres verde y azul y se ha ensayado su combinación con otros tratamientos alternativos (Capítulos 7 y 8).

Entre las principales conclusiones que se han obtenido, destaca que el género *Penicillium* se encuentra presente en los campos de mandarina “Clemenules” durante todo el periodo de recolección y que la fruta llegada del campo es la principal fuente de contaminación fúngica de las centrales citrícolas de la zona, en las cuales existen cepas tanto de *P. digitatum* como de *P. italicum* resistentes a los fungicidas tiabendazol e imazalil. Baños de corta duración en soluciones de carbonato o bicarbonato sódicos al 2 o 3% son más efectivos que el agua caliente sola para el control de las podredumbres verde y azul en naranjas y mandarinas clementinas. Se trata de tratamientos sinérgicos con el calor (45°C) y de acción fungistática y no muy persistente. Otros tratamientos efectivos son baños en soluciones calientes de sorbato potásico, benzoato sódico, molibdato amónico y molibdato sódico. El almacenamiento en frío (5°C) en atmósferas ozonizadas (0,3 o 1,0 ppm de ozono) no reduce la incidencia de las podredumbres verde y azul en naranjas y limones, pero sí retrasa su desarrollo e inhibe la esporulación de los patógenos. La cepa CPA-2 de la bacteria *Pantoea agglomerans* es un antagonista efectivo en el control biológico de las podredumbres verde y azul en naranjas y clementinas. Su acción se complementa satisfactoriamente con un tratamiento previo de bicarbonato sódico al 2%.

## Summary

Economic losses caused by postharvest diseases are among the major concerns of the citrus industry worldwide. In our Mediterranean conditions, wound pathogens are the principal cause of postharvest decay. Postharvest green mold, caused by *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc., and postharvest blue mold, caused by *P. italicum* Wehmer, are the most economically important citrus postharvest diseases. Typically, these diseases are primarily controlled by application of synthetic fungicides. 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 and iatrogenic diseases. Furthermore, concerns about human health risks and the protection of the environment associated with fungicide residues have increased the need to find and develop alternatives to fungicide usage. This is the basic objective of the present doctoral thesis. Firstly, fruit epiphyte and environmental fungal populations in 'Clemenules' orchards in Tarragona (Chapter 1) and fungal populations and fungicide-resistant biotypes of *Penicillium* spp. in the atmosphere and on surfaces of equipment and facilities in Tarragona citrus packinghouses (Chapter 2) were characterized. Then, different physical, chemical, biological, and combined methods were evaluated for the control of citrus postharvest green and blue molds. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate treatments were extensively studied (Chapters 3 and 4); numerous other food additives and low-toxicity compounds were evaluated (Chapter 5); and the effect of gaseous ozone exposure during cold storage was investigated (Chapter 6). Finally, antagonistic microorganisms effective for the biological control of green and blue molds were isolated, identified, characterized, and assayed in combination with other alternative methods (Chapters 7 and 8).

The following are some of the most important conclusions: the pathogenic genus *Penicillium* is present through the entire harvesting period in 'Clemenules' orchards. Fruit from the orchards are the major source of fungal contamination in the packinghouses. Both thiabendazole- and imazalil-resistant biotypes of *P. digitatum* and *P. italicum* were found in Tarragona packinghouses. Brief dips in 2 or 3% sodium carbonate or sodium bicarbonate solutions are more effective than hot water alone for the control of green and blue molds on oranges and clementine mandarins. These treatments are synergic to heat (45°C) and their activity is fungistatic and not very persistent. Other effective treatments are brief dips in hot solutions of potassium sorbate, sodium benzoate, ammonium molybdate, and sodium molybdate. Storage at low temperature (5°C) under an ozonated atmosphere (0.3 or 1.0 ppm ozone) does not reduce green and blue mold incidence on oranges and lemons but does delay disease development and prevent sporulation of the pathogens. The strain CPA-2 of the bacterium *Pantoea agglomerans* is an effective antagonist for the biological control of postharvest green and blue molds on oranges and clementines. Its action is satisfactorily complemented by a previous 2% sodium bicarbonate treatment.

# Introducció General

---



## Malalties de postcollita dels fruits cítrics

Les malalties de postcollita, aquelles que afecten als fruits durant tot el procés de comercialització, des del moment de la recollecció fins que arriben al consumidor, representen actualment un dels principals problemes de la citricultura mundial. La tendència actual és restringir la denominació de malalties per a les que són d'origen parasitari (l'agent causal és un microorganisme viu), i donar el nom d'alteracions o desordres als problemes d'origen abiòtic o fisiològic. Degut al pH baix dels teixits dels cítrics, i de la majoria de fruits en general, els agents patògens productors de la gran majoria de malalties de postcollita són fongs, més concretament floridures; la simptomatologia que produeixen als fruits són les podridures. Les pèrdues degudes a podridures parasitàries són molt variables i depenen de l'àrea productora, l'espècie i el cultivar, l'edat i condició dels arbres, les condicions climatològiques durant tota la campanya, l'època i la forma de recol·lectar, el maneig dels fruits en postcollita i les condicions d'emmagatzemament (Eckert i Brown, 1986). Diversos seguiments en centrals cítriques i mercats de destí (Bancroft *et al.*, 1984; Ceponis i Capellini, 1985; Ceponis *et al.*, 1986) xifren entre un 4 i un 10% de la producció el total de pèrdues en postcollita de cítrics per a consum en fresc (no processats industrialment) i assenyalen que entre un 75 i un 80% d'aquestes pèrdues són degudes a podridures; la resta es deuen majoritàriament a fisiopaties de la pell i a danys mecànics. Tuset (1987) indica que en les condicions espanyoles les pèrdues parasitàries poden suposar d'un 3 a un 6% de tota la producció comercialitzada en una campanya normal mitja, i poden superar el 8% si la climatologia en el període de recollecció és especialment favorable al desenvolupament de les floridures (temperatura superior als 24°C i humitat ambiental elevada). Aquest autor, assumint les dificultats pròpies de realitzar una estimació d'aquest tipus, considera que a l'Estat espanyol, amb una producció total de cítrics de 4 milions de tones (any 1987) destinades en un 60% a l'exportació, en un 10% a la indústria i en un 30% al consum interior, les pèrdues per podridures parasitàries se situen al voltant dels 6.000 milions de pessetes, podent-se duplicar fàcilment aquesta xifra en casos de climatologia favorable a la incidència dels fongs. Això dóna idea de la importància econòmica de les malalties de postcollita, i més si es té en compte que l'any 1996 la producció espanyola ja superava els 4,5 milions de tones (AEA, 1999).

Part del present treball de tesi doctoral s'emmarca en un projecte de desenvolupament d'un programa de producció integrada de cítrics a Catalunya. A les comarques de Tarragona es cultiva més del 99% de la producció catalana de cítrics, que l'any 1998 amb 7.740 ha plantades va ser de 87.272 tones (EAPC, 1998). Aproximadament el 95% de la producció de Tarragona es concentra a les dues comarques més meridionals, el Baix Ebre i el Montsià, aquesta darrera colindant amb la província de Castelló. La principal espècie cultivada, per damunt de la taronja, és la mandarina clementina (*Citrus reticulata* Blanco), amb unes 4.000 ha plantades l'any 1998. La varietat més important és la "Clemenules", coneguda també com "Clementina de Nules". La superfície plantada pràcticament s'ha duplicat durant els darrers deu anys i el cultiu, encara en contínua expansió, ha passat a constituir un dels principals motors econòmics de la zona. Actualment, la producció de mandarina a Tarragona suposa aproximadament el 3% de la producció total espanyola i la major part d'aquesta producció es destina als mercats foranis, principalment de la UE (EAPC, 1998).

Pel que fa referència a la patologia de postcollita, el primer pas a l'endegar un projecte de producció integrada és caracteritzar les poblacions fúngiques en camps representatius de tota la zona productora i determinar els nivells de contaminació fúngica en les centrals cítriques de la zona. Aquests nivells i, en última instància, la importància econòmica de les malalties de postcollita estaran fortament condicionats per les condicions ambientals locals de la zona productora en qüestió. L'estudi de la presència i distribució dels fongs patògens permetrà establir riscos potencials de pèrdues i planificar adequadament els mitjans de control.

## Classificació i descripció de les principals malalties

La classificació més generalitzada de les malalties de postcollita de cítrics s'ha fet atenent al moment en què té lloc la infecció. S'han establert dos grans grups: el grup de les infeccions en precollita i el grup de les infeccions en postcollita (Eckert i Eaks, 1989).

En les malalties del primer grup, les estructures infectives del patògen arriben a les flors o als fruits durant el seu desenvolupament en camp i romanen inactives fins que un cop collits els fruits, o en ocasions al mateix camp, les condicions ambientals i/o canvis en l'estat de l'hoste associats a la

maduració propicien el desenvolupament de la malaltia. Aquestes infeccions inactives s'anomenen latents quan no són visibles a simple vista i quiescents quan ho són (Eckert i Ogawa, 1985). Els teixits de fruits joves o immadurs presenten normalment nivells alts de resistència inherent o induïda que eviten l'activació dels patògens (Eckert i Ratnayake, 1981). Simmonds (1963) planteja quatre possibles explicacions de per què els patògens en fase inactiva esdevenen actius: i) per la presència en el fruit verd de toxines que desapareixen en madurar, ii) el fruit verd no proporciona al patogen els elements nutritius adequats, iii) els requeriments energètics per al desenvolupament de la malaltia només es poden veure satisfets quan el fruit ja ha madurat i iv) la producció d'enzims per part del patogen no és suficient per envair el fruit immadur. La font d'inòcul causant d'aquest tipus de malalties es troba al camp, al sòl o en òrgans vegetals, i l'inòcul es disemina per l'aire i/o per l'aigua de pluja (Viñas, 1990).

En el grup de malalties amb infeccions en postcollita, la infecció té lloc a través de ferides de la pell produïdes principalment durant la recol·lecció, transport o maneig en central dels fruits, encara que també les han pogut produir en camp distints agents biòtics (insectes, àcars, ocells, etc.) o abiòtics (aigua, vent, calamarsa, etc.) (Roth, 1967; Snowdon, 1990). En ferides recents, els teixits frescos queden totalment desprotegits, possibilitant que es produeixi fàcilment la infecció. Encara que no és el cas més generalitzat, alguns patògens com per exemple *Botrytis cinerea*, són capaços de penetrar directament la cutícula del fruit. En alguns casos, i en funció de les condicions ambientals, les ferides esdevenen resistents al cap d'uns dies o inclús al cap d'unes hores (Eckert i Ogawa, 1985). En aquestes malalties la font d'inòcul pot trobar-se al camp però també pot trobar-se a les pròpies centrals cítriques, a les parets, a la superfície de les instal·lacions o als embalatges. En aquest darrer cas, la diseminació de l'inòcul pot tenir lloc, a més de per l'aire, per l'aigua de drénxers o banys o per contacte fruit-embalatge i, en el cas de floridures formadores de nius, també per contacte fruit infectat-fruit sa (Viñas, 1990). Per minimitzar la incidència cal recol·lectar en el període adequat, amb la maduresa dels fruits requerida i sempre amb temps sec. Resulta crítica una recol·lecció el més acurada possible, sense cops ni ferides. També és molt important portar a terme periòdicament a les centrals cítriques una neteja i desinfecció acurades.

La incidència, i conseqüentment la importància econòmica, de les malalties d'ambdós grups es veu enormement influenciada per les condicions ambientals de cada zona productora: la temperatura i la humitat relativa (HR) que es donen al camp, especialment durant el període anterior a la recol·lecció, determinen directament la quantitat d'inòcul disponible i la seva capacitat de diseminació i de contaminació dels fruits (Snowdon, 1990). En àrees amb estius poc plujosos com la zona mediterrània o, com per exemple, Califòrnia o la major part de Sudàfrica, les pèrdues totals per podrits són considerablement menors que en àrees amb estius més plujosos com Florida, Brasil o zones humides d' Austràlia (Eckert i Eaks, 1989).

En aquestes zones més humides són molt importants les infeccions en precollita, principalment a les flors i als fruits joves. Les principals malalties són les anomenades podridures pedunculars, causades pels patògens *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon i Maubl. (sinònim: *Diplodia natalensis* Pole-Evans) i *Phomopsis citri* H. Fawc.; la podridura per *Alternaria* o podridura negra, causada per *Alternaria citri* Ellis i Pierce, i de forma secundària també per *A. alternata* (Fr.:Fr.) Keissl.; la podridura marró o aigua, causada per *Phytophthora citrophthora* (R.E. Sm. i E.H. Sm.) Leonian o per *P. citricola* Sawada; la podridura gris, causada per *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.; i l'antracnosi, causada per *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. i Sacc. (Fawcett, 1936; Smoot *et al.*, 1971; Whiteside *et al.*, 1993). En les nostres condicions mediterrànies els problemes ocasionats per les podridures pedunculars esdevenen pràcticament anecdòtics; segons els anys i les zones poden tenir certa importància les podridures negra, gris i marró, i també l'antracnosi (Tuset, 1987). Tuset (1998) indica que algunes d'aquestes malalties es troben actualment en progrés i cada cop augmenta més la seva incidència.

En les condicions climàtiques mediterrànies com són les d'Espanya, Itàlia, Israel o Califòrnia destaquen les malalties que s'originen amb infeccions en postcollita (Pratella *et al.*, 1969; Gutter, 1977; Tuset, 1987). Els agents causals d'aquestes malalties solen anomenar-se patògens de ferida. Les més importants són la podridura verda, causada per *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. i la podridura blava, causada per *Penicillium italicum* Wehmer; després destaquen la podridura àcida o amarga, causada per *Geotrichum citri-aurantii* (Ferraris) E.E. Butler (sinònim: *G. candidum* Link ex Pers.) i la podridura per *Rhizopus*, causada per *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill., i en certes ocasions (Tuset *et al.*, 1992) per *R. oryzae* Went i P. Gerlign (sinònim: *R. arrhizus* Fischer).

Altres podridures considerades com a malalties menors en postcollita de cítrics són (Smoot *et al.*, 1971; Tuset, 1987; Whiteside *et al.*, 1993; Tuset, 1998): la podridura verd-grisosa, causada per *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link; la podridura per *Trichoderma*, causada per *Trichoderma viride* Pers. ex Gray o per *T.*

*aureoviride* Rifai; la podridura rosa, causada per *Gliocladium roseum* Bainier; la podridura per *Fusarium*, causada per *Fusarium oxysporum* Schlecht.:Fr. o *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.; la podridura cotonosa, causada per *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary; la podridura negra, causada per *Aspergillus niger* Tiegh.; i la podridura per *Pleospora*, causada per *Pleospora herbarum* (Pers.:Fr.) Rabenh.

Tuset *et al.* (1980) i Tuset (1987) van quantificar la incidència de les malalties de postcollita en centrals cítriques valencianes. La podridura verda va representar entre un 55 i un 80% del total de podrits parasitaris en taronges i mandarines durant tota la comercialització, i entre un 30 i un 55% del total durant l'emmagatzemament en cambra frigorífica. La podridura blava va resultar ser la segona malaltia més important durant tota la comercialització (entre 2 i 30% del total de podrits), però la primera durant la conservació frigorífica (més del 50% del total de podrits).

### La podridura verda

La podridura verda és la malaltia de postcollita dels cítrics més generalitzada arreu del món i la de major importància econòmica en les àrees subtropicals àrides. En les àrees subtropicals humides la seva incidència és similar en nombres absoluts però en proporció queda disminuïda per la tremenda incidència de les podridures pedunculars (Eckert i Brown, 1986).

L'agent causal, *P. digitatum*, és un deuteromicet de la família Moniliaceae. Es tracta d'un fong imperfecte, sense fase sexual coneguda. Les hifes són cilíndriques, sovint solitàries. Els conidiòfors formen rames irregulars tabicades. Les espores asexuades o conidis es generen per escissió en cadenes de longitud variable i poden presentar distints tamanys i formes inclús dintre de la mateixa cadena; majoritàriament són el·lipsoidals de dimensions 3,5-8,0 x 3,0-4,0 µm (Samson *et al.*, 1995).

Les colònies fúngiques crescudes en medis nutritius artificials són d'aparença similar a la podridura que es desenvolupa en fruits infectats. Smilanick i Eckert (1986) van desenvolupar medis de cultiu selectius per a l'aïllament de *P. digitatum*. El creixement de la floridura és òptim a temperatures al voltant de 24°C i molt lent a temperatures superiors als 30°C o inferiors als 10°C; a 1°C queda pràcticament inhibida (Whiteside *et al.*, 1993). La malaltia es manifesta inicialment com una taca circular a la superfície de la pell envoltant el punt d'infecció, d'uns 0,6-1,2 cm de diàmetre, tova, aquosa i lleugerament descolorida. Aquesta taca s'engrandeix ràpidament a temperatures entre 15 i 28°C i al centre comença a aparèixer miceli aeri de color blanc. Quan el miceli ocupa una àrea d'uns 2,5 cm de diàmetre, es comencen a produir espores de color verd-oliva. L'àrea d'esperulació està envoltada per una ampla franja de miceli blanc i per una altra franja externa molt més prima de teixit tou i descolorit. En condicions d'humitat alta, el fruit queda totalment cobert d'espores i internament descompost al cap d'entre 5 i 10 dies. Tots els fruits cítrics són susceptibles a la podridura verda. La susceptibilitat varia segons l'espècie i el cultivar; en ordre decreixent trobem: taronges, mandarines, llimones i aranges (Eckert i Brown, 1986).

*P. digitatum* pot contaminar els fruits en camp, en magatzem i/o durant la distribució i venda als mercats a través dels conidis que, a partir de fruits malalts, es diseminen molt fàcilment i en grans quantitats per l'aire, sobretot en condicions de baixa humitat ambiental. El fong sobreviu de campanya a campanya al camp, primàriament en forma de conidis. A les centrals cítriques, el cicle d'infecció i esporulació es pot repetir moltes vegades durant la mateixa campanya, de manera que si no s'adopten mesures adequades, la pressió d'inòcul pot anar augmentant a mesura que avança la temporada. Es tracta d'un patògen de ferida estricta: les espores situades a la superfície del fruit no germinen si no es produeix una ferida o una microferida al flavedo. La germinació dels conidis requereix aigua lliure i nutrients (Green, 1932). Si la ferida penetra uns 2 o 3 mm dins l'albedo o afecta una glàndula d'oli essencial, la infecció esdevé irreversible al cap d'uns 2 dies a 20-25°C (Eckert i Eaks, 1989). En el procés infectiu, *P. digitatum* produeix una exopoligalacturonasa que catalitza la hidròlisi terminal de l'àcid pèctic i resulta en l'acumulació al teixit malalt d'àcid galacturònic lliure; aquest àcid, juntament amb la pròpia exopoligalacturonasa i una pectinmetilesterasa produïda per l'hoste sembla ser el responsable de la maceració dels teixits infectats (Barmore i Brown, 1979). Algunes substàncies presents a l'oli essencial, com per exemple la llimonina i la prangolarina en llimones afavoreixen el desenvolupament de la malaltia (Arimoto *et al.*, 1995). D'altra banda, certs compostos químics volàtils produïts a les ferides de la pell induïxen la germinació dels conidis (Eckert i Ratnayake, 1994).

Les ferides causants d'infecció són majoritàriament ferides mecàniques que es produeixen durant la recol·lecció i el maneig en postcollita dels fruits, però que també s'han pogut produir anteriorment al camp (Roth, 1967). No obstant, també pot tractar-se de ferides induïdes fisiològicament, com són les degudes a distintes fisiopaties de la pell, oleocelosis d'etiologies diverses (trencament de glàndules

oleíferes i sortida d'oli essencial que és fitotòxic per a les cèl·lules epidèrmiques amb les que contacta) o danys per fred (Whiteside *et al.*, 1993). La incidència d'algun d'aquests desordres pot estar relacionada amb certes pràctiques culturals; per exemple, la fertilització abundant i la irrigació molt freqüent (reg localitzat) poden provocar sobrepressions hídriques en el teixit glandular que poden ser causa d'oleocelosi (Tuset, 1998).

### **La podridura blava**

La podridura blava és, després de la podridura verda, la segona malaltia de postcollita de major importància econòmica en les àrees subtropicals àrides. No obstant, esdevé la primera en certes condicions desfavorables per al desenvolupament de la podridura verda. La temperatura òptima de creixement de la floridura causal, *P. italicum*, és la mateixa que la de *P. digitatum* (24°C), però *P. italicum* creix més lentament que *P. digitatum* a temperatures ambientals (de 15 a 28°C). *P. italicum*, en canvi, és una espècie més adaptada a temperatures inferiors als 10°C, motiu pel qual la incidència de la podridura blava durant la conservació frigorífica dels fruits cítrics és normalment superior a la incidència de la podridura verda (Whiteside *et al.*, 1993).

*P. italicum* és també un deuteromicet de la família Moniliaceae. Les hifes són cilíndriques, més primes i ramificades que les de *P. digitatum*. Els conidiòfors i les cadenes de conidis presenten, a diferència dels de *P. digitatum*, la forma de pinzell típica del gènere *Penicillium*. Els conidis són més petits que els de *P. digitatum* (3,0-5,0 x 2,5-3,5 µm) i són majoritàriament de forma cilíndrica, encara que també poden ser el·lipsoidals o ovalats (Samson *et al.*, 1995).

L'aspecte de la floridura és molt semblant *in vitro* i *in vivo*. Els primers símptomes de la malaltia són iguals que els de la podridura verda. Al centre de la lesió apareix miceli blanc que a temperatura ambient creix més lentament que el de *P. digitatum*, però esporula més ràpidament. En conseqüència, la franja de miceli blanc que envolta l'àrea esporulada, de color blau, és molt menys ampla que en el cas de la podridura verda. També contràriament al cas de la podridura verda, entre el miceli blanc i el perímetre de la lesió queda una ampla franja de teixit tou, descolorit i de consistència aquosa que es pot penetrar fàcilment amb el dit. Les masses d'espores blaves que cobreixen el fruit poden adoptar un color verd-marronós amb l'edat.

El cicle de la malaltia, el procés infecciós i els aspectes epidemiològics que determinen la incidència de la podridura blava són similars als de la podridura verda descrits en el subapartat anterior. *P. italicum* és també un patògen de ferida estricta que infecta totes les espècies de cítrics. A part de les diferències d'adaptació a distintes temperatures que s'han comentat, altres diferències destacables són que en el procés infectiu *P. italicum* produeix una endopoligalacturonassa enlloc de la exopoligalacturonassa produïda per *P. digitatum* (Barmore i Brown, 1981), que la podridura blava és capaç de propagar-se per contacte entre un fruit sa i un fruit malalt (Barmore i Brown, 1982), i que la podridura blava pot resultar predominant en fruits tractats amb benzimidazols perquè els aïllats de *P. italicum* desenvolupen resistències a aquests fungicides més freqüentment que els aïllats de *P. digitatum* (Gutter, 1975). Un altra diferència és que contràriament a altres espècies de *Penicillium* com són *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. frequentans* o *P. variable*, el miceli de *P. italicum* és capaç d'esporular estant submergit en distints medis líquids (van Gestel, 1983).

### **Control de les malalties de postcollita**

Els tractaments fungicides en postcollita amb productes químics de síntesi constitueixen, des que van començar a utilitzar-se massivament fa entre 40 i 50 anys, la base del control de les malalties de postcollita de cítrics. L'alt nivell d'eficàcia, la relativa economia i la comoditat d'aplicació van generalitzar la utilització d'aquests productes a totes les àrees productores de cítrics del món i fan que, tot i la greu problemàtica que comporten, encara resultin imprescindibles avui dia (Eckert i Ogawa, 1985). Malgrat tot, els tractaments en postcollita només són una de les possibles actuacions que cal considerar a l'hora de planificar globalment la lluita contra les malalties.



## **Estratègies generals de control**

És tenint en compte els distints aspectes de l'epidemiologia dels patògens causants de podridures que cada campanya, i per a cada cas particular concret, cal dissenyar les estratègies de control més adequades. A nivell general poden considerar-se les següents:

### ***Reduir la contaminació fúngica en precollita***

Inclou actuacions culturals com no recol·lectar quan la fruita està molla, racionalitzar l'ús del reg i l'adobat, retirar la fusta d'esporga i els fruits del terra o no deixar que embalatges amb fruita recol·lectada restin massa temps sota els arbres. També inclou tractaments fungicides en camp per disminuir la quantitat d'inòcul, tractaments insecticides per evitar picades en la pell dels fruits que posteriorment poden ser una via d'entrada per als patògens, i neteja i desinfecció dels embalatges de camp (Eckert i Brown, 1986).

### ***Mantenir o millorar la resistència dels fruits a la infecció***

El punt clau d'aquest tipus de lluita en les nostres condicions mediterrànies és realitzar una recol·lecció extremadament acurada que eviti al màxim la producció de ferides a la pell. La incidència de *Penicillium* presenta una correlació directa amb el nivell de danys infligits a la fruita durant la collita i posterior maneig (Christ, 1966). Els tractaments en precollita amb reguladors del creixement (2,4-D, àcid giberèlic, etc.) poden incrementar la resistència de la pell a les ferides i retardar-ne la senescència, cosa que redueix la susceptibilitat del fruit a les malalties (Brown, 1980). Tractaments amb algunes d'aquestes substàncies també poden realitzar-se en postcollita abans de l'emmagatzemament; a Califòrnia, per exemple, és normal tractar les llimones amb una solució aquosa de cera que conté de 250 a 500 ppm de 2,4-D (àcid 2,4-diclorofenoxiacètic, isopropil ester) (Eckert i Eaks, 1989).

Altres tractaments de postcollita també poden contribuir al manteniment de la resistència dels fruits. Les pròpies condicions de desverdiment o alguns tractaments de curat (com mantenir la fruita a 34-35°C durant 48-72 h) indueixen la síntesi de lignines i fenols en les ferides, compostos que formen una barrera mecànica a la invasió del patògen (Ben-Yehoshua *et al.*, 1989; Lanza, 1997). La conservació en fred normal o en atmosferes controlades amb alta humitat ambiental inhibeix la respiració de l'hoste i retarda la senescència de la pell, contribuint així a mantenir la resistència dels fruits al parasitisme (Schifmann-Nadel, 1977; Salunkhe i Desai, 1984). A més a més, els tractaments tèrmics com el curat o els banys en aigua calenta també poden induir en fruits ferits o infectats la producció de substàncies conferidores de resistència com les fitoalexines escoparona i escopoletina o les proteïnes quitinasa i  $\beta$ -1,3 glucanasa (Ferguson *et al.*, 2000). Altres tractaments físics com la radiació ionitzant o la llum ultraviolada, químics com el quitosan, o biològics com els microorganismes antagonics també poden, per distints mecanismes, induir resistències als fruits cítrics contra les malalties de postcollita (Wilson *et al.*, 1994).

### ***Reduir les poblacions dels patògens a les centrals cítriques***

La higienització de les centrals, això és, netejar i posteriorment desinfectar totes les instal·lacions i infraestructures del magatzem (zona de recepció de fruita, línies de confecció, cambres frigorífiques, etc.), així com els embalatges, abans de l'inici de la campanya i periòdicament durant la mateixa, resulta imprescindible per evitar reinfeccions dels fruits amb patògens de ferida com *Penicillium* spp. o *G. citri-aurantii* (Gardner *et al.*, 1986). Per a la neteja s'utilitzen comunament aigua a pressió i sabons alcalins i per a la desinfecció distints productes comercials a base de sals d'amoni quaternari, aldehids o compostos clorats. El fungicida sintètic ortofenil fenol també s'ha emprat com a desinfectant de superfícies. Un disseny adequat de la pròpia central i de les seves instal·lacions pot contribuir enormement a minimitzar la recontaminació de la central (separació eficient de zones brutes i netes, maneig adequat de la fruita destriada, facilitat de neteja dels equips, ubicació de les línies de confecció que permeti un accés fàcil a les zones més brutes, sistemes eficients de desguàs, etc.). Un programa de neteja i desinfecció efectiu hauria d'incloure una planificació temporal i de recursos humans acurada, així com un seguiment periòdic dels nivells de contaminació fúngica de l'ambient i de les superfícies de la central mitjançant mostres amb plaques amb medi patata dextrosa agar (PDA) o un altre medi de cultiu adequat per al creixement de les floridures.

El procediment més habitual per reduir la càrrega d'inòcul patogènic de la fruita que arriba del camp és la neteja amb solucions clorades. Normalment l'aplicació es fa en bany o dutxa a baixa pressió a l'inici de la línia de confecció barrejant el clor amb detergents i esbandint els fruits després. La font de clor

majoritàriament és l'hipoclorit sòdic (NaClO), però també pot ser l'hipoclorit càlcic (CaCl<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el clor gas (Cl<sub>2</sub>) o distintes cloramines (R<sub>x</sub>Cl<sub>y</sub>N). Altres alternatives que s'han provat amb aquest propòsit són el diòxid de clor (ClO<sub>2</sub>), l'ozó en aigua (O<sub>3</sub>) o l'àcid peroxiacètic (HCH<sub>3</sub>CO<sub>3</sub>) (Suslow, 1997). L'activitat fungicida de les solucions de clor augmenta amb la concentració, la temperatura i el temps de exposició i disminueix amb el pH (Segall, 1968). És normal clorar les solucions de neteja amb uns 200 ppm de NaClO. El pH recomanat per al tractament està entre 6,5 i 7,5; a pH superiors l'efecte biocida és reduït perquè en la dissolució aquosa en equilibri hi ha una proporció baixa d'àcid hipocloròs (HClO), que és la forma més activa contra els microorganismes, i alta d'ió hipoclorit (ClO<sup>-</sup>); a pH inferiors la solució és més efectiva però molt inestable, alliberant-se fàcilment clor gas a l'atmosfera. És important prendre periòdicament mostres i controlar els nivells de pH i clor actiu de les solucions. El HClO oxida la matèria orgànica molt més ràpidament que l'ió ClO<sup>-</sup> i, en conseqüència, presenta una activitat antimicrobiana molt més alta. Aquests tractaments d'higienització maten per contacte les espores fúngiques presents a la superfície del fruit però no controlen els patògens de ferida quan la infecció ja ha començat el seu desenvolupament, no podent, per tant, ésser utilitzats per substituir als fungicides sintètics (Brown i Wardowski, 1984). Tot i això, són tractaments especialment importants quan l'efectivitat dels fungicides comuns no és satisfactòria, ja sigui perquè no controlen un patògen concret o perquè han proliferat soques resistents. L'addició de NaClO als drenchers o banys on s'apliquen aquests fungicides evita l'acumulació d'espores de *G. citri-aurantii* o de soques de *Penicillium* spp. resistents als fungicides (Eckert i Eaks, 1989). També s'ha comprovat que aquests tractaments controlen de manera efectiva les poblacions bacterianes de la superfície dels cítrics i particularment les poblacions de coliforms fecals perillosos per a la salut humana com poden ser *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. o *Escherichia coli* (Pao i Brown, 1998).

Un altre procediment d'higienització habitual durant un temps als EUA va ser la fumigació de les cambres, especialment les de llimones, amb triclorur de nitrogen (NCl<sub>3</sub>; Eckert i Eaks, 1989). Aquest compost és un desinfectant eficaç a concentracions més baixes que el clor i, a diferència del clor, és capaç de controlar els podrits en fruita inoculada (Klotz, 1936). Malgrat això, va deixar d'utilitzar-se perquè en ambients humits el NCl<sub>3</sub> es descomposa en HClO i HCl, compostos que danyen les estructures metàl·liques de les cambres de conservació.

### ***Tractaments antifúngics en postcollita***

Alguns dels tractaments que s'han comentat anteriorment per ajudar a mantenir la resistència dels fruits a la infecció, poden tenir, a més, una acció directa sobre els patògens. Tractaments tèrmics com el curat o l'aigua calenta poden exercir una acció directa de control per inhibició tèrmica de la germinació de les espores o del creixement miceliar de les floridures (Barkai-Golan and Phillips, 1991; Lurie, 1998). La conservació a temperatures baixes i/o en atmosferes modificades retarda i en alguns casos inhibeix totalment el desenvolupament de les podridures. El creixement de patògens importants com per exemple *G. citri-aurantii* o *R. stolonifer* queda parat pràcticament de manera indefinida a temperatures pròximes als 0°C (Eckert, 1977). Els factors limitants són els danys per fred, el possible augment de la incidència de malalties causades per patògens que, com *P. italicum*, *A. citri*, *B. cinerea* o *C. herbarum*, estan més adaptats a les baixes temperatures i l'efecte transitori del tractament. Normalment, quan acaba el període de conservació frigorífica i els fruits són retornats a temperatures ambientals, les podridures reestableixen ràpidament el seu desenvolupament normal.

Malgrat tot, la gran majoria de tractaments antifúngics, tant preventius com curatius, que actualment es porten a terme a les centrals cítriques de tot el món es realitzen amb productes químics de síntesi. Malauradament encara són molts pocs els tractaments alternatius disponibles a nivell comercial i els pocs que s'han implementat no han satisfet les expectatives que s'havia dipositat en ells en les fases de recerca experimental.

### **Fungicides de síntesi**

Les matèries actives més utilitzades són els imidazols (imazalil i procloraz), els benzimidazols (tiabendazol i benomil), i l'ortofenilfenat sòdic (SOPP) (Eckert i Brown, 1986). L'aplicació habitual a les centrals espanyoles és en drénxer sobre els embalatges tal qual arriben del camp, en bany o màquina d'escuma barrejats amb detergents com el dodecilbenzè sulfonat sòdic al principi de la línia de confecció, o en dutxa sols o barrejats amb les ceres després del rentat i la primera selecció (Correas i Miranda, 1990). En casos especials, com pot ser quan es detecten en central problemes greus de podridures per *G.*

*citri-aurantii* o *Rhizopus* spp., s'utilitzen la guazatina i el dicloran respectivament (Roger Amat, 1988). Als EUA és freqüent la utilització en taronges i llimones (no en mandarines) de paper impregnat amb bifenil en partides que s'exporten a mercats molt llunyans (Eckert i Brown, 1986).

### **Problemàtica de la utilització de fungicides de síntesi**

La utilització massiva, continuada i en alguns casos poc controlada dels fungicides sintètics ha generat una sèrie de problemes greus com són la proliferació de soques dels patògens resistents a aquests productes químics i a altres d'estructura o propietats similars, l'increment de residus als fruits amb el consegüent increment dels riscos per a la salut humana i el medi ambient, i l'aparició de malalties iatrogèniques.

### **Soques dels patògens resistents als fungicides**

Tot i que en postcollita de cítrics ja s'havien detectat casos amb anterioritat (Duran i Norman, 1961; Harding, 1962), va ser als anys 70 quan va tenir-se constància als EUA de què no es tractava d'un problema puntual (Harding, 1972; Houck, 1977). Des d'aquell moment, un gran nombre d'estudis han posat de manifest la importància real a tot el món del problema de les resistències.

Encara que s'ha demostrat que moltes altres espècies fúngiques desenvolupen resistències, la gran majoria d'estudis s'han referit, per la seva importància econòmica, a les desenvolupades per aïllats dels patògens *P. digitatum* i *P. italicum* exposats continuadament a l'ortofenilfenat sòdic i a fungicides dels grups dels imidazols i dels benzimidazols. Per a les dues floridures s'han descrit casos tant de resistència simple com de resistència creuada i múltiple (Gutter *et al.*, 1981; Brown, 1982; De Waard *et al.*, 1982; El-Goorani *et al.*, 1983; Eckert, 1990; Bus *et al.*, 1991). A nivell de l'Estat espanyol, durant la dècada dels 80 van quantificar-se i caracteritzar-se les soques de *Penicillium* spp. resistents a diversos fungicides presents a les cambres frigorífiques i de desverdiment de centrals cítriques de la zona de València (Díaz *et al.*, 1987a, 1987b, Díaz i Vila, 1988, 1989).

La rapidesa del cicle reproductiu (una generació en uns 7 dies a temperatura ambient) i l'enorme facilitat amb què les noves espores són dispersades per l'aire des de fruits malalts cap a fruits sans fan que, comparativament, les espècies del gènere *Penicillium* siguin més propenses a desenvolupar resistències que altres espècies patògenes (Eckert i Eaks, 1989). La gravetat del problema ha fet fracassar distints programes de control de malalties de postcollita. En alguns casos, l'increment sobtat de les podridures i la desconexió de les causes d'aquest increment han portat a augmentar les dosis de fungicides utilitzades, cosa que, degut a l'augment de la pressió de selecció sobre el patògen, lluny de solucionar el problema, només l'ha empitjorat i, a més a més, amb un cost econòmic considerable. En algunes centrals cítriques de Califòrnia, va comprovar-se que, com a conseqüència de la proliferació de soques de *P. digitatum* resistents a l'imazalil, les dosis màximes permeses d'aquest fungicida no controlaven l' esporulació del patògen i pràcticament no reduïen la incidència de la podridura verda (Eckert *et al.*, 1994). També en centrals californianes, la proporció d'aïllats de *P. digitatum* amb resistència múltiple als fungicides imazalil, tiabendazol i o-fenilfenol es va duplicar en sis anys (Holmes i Eckert, 1999). En aquest estudi, la freqüència de biotipus de *P. digitatum* resistents a l'imazalil va ser molt superior a la de biotipus resistents de *P. italicum*. Gutter (1975) indica que, en canvi, els aïllats de *P. italicum* desenvolupen resistències als benzimidazols més freqüentment que els aïllats de *P. digitatum*.

### **Residus a la fruita**

La problemàtica dels residus de pesticides als fruits és especialment important perquè són parts de la planta que poden ésser consumides en fresc i, per tant, directament ingerides. Quan els productes químics són aplicats en postcollita, la preocupació pels seus possibles efectes nocius encara esdevé més notòria degut a la proximitat temporal entre els tractaments i el consum. Distints informes alerten dels riscos per a la salut humana associats a l'ús de fungicides. En un estudi de l'any 1987 de la "National Academy of Sciences" dels EUA es va posar de manifest que el 90% dels fungicides comercialitzats presentaven components cancerígens. La preocupació encara és més gran quan es consideren els riscos de la presència de residus a la dieta de la mainada (NRC, 1993).

Els residus a la fruita no poden excedir el límit màxim de residus (LMR) establert per l'administració de cada país per a cada matèria activa concreta (Dezman *et al.*, 1986). Aquest límit sol ésser bastant

restrictiu, especialment en els països més desenvolupats. Sovint, no obstant, aquest límit difereix de forma important entre uns estats i uns altres, la qual cosa s'utilitza per establir barreres al comerç. A l'Estat espanyol, el LMR en postcollita de cítrics és de 5 ppm per a l'imazalil, procloraz i guazatina, 6 ppm per al tiabendazol, 12 ppm per al SOPP i 0,5 ppm per al dicloran.

La quantitat de residus d'un fungicida sobre el fruit depèn bàsicament de les propietats intrínseques del propi fungicida, de la dosi aplicada i de la forma d'aplicació. En assajos amb equipament comercial de polvorització, els residus d'imazalil en taronges foren més alts quan es va aplicar dissolt en aigua que quan es va aplicar barrejat amb la cera (Brown *et al.*, 1983). Banyes en solucions aquoses calentes d'imazalil, per contra, van deixar menys residus i van ser més efectives en el control de la podridura verda en taronjes que aplicacions comercials d'imazalil barrejat amb la cera (Smilanick *et al.*, 1997b). Els nivells de residus d'imazalil o tiabendazol sobre la pell d'aranges o llimones immersos en solucions a 20 o 50°C van variar en funció de la temperatura de la solució i de la data de collita dels fruits (Schirra *et al.*, 1997b, 2000b).

### **Malalties iatrogèniques**

Les malalties iatrogèniques són aquelles que apareixen o incrementen la seva severitat degut a la utilització d'un producte químic en la protecció d'un conreu (Griffiths, 1981). Un dels exemples clàssics d'aquest fenomen, al que Yarwood (1970) denominava "malalties fetes per l'home" és el de la cendrosa als EUA.

Els fungicides sistèmics tenen especificitat en el control dels patògens, però al mateix temps eliminen una àmplia varietat de fongs sapròfits no patogènics, afavorint l'aparició de malalties iatrogèniques (Vyas, 1988). Els benzimidazols són un cas clar de fungicides que han afavorit l'aparició de noves malalties amb importància econòmica. Un exemple en postcollita de cítrics podria ser l'augment de la incidència de la podridura amarga arran dels tractaments químics amb benzimidazols i imazalil contra *Penicillium* spp. *G. citri-aurantii* no és controlat per cap d'aquests fungicides i possiblement es beneficia de la reducció de les poblacions de competidors que sí són sensibles als fungicides (Roger Amat, 1988).

### **Sistemes de control alternatius als fungicides de síntesi**

Essent la utilització de fungicides de síntesi un mètode de control de malalties poc desitjable pels problemes ambientals i de salut que comporta, la indústria de la conservació i comercialització de fruits cítrics ha d'assumir les exigències d'una legislació cada cop més restrictiva en tot allò referent a l'ús d'aquests productes. D'altra banda, però, existeix cada dia més una demanda social de fruita de qualitat, amb bon aspecte físic i estat sanitari adequat. Davant aquesta situació no és d'estranyar que actualment una de les prioritats màximes del sector cítricol sigui trobar i desenvolupar nous sistemes de control que per sí sols o en combinació garanteixin una eficàcia similar a la dels fungicides sintètics a un cost raonable i sense afectar adversament la qualitat final de la fruita. Aquest és l'objectiu bàsic d'aquesta tesi doctoral i de moltes altres línies de recerca arreu del món.

Aquest objectiu és encara més important en el contexte del control integrat de plagues i malalties o, més ample encara, en el de la producció integrada de cítrics, conceptes que neixen en un intent de racionalitzar les pràctiques agrícoles. Tots els recursos i esforços que s'estan esmerçant en aconseguir un control integrat que permeti minimitzar les aplicacions de pesticides en camp, i obtenir així una fruita lliure de residus, no tindrien gaire sentit si en postcollita, quan més a prop del consumidor està aquesta fruita, es continuessin utilitzant els tractaments químics de forma indiscriminada. L'objectiu ideal de qualsevol programa de producció integrada seria l'eliminació total dels fungicides sintètics en postcollita, però la manca d'alternatives ha fet que la legislació proposi una fase transitòria en la qual encara s'admeten, però amb restriccions. En el cas de Catalunya, està a punt de publicar-se al DOGC la nova Norma Tècnica per a la Denominació Genèrica Producció Integrada dels Cítrics, la qual preveu la utilització de l'imazalil, l'ortofenilfenol i el tiabendazol restringida a l'autorització del tècnic assessor i sota el seu control. La Norma estableix també que cal garantir uns continguts de residus als fruits inferiors al 50% del límit establert per la legislació vigent i recomana que aquestes matèries actives no s'apliquin més d'un cop sobre la mateixa fruita (NTDGPIC, 2001).

Segons la seva naturalesa, els sistemes alternatius als fungicides de síntesi poden classificar-se en físics, químics i biològics.

## Sistemes físics

### *Conservació frigorífica*

La conservació a baixes temperatures és el sistema utilitzat comercialment sempre que es pretèn retardar per un període de temps considerable l'arribada als mercats dels fruits cítrics. L'emmagatzemament a temperatura baixa, humitat alta i ventilació adequada ralentix la respiració i disminueix les pèrdues d'aigua dels fruits, retardant l'entrada en la fase de senescència (Grierson i Ben-Yehoshua, 1986). Com ja s'ha comentat, aquest alentiment de l'activitat metabòlica del fruit afecta al desenvolupament de malalties tant de forma indirecta, ajudant a mantenir la resistència del fruit a la infecció, com de forma directa, retardant o inhibint el creixement dels patògens. No obstant, no es tracta d'una acció permanent i la conservació frigorífica per sí sola no pot garantir una incidència baixa de malalties (Eckert, 1977). En aquest sentit, més que un mètode alternatiu als fungicides sintètics, es podria considerar un sistema complementari a altres tractaments antifúngics de postcollita.

El potencial de conservació en fred dels fruits cítrics és molt variable i depèn de l'espècie, el cultivar i multitud de factors de precollita, collita i postcollita (Grierson i Ben-Yehoshua, 1986). Les condicions de conservació recomanades en general són de 85-95% HR i de 4-8°C per a les taronges, 12-14°C per a les llimones i aranges, 10-12°C per a les llimes i 5-8°C per a les mandarines (Kader i Arpaia, 1992). En les condicions espanyoles, les taronges solen conservar-se al voltant dels 3°C (Roger Amat, 1988). Les taronges del grup "Navel" són més sensibles al desenvolupament de fisiopaties i podridures durant la conservació frigorífica que les taronges de la varietat "Valencia Late". Mentre que a 6°C el potencial de conservació de les primeres és de 6-8 setmanes, el de les darreres és de 10-12 setmanes (Arras i De Cicco, 1994).

### *Conservació frigorífica en atmosferes controlades*

#### *Atmosferes controlades convencionals*

La principal finalitat de l'emmagatzemament de fruits cítrics a baixa temperatura en atmosferes amb menys oxigen (O<sub>2</sub>) i més diòxid de carboni (CO<sub>2</sub>) que l'aire és allargar la vida fisiològica dels fruits i mantenir durant més temps la seva qualitat (Brown, 1980). Des del punt de vista del control de malalties, les atmosferes controlades poden tenir, de la mateixa manera que la conservació en fred normal, un efecte directe i indirecte sobre els patògens (Kader, 1986). En aquest sentit, aquest tipus de conservació també pot considerar-se més aviat un sistema complementari que un sistema substitutiu dels tractaments antifúngics.

La utilització d'atmosferes controlades no s'ha generalitzat fins ara a nivell comercial perquè els avantatges que proporciona no compensen els elevats costos d'instal·lació i manteniment. A nivell de recerca, la seva utilització no ha donat, en general, millors resultats que la conservació convencional en fred, ni en la preservació de la qualitat del fruit ni en la prevenció de podridures o danys per fred (Brown, 1980; Grierson i Ben-Yehoshua, 1986). De fet, distints treballs indiquen una major incidència de podrits en fruits cítrics emmagatzemats sota certes condicions d'atmosfera controlada que en fruits emmagatzemats en atmosfera d'aire (Chace, 1969; Harding, 1969; Aharoni and Lattar, 1972). En alguns casos, com el de *G. citri-aurantii*, el patògen creix inclús més ràpid a concentracions baixes d'O<sub>2</sub> que en aire (Wells i Spalding, 1976). En altres estudis, en canvi, s'ha observat un efecte beneficiós de les atmosferes controlades. Per exemple, en taronges "Valencia Late" es va trobar una incidència de podrits menor després de la conservació en 10 o 15% O<sub>2</sub> i 0% CO<sub>2</sub> que després de la conservació en aire (Smoot, 1969). En altres casos l'efecte beneficiós s'ha observat només a l'eliminar de l'atmosfera de la cambra l'etilè produït pels fruits (McGlasson i Eaks, 1972; Wild *et al.*, 1976). Alguns estudis amb mandarines "Satsuma" (Oogaki i Manago, 1977) i "Kinnow" (Singh i Singh, 1996) indiquen un efecte positiu de les atmosferes controlades en la qualitat i en el potencial de conservació del fruit; no obstant, no indiquen com les condicions de conservació afecten a la incidència de podridures.

Segons Kader i Arpaia (1992), les concentracions de gasos en les condicions normals de conservació en atmosfera controlada, en cas que aquesta s'utilitzi, serien de 5% O<sub>2</sub> i 0-5% CO<sub>2</sub> per taronges i llimones i 5% O<sub>2</sub> i 5-10% CO<sub>2</sub> per aranges i llimes.

Altres tipus d'atmosferes controlades que no es basen només en la manipulació de les concentracions d'O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub> inclouen la utilització de monòxid de carboni (CO) i la conservació en atmosferes hipobàriques.

#### *Atmosferes amb monòxid de carboni*

Una atmosfera amb el 2-3% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub> enriquida amb el 5-10% CO produeix un efecte fungiestàtic sobre la majoria dels fongs causants de podridures en postcollita sense produir fitotoxicitats aparents (El-Goorani i Sommer, 1979; Kader, 1986). Però el CO és un gas inflamable a concentracions entre el 12 i el 75% i el seu ús requereix prendre precaucions per a la seguretat del personal i pot resultar bastant car.

#### *Atmosferes hipobàriques*

La conservació o transport de fruits a pressions ambientals inferiors a la atmosfèrica (760 mm Hg) incrementa la difusivitat de compostos volàtils com l'etilè i redueix la pressió parcial de l'O<sub>2</sub> i el CO<sub>2</sub>, permetent en certs casos allargar la conservació de fruites, verdures i flors tallades (Burg i Burg, 1966). Els efectes sobre els patògens no són, en general, superiors als de l'atmosfera controlada convencional i sovint es veuen influenciats per altres factors. L'emmagatzemament a 10°C a una pressió de 170 mm Hg va reduir la incidència de la podridura àcida causada per *G. citri-aurantii* en llimes; no obstant, una pressió de 76 mm Hg la va incrementar (Spalding i Reeder, 1976).

#### **Tractaments amb calor: curat i aigua calenta**

Bàsicament són dos els tipus de tractaments amb calor que poden realitzar-se en postcollita de cítrics per tal de reduir la incidència de malalties: el curat i els tractaments amb aigua calenta.

El curat és un procediment pel qual la fruita arribada del camp s'emmagatzema a altes temperatures (25-40°C) i alta humitat ambiental durant períodes de temps variable (1-4 dies). La durada i característiques del tractament amb aire calent són molt variables a les distintes zones productores de cítrics del món en funció del tipus de fruits que es tractin (Grierson i Ben-Yehoshua, 1986). En general, s'ha comprovat que el tractament redueix significativament la incidència de distintes podridures com per exemple la marró, la verda, la grisa o l'àcida en taronges, llimones i aranges (Fawcett, 1922; Ben-Yehoshua *et al.*, 1987, 1989; Tuset *et al.*, 1996; Lanza, 1997).

Els tractaments amb aigua calenta permeten assolir els efectes beneficiosos del curat amb una tecnologia molt més simple, pràctica i barata. La immersió dels cítrics en aigua calenta com a sistema de control de malalties de postcollita va començar a provar-se als EUA a la dècada dels 20 contra la podridura marró causada per *Phytophthora* spp. (Fawcett, 1922). Als anys 60 es va comprovar que banys de 5 min en aigua a 53°C controlaven la podridura verda en taronges (Smoot i Melvin, 1963) i llimones (Houck, 1967). Des de llavors, distintos investigadors han posat de manifest en distintes espècies de cítrics els efectes antifúngics de tractaments de poca durada (2-5 min) amb aigua calenta (40-53°C) contra distintos patògens de postcollita (Spalding i Reeder, 1985; Couey, 1989; Barkai-Golan i Phillips, 1991; Barkai-Golan i Apelbaum, 1991; Tuset *et al.*, 1996; González-Aguilar *et al.*, 1997). El factor limitant i el desavantatge principal respecte al curat són els danys irreversibles que l'aigua calenta produeix a la pell dels fruits si s'aplica a una temperatura excessiva i/o durant massa temps. En general, temperatures superiors als 53°C resulten fitotòxiques.

Els efectes tant del curat com de l'aigua calenta sobre els patògens poden ésser directes o indirectes. La principal diferència entre els dos tipus de tractament és que, en general, amb l'aigua calenta aquests efectes són força més accentuats que amb el curat perquè les temperatures aplicades són superiors i, a més, s'aconsegueixen amb un temps de tractament molt més curt. Els efectes directes són possibles perquè tant les espores fúngiques com la majoria de les infeccions inactives estan localitzades o bé a la superfície de la pell o bé a les primeres capes de cèl·lules situades immediatament sota la pell del fruit (Lurie, 1998). Aquests efectes directes no han estat molt estudiats però en general consisteixen en la inhibició de la germinació o del creixement del tub germinatiu, o en danys sobre les hifes en creixement. Depenen de factors intrínsecs del patogen com l'espècie, l'edat, l'activitat metabòlica, la densitat d'inòcul, el contingut d'aigua de les espores, etc. i de factors extrínsecs com la temperatura de l'aire o l'aigua o la durada del tractament (Barkai-Golan i Phillips, 1991). A més, la resposta del patogen depèn del medi de creixement i és diferent *in vitro* i *in vivo* (Dettori *et al.*, 1996). La calor pot causar canvis en el nucli i les parets cel·lulars, destruir mitocondries i vaquoles, i provocar la pèrdua de citoplasma a les espores (Barkai-Golan i Phillips, 1991). Estudis recents (Schirra *et al.*, 2000a) demostren que, a diferència del que es pensava anteriorment, la immersió dels fruits en aigua calenta no redueix el nombre de conidis presents a les ferides de la pell. Una de les principals preocupacions relacionades amb la possible generalització dels tractaments de calor és l'aparició i proliferació de soques termotolerants dels patògens (Ferguson *et al.*, 2000).

Els efectes indirectes es refereixen a la inducció a l'hoste de resistència a la infecció. En aquest sentit, les investigacions més recents apunten a què la calor influeix al mateix temps sobre una sèrie de mecanismes diferents (Schirra *et al.*, 2000a). La calor pot contribuir a mantenir o perllongar l'activitat antifúngica de compostos constituents de la pell dels fruits cítrics o, per altra banda, pot contribuir a induir mecanismes addicionals de defensa contra els patògens, ja sigui provocant canvis físics en la pell o induint la síntesi de substàncies que, d'una manera o una altra, interfereixen amb el desenvolupament normal de la malaltia. El curat de llimones a 36°C durant 3 dies va retardar la senescència del fruit, evitant així la disminució de la concentració de citral, un compost amb activitat antifúngica contra *P. digitatum* present de forma natural en ferides de la pell i que deixa de produir-se a mesura que el fruit envelleix (Ben-Yehoshua *et al.*, 1995). Un dels efectes del curat més estudiats és la inducció en les ferides de la pell de la biosíntesi, catalitzada per l'enzim fenilalanina amoni liasa (PAL), de lignina i materials anàlegs que actuen com una barrera física a la penetració de les hifes del patogen (Ben-Yehoshua *et al.*, 1989; Lanza, 1997); d'aquí precisament va sorgir el nom del tractament, del fet que “cura” ferides. L'aigua calenta pot provocar un efecte similar (Nafussi *et al.*, 2000). El curat, però especialment l'aigua calenta, poden provocar canvis en l'estructura de les ceres epicuticulars del flavedo. Si la cera s'arriba a fondre, pot tancar microferides, microesquerdes i estomes constituint així una barrera física a la invasió del patogen (Porat *et al.*, 2000; D'hallewin i Schirra, 2001). No obstant, en cas de conservació prolongada dels fruits, aquest efecte protector es pot perdre i llavors els estomes danyats i les microfisures esdevenen molt vulnerables a la invasió (D'hallewin i Schirra, 2000). Tant el curat com l'aigua calenta poden induir al fruit la síntesi de compostos amb accentuada activitat antifúngica, coneguts genèricament com fitoalexines. No obstant, la calor per sí sola no induïx aquesta síntesi en fruits intactes. La producció en distintes espècies de cítrics de les fitoalexines escoparona i escopoletina fins a dosis efectives per al control de la podridura verda només va tenir lloc en fruits ferits i prèviament inoculats amb el patogen (Kim *et al.*, 1991; Nafussi *et al.*, 2000). Un altre dels mecanismes d'inducció de resistència relacionats amb els tractaments amb calor és l'increment de la biosíntesi de proteïnes com la quitinasa o la  $\beta$ -1,3-glucanasa que són constituents de la pell i que juguen un paper important en la degradació de les hifes. A més a més, es sospita que algunes de les proteïnes sintetitzades pel fruit per a protegir-se d'una possible desnaturalització causada per la calor, proteïnes conegudes com “heat shock proteins” (HSP), també podrien estar implicades en alguns dels mecanismes de defensa contra les floridures (Schirra *et al.*, 2000a).

Un bon nombre d'estudis indiquen que, en cas de conservació frigorífica prolongada de la fruita, tractaments previs tant de curat com d'aigua calenta incrementen la resistència dels fruits als danys per fred (Wild i Hood, 1989; Ben-Yehoshua *et al.*, 1989; Wild, 1993; Rodov *et al.*, 1995; González-Aguilar *et al.*, 1997; Schirra i D'hallewin, 1997; Schirra *et al.*, 1997a, 1998).

Malgrat l'evidència dels seus efectes beneficiosos, el curat dels cítrics no s'està utilitzant a nivell comercial de forma generalitzada degut a l'elevat cost d'escalfar grans quantitats de fruita durant 2 o 3 dies. A Catalunya no és normal realitzar-lo. A la zona de València algunes empreses mantenen les taronges durant unes 70 h a 35°C i 98% HR (Tuset *et al.*, 1992). En algunes zones com Florida, on es realitzen tractaments de desverdiment dels fruits aplicant-los-hi etilè (al voltant de 5  $\mu$ l) durant de 2 a 4 dies a altes temperatures (fins a 30°C) i 90-95% HR, s'ha observat que aquests tractaments tenen efectes anàlegs als del curat pel que fa al control de patògens de ferida com *P. digitatum* (Brown, 1973). Malgrat això, s'ha constatat que uns nivells excessius d'etilè o una exposició massa prolongada provoquen un augment significatiu de les pèrdues ocasionades per infeccions inactives com les de les podridures pedunculars (Brown i Lee, 1993) o l'antracnosi (Brown, 1975). A més, també s'ha comprovat que l'etilè després durant el procés de curat pot afavorir l'aparició de fitotoxicitats degudes a un excés de calor (Ben-Yehoshua *et al.*, 1990).

### **Radiació ionitzant**

Els efectes de la radiació ionitzant (irradiació de raigs gamma) sobre els fruits cítrics en general i sobre les malalties de postcollita en particular s'han estudiat extensivament des de la dècada dels 60. L'any 1986 una regulació de la US FDA va permetre la irradiació d'aliments als EUA a una dosi màxima de 1000 Gy (Kader, 1999). L'aplicació de raigs gamma és un mètode curatiu que permet controlar patògens ja establerts als teixits de l'hoste. Els fruits madurs són relativament resistents a la irradiació perquè en aquest estat de desenvolupament pràcticament ja no es dona divisió cel·lular (Eckert, 1977). Els fruits frescos com per exemple els cítrics són més tolerants que les verdures i les flors tallades (Kader, 1999).

L'efectivitat dels raigs gamma com a tractament fungistàtic o fungicida depèn del tipus de patògen, el seu estat de creixement i la seva població a l'hoste (densitat d'inòcul). Entre els patògens de postcollita de cítrics, els que infecten els fruits al camp i es presenten majoritàriament com infeccions inactives, com per exemple *A. citri* o *D. natalensis* són més resistents a la irradiació que els patògens de ferida com *Penicillium* spp., *T. viride* o *G. citri-aurantii* (Maxie *et al.*, 1969).

El principal problema de la radiació ionitzant i la causa de què el seu ús no s'hagi generalitzat és que les dosis mínimes requerides per a un control efectiu de les malalties (1000-1750 Gy) resulten fitotòxiques. A les dosis tolerades pels cítrics, difícilment es pot aconseguir l'erradicació dels patògens i els beneficis del tractament, que bàsicament són un retard en la producció dels podrits, no justifiquen el cost de la seva implementació (Maxie *et al.*, 1969; Eckert, 1977). A més a més, fins ara sempre han estat disponibles mitjans de control més barats, efectius i segurs. No obstant, no resulta descartable que davant una eventual prohibició dels fungicides sintètics en un futur es reexaminin la utilització de la irradiació, especialment a dosis baixes i en combinació amb altres sistemes de control com podrien ser els tractaments tèrmics o les atmosferes controlades (Kader i Arpaia, 1992).

### **Llum ultraviolada**

La llum ultraviolada (UV) és altament energètica i pot ser fàcilment absorbida pels organismes vius. Quan això passa, els pot danyar directament per reacció amb membranes, enzims o àcids nucleics, o pot activar molècules específiques que es transformen en fototoxines capaces d'interferir amb processos fisiològics essencials de l'organisme (Larson i Berenbaum, 1988). Aquest principi s'ha utilitzat per intentar inactivar les espores de patògens importants de postcollita de cítrics com *P. digitatum*, *P. italicum*, *F. oxysporum* i *F. solani*, però es va observar que en molts casos els conidis presentaven pigments que els protegien de l'acció de la llum UV (Asthana i Tuveson, 1992).

La irradiació a dosis baixes de llum UV llunyana o de baixa longitud d'ona (UV-C, entre 100 i 280 nm) sobre els cítrics ja recollits pot induir resistències a la pell del fruit contra malalties de postcollita (Chalutz *et al.*, 1992b; Ben-Yehoshua *et al.*, 1992). En aquest sentit, la llum UV-C és una hormetina perquè és nociva a dosis altes però a dosis subletals estimula una resposta beneficiosa a l'hoste (Luckey, 1991). Les dosis efectives en la inducció de la resistència s'anomenen hormètiques i en el cas de la podridura verda de les aranges varien de 1,6 a 8,0 kJ m<sup>-2</sup> de llum UV-C (254 nm) en funció de la data de collita (Droby *et al.*, 1993a). El mode d'acció sembla estar relacionat amb la inducció de la biosíntesi de fitoalexines com l'escoparona (Kim *et al.*, 1991; Ben-Yehoshua *et al.*, 1992). A diferència dels tractaments amb calor, que només indueixen aquesta síntesi en ferides i presència del patògen, la llum UV-C també la induïx en fruits no inoculats (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992). També s'ha comprovat que en fruits tractats es produeix un notable increment de l'activitat dels enzims PAL i peroxidasa, enzims relacionats amb la biogènesi de lignina i materials anàlegs, però no es creu que aquest mecanisme influeixi directament sobre la resistència del fruit (Droby *et al.*, 1993a). El fenomen d'hormesi no es dona amb llum d'altres regions de l'espectre UV de longituds d'ona més altes, ni amb llum UV mitjana (UV-B, entre 280 i 315 nm) ni amb llum UV propera (UV-A, entre 315 i 400 nm).

### **Sistemes químics**

Els productes químics alternatius als fungicides de síntesi tradicionals han d'ésser substàncies, naturals o de síntesi, amb efectes residuals sobre el medi ambient i toxicològics sobre persones i animals coneguts i molt baixos. Per aquest motiu no és d'estranyar que la majoria dels candidats que s'assajen siguin substàncies presents de forma natural en plantes, animals o microorganismes o, en el cas de productes sintetitzats artificialment, siguin additius alimentaris permesos per la legislació.

### **Substàncies naturals**

Algunes substàncies naturals derivades de plantes o animals presenten una marcada activitat biocida. Mentre que nombrosos insecticides s'han desenvolupat a partir de metabòlits secundaris de plantes, pràcticament no existeixen fungicides comercials amb aquest origen, tot i que a nivell experimental s'ha trobat que un bon nombre presenten activitat antifúngica, ja sigui fungicida o fungistàtica (Wilson *et al.*, 1991).

Aquesta activitat s'ha comprovat per a diferents extractes de plantes superiors (Grange i Ahmed, 1988). Entre els 345 extractes de plantes que es van assajar contra *B. cinerea*, els més efectius van ésser dels gèneres *Allium* i *Capsicum* (Wilson *et al.*, 1997). Els glucosinolats, un ampli grup de compostos produïts



per nombroses espècies de la família de les crucíferes, presenten una marcada activitat antimicrobiana tant *in vitro* com *in vivo* (Mari *et al.*, 1993).

Distints components naturals del flavedo dels fruits cítrics, ja siguin preformats o induïts (fitoalexines), també presenten activitat antifúngica. Entre els components preformats destaquen alguns terpens com el citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal), cumarines com la limetina (5,7-dimetoxicumarina), la 5-geranoxi-7-metoxicumarina o la 7-geranoxicumarina, i furanocumarines com la isopimpinellina (5,8-dimetoxipsoralè) (Angioni *et al.*, 1998). Les fitoalexines més estudiades són l'escoparona (6,7-dimetoxicumarina) i l'escopoletina (6-hidroxi-7-metoxicumarina) (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992, 1995). L'activitat de tots aquests components naturals disminueix sensiblement després de la collita a mesura que el fruit envelleix (Kim *et al.*, 1991). Alguns s'han aconseguit sintetitzar artificialment i utilitzar com a tractaments fungicides, tot i que encara no a nivell comercial (Angioni *et al.*, 1998).

Els olis essencials d'un nombre important d'espècies vegetals (per exemple dels gèneres *Citrus*, *Thymus*, *Origanum*, *Salvia*, *Mentha*, *Rosmarinus*, *Abies*, *Pinus*, *Lavandula*, *Eucaliptus*, etc.) han estat avaluats per la seva capacitat fungitòxica (Singh *et al.*, 1980; Wilson *et al.*, 1997) i alguns dels compostos responsables d'aquesta capacitat, majoritàriament components terpenics, han estat identificats. Entre ells destaquen el carvacrol, el p-anisaldehyd (Caccioni i Guizzardi, 1994), la L-carvona i l'eugenol (Bompeix i Cholodowski-Faivre, 1997). La D-limonina, el cineol, el  $\beta$ -mircè, l' $\alpha$ -pinè, el  $\beta$ -pinè i el càmfor són components d'olis essencials actius contra *B. cinerea* (Wilson *et al.*, 1997). S'ha observat que alguns d'aquests components presenten certa especificitat. Per exemple, la L-carvona, extreta de *Mentha* spp., és efectiva contra *B. cinerea* però no contra *Penicillium* spp. (Bompeix i Cholodowski-Faivre, 1997).

Certs compostos aromàtics volàtils i components de l'aroma produïts durant la maduració en postcollita d'alguns fruits també presenten activitat inhibidora contra patògens de postcollita. Fumigacions amb acetaldehyd, hexanal o benzaldehyd podrien resultar interessants, especialment per al control d'infeccions latents, les quals no es poden controlar ni amb fungicides no sistèmics ni amb agents de biocontrol (Wilson *et al.*, 1997; Mari i Guizzardi, 1998).

L'àcid jasmònic i el metil jasmonat, coneguts conjuntament com a jasmonats, són reguladors del creixement naturals amb capacitat inhibidora de la podridura verda causada per *P. digitatum* (Droby *et al.*, 1999).

S'estima que només al voltant del 2% de les plantes superiors han estat avaluades per les seves propietats pesticides i que, d'aquestes, la gran majoria ho han estat per les seves propietats insecticides. De fet, l'activitat fungicida s'ha avaluat en menys de l'1% de les plantes superiors, la qual cosa deixa obert un ampli ventall de possibilitats per al desenvolupament de noves matèries actives (Wilson *et al.*, 1991; Wisniewski *et al.*, 2001).

El quitosan, un polímer d'elevat pes molecular de la  $\beta$ -1,4-glucosamina que s'obté per deacetilació de la quitina present a l'exoesquelet dels artròpodes i que també es troba com a component estructural de la paret cel·lular d'alguns fongs, presenta activitat antifúngica contra un ampli ventall de patògens de postcollita, incluint alguns dels més importants de la postcollita de cítrics (El Ghaouth *et al.*, 1992). Aquest compost pot formar pel·lícules amb les quals es pot embolicar la superfície del fruit i regular l'intercanvi d'humitat i gasos per tal d'allargar el període de conservació. A més, s'ha comprovat que indueix resistència als teixits dels fruits contra les podridures de postcollita per estimulació de la formació de barreres estructurals defensives i/o per inducció de la producció d'hidrolases com quitinases, quitosanases o  $\beta$ -1,4-glucanases (Wilson *et al.*, 1994).

Tot i que alguns antibiòtics com la iturina, produïda per *Bacillus subtilis*, són excel·lents fungicides contra una quantitat considerable de patògens vegetals (Gueldner *et al.*, 1988), la utilització de metabòlits secundaris microbians en agricultura no s'ha generalitzat degut bàsicament al perill d'aparició de resistències en soques bacterianes patògenes per als humans o el bestiar (Wisniewski i Wilson, 1992). Altres inconvenients són que poden resultar poc eficaços, altament inestables i, degut a la seva producció en fermentadors, poden presentar uns costos de producció molt elevats (Lievens *et al.*, 1989).

### **Conservants i additius alimentaris**

Segons el Codex Alimentarius són additius alimentaris aquelles substàncies que sense ésser consumides normalment i sense ésser ingredients característics dels aliments, s'hi afegeixen amb una finalitat tecnològica u organolèptica distinta a la de mantenir o millorar les seves propietats nutritives. La classificació més generalitzada els agrupa en categories funcionals: colorants, conservants, antioxidants, emulgents, espesants, etc. En general, els additius amb activitat antimicrobiana directa formen el grup

dels conservants o preservatius. L'acció d'aquestes substàncies contra els microorganismes pot ésser inhibidora o letal, en funció de la dosi. Molts són productes que a més presenten especificitats i, així, es parla de productes amb acció fungistàtica, bacteriostàtica, fungicida o bactericida (Lück, 1981). En alguns casos pot ocórrer que additius no inclosos al grup dels conservants també presentin certa capacitat directa o indirecta d'inhibir el desenvolupament de microorganismes. Això passa sovint amb productes correctors de pH, com alguns àcids, hidròxids i sals (carbonats, fosfats, etc.), o amb productes classificats com agents depressors de l'activitat d'aigua. Aquestes substàncies contribueixen a garantir l'estabilitat microbiològica de l'aliment al reduir la disponibilitat físico-química d'aigua. Són agents depressors de l'activitat d'aigua diverses sals minerals (alguns clorurs, fosfats, carbonats i sulfats), àcids orgànics i les seves sals (àcid acètic, làctic, cítric, tartàric, etc.), mono, di i oligosacàrids (sacarosa, fructosa, etc.), alcohols (etanol, sorbitol, glicerina, etc.) i proteïnes i derivats (Multon, 1988). Sovint, aquestes substàncies es barregen amb els conservants pròpiament dits per tal d'incrementar la seva eficàcia. La combinació de diferents conservants també pot reportar efectes additius o sinèrgics (Lück, 1981).

Pocs conservants alimentaris s'han assajat contra les principals malalties de la postcollita dels cítrics i, de moment, no n'hi ha cap de registrat per a la seva utilització comercial. L'any 1978, Smoot i McCornack van indicar que solucions al 2% (p/v) de sorbat potàssic eren efectives en el control de soques de *P. digitatum* resistents als benzimidazols. Solucions de sorbat potàssic al 2% escalfades a 50°C van controlar la podridura amarga causada per *G. citri-aurantii* en llimones (Kitagawa i Kawada, 1984). El benzoat i el propionat sòdics van igualar l'efectivitat del sorbat potàssic en el control de la podridura verda en taronges "Valencia Late" (Hall, 1988). Fumigacions amb 1,5-2,5 mg l<sup>-1</sup> d'àcid fòrmic, acètic o propiònic van reduir significativament la incidència de la podridura verda en taronges, llimones i aranges; l'àcid fòrmic, no obstant, va resultar fitotòxic (Sholberg, 1998). La immersió de llimones inoculades artificialment en solucions calentes al 2% (p/p) de diòxid de sofre va controlar *P. digitatum* de forma eficaç (Smilanick *et al.*, 1995).

Entre els additius alimentaris més interessants per al control de podridures causades per *Penicillium* spp. en postcollita de cítrics es troben el bicarbonat i el carbonat sòdics, que no formen part del grup dels conservants. Un dels objectius bàsics d'aquesta tesi és aprofundir en l'estudi d'aquests productes com a sistemes de control de les podridures verda i blava en taronges i mandarines clementines i avaluar la seva eficàcia sols o en combinació amb altres sistemes de lluita. Es tracta d'additius permesos sense restriccions per les legislacions europea i nordamericana per moltes i variades aplicacions en el camp alimentari. Als EUA, són productes catalogats com segurs (GRAS) per la US FDA i s'ha proposat a la US EPA que no es limiti la quantitat de residus d'aquestes substàncies permeses als productes agroalimentaris. A més a més, l'USDA els ha aprovat com a ingredients de productes alimentaris classificats com a orgànics. La utilització del bicarbonat sòdic en el control de *P. digitatum* i *P. italicum* va ésser proposada per Barger al 1928 com una alternativa al bòrax. El carbonat sòdic s'ha utilitzat en llimones a Califòrnia durant més de 70 anys per millorar la neteja dels fruits i controlar podridures (Eckert i Eaks, 1989). Aquests tractaments van ésser desplaçats per fungicides de síntesi més efectius a partir de l'aparició del SOPP als anys 50. No obstant, dins la conjuntura actual reapareixen com a mitjans de control molt interessants perquè els carbonats són de fàcil disponibilitat, barats i poden utilitzar-se sense riscos importants de produir fototoxicitats als fruits tractats. Investigacions recents realitzades a Califòrnia indiquen que la immersió dels fruits en solucions tant de bicarbonat sòdic com de carbonat sòdic resulta efectiva a nivell comercial per al control de la podridura verda en llimones (Smilanick *et al.*, 1995) i taronges (Smilanick *et al.*, 1997a, 1999b). L'efectivitat del tractament depèn bàsicament de tres factors: la temperatura de les solucions, la concentració de sal i el temps d'immersió dels fruits (Smilanick *et al.*, 1997a). Les sals sòdiques són més efectives que les potàssiques o amòniques (Marloth, 1931; Smilanick *et al.*, 1999b). L'addició d'hipoclorit sòdic a les solucions de bicarbonat sòdic permet eliminar les espores fúngiques de la solució i evitar així recontaminacions en fruits tractats posteriorment. Aquesta addició, a més a més, augmenta significativament el control de la podridura verda respecte al bicarbonat sol (Smilanick *et al.*, 1999b). Una nova variant que s'ha assajat últimament és la substitució dels banys en tancs per l'aplicació dels carbonats en combinació amb un rentat dels fruits amb aigua a alta pressió (1000-3500 kPa). Tot i que aquest rentat no té capacitat de control per sí mateix, l'eficàcia del tractament combinat és equiparable a la dels banys (Sorenson *et al.*, 1999).

## **Ozó**

L'ozó ( $O_3$ ) és un gas molt inestable que ocorre a la natura de forma natural i que es descomposa espontàniament o en contacte amb superfícies oxidables. Ja des de fa molt temps s'ha utilitzat per a la desinfecció d'aire o aigua degut al seu elevat potencial d'oxidació i a què pot generar-se artificialment de forma relativament fàcil. Avui dia existeix un gran interès en utilitzar-lo en la indústria alimentària, especialment des que l'any 1997 va ésser declarat per la legislació nordamericana com a compost reconegut com a segur (GRAS) per al contacte directe amb aliments (US FDA, 1997). En postcollita de fruites i verdures, l'ozó pot aplicar-se en aire o aigua com un tractament desinfectant relativament breu realitzat amb anterioritat a l'emmagatzemament o pot aplicar-se com un tractament en aire, continu o intermitent, durant tot el període d'emmagatzemament. En aquest darrer cas es parla de conservació en atmosferes ozonitzades i, en aquest sentit, el tractament es podria equiparar als inclosos en el subapartat de conservació en atmosferes controlades. Els avantatges de l'ozó són l'elevada capacitat biocida per contacte i la manca total de residus en la fruita tractada. Una altra aplicació que s'ha descrit és la seva utilització per reduir els nivells d'etilè en cambres de conservació i endarrerir així el procés de maduració de la fruita (Dickson *et al.*, 1992). El principal inconvenient és que a dosis relativament baixes resulta perillós per a la salut humana i per al seu ús comercial cal implementar mesures especials de seguretat.

Els tractaments amb aigua ozonitzada s'han proposat com a substitutius de les solucions clorades per a la higienització dels fruits cítrics i per a la desinfecció de superfícies en centrals cítriques (Smilanick *et al.*, 1999a). El potencial d'oxidació de l'ozó és 1,5 vegades més gran que el del clor i el temps de contacte necessari per a l'acció biocida és unes 4 o 5 vegades més petit. No obstant, els costos d'implementació i manteniment són més elevats perquè cal generar el gas i ozonitzar l'aigua del tractament de forma contínua (Suslow, 1998). El tractament és molt efectiu en la reducció de les poblacions fúngiques i bacterianes presents de forma natural en la superfície dels fruits, però, de la mateixa manera que el clor, l'aigua ozonitzada no és capaç de controlar les infeccions provinents del camp i ja establertes en ferides de la pell dels fruits (Smilanick *et al.*, 1999a).

Els resultats disponibles sobre els efectes de la conservació de cítrics en atmosferes ozonitzades són contradictoris. Això també passa amb els resultats d'assajos realitzats amb altres tipus de fruita fresca com pomes, peres, fruites d'òs, maduixes o raïm. Mentre que en alguns treballs l'exposició de fruits cítrics a l'ozó gasós va reportar beneficis clars pel que respecta a la incidència de malalties de postcollita i a la qualitat dels fruits emmagatzemats (Harding, 1968; Jin *et al.*, 1989), en altres treballs no només no s'indiquen beneficis sinó que s'assenyala que el gas va resultar fitotòxic (Klotz, 1936; Hopkins i Loucks, 1949). En general, els resultats tant en un sentit com en l'altre provenen de treballs bastant antics i realitzats normalment amb concentracions d'ozó massa altes per als estàndards actuals de seguretat. Per exemple, segons la legislació californiana, la concentració màxima d'ozó en aire a la que una persona pot estar exposada durant un període de temps curt (15 min) és actualment de 0,3 ppm (v/v). Els efectes de l'ozó gasós a concentracions similars a aquesta sobre el desenvolupament de les podridures verda i blava en fruits cítrics conservats en fred no han estat avaluats.

## **Altres productes químics**

Als EUA, la US EPA ha obert recentment una nova categoria de fungicides de síntesi, batejada com a "Reduced Risk Fungicides" (fungicides de risc reduït), en la qual s'integren aquelles noves matèries actives que, en comparació amb els fungicides tradicionals, siguin de toxicitat més baixa pels humans i els organismes que no es preten controlar, contaminin menys el medi ambient i/o puguin ésser adoptats en programes de control integrat. En el cas de la postcollita dels cítrics, s'ha demanat el registre en aquesta categoria de l'azoxistrobina, una estrobilurina efectiva contra la podridura verda (Adaskaveg i Förster, 2000).

Entre els tractaments amb altres productes químics que s'han mostrat efectius contra certes malalties de postcollita de cítrics, destaquen els banys en solucions calentes de bòrax (tetraborat sòdic decahidratat), àcid bòric, barrejes de bòrax i àcid bòric, o polibor (octaborat disòdic) (Winston, 1935; Eckert i Eaks, 1989), etanol (Smilanick *et al.*, 1995; Brown i Baraka, 1996) i polisulfur de calci (Smilanick i Sorenson, 2001). Les solucions de peròxid d'hidrogen van resultar inefectives en el control de la podridura verda (Smilanick *et al.*, 1995).

## Sistemes biològics

Encara que en un sentit ample el terme control biològic de malalties vegetals inclouria l'obtenció de cultivars de l'hoste resistent a les malalties i també la utilització de substàncies naturals derivades de plantes o animals, en aquest treball l'utilitzarem per referir-nos només al control mitjançant la utilització de microorganismes antagonics als microorganismes patògens.

### *Control biològic*

Segons Baker i Cook (1974), el control biològic és la reducció de la densitat d'inòcul o de la producció de malaltia per part del patògen o de la seva activitat com a paràsit mitjançant un o més organismes antagonics, per acció natural o a través de la manipulació de l'ambient, l'hoste o el propi antagonista. Segons Nigam i Mukerji (1988), el control biològic és la manipulació directa o indirecta per part de l'home dels agents vius que de forma natural tenen capacitat de control (antagonistes); aquesta manipulació provoca un augment de l'atac d'aquests agents sobre els patògens. La relació biològica entre els antagonistes i els patògens sol ésser bastant específica.

Els principals avantatges del control microbiològic, en comparació amb altres sistemes de lluita, són els següents (Deacon, 1983): i) els antagonistes són més segurs perquè no s'acumulen en els aliments; ii) són persistents al llarg del temps perquè al no alterar de manera substancial les principals característiques del patògen, és molt més difícil que aquest desenvolupi resistències; iii) produeixen un efecte insignificant en el balanç ecològic ja que no destrueixen els enemics naturals de les espècies patògenes; iv) freqüentment són compatibles amb altres sistemes de control, inclosos els productes químics de síntesi.

Les característiques desitjables d'un antagonista o agent de biocontrol són les següents (Wisniewski i Wilson, 1992): i) estabilitat genètica, ii) efectivitat a baixes concentracions, iii) poca exigència pel que fa a requeriments nutritius, iv) efectivitat per a un gran nombre de patògens i per diversos fruits i vegetals, v) capacitat de reproduir-se en medis de creixement econòmics, vi) facilitat d'aplicació, vii) no productors de metabòlits secundaris que siguin tòxics per a les persones o animals, viii) resistència als insecticides i fungicides amb què pot arribar a estar en contacte, ix) compatibilitat amb altres tractaments químics o físics, x) no patògenic sobre l'hoste, xi) capacitat de sobreviure sota condicions adverses (incloses baixes temperatures i l'emmagatzematge en atmosferes controlades).

El gran potencial del control biològic com a sistema de lluita contra les malalties de postcollita de cítrics ha fet que durant els últims anys s'hagin endegat intenses investigacions en la majoria dels països productors de cítrics com són els EUA, Israel, Austràlia, Itàlia, Sudàfrica i també Espanya. La recerca s'ha centrat bàsicament en el control de patògens de ferida i especialment en el de *P. digitatum* i *P. italicum*. Els factors que determinen majoritàriament les possibilitats d'utilització d'un antagonista són la seva supervivència i la seva efectivitat en condicions ambientals i de frigoconservació. També és molt important la seva capacitat de colonitzar la superfície de la ferida. La fruita emmagatzemada en cambres frigorífiques representa una bona oportunitat per utilitzar el control biològic, ja que la fruita es troba sota condicions ambientals controlades, tant pel que fa a la humitat relativa, com a la temperatura i a la concentració de gasos (Wilson *et al.*, 1991). El resultat d'aquesta recerca ha estat el desenvolupament de l'anomenada primera generació d'agents de biocontrol, és a dir, la identificació de diversos microorganismes, majoritàriament llevats i bacteries, però també alguna floridura, que per ells mateixos presenten una bona capacitat de control (Droby *et al.*, 2001). Entre els més destacats d'aquests antagonistes es troben les bacteries *Pseudomonas syringae* (Smilanick *et al.*, 1996; Bull *et al.*, 1997), *Pseudomonas cepacia* (Smilanick i Denis-Arrue, 1992; Huang *et al.*, 1993), *Bacillus subtilis* (Singh i Deverall, 1984; Arras i D'hallewin, 1994) i *Bacillus pumilus* (Huang *et al.*, 1992); els llevats *Candida oleophila* (Wilson *et al.*, 1993; McGuire i Hagenmaier, 1996; Droby *et al.*, 1998), *Candida guilliermondii* (forma teleomòrfica: *Pichia guilliermondii*, i prèviament classificat com *Debaryomyces hansenii*; Chalutz i Wilson, 1990; Droby *et al.*, 1993b; McGuire, 1994) i *Candida famata* (Arras, 1996), i les floridures *Trichoderma viride* (de Matos, 1983; Díaz i Vila, 1990) i *Aureobasidium pullulans* (Schena *et al.*, 1999).

Tot i la intensitat de les investigacions, el control biològic és encara un camp força nou en tot allò referent a la patentabilitat, registre i comercialització dels agents de biocontrol. Als països de la UE, el registre dels productes patentats representa un obstacle important per a la comercialització. La directiva que regeix el registre d'agents de biocontrol és la 91/414/CEE, que està avui dia en fase de revisió i modificació. Als EUA, en canvi, la normativa específica de registre dels agents de biocontrol simplifica molt aquest procediment i els estudis toxicològics són més curts i barats que els dels productes químics de síntesi, principalment perquè no és necessari estudiar la toxicologia crònica. Això és degut al gran

interès per part de l'EPA en facilitar l'aparició de pesticides biològics. Així, les úniques formulacions a base d'antagonistes disponibles actualment al mercat per al control de malalties de postcollita de cítrics han estat registrats als EUA i són l'Aspire<sup>®</sup> (*Candida oleophila* Montrocher, soca I-182; Ecogen Inc., Langhorne, PA, EUA) i el Bio-Save 1000<sup>®</sup> (*Pseudomonas syringae* Van Hall, soca ESC-10; EcoScience, Longwood, FL, EUA).

La majoria dels agents de biocontrol han estat assajats solament contra un petit nombre de patògens i en conreus molt concrets. Actualment es comença a dedicar més esforços per identificar antagonistes amb espectre d'acció el més ampli possible, és a dir, efectius contra varies malalties i en diferents conreus. Una assignatura pendent que queda en la majoria dels agents de biocontrol descoberts recentment és la determinació del seu mode d'actuació, tot i que en molts dels casos s'ha assenyalat quin podria ésser. La complexitat que els envolta fa que els pocs estudis que hi ha siguin poc conclouents. Els possibles mecanismes són la secreció d'antibiòtics, la competència per nutrients i/o espai, la inducció de resistències als teixits de l'hoste i la interacció directa amb el patogen (Wilson *et al.*, 1991). L'aplicació dels antagonistes a nivell comercial ha resultat en una gran variabilitat en els resultats i no ha igualat, en general, l'eficàcia dels fungicides sintètics. Per aquest motiu, actualment es treballa en el desenvolupament de l'anomenada segona generació de productes biològics (Droby *et al.*, 2001), en la qual s'intenta millorar la capacitat antagònica dels agents de biocontrol per distints mitjans com per exemple la seva manipulació genètica o l'addició de nutrients. Una altra possibilitat força interessant, que es presentarà més endavant, és la combinació del control biològic amb altres sistemes de lluita.

### **Obtenció de cultivars resistents**

L'obtenció de genotips resistents a les malalties de postcollita és, entre les alternatives als fungicides de síntesi, l'opció a més llarg termini de totes. No obstant, les tècniques modernes d'enginyeria genètica podrien permetre assolir aquesta obtenció en un període de temps molt més curt que la selecció genètica tradicional. En aquest cas, però, caldria esbrinar com els mercats acollirien la fruita produïda per aquests cultivars resistents ja que, degut a la polèmica que avui dia envolta a tots els aliments genèticament modificats, la resposta dels consumidors és incerta, i més si es té en compte que les fruites són aliments de consum directe.

### **Integració de sistemes alternatius**

Davant el fet que amb els sistemes alternatius que s'han assajat fins ara, siguin físics, químics o biològics, difícilment s'assoleixen els nivells d'efectivitat que proporcionen els fungicides sintètics, actualment s'estan dedicant molts esforços a nivell mundial en avaluar la integració de dos o més sistemes.

El raspallat amb aigua calenta (HWB) és una tècnica desenvolupada i patentada recentment a Israel que combina un raspallat suau sobre els fruits cítrics amb una dutxa de curta durada (10-20 s) amb aigua a alta temperatura (56-60°C). Els estudis realitzats indiquen que aquesta tècnica redueix significativament la podridura verda sense afectar la qualitat externa ni interna de taronges, aranges i mandarines (Porat *et al.*, 2000). El recobriment individual dels fruits cítrics amb envoltures plàstiques és una pràctica que, a part de poder-se combinar amb la conservació a baixes temperatures per minimitzar les pèrdues d'aigua per transpiració (Grierson i Ben-Yehoshua, 1986), permet millorar l'efecte del curat a altes temperatures (Ben-Yehoshua *et al.*, 1989). La combinació del recobriment dels fruits amb banys d'aigua calenta o amb el tractament de raspallat amb aigua calenta també afavoreix el manteniment de la qualitat en aranges conservades en fred (Rodov *et al.*, 2000).

L'escalfament de les solucions aquoses de fungicides sintètics com l'imazalil o el tiabendazol augmenta la seva efectivitat en comparació amb les solucions a temperatura ambient, permet disminuir les dosis d'aplicació i també té efectes positius en la inducció de resistència als danys per fred (Barkai-Golan i Apelbaum, 1991; Schirra i Mulas, 1995; Tuset *et al.*, 1996; Schirra *et al.*, 1997b; Smilanick *et al.*, 1997b; Schirra *et al.*, 2000b). L'efectivitat dels tractaments amb additius alimentaris, productes químics de baixa toxicitat i algunes substàncies naturals es pot incrementar significativament quan les solucions aquoses d'aquests compostos s'escalfen a temperatures adequades, observant-se un sinerqisme entre els efectes propis dels productes i els de l'aigua calenta. Aquest és el cas de substàncies com el carbonat sòdic (Smilanick *et al.*, 1997a; Daus *et al.*, 2000), el sorbat potàssic (Wild, 1987; Kitagawa i Kawada, 1984; Brown i Baraka, 1996), l'etanol i el diòxid de sofre (Smilanick *et al.*, 1995; Brown i Baraka, 1996) i els terpens L-carvona i eugenol, components d'olis essencials presents en plantes superiors (Bompeix i

Cholodowski-Faivre, 1997). La temperatura més convenient cal determinar-la per a cada producte, però en general, i de manera semblant al cas de l'aigua calenta sola, temperatures inferiors als 40°C no aporten cap millora i temperatures superiors als 50°C resulten fitotòxiques. En altres casos com per exemple el dels tractaments amb polisulfur de calci contra la podridura verda, les solucions a temperatura ambient resulten del tot inefectives i el control de la malaltia només es produeix quan aquestes solucions s'escalfen a temperatures superiors als 40°C (Smilanick i Sorenson, 2001).

L'aplicació de microorganismes antagonics en combinació amb altres sistemes alternatius, tant físics com químics, és avui dia un camp de recerca molt actiu. La capacitat de control de la podridura verda per part de l'antagonista *Pseudomonas glathei* en taronges es va veure significativament incrementada quan la fruita tractada amb l'agent de biocontrol es va sotmetre a un tractament de curat a 30°C durant 24 h (Huang *et al.*, 1995). La integració entre un tractament amb llum ultraviolada (UV-C) i un tractament amb l'antagonista *Candida guilliermondii* (llavors classificat com *Debaryomyces hansenii*) va donar millors resultats contra la podridura verda en mandarines que ambdós tractaments per separat (Stevens *et al.*, 1997). El recobriment individual dels fruits amb diferents materials s'ha assajat amb èxit com a sistema portador de distints microorganismes antagonics; aquest procediment permet, a més, reduir les pèrdues d'aigua del fruit per transpiració i endarrerir la seva senescència (McGuire, 1994; McGuire i Hagenmaier, 1996). Recobriments a base de metilcelulosa i de metilcelulosa formulada addicionant glucosa i clorur càlcic van millorar l'efectivitat de *Candida guilliermondii* en el control de *P. digitatum* en taronges (Potjewijd *et al.*, 1995). Un altre mètode físic que ha mostrat una acció sinèrgica en combinar-se amb el control biològic és el raspatllat amb aigua calenta (Daus *et al.*, 2000).

A continuació es relacionen alguns dels productes amb els quals s'han obtingut els resultats més interessants a l'integrar tractaments químics amb l'aplicació d'agents microbians de biocontrol; la gran majoria d'aquests resultats es refereixen al control integrat de la podridura verda: clorur càlcic (Chalutz *et al.*, 1992a; Droby *et al.*, 1997), carbonat sòdic (Wisniewski *et al.*, 1998; Smilanick *et al.*, 1999b; Daus *et al.*, 2000), àcid nordihidroguairacètic, poli-D-lisina i poli-D-arginina (Wisniewski *et al.*, 1998), quitosan i derivats (Fajardo *et al.*, 1998; El Ghaouth *et al.*, 2000a), 2-deoxi-D-glucosa (El Ghaouth *et al.*, 2000b), lisozima (Wisniewski *et al.*, 2001). Algunes d'aquestes substàncies complementen amb una acció curativa l'activitat dels agents de biocontrol.

A part de la seva efectivitat més gran, altres avantatges de les combinacions respecte a l'aplicació d'agents de biocontrol sols són la seva major estabilitat i el fet que la complexitat dels seus modes d'acció dificulta més el desenvolupament de resistències per part dels patògens (Droby *et al.*, 2001). La integració de tractaments apareix, per tant, com la tecnologia més prometedora per aconseguir igualar l'efectivitat dels fungicides sintètics. Caldria, com a perspectiva de futur, continuar els esforços de recerca en aquesta direcció.

## Objectius

L'objectiu general d'aquesta tesi és el desenvolupament de sistemes alternatius que possibilitin el control de les principals malalties de postcollita sense la utilització de productes químics de síntesi. El treball de la tesi està centrat en el sector cítricol català, representat bàsicament per la zona productora del sud de Tarragona, comarques del Baix Ebre i Montsià. Després de caracteritzar les poblacions fúngiques en camps i centrals de la zona, es pretén, com un component important d'un programa de producció integrada de cítrics, oferir alternatives o aprofundir en l'estudi d'alternatives per al control de les podridures verda i blava, causades respectivament per *P. digitatum* i *P. italicum*.

Els objectius particulars que es plantegen són els següents:

1. Caracterització de la micoflora de la superfície dels fruits i ambiental en camps de mandarina clementina "Clemenules" representatius de la zona cítricola de Tarragona durant el període de recol·lecció.
2. Caracterització de la micoflora ambiental i de la superfície d'equips i instal·lacions en centrals cítriques de Tarragona durant el període de comercialització de les clementines.
3. Quantificació en centrals cítriques de Tarragona de les soques de *P. digitatum*, *P. italicum* i altres *Penicillium* spp. resistents als fungicides imazalil i tiabendazol.

4. Avaluació de tractaments amb aigua calenta, carbonat sòdic i bicarbonat sòdic per al control de les podridures verda i blava en taronges i mandarines clementines comercialitzades directament o conservades en fred normal.
5. Avaluació *in vivo* d'altres additius alimentaris i compostos de baixa toxicitat per al control de les podridures verda i blava en taronges i llimones.
6. Determinació de l'efecte de l'exposició contínua o intermitent a una atmosfera ozonitzada durant la conservació frigorífica sobre el desenvolupament de les podridures verda i blava en taronges i llimones.
7. Aïllament de bacteris i llevats epifítics i endofítics i determinació *in vivo* en taronges i mandarines de la seva capacitat antagonista contra els patògens *P. digitatum* i *P. italicum*.
8. Avaluació de l'efectivitat de la soca CPA-2 del bacteri *Pantoea agglomerans* en el control biològic de les podridures verda i blava en taronges i mandarines. Determinació de la dinàmica poblacional de l'antagonista a temperatura ambient i en fred normal.
9. Millora del control de les podridures verda i blava en taronges mitjançant la combinació de l'aplicació de la soca CPA-2 de *P. agglomerans* amb tractaments amb bicarbonat sòdic.

## Referències bibliogràfiques

- Adaskaveg, J.E., Förster, H. 2000. "Reduced Risk" fungicides, a new direction for management of postharvest decays on fruit crops in the United States. Proc. Fourth Int. Conf. Postharvest Sci. Postharvest 2000, 26-31 març, Jerusalem, Israel. p. 35 (resum).
- AEA, Anuario de Estadística Agraria. 1999. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, Espanya.
- Aharoni, Y., Lattar, F.S., 1972. The effect of various storage atmospheres on the occurrence of rots and blemishes on Shamouti oranges. Phytopathol. Z. 73: 371-374.
- Angioni, A., Cabras, P., D'hallewin, G., Pirisi, F.M., Reniero, F., Schirra, M. 1998. Synthesis and inhibitory activity of 7-geranoxycoumarin against *Penicillium* species in *Citrus* fruit. Phytochemistry 47: 1521-1525.
- Arimoto, Y., Sugarawa, F., Yoshida, S., Yamaguchi, I. 1995. Prangolarin is a chemical facilitator for the enhanced development of the infection process in the epicarp of *Citrus limon* by *Penicillium digitatum*. J. Agric. Food Chem. 43: 2283-2285.
- 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.
- Arras, G., De Cicco, V. 1994. Metabolic changes and postharvest diseases of orange fruit during storage. Proc. Sixth Int. Symp. Eur. Conc. Act. Prog. COST 94, 19-22 octubre, Oosterbeek, Holanda. pp. 201-208.
- Arras, G., D'hallewin, G. 1994. *In vitro* and *in vivo* control of *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea* in citrus fruit by *Bacillus subtilis* strains. Agr. Med. 124: 56-61.
- Asthana, A., Tuveson, R.W. 1992. Effects of UV and phototoxins on selected fungal pathogens of citrus. Int. J. Plant Sci. 153: 442-452.
- Baker, K.F., Cook, R.J. 1974. Biological Control of Plant Pathogen. Freeman, W.H. & Co., San Francisco, CA, EUA.
- 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.
- Barkai-Golan, R., Phillips, D.J. 1991. Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. *Plant Dis.* 75: 1085-1089.
- Barmore, C.R., Brown, G.E. 1979. Role of pectolytic enzymes and galacturonic acid in citrus fruit decay caused by *Penicillium digitatum*. *Phytopathology* 69: 675-678.
- Barmore, C.R., Brown, G.E. 1981. Polygalacturonase from citrus fruit infected with *Penicillium italicum*. *Phytopathology* 71: 328-331.
- Barmore, C.R., Brown, G.E. 1982. Spread of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* during contact between citrus fruits. *Phytopathology* 72: 116-120.
- Ben-Yehoshua, S., Kim, J.J., Shapiro, B. 1989. Curing of citrus fruits, applications and mode of action. *Proc. Fifth Int. Cont. Atmosphere Res. Conf. Vol. 2*, 14-16 juny, Wenatchee, WA, EUA. pp. 179-196.
- Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Fang, D.Q., Kim, J.J. 1995. Preformed antifungal compounds of citrus fruits: effect of postharvest treatments with heat and growth regulators. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1062-1066.
- Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Kim, J.J., Carmeli, S. 1992. Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1217-1221.
- Ben-Yehoshua, S., Shapiro, B., Moran, R. 1987. Individual seal-packaging enables the use of curing at high temperatures to reduce decay and heal injury of citrus fruits. *HortScience* 22: 777-783.
- Ben-Yehoshua, S., Shapiro, B., Shomer, M. 1990. Ethylene enhanced heat damage to flavedo tissue of cured citrus fruit. *HortScience* 25: 122-124.
- Bompeix, G., Cholodowski-Faivre, D. 1997. Fungicides and natural plant products combined with hot dip treatments in water. *Proc. Int. Symp. Post-harvest Treatment of Citrus Fruits to Control Decay during Storage and Marketing*, 13 octubre, Acireale, Itàlia. pp. 153-164.
- Brown, G.E. 1973. Development of green mold in degreened oranges. *Phytopathology* 63: 1104-1107.
- Brown, G.E. 1975. Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. *Phytopathology* 65: 404-409.
- Brown, G.E. 1980. Fruit handling and decay control techniques affecting quality. A: *Citrus Nutrition and Quality*. Nagy, S., Attaway, J.A. (Eds.). ACS Symp. Ser. 143, Washington, DC, EUA. pp. 193-224.
- Brown, G.E. 1982. Resistance of decay fungi to benzimidazole fungicides used in Florida citrus packinghouses. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 95: 239-242.
- Brown, G.E., Baraka, M.A. 1996. Effect of washing sequence and heated solutions to degreened Hamlin oranges on *Diplodia* stem-end rot, fruit colour and phytotoxicity. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 2: 1164-1170.
- Brown, G.E., Lee, H.S. 1993. Interactions of ethylene with citrus stem-end rot caused by *Diplodia natalensis*. *Phytopathology* 83: 1204-1208.
- Brown, G.E., Nagy, S., Maraulja, M. 1983. Residues from postharvest nonrecovery spray applications of imazalil to oranges and effects on green mold caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Dis.* 67: 954-957.
- Brown, G.E., Wardowski, W.F. 1984. Use of chlorine and chlorine dioxide in Florida citrus packinghouses to reduce inoculum of decay pathogens. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 97: 97-100.
- 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.
- Burg, S.P., Burg, E.A. 1966. Fruit storage at subatmospheric pressures. *Science* 153: 314-315.
- Bus, V.G., Bongers, A.J., 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.
- Caccioni, D.R.L., Guizzardi, M. 1994. Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components. *J. Ess. Oil Res.* 6: 173-179.
- Ceponis, M.J., Capellini, R.A. 1985. Wholesail and retail losses in grapefruit marketed in metropolitan New York. *HortScience* 20: 93-95.
- Ceponis, M.J., Capellini, R.A., Lightner, G.W. 1986. Disorders in citrus shipments to the New York market, 1972-1984. *Plant Dis.* 70: 1162-1165.
- Chace, W.G. Jr. 1969. Controlled atmosphere storage of Florida citrus fruit. *Proc. First Int. Citrus Symp.* 3: 1365-1373.
- Chalutz, E., Droby, S., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M. 1992a. Calcium-enhanced biocontrol activity of two yeasts antagonists of citrus postharvest diseases. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 3: 1066-1069.
- Chalutz, E., Droby, S., Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. 1992b. UV-induced resistance to postharvest diseases of citrus fruit. *J. Phytochem. Photobiol.* 15: 367-374.



- Chalutz, E., Wilson, C.L. 1990. Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. Plant Dis. 74: 134-137.
- Christ, R.A. 1966. The effect of handling on citrus wastage. S. Afr. Citrus J. 387: 7, 9, 11, 13, 15.
- Correas, J.L., Miranda, G. 1990. Tratamientos químicos de cítricos en post-recolección. Fruticultura Profesional 28: 68-78.
- Couey, H.M. 1989. Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pests of fruits. HortScience 24: 198-202.
- D'hallewin, G., Schirra, M. 2001. Structural changes in epicuticular wax and storage response of 'Marsh Seedless' grapefruits after ethanol dips at 21 and 50°C. Acta Hort. 553: 441-442.
- 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).
- De Matos, A.P. 1983. Chemical and microbiological factors influencing the infection of lemons by *Geotrichum candidum* and *Penicillium digitatum*. PhD thesis, University of California, Riverside, CA, EUA.
- De Waard, M.A., Groeneweg, H., Van Nistelrooy, J.G.M. 1982. Laboratory resistance to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in *Penicillium italicum*. Neth. J. Plant Path. 88: 99-112.
- Deacon, J.W. 1983. Microbial Control of Plant Pest and Diseases. Van Nostrand Reinhold Co. Ltd., London, GB.
- Dettoni, 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.
- Dezman, D.J., Nagy, S., Brown, G.E. 1986. Postharvest fungal decay control chemicals: treatments and residues in citrus fruits. Residue Rev. 97: 37-92.
- Díaz, M.A., Vila, R. 1988. El problema de la resistencia a los fungicidas: referencia a la situación en los almacenes españoles de comercialización de cítricos. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 28: 151-158.
- Díaz, M.A., Vila, R. 1989. Imazalil resistant *Penicillium* isolates from spanish citrus packinghouses. Microbiol. Alim. Nutr. 7: 191-192.
- 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., Vila, R., Hernández, E. 1987a. Detección de *Penicillium italicum* resistentes a OPPS, benomilo, TBZ y CGA-64251, procedentes de almacenes españoles de comercialización de frutos cítricos. Alimentaria 184: 59-70.
- Díaz, M.A., Vila, R., Hernández, E. 1987b. Resistencia de *Penicillium digitatum*, aislados en centros españoles de comercialización de cítricos, frente a los fungicidas OPPS, benomilo, TBZ y CGA-64251. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 27: 439-445.
- Dickson, R.G., Law, S.E., Kays, S.J., Eiteman, M.A. 1992. Abatement of ethylene by ozone treatment in controlled atmosphere storage of fruits and vegetables. Proc. Int. Winter Meet. Amer. Soc. Agric. Engin., 15-18 desembre, Nashville, TN, EUA.
- Droby, S., Chalutz, E., Horev, B., Cohen, L., Gaba, V., Wilson, C.L., Wisniewski, M. 1993a. Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mould decay caused by *Penicillium digitatum*. Plant Pathol. 42: 418-424.
- Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., Katz, H., Keren-Tzur, 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., 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., Hofstein, R., Wilson, C.L., Wisniewski, M., Fridlender, B., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A., Timar, D., Chalutz, E. 1993b. Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruits. Biol. Control 3: 47-52.
- Droby, S., Porat, R., Cohen, L., Weiss, B., Shapiro, B., Philosoph-Hadas, S., Meir, S. 1999. Suppressing green mold decay in grapefruit with postharvest jasmonate application. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 124: 184-188.
- Droby, S., Wisniewski, M.E., Cohen, L., Weiss, B., Touitou, D., Eilam, Y., Chalutz, E. 1997. Influence of CaCl<sub>2</sub> on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. Phytopathology 87: 310-315.
- Duran, R., Norman, S.M. 1961. Differential sensitivity to biphenyl among strains of *Penicillium digitatum* Sacc. Plant Dis. Rep. 45: 475-480.
- EAPC, Estadístiques Agràries i Pesqueres de Catalunya. 1998. Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Catalunya, Espanya.
- Eckert, J.W. 1977. Control of postharvest diseases. A: Antifungal Compounds. Vol. 1. Siegel, M.R., Sisler, H.D. (Eds.). Marcel Dekker Inc., New York, EUA. pp. 269-352.

- Eckert, J.W. 1990. Impact of fungicide resistance on citrus fruit decay control. A: Managing Resistance to Agrochemicals. From Fundamental Research to Practical Strategies. Green, M.B., Le Baron, H.M., Moberg, W.K. (Eds.). ACS Symp. Ser. 421, Washington, DC, EUA. pp. 286-302.
- 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.
- Eckert, J.W., Ogawa, J.M. 1985. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. Ann. Rev. Phytopathol. 23: 421-454.
- Eckert, J.W., Ratnayake, M. 1981. Host pathogen interactions in postharvest diseases. A: Postharvest Physiology and Crop Preservation. Lieberman, M. (Ed.). Plenum Press, New York, EUA. pp. 247-264.
- Eckert, J.W., Ratnayake, M. 1994. Role of volatile compounds from wounded oranges in induction of germination of *Penicillium digitatum* conidia. Phytopathology 84: 743-750.
- Eckert, J.W., Sievert, J.R., Ratnayake, M. 1994. Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. Plant Dis. 78: 971-974.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Asselin, A., Benhamou, N. 1992. Anti-fungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. Mycol. Res. 96: 769-779.
- 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.
- El-Goorani, M.A., El-Kasheir, H.M., Shoeib, A.A. 1983. Resistance to benzimidazole fungicides of *Penicillium italicum* and *P. digitatum* isolated from packinghouses and orchards in Egypt. Plant Dis. 62: 100-102.
- El-Goorani, M.A., Sommer, N.F. 1979. Suppression of postharvest plant pathogenic fungi by carbon monoxide. Phytopathology 69: 834-838.
- Fajardo, J.E., McCollum, T.G., McDonald, R.E., Mayer, R.T. 1998. Differential induction of proteins in orange flavedo by biologically based elicitors and challenged by *Penicillium digitatum* Sacc. Biol. Control 13: 143-151.
- Fawcett, H.S. 1922. Packinghouse control of brown rot. Calif. Citrogr. 7: 232, 254.
- Fawcett, H.S. 1936. Citrus Diseases and their Control. 2a ed. Ed. McGraw-Hill Book Co., New York, EUA.
- 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.
- González-Aguilar, G.A., Zacarias, L., Mulas, M., Lafuente, M.T. 1997. Temperature and duration of water dips influence chilling injury, decay and polyamine content in "Fortune" mandarins. Postharvest Biol. Technol. 12: 61-69.
- Grange, M., Ahmed, S. 1988. Handbook of Plants with Pest Control Properties. John Wiley & Sons, New York, EUA.
- Green, F.M. 1932. The infection of oranges by *Penicillium*. J. Pomol. Hort. Sci. 10: 184-215.
- Grierson, W., Ben-Yehoshua, S. 1986. Storage of citrus fruits. A: Fresh Citrus Fruits. Wardowski, W.F., Nagy, S., Grierson, W. (Eds.). AVI Publishing Co. Inc., Westport, CT, EUA. pp. 479-507.
- Griffiths, E. 1981. Iatrogenic plant diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 19: 69-82.
- Gueldner, R.C., Reilly, C.C., Pusey, P.L., Costello, C.E., Arrendale, R.F., Cox, R.H., Himmelsbach, D.S., Crumley, F.G., Cutler, H.G. 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. J. Agric. Food Chem. 36: 366-370.
- Gutter, Y. 1975. Interrelationship of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* in thiabendazole-treated oranges. Phytopathology 65: 498-499.
- Gutter, Y. 1977. Problems of decay in marketing citrus fruits: strategy and solutions around the world. Proc. Int. Soc. Citriculture 1: 242-244.
- Gutter, Y., Shachnai, A., Schiffmann-Nadel, M., Dinoor, A. 1981. Biological aspects of citrus molds tolerant to benzimidazole fungicides. Phytopathology 71: 482-487.
- 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. 1962. Differential sensitivity to sodium orthophenylphenate by biphenyl-sensitive and biphenyl-resistant strains of *Penicillium digitatum*. Plant Dis. Rep. 46: 100-104.
- Harding, P.R. Jr. 1968. Effect of ozone on *Penicillium* mold decay and sporulation. Plant Dis. Rep. 52: 245-247.

- Harding, P.R. Jr. 1969. Effect of low oxygen and low carbon dioxide combination in controlled atmosphere storage of lemons, grapefruit and oranges. *Plant Dis. Rep.* 53: 585-588.
- Harding, P.R. Jr. 1972. Differential sensitivity to thiabendazole by strains of *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. *Plant Dis. Rep.* 56: 256-260.
- Holmes, G.J., Eckert, J.W. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* 89: 716-721.
- 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.
- Houck, L.G. 1967. Hot water treatments for control of *Penicillium* green mold of Eureka lemons. *Phytopathology* 57: 99 (resum).
- Houck, L.G. 1977. Problems of resistance to citrus fungicides. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1: 263-269.
- Huang, Y., Deverall, B.J., Morris, S.C. 1995. Postharvest control of green mold 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., Deverall, B.J., Morris, S.C., Wild, B.L. 1993. Biocontrol of postharvest orange diseases by a strain of *Pseudomonas cepacia* under semi-commercial conditions. *Postharvest Biol. Technol.* 3: 293-304.
- 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.
- Jin, L., Xiaoyu, W., Honglin, Y., Zonggan, Y., Jiaxun, W., Yaguang, L. 1989. Influence of discharge products on post-harvest physiology of fruit. *Proc. Sixth Int. Symp. High Voltage Engin.*, 28 agosto-1 setiembre, New Orleans, LA, EUA. pp. 1-4.
- Kader, A.A. 1986. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technol.* 40: 99-104.
- Kader, A.A. 1999. Current and potential applications of ionizing radiation in postharvest handling of fresh horticultural perishables. *Int. Produce J.* 8: 38-39.
- Kader, A.A., Arpaia, M.L. 1992. Postharvest handling systems: subtropical fruits. A: *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. 2a ed. Kader, A.A. (Ed.). Pub. 3311, University of California Press, Berkeley, CA, EUA. pp. 233-240.
- Kim, J.J., Ben-Yehoshua, S., Shapiro, B., Henis, Y., Carmeli, S. 1991. Accumulation of scoparone in heat-treated lemon fruit inoculated with *Penicillium digitatum* Sacc. *Plant Physiol.* 97: 880-885.
- 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.
- Lanza, G. 1997. Control del "moho verde" (*Penicillium digitatum*) mediante curación ("curing") a alta temperatura. Últimos ensayos en Italia. *Phytoma España* 90: 95-99.
- Larson, R.A., Berenbaum, M.R. 1988. Environmental phytotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 22: 254-260.
- Lievens, K.H., van Rijsbergen, R., Leyns, F., Lambert, B.J., Tenning, P., Swings, J., Joos, H.J.P. 1989. Dominant rhizosphere bacteria as a source for antifungal agents. *Pest. Sci.* 27: 141-154.
- Lück, E. 1981. Conservación química de los alimentos. Ed. Acribia, Saragossa, Espanya.
- Luckey, T.D. 1991. Radiation hormesis. CRC Press, Boca Raton, FL, EUA.
- Lurie, S. 1998. Postharvest heat treatments. *Postharvest Biol. Technol.* 14: 257-269.
- Mari, M., Guizzardi, M. 1998. The postharvest phase: emerging technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica* 26: 59-66.
- Mari, M., Iori, R., Leoni, E., Marchi, A. 1993. *In vitro* activity of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest fruit pathogens. *Ann. Appl. Biol.* 123: 155-164.
- 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.
- Maxie, E.C., Sommer, N.F., Eaks, I.L. 1969. Effect of gamma radiation on citrus fruits. *Proc. First Int. Citrus Symp.* 3: 1375-1387.
- McGlasson, W.B., Eaks, I.L. 1972. A role for ethylene in the development of wastage and off-flavors in stored "Valencia" oranges. *HortScience* 7: 80-81.
- 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.
- Multon, J.L. 1988. Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias. Ed. Acribia, Saragossa, Espanya.

- Nafussi, B., Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Peretz, J., Ozer, B.K., D'hallewin, G. 2000. Mode of action of hot water dip in reducing decay of lemon fruit. Proc. Fourth Int. Conf. Postharvest Sci. Postharvest 2000, 26-31 març, Jerusalem, Israel. p. 8 (resum).
- Nigam, N., Mukerji, K.G. 1988. Biological control. Concepts and practices. A: Biocontrol of Plant Diseases. Vol 1. Mukerji, K.G., Garg, K.L. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL, EUA. pp. 2-9.
- NRC, National Research Council. 1993. Pesticides in the Diets of Infants and Children. National Academy Press, Washington, DC, EUA.
- NTDGPIC, Norma Tècnica per a la Denominació Genèrica Producció Integrada dels Cítrics. 2001. DARP, Generalitat de Catalunya. <http://www.gencat.es/darp/c/camp/pi>
- Oogaki, C., Manago, M. 1977. Studies on the controlled atmosphere storage of 'Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). Proc. Int. Soc. Citriculture. 3: 1127-1133.
- Pao, S., Brown, G.E. 1998. Reduction of microorganisms on citrus fruit surfaces during packinghouse processing. J. Food Prot. 61: 903-906.
- Porat, R., Daus, A., Weiss, B., Cohen, L., Fallik, E., Droby, S. 2000. Reduction of postharvest decay in organic citrus fruit by a short hot water brushing treatment. Postharvest Biol. Technol. 18: 151-157.
- Potjewijd, R., Nisperos, M.O., Burns, J.K., Parish, M., Baldwin, E.A. 1995. Cellulose-based coatings as carriers for *Candida guilliermondii* and *Debaryomyces* sp. in reducing decay of oranges. HortScience 30: 1417-1421.
- Pratella, G.C., Tonini, G., Cessari, A. 1969. Postharvest disease problems of Italian citrus fruit. Proc. First Int. Citrus Symp. 3: 1317-1323.
- Rodov, V., Agar, T., Peretz, J., Nafussi, B., Kim, J.J., Ben-Yehoshua, S. 2000. Effect of combined application of heat treatments and plastic packaging on keeping quality of 'Oroblanco' fruit (*Citrus grandis* L. x *C. paradisi* Macf.). Postharvest Biol. Technol. 20: 287-294.
- Rodov, V., Ben-Yehoshua, S., Albagli, R., Fang, D.Q. 1995. Reducing chilling injury and decay of stored citrus fruit by hot water dips. Postharvest Biol. Technol. 5: 119-127.
- Roger Amat, S. 1988. Defectos y Alteraciones de los Frutos Cítricos en su Comercialización. Lit. Nicolau, Almassora, València, Espanya.
- Roth, G. 1967. Citrus fruit decay in South Africa caused by *Penicillium digitatum* Sacc. Phytopathol. Z. 58: 383-396.
- Salunkhe, D.K., Desai, B.B. 1984. Postharvest Biotechnology of Fruits. Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL, EUA.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. (Eds.). 1995. Introduction to Food-borne Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holanda.
- 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.
- Schifmann-Nadel, M. 1977. Chemical and physiological changes in citrus fruit during storage and their relation to fungal infection. Proc. Int. Soc. Citriculture 1: 311-317.
- Schirra, M., Agabbio, M., D'hallewin, G., Pala, M., Ruggiu, R. 1997a. Response of Tarocco oranges to picking date, postharvest hot water dips and chilling storage temperature. J. Agric. Food Chem. 45: 3216-3220.
- Schirra, M., Cabras, P., Angioni, A., D'hallewin, G., Ruggiu, R., Minelli, E.V. 1997b. Effect of heated solutions on decay control and residues of imazalil in lemons. J. Agric. Food Chem. 45: 4127-4130.
- Schirra, M., D'hallewin, G. 1997. Storage performance of 'Fortune' mandarins following hot water dips. Postharvest Biol. Technol. 10: 229-238.
- Schirra, M., D'hallewin, G., Ben-Yehoshua, S., Fallik, E. 2000a. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. Postharvest Biol. Technol. 21: 71-85.
- Schirra, M., D'hallewin, G., Cabras, P., Angioni, A., Ben-Yehoshua, S., Lurie, S. 2000b. Chilling injury and residue uptake in cold-stored 'Star Ruby' grapefruit following thiabendazole and imazalil dip treatments at 20 and 50°C. Postharvest Biol. Technol. 20: 91-98.
- 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.
- Segall, R.H. 1968. Fungicidal effectiveness of chlorine as influenced by concentration, temperature, pH, and spore exposure time. Phytopathology 58: 1412-1414.
- Sholberg, P.L. 1998. Fumigation of fruit with short-chain organic acids to reduce the potential of postharvest decay. Plant Dis. 82: 689-693.
- Simmonds, J.H. 1963. Studies in the latent phase of *Colletotrichum* species concerning ripe rots of tropical fruits. Queensland J. Agr. Sci. 20: 373-424.
- Singh, V., Deverall, B.J. 1984. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. Trans. Br. Mycol. Soc. 83: 487-490.

- Singh, A.K., Dickshit, A., Sharma, M.L., Dixit, S.N. 1980. Fungitoxic activity of some essential oils. *Econ. Bot.* 34: 186-190.
- Singh, A., Singh, R., 1996. Quality of Kinnow mandarins as affected by modified atmosphere storage. *J. Food Sci. Technol.* 33: 483-487.
- Smilanick, J.L., Crisosto, C.H., Mlikota, F. 1999a. Postharvest use of ozone on fresh fruit. *Perishables Handling Quarterly* 99: 10-14.
- Smilanick, J.L., Denis-Arrue, R. 1992. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Dis.* 76: 481-485.
- Smilanick, J.L., Eckert, J.W. 1986. Selective medium for isolating *Penicillium digitatum*. *Plant Dis.* 70: 254-256.
- Smilanick, J.L., Gouin-Behe, C.C., Margosan, D.A., Bull, C.T., Mackey, B.E. 1996. Virulence on citrus of *Pseudomonas syringae* strains that control postharvest green mold of citrus fruit. *Plant Dis.* 80: 1123-1128.
- 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. 1999b. 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.
- Smilanick, J.L., Sorenson, D. 2001. Control of postharvest decay of citrus fruit with calcium polysulfide. *Postharvest Biol. Technol.* 21: 157-168.
- Smoot, J.J. 1969. Decay of Florida citrus fruit stored in controlled atmospheres and in air. *Proc. First Int. Citrus Symp.* 3: 1285-1293.
- Smoot, J.J., Houck, L.G., Johnson, H.B. 1971. *Market Diseases of Citrus and Other Subtropical Fruits.* USDA Agric. Handb. 398.
- 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.
- Snowdon, A.L. 1990. *A Color Atlas of Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables.* CRC Press, Boca Raton, FL, EUA.
- Sorenson, D., Smilanick, J.L., Margosan, D.A. 1999. Postharvest high pressure washing of citrus fruit with sodium bicarbonate to control green mold. *Phytopathology* 89: S74 (resum).
- Spalding, D.H., Reeder, W.F. 1976. Low pressure (hypobaric) storage of limes. *J. Amer. Hort. Sci.* 101: 367-370.
- Spalding, D.H., Reeder, W.F. 1985. Effect of hot water and gamma radiation on postharvest decay of grapefruit. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 98: 207-208.
- 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.
- Suslow, T. 1997. *Postharvest Chlorination. Basic Properties and Key Points for Effective Disinfection.* Pub. 8003, University of California Press, Berkeley, CA, EUA.
- Suslow, T. 1998. *Basics of ozone applications for postharvest treatment of fruits and vegetables.* *Perishables Handling Quarterly* 94: 9-11.
- Tuset, J.J. 1987. *Podredumbres de los Frutos Cítricos.* Conselleria d'Agricultura i Pesca, Generalitat Valenciana, València, Espanya.
- Tuset, J.J. 1998. Una década de las enfermedades fúngicas de la postrecolección de los agrios. *Phytoma España* 100: 180-187.
- 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.
- Tuset, J.J., Piquer, J., García Ramos, J. 1980. El podrido de los frutos cítricos en nuestras condiciones ambientales. *ITEA* 40: 34-42.
- Tuset, J.J., Portilla, M.T., Hinarejos, C., Buj, A. 1992. *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*, causing postharvest decay of citrus fruit. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 3: 1040-1043.
- US FDA, United States Food and Drug Administration. 1997. Substances generally recognized as safe, proposed rule. *Federal Register* 62 (74): 18937-18964.
- van Gestel, J.F.E. 1983. Microcycle conidiation in *Penicillium italicum*. *Exp. Mycol.* 7: 287-291.

- Viñas, I. 1990. Principios básicos de la patología de post-cosecha. *Frut* 5: 285-292.
- Vyas, C. 1988. Iatrogenic diseases. A: Nontarget Effects of Agricultural Fungicides. Vyas, C. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, EUA. pp. 87-96.
- Wells, J.M., Spalding, D.H. 1976. Stimulation of *Geotrichum candidum* by low oxygen and high carbon dioxide atmospheres. *Phytopathology* 65: 1299-1302.
- 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.
- Wild, B.L. 1993. Reduction of chilling injury in grapefruits and oranges stored at 1°C by prestorage hot dip treatments, curing and wax application. *Austral. J. Exp. Agric.* 33: 495-498.
- Wild, B.L., Hood, C.W. 1989. Hot dip treatments reduce chilling injury in long-term storage of "Valencia" oranges. *HortScience* 24: 109-110.
- Wild, B.L., McGlasson, W.B., Lee, T.H. 1976. Effect of reduced ethylene levels in storage atmospheres on lemon keeping quality. *HortScience* 11: 114-115.
- Wilson, C.L., El Ghaouth, A., Chalutz, E., Droby, S., Stevens, C., Lu, J.Y., Khan, V.A., Arul, J. 1994. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plant Dis.* 78: 837-844.
- Wilson, C.L., Solar, J.M., El Ghaouth, A., Wisniewski, M.E. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 81: 204-210.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., Biles, C.L., McLaughlin, R., Chalutz, E., Droby, S. 1991. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. *Crop Prot.* 10: 172-177.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., Droby, S., Chalutz, E. 1993. A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Sci. Hortic.* 40: 105-112.
- Winston, J.R. 1935. Reducing decay in citrus fruits with borax. *USDA Agric. Tech. Bull.* 488.
- 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 agosto, Edinburg, Escòcia. Abstract 5.2.61 (resum).
- Wisniewski, M.E., Wilson, C.L. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *HortScience* 27: 94-98.
- Wisniewski, M.E., Wilson, C.L., El Ghaouth, A., Droby, S. 2001. Non-chemical approaches to postharvest disease control. *Acta Hort.* 553: 407-412.
- Yarwood, C.E. 1970. Man made diseases. *Science* 168: 218.

