

## Identificación de *Fusarium oxysporum* como agente causal de la podredumbre del pedúnculo de limón en Tucumán (Argentina) y su control\*

Gabriela M. Fogliata\*\*, Cristina V. Martínez\*\*, María E. Acosta\*\*,  
María L. Muñoz\*\* y L. Daniel Ploper\*\*

### RESUMEN

En 2007 se detectó una pudrición del pedúnculo, con presencia de micelio, en frutos de limón almacenados en empaques comerciales en Tucumán, República Argentina. Esta enfermedad, conocida como "Fusarium rot", puede ser causada por diferentes especies del género *Fusarium*. Es considerada de baja importancia por su aparición ocasional, aunque en otros países existen antecedentes de pérdidas significativas de frutos de naranja y pomelo. Los objetivos del presente estudio fueron identificar el agente causal de esta pudrición, evaluar el daño en el fruto y estimar la eficacia *in vitro* contra el agente causal de la pudrición de los fungicidas de poscosecha utilizados actualmente para el control de otras pudriciones. Durante las campañas de 2007 a 2011 se aislaron 22 cepas, las que fueron todas identificadas como *Fusarium oxysporum* mediante caracterización morfológica y cultural, PCR y secuenciación. Se realizaron pruebas de patogenicidad inoculando frutos de limón y re-aislamientos en APG. Se evaluó incidencia y tipo de daño, almacenando en condiciones predisponentes para el desarrollo de la pudrición frutos de limón sin tratar, o tratados con hipoclorito de sodio solo o con etefon, observándose una incidencia del 14,0%, 22,5% y el 41,0%, respectivamente. La pudrición del pedúnculo no avanzó hacia la cáscara o a tejidos internos del fruto. La mayor eficacia *in vitro*, para inhibir el crecimiento del micelio en APG, se obtuvo con carbendazim (EC<sub>95</sub> de 1,5 mg/L) y propiconazole (EC<sub>95</sub> de 7,2 mg/L). Azoxistrobina+fludioxonil, imazalil, tiabendazol e imazalil+pirimetanil mostraron menor eficacia (EC<sub>95</sub> de 46,6 mg/L, 56,3 mg/L, 84,3 mg/L y 93,9 mg/L, respectivamente). Se confirmó que *Fusarium oxysporum* causa la podredumbre del pedúnculo en limón en Tucumán. El principal daño fue el desarrollo de micelio blanco sobre el pedúnculo, sin que la pudrición avanzara hacia la cáscara. Entre los fungicidas más eficaces, carbendazim tiene restricciones para su uso en la fruta fresca y para la industria, resultando de interés propiconazole para ser evaluado en pruebas *in vivo*.

**Palabras clave:** *Citrus limon*, imazalil, carbendazim, propiconazole, EC<sub>95</sub>.

### ABSTRACT

**Identification of *Fusarium oxysporum* as the causal agent of a peduncle rot in Tucumán, Argentina and *in vitro* efficacy of fungicides for its control**

In 2007, a peduncle rot with presence of mycelium was detected in lemon fruits stored in commercial packinghouses in Tucumán. This disease, known as "Fusarium rot", can be caused by different species of the genus *Fusarium*. Although it is considered a disease of low importance, due to its occasional occurrence, significant losses in orange and grapefruit fruits have been reported in other countries. The current study was conducted to identify the causal agent of lemon peduncle rot in Tucumán, evaluate its damage in fruit and estimate the *in vitro* efficacy against its causal agent, of postharvest fungicides currently used for control of other fruit rots. During the years 2007 to 2011, 22 strains were collected, which were all identified as *Fusarium oxysporum* by morphological and cultural characterization, PCR and sequencing. Pathogenicity tests were performed on fruit by artificial inoculation and the fungus re-isolated on PDA. In order to evaluate the incidence and type of damage, lemon fruits, untreated or treated with sodium hypochlorite, alone or with ethephon were stored under predisposing conditions, resulting in an incidence of 14.0%, 22.5% and 41.0%, respectively. Peduncle rot did not advance towards the peel or internal tissues of the fruit. The highest *in vitro* efficacy, inhibition of mycelial growth of the pathogen in PDA, was obtained with carbendazim (EC<sub>95</sub> 1.5 mg/L) and propiconazole (EC<sub>95</sub> 7.2 mg/L). Azoxystrobin+fludioxonil, imazalil, thiabendazole and imazalil+pyrimethanil, were less effective (EC<sub>95</sub> of 46.6 mg/L, 56.3 mg/L,

Fecha de ingreso: 20/10/17 - Fecha de egreso: 27/09/18

\*Parte de los datos que se presentan en este trabajo fueron publicados en la revista *Plant Disease*, Vol. 97 (7): 989 (2013).

\*\*Sección Fitopatología, EEAOC, gfogliata@eeaoc.org.ar.

84.3 mg/L and 93.9 mg/L, respectively). *Fusarium oxysporum* was confirmed as the causal agent of peduncle rot in lemon in Tucumán, with development of white mycelium and with the rot only restricted to the peduncle. Among the most effective fungicides *in vitro*, carbendazim has restrictions on its use, both for fresh fruit and for industry, so it is of interest to evaluate propiconazole in *in vivo* tests..

**Key words:** *Citrus limon*, imazalil, carbendazim, propiconazole, EC<sub>95</sub>.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La República Argentina es el principal productor y exportador mundial de limón, concentrándose el 85% de esa producción en la provincia de Tucumán. Del total producido, la mayor parte es industrializado y un 15% se comercializa como fruta fresca, especialmente destinada a la exportación. Los principales mercados de la fruta fresca son los países de la Unión Europea (UE), seguidos por Rusia, otros países de Europa del Este y Asia (Feder citrus, 2016).

Durante la exportación a estos mercados distantes pueden ocurrir pérdidas por enfermedades de poscosecha que causan pudrición del fruto. Las pudriciones prevalentes en el limón en Tucumán son el "moho verde", causada por *Penicillium digitatum* Wehmer; la "podredumbre amarga", causada por *Geotrichum citri-aurantii* (Ferraris) Butler; la "podredumbre morena", causada por *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (syn. *P. parasitica* Dastur) y por *Phytophthora citrophthora* (R. E. Sm & E. H. Sm.) Leonian; y la "podredumbre peduncular", causada por *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. y por *Phomopsis citri* H. Fawc. non Sacc. Traverso & Spessa. Para minimizar los daños de estas pudriciones se realiza un manejo integral que incluye aplicaciones de fungicidas en campo, manipulación cuidadosa del fruto durante las etapas de cosecha, almacenamiento y transporte para minimizar heridas, mantenimiento de la higiene de las plantas de empaque y aplicaciones de desinfectantes y fungicidas en la etapa de poscosecha.

En la campaña 2007, en Tucumán se detectó otra enfermedad caracterizada por la presencia de un micelio blanco en el pedúnculo en frutos de limón que estaban embalados en cajas de cartón, y almacenados en los empaques comerciales como testigos de partidas de exportación. No se conocía hasta ese momento el agente casual y si bien su prevalencia fue baja, afectó la calidad en la fruta fresca debido a que llegaron frutos con este problema a los destinos de exportación. Hubo sucesivas detecciones en años posteriores, especialmente en frutos procedentes de los departamentos de Monteros, Chicligasta y J. B. Alberdi, ubicados al sur de la provincia de Tucumán.

La pudrición observada coincidía con la enfermedad reportada en otros países como "Fusarium rot", causada por diferentes especies del género

*Fusarium*.

"Fusarium rot" fue citada en Florida y California (EE.UU.) en frutos de naranja y limón en almacenamiento (Fawcett, 1936). Más tarde fue reportada en Israel, donde afectaba frutos que permanecían almacenados durante largos periodos de tiempo (Schiffmann-Nadel, 1969), especialmente limones y pomelos debilitados fisiológicamente (Joffe and Schiffmann-Nadel, 1971).

Se menciona que esta enfermedad puede causar pudrición del extremo peduncular y/o estilar y, menos frecuentemente, de cualquier otra parte superficial del fruto, así como una pudrición interna del fruto sin síntomas externos visibles, y que desarrolla el micelio cuando está bajo condiciones de alta humedad relativa (Brown *et al.*, 2000).

Es considerada una enfermedad de poscosecha de baja importancia de los frutos cítricos debido a que su aparición es ocasional. No obstante, existen antecedentes de pérdidas significativas de frutos almacenados de naranja y pomelo en Israel y Australia (Brown *et al.*, 2000) y menciones de su aparición cada vez más regular en España (Tuset, 2000).

Se citaron varias especies del género *Fusarium* en cítricos, siendo las más frecuentes *F. moniliforme* (J. Sheld.) Snyd. & Hans., *F. oxysporum* (Schlecht) emend. Snyd. and Hans., *F. solani* (Mart.) Appel. and Wollenw. emend. Snyd. and Hans. y *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc. Estas especies fueron aisladas de frutos de limón, pomelo y naranja con pudrición del extremo peduncular. Además, se aisló *Fusarium* sp. de frutos cítricos con pudrición interna, aunque en este último caso estuvo asociado siempre a *Alternaria citri* Ellis & N. Pierce in N. Pierce (Schiffmann-Nadel *et al.*, 1987).

Las especies aisladas desarrollan en medios de cultivo artificiales colonias de aspecto algodonoso, de color amarillo, rosado o violeta con formación de macro y/o micro-conidios (Brown *et al.*, 2000).

El patógeno sobrevive en las ramas secas de la copa de los árboles y en la hojarasca que se encuentra debajo de estos. Allí se reproduce formando los conidios, los cuales se diseminan a través del agua o el viento, hasta depositarse sobre los frutos inmaduros. En condiciones favorables de temperatura y presencia de agua libre sobre la superficie de los frutos, los conidios germinan y penetran en el tejido vegetal, infectándolos de este modo. Así, el patógeno es adquirido en el campo permaneciendo en

estado quiescente en tejidos necróticos del cáliz y del receptáculo floral, adherido al fruto y en las grietas del extremo estilar. La colonización del tejido infectado se produce cuando el fruto madura y permanece almacenado durante largos períodos, desarrollando un micelio blanco, amarillento, rosado o violeta (Brown *et al.*, 2000).

Para su control, la bibliografía menciona que solo se requieren medidas preventivas en caso que el fruto sea almacenado durante períodos excepcionalmente largos, siendo eficaz la aplicación en poscosecha de 2,4-D (para retrasar la senescencia del pedúnculo) y la aplicación de imazalil en cera, así como el almacenamiento de los frutos a 5°C y con un manejo adecuado de la ventilación durante el mismo (Brown *et al.*, 2000).

Entre los productos recomendados para su control, la aplicación de 2,4-D está en desuso en Tucumán, mientras que la aplicación de imazalil en cera es una práctica habitual para control del moho verde. Además de imazalil, en Tucumán se utilizan otros fungicidas para el control de otras pudriciones, como las mezclas pirimetanil más imazalil y azoxistrobina más fludioxonil para control de cepas de *P. digitatum* resistentes a imazalil, propiconazole para control de la "podredumbre amarga", tiabendazol y, en forma menos generalizada, carbendazim para control de la "podredumbre peduncular", por lo que resulta de interés evaluar la eficacia de estos para controlar *Fusarium* sp.

Los objetivos del presente estudio fueron identificar el agente causal de la pudrición del pedúnculo de limón en Tucumán, evaluar el daño que causa en el fruto y estimar la eficacia *in vitro* contra su agente causal de los fungicidas de poscosecha utilizados actualmente para el control de otras pudriciones.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamientos y caracterización morfológica y cultural

Se realizó la observación de los síntomas y signos presentes en frutos de limón enfermos que procedían de cajas de cartón embaladas que los empaques almacenan como testigos de las partidas de exportación. El micelio desarrollado sobre los pedúnculos fue observado en microscopio óptico para identificar las estructuras presentes. Estas observaciones se realizaron en el año de su primera detección, 2007, y se repitió en los años 2009, 2010 y 2011.

A partir de los frutos enfermos se realizaron aislamientos en medio de cultivo agar papa glucosado (APG) al 2%, acidificado con ácido láctico. Se sembraron trozos de pedúnculo con presencia de micelio y trozos a los cuales se les retiró el micelio previo a la siembra. En este último caso se realizó una desinfección superficial por inmersión en etanol al 70% durante veinte segundos, luego en hipoclorito de sodio al 5% durante un minuto y posteriormente tres enjuagues en agua destilada estéril.

Se incubó a 25°C+ 2°C durante siete días. Para obtener cultivos monospóricos se empleó la técnica de dilución en placa; para ello se sembró una suspensión diluida de conidios en APG, se incubó por 48 h y se transfirieron las colonias generadas a partir de una única colonia a medio APG.

Para evaluar las características culturales y morfológicas de los aislamientos se utilizaron colonias de siete días desarrolladas en APG. Se registraron los rasgos morfológicos y las dimensiones de las estructuras reproductivas. De cada cepa, se midieron 50 microconidios y 50 macroconidios en microscopio óptico BM 180 (Boeco).

Además, para determinar la presencia de clamidosporas y la estructura de los conidióforos se realizaron repiques en medio de cultivo agar nutritivo sintético (SNA, por sus siglas en inglés) (1,0 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0 g de KNO<sub>3</sub>; 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,5 g de KCl; 0,2 g de sacarosa y 20,0 g de agar; en un litro de agua destilada). Se compararon las características de los aislados obtenidos con las descripciones del manual de identificación de Nelson *et al.* (1983). Debido a que todas las colonias aisladas presentaron características similares entre sí, se seleccionó una de ellas, identificada como D2 para los posteriores estudios realizados.

### Pruebas de patogenicidad

Para confirmar la patogenicidad del hongo aislado se realizaron inoculaciones de trozos de colonia en frutos de limón. Para ello, se desinfectaron superficialmente diez frutos con etanol al 70%, luego se extrajo un disco de cáscara (de 5 mm de diámetro por 1 mm de profundidad) cerca de la zona de inserción del pedúnculo, y se colocó en la zona herida un disco de colonia de 5 mm de diámetro de la cepa D2, extraído de un cultivo de cinco días, desarrollado sobre APG en incubación a 25°C±2°C. Se cubrió el sitio de inoculación con el disco de cáscara, extraído previamente, y se colocó por encima algodón humedecido, con agua destilada estéril, para conservar la humedad. Los frutos fueron envueltos con bolsas de polietileno para mantener las condiciones de alta humedad. Como testigo, se inocularon diez frutos con discos de APG de 5 mm de diámetro. La incubación se realizó a temperatura de 25°C y alta humedad relativa. El ensayo se repitió dos veces.

Se realizaron re-aislamientos en APG al 2% para completar los postulados de Koch.

### Evaluación del daño en frutos de limón

Se calculó la incidencia (porcentaje de frutos enfermos), el efecto de la aplicación de hipoclorito de sodio (desinfectante utilizado en los empaques comerciales) y si la pudrición del pedúnculo avanzaba hacia otros tejidos (externos o internos) del fruto, en frutos almacenados como testigos de partidas de exportación durante las

campañas 2007, 2009, 2010 y 2011. Los mismos provenían de un lote de limón con presencia de *Fusarium* sp.

En el mes de abril se recolectaron al azar 540 frutos de tamaño y color de exportación (60 mm de diámetro ecuatorial y color amarillo claro con zona estilar verde). En laboratorio se realizaron tres tratamientos:

1. Testigo: sin tratar
2. Hipoclorito de sodio (200 ppm de cloro activo) aplicado por inmersión durante 2 min (para simular el tratamiento que reciben los frutos al llegar a los empaques).
3. Hipoclorito de sodio más etefon (200 ml de producto comercial al 48% en 100 L de agua) por inmersión durante 1 min, para evaluar si la incidencia aumenta con el cambio de color del fruto.

Cada tratamiento tuvo seis repeticiones de 30 frutos cada una.

Los frutos fueron almacenados durante 30 días a  $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  y alta humedad relativa para evaluar el efecto de los tratamientos y determinar si la pudrición del pedúnculo avanzaba hacia otros tejidos, externos o internos, del fruto. Se compararon las medias de la incidencia con la prueba LSD ( $P = 0,05$ ).

#### Identificación molecular

##### Extracción de ADN y PCR con cebadores específicos

La extracción de ADN se realizó a partir de la colonia D2 cultivada en medio líquido papa glucosado (PG). Se colocaron 100 mg de material fúngico en tubos de 2 ml junto a seis esferas de cerámica y se homogeneizó a 5500 rpm con dos ciclos de diez segundos en homogenizador de tejidos (Precellys 24, Bertin Technologies). La extracción se realizó siguiendo el protocolo de Raeder and Broda (1985) modificado por el Laboratorio de Fitopatología de la EEAOC.

Se evaluó la integridad del ADN genómico obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% D1-LE (Biodynamics) con posterior tinción con bromuro de etidio y visualización con luz ultravioleta (UV). La concentración fue determinada midiendo la absorbancia a 260 nm y la pureza calculando el cociente de la absorbancia a 260 y 280 nm mediante espectrofotómetro GeneQuant Pro (GeneQuant).

La identificación molecular se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Debido a que las características morfológicas y culturales de las colonias respondían a *Fusarium oxysporum*, se seleccionaron cebadores específicos de esta especie, PFO2 (5'-CCCAGGGTATTACACGGT-3') y PFO3 (5'-CGGGGATAAAGCGG-3'), publicados por Edel *et al.*

(2000), los cuales amplifican fragmentos de 70 pb. La reacción se realizó adicionando 1  $\mu\text{l}$  de ADN fúngico a la mezcla constituida por la solución PCR buffer (1x), desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) (75  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (1,875 mM), cebadores específicos (750 nM), enzima Taq polimerasa (4U) (Invitrogen) y  $\text{H}_2\text{O}$ , libre de nucleasas, hasta completar un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . Como control negativo se utilizó la mezcla de reactivos sin la adición de ADN (NTC, por sus siglas en inglés) y muestras de ADN de *Phomopsis citri* (uno de los patógenos causante de la "podredumbre peduncular" en fruto cítrico) y *Fusarium tucumanae*, especie aislada de plantas de soja. Como control positivo se utilizó ADN de la cepa 164-11 de *Fusarium oxysporum*, adquirida en el Centro de Referencia de Micología (CEREMIC), Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

El programa de amplificación consistió de un ciclo inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  (3 min), seguido de 30 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  (30 s),  $65^{\circ}\text{C}$  (30 s) y  $72^{\circ}\text{C}$  (30 s), con un ciclo de extensión final de  $72^{\circ}\text{C}$  (3 min). Las amplificaciones se realizaron en un equipo MiniCycler PTC 150 (MJ Research). Los resultados fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 4% D1-LE (Biodynamics).

#### Secuenciación

Para realizar la secuenciación se utilizó la técnica PCR con cebadores que amplifican la región ITS. Los cebadores fueron ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') publicados por White *et al.* (1990), que amplifican un fragmento de 600 pb. La reacción se realizó adicionando 1  $\mu\text{l}$  de ADN fúngico, extraído a partir de la colonia D2, a la mezcla constituida por la solución PCR buffer (1x), dNTPs (0,4 mM),  $\text{MgCl}_2$  (1,5 mM), cada cebador (70 nM), enzima Taq polimerasa (1,5U) (Invitrogen) y  $\text{H}_2\text{O}$ , libre de nucleasas, hasta completar un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ . Como control negativo se utilizó un NTC.

El programa de amplificación consistió en un ciclo inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  (5 min), seguido de 35 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  (1 min),  $50^{\circ}\text{C}$  (1 min) y  $72^{\circ}\text{C}$  (1 min), con un ciclo de extensión final de  $72^{\circ}\text{C}$  (5 min). Las amplificaciones fueron realizadas utilizando el equipo MiniCycler PTC 150 (MJ Research). Los resultados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa 1,5% D1-LE (Biodynamics).

Los productos amplificados fueron enviados al Servicio de Secuenciación CERELA-CONICET, Tucumán, para su purificación y secuenciación. Las secuencias fueron analizadas con el programa BLAST.

#### Evaluación de la eficacia *in vitro* de los fungicidas

Se evaluó la eficacia *in vitro* de imazalil (Fungaflor 75 SP), imazalil+pirimetanil (Philabuster 20+20 SC), azoxistrobina+fludioxonil (Graduate-A SC 23,8+23,8), tiabendazol (Tecto 50 SC), carbendazim (Chemcarb SC

50) y propiconazole (Melanite EC 25) para inhibir el crecimiento del micelio del patógeno aislado. Las pruebas se realizaron en APG adicionado con 1 mg/L, 10 mg/L y 100 mg/L de cada fungicida o mezcla de fungicida en placas de Petri de 90 mm de diámetro. Como testigo se utilizó APG sin fungicida. Se transfirió al APG un disco de colonia de 5 mm de diámetro, extraído del borde de una colonia pura del patógeno de siete días de edad, colocándolo en el centro de la placa. Se realizaron tres repeticiones por cada concentración evaluada. La incubación fue a  $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  hasta que la colonia en el testigo ocupó la totalidad de la superficie de la placa. Se midió el diámetro de las colonias cada 48 h y se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio (PIC) en comparación con el crecimiento del hongo en la placa testigo. Se estimó, además, la concentración efectiva que produce el 95% de inhibición del crecimiento del micelio ( $\text{EC}_{95}$ , por sus siglas en inglés) de cada producto mediante regresión lineal del logaritmo del PIC contra el logaritmo de la concentración. Se realizó un ANOVA y se compararon las medias de  $\text{EC}_{95}$  con la prueba LSD ( $P = 0,05$ ). El ensayo se repitió dos veces.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamientos y caracterización morfológica y cultural

Los frutos de limón recolectados en los empaques comerciales, mostraban el desarrollo de un micelio blanco sobre el pedúnculo (Figura 1).

Al microscopio óptico se observó un micelio hialino, formado por hifas septadas, y la presencia de macroconidios multicelulares, ligeramente falcados (curvados) y microconidios unicelulares de forma ovoide u oblonga, característicos del hongo *Fusarium* sp. según lo descrito por Brown *et al.* (2000).

Las colonias aisladas en medio APG en todas las campañas mostraron características morfológicas y



Figura 1. Micelio blanco sobre el pedúnculo de frutos de limón almacenados en empaques comerciales como testigos de partidas de exportación, Tucumán, R. Argentina.

culturales similares entre sí. Estas presentaban un aspecto algodonoso, color blanco que tornaba a rosado-violeta (Figura 2a). En microscopio óptico, se observó la presencia de abundantes microconidios, generalmente unicelulares de  $1,9\text{-}3,6\ \mu\text{m} \times 4,8\text{-}10,8\ \mu\text{m}$  y macroconidios tabicados y de forma ligeramente falcada de  $2,4\text{-}4,8\ \mu\text{m} \times 19,2\text{-}31,2\ \mu\text{m}$  (Figura 2b). En medio SNA se observaron clamidosporas simples y de a pares (Figura 2c), conidióforos con ramificaciones de monofálides (Figura 2d) y microconidios en falsas cabezas en monofálides cortas.

Todas las características culturales y morfológicas observadas correspondieron a *Fusarium oxysporum*, de acuerdo al manual de identificación de Nelson *et al.* (1983), especie reportada como una de las más frecuentes en frutos cítricos (Tuset, 2000). No se detectaron las otras especies reportadas de este género y tampoco otros microorganismos patógenos asociados.

### Pruebas de patogenicidad

Los frutos inoculados mostraron el desarrollo de micelio en el pedúnculo, similar a lo observado en los frutos infectados de forma natural. La primera manifestación de la enfermedad fue el desarrollo de un micelio blanco en el sitio de inoculación, entre cinco y seis días después de realizada la misma, y luego avanzó hacia el pedúnculo (Figura 3). Después de 20 días, se observó oscurecimiento y caída del pedúnculo y un 20% de los frutos inoculados desarrollaron una coloración beige a marrón claro de la cáscara alrededor del pedúnculo, sin descomposición interna visible. Los frutos del control no desarrollaron síntomas ni signos de la enfermedad.

Se re-aisló el patógeno, obteniéndose colonias con características morfológicas y culturales similares a la cepa D2 utilizada para la inoculación, cumpliendo de esta manera con los postulados de Koch.

### Evaluación del daño en frutos de limón

La incidencia promedio de la enfermedad fue del 15% en los frutos sin tratamiento y del 22,5% en los frutos tratados con hipoclorito de sodio, valores estadísticamente similares entre sí (Tabla 1). Los frutos tratados con etefon, que mostraron un cambio de color de la cáscara a un amarillo más fuerte en todo el fruto, tuvieron una incidencia mayor (41%).

Los frutos desarrollaron un micelio de aspecto algodonoso y color blanco que cubría parcial o totalmente el pedúnculo. La pudrición quedó restringida al pedúnculo, provocando ocasionalmente la caída este, sin que se observaran síntomas en la cáscara o en cualquier otra parte del fruto. En ningún caso se observó pudrición interna del fruto.

Estas observaciones, así como las realizadas en los frutos recolectados en los empaques, no coinciden con la primera caracterización reportada de esta enfermedad en

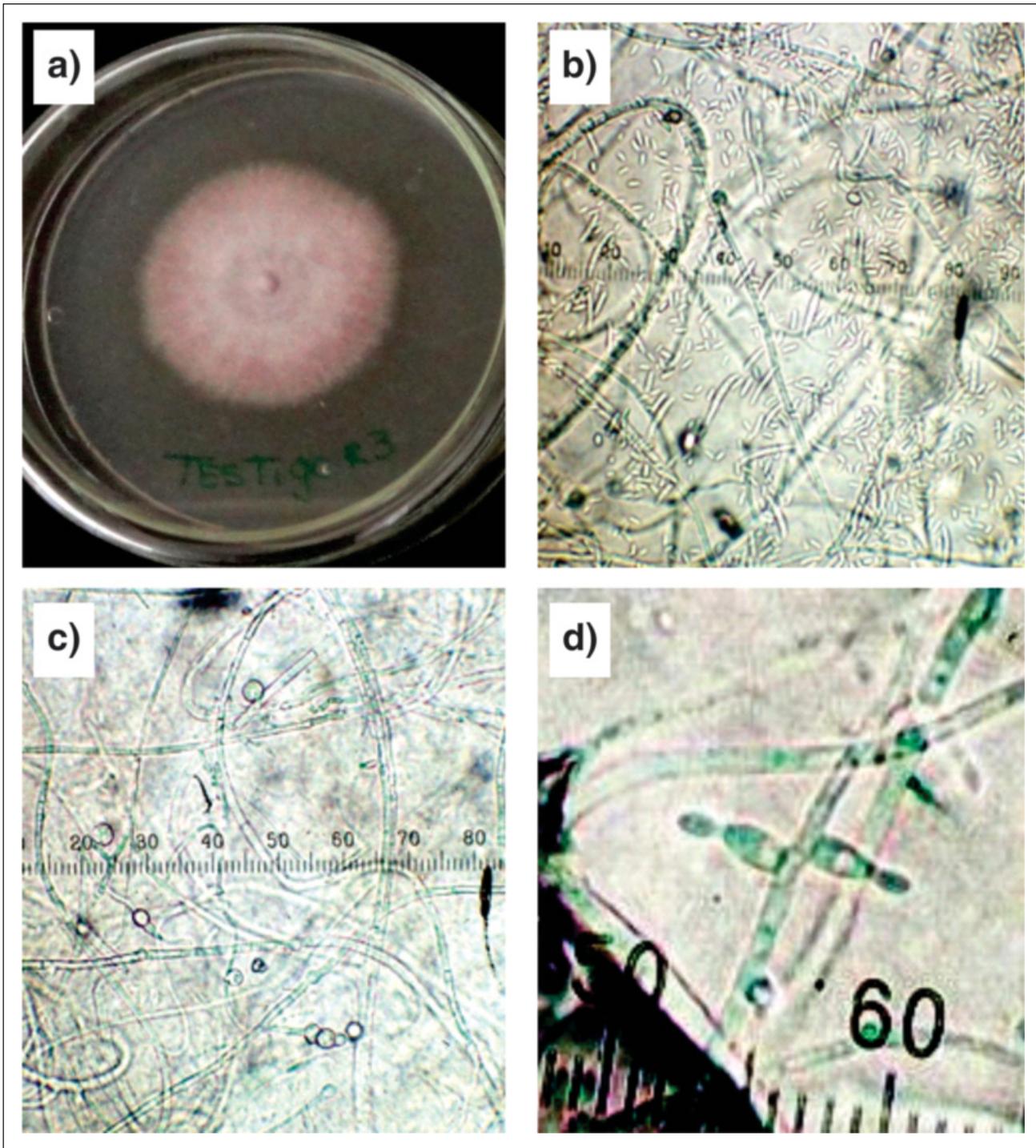


Figura 2. *Fusarium oxysporum* aislado de limón: a) aspecto de la colonia en medio agar papa glucosado, b) macro y microconidios, c) clamidosporas, y d) monofiálides, Laboratorio de Fitopatología, EEAOC, Tucumán, R. Argentina.

naranja y pomelo (Schiffmann-Nadel *et al.*, 1987), que mencionaba que la patología se iniciaba como pudrición de la cáscara, con ablandamiento y cambio de color, y que posteriormente desarrollaba el micelio sobre el pedúnculo bajo condiciones de alta humedad. En el presente estudio,

realizado en limón, la primera manifestación de la enfermedad fue la presencia del micelio sobre el pedúnculo, sin que hubiera cambio visible alguno en la cáscara o en la parte interna del fruto en la mayoría de las muestras analizadas, y ese avance hacia la cáscara solo



Figura 3. Desarrollo de micelio sobre el pedúnculo y sobre el sitio de la inoculación en la cáscara de frutos de limón a los 10 días de la inoculación artificial con la cepa D2 de *Fusarium oxysporum* (Laboratorio de Fitopatología, EEAOC, Tucumán, R. Argentina).

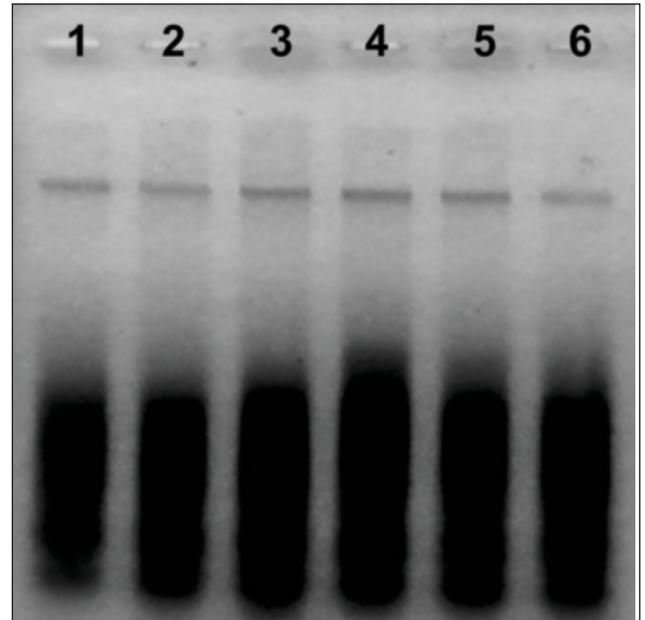


Figura 4. Fragmentos de ADN extraídos de las colonias aisladas a partir del pedúnculo de frutos de limón, visualizados en gel de agarosa al 1%. Calle 1: colonia D2; calle 2: colonia D7; calle 3: colonia D14; calle 4: colonia D18; colonia 5: colonia D20 y calle 6: colonia D22 (Laboratorio de Fitopatología, EEAOC, Tucumán, R. Argentina).

Tabla 1. Incidencia promedio de la "podredumbre del pedúnculo por *Fusarium*" en frutos de limón almacenados 30 días a  $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  y alta humedad relativa, luego de la cosecha. Tucumán, R. Argentina, 2012.

Producto	Tratamiento		Incidencia promedio de la "podredumbre del pedúnculo por <i>Fusarium</i> " en frutos de limón (%)
	Dosis	Aplicación	
Sin tratar	-	-	15,0 a*
Hipoclorito de sodio	200 ppm de Cl activo	Inmersión 2 min	22,5 a
Hipoclorito de sodio + etefon	200 ppm de Cl activo	Inmersión 2 min	41,0 b
	200 ml/100 L	Inmersión 1 min	

\*Distintas letras difieren significativamente entre sí (LSD,  $P < 0,05$ ).

se vio en menos del 1% de las muestras recolectadas en una única campaña, y en el 20% de los frutos inoculados artificialmente.

#### Identificación molecular

Las muestras de ADN extraídas a partir del material fúngico resultaron de buena calidad e integridad, según los fragmentos visualizados en gel de agarosa al 1% (Figura 4). Por espectrofotometría, las concentraciones de los ADN

extraídos oscilaron entre 520 ng/ $\mu\text{l}$  y 1.115 ng/ $\mu\text{l}$  y la pureza de los mismos mostró valores dentro del rango aceptable de 1,7 a 2,0 (Tabla 2).

En la reacción de PCR, con los cebadores específicos para *F. oxysporum* realizada para identificación molecular se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 70 pb tanto con la cepa D2 como con el control positivo 164-11 (cepa de referencia del CEREMIC). El tamaño del fragmento obtenido correspondió a *F. oxysporum*, en

**Tabla 2. Resultados de la cuantificación en espectrofotómetro de los ADN extraídos de las colonias aisladas a partir del micelio presente en el pedúnculo de frutos de limón. Laboratorio de Fitopatología, EEAOC, Tucumán.**

Cepa	Absorbancia		Relación de absorbancia 260/280	Cantidad de ADN (ng/μl)
	260	(nm) 280		
D2	0,10	0,06	1,79	520
D7	0,11	0,06	1,79	565
D14	0,22	0,12	1,87	1-115
D18	0,18	0,10	1,81	885
D20	0,15	0,09	1,72	730
D22	0,12	0,07	1,81	615

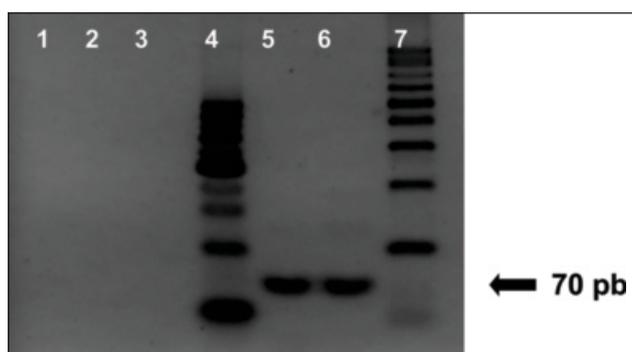
coincidencia con Edel *et al.* (2000). No se obtuvieron fragmentos de ADN en los controles negativos utilizados (NTC, *Phomopsis citri* y *Fusarium tucumaniae* de soja) (Figura 5).

Los fragmentos de ADN obtenidos mediante la amplificación de la región ITS, para su posterior secuenciación, fueron de aproximadamente 600 pb para las cepas D2 y 164-11 (control positivo), que corresponde al resultado esperado según lo publicado por White *et al.* (1990) (Figura 6). No se obtuvo fragmento de ADN en el control negativo utilizado (NTC).

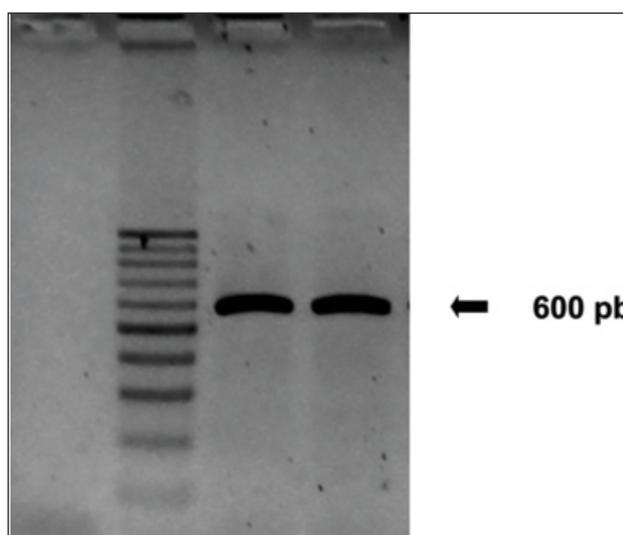
El análisis en el BLAST de la secuencia obtenida mostró una identidad del 100% con las cepas CCF 4362 y 1166 de *Fusarium oxysporum* (Número de acceso en GenBank HE974454 y FR731133, respectivamente).

#### Actividad fungicida *in vitro*

*Fusarium oxysporum* fue sensible a todos los fungicidas evaluados, mostrando diferencias significativas entre los valores de EC<sub>95</sub>. En todos los casos, a mayor



**Figura 5. Fragmentos de ADN en gel de agarosa al 4%, generados con cebadores específicos para *Fusarium oxysporum*. Calles 1, 2 y 3: controles negativos; calle 4: marcador de peso molecular (50 pb); calle 5: cepa D2; calle 6: cepa 164-11 (control positivo) y calle 7: marcador de peso molecular (100 pb). El fragmento de 70 pb corresponde a un resultado positivo (Laboratorio de Fitopatología, EEAOC, Tucumán, R. Argentina).**



**Figura 6. Fragmentos de ADN en gel de agarosa al 1,5%, generados con cebadores ITS. Calle 1: control negativo; calle 2: marcador de peso molecular (100 pb); calle 3: cepa D2 y calle 4: 164-11 (control positivo). La banda de 600 pb corresponde a un resultado positivo (Laboratorio de Fitopatología, EEAOC, Tucumán, R. Argentina).**

concentración de fungicida se obtuvo una mayor inhibición del crecimiento del micelio. El fungicida más eficaz fue carbendazim, seguido por propiconazole, con valores de EC<sub>95</sub> de 0,7 mg/L y 7,2 mg/L, respectivamente. Los fungicidas restantes tuvieron valores más altos y variaron entre 46,6 mg/L y 93,9 mg/L (Tabla 3).

Entre los fungicidas de mayor eficacia *in vitro*, resulta de interés evaluar a propiconazole en pruebas *in vivo*, debido a que el producto comercial Melanite, registrado recientemente en la Argentina (año 2015) para su uso en cítricos es utilizado actualmente en los empaques para el control de la podredumbre amarga y el uso de este se está generalizando. En cambio, carbendazim tiene restricciones de uso en algunos mercados y también en la industria del limón, debido a que no se permiten residuos de este fungicida en el aceite esencial.

Tabla 3. Sensibilidad *in vitro* de *Fusarium oxysporum* frente a fungicidas, expresada en valores de promedios de EC<sub>95</sub> y PIC.

Fungicida	Promedio de porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio (PIC)			Promedio de EC <sub>95</sub> (mg/L)
	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L	
Carbendazim	94,0	100	100	1,5 a**
Propiconazole	89,7	98,1	99,1	7,2 b
Azoxistrobina + fludioxonil*	67,6	89,9	97,6	46,6 c
Imazalil	55,5	82,6	98,3	56,3 d
Tiabendazol	0,1	56,2	99,0	84,6 e
Imazalil + pirimetanil*	57,2	75,8	99,7	93,9 f

\* Para el caso de las mezclas de fungicidas se consideró la suma de los dos activos.

\*\* Distintas letras difieren significativamente entre sí (LSD,  $P < 0,05$ ).

### CONCLUSIONES

Los estudios realizados permitieron confirmar que el agente causal de la podredumbre del pedúnculo observada en frutos de limón en Tucumán es *Fusarium oxysporum*, una de las especies causantes de la podredumbre por *Fusarium* o "Fusarium rot".

El principal daño de la enfermedad en los frutos de limón fue el desarrollo de un micelio blanco sobre el pedúnculo, con la posterior caída de este. Frutos almacenados durante 30 días en condiciones predisponentes para la enfermedad mostraron que la pudrición quedó restringida al pedúnculo, sin pudrición de la cáscara o de los tejidos internos del fruto. Sólo en un año (2007) se observó un cambio de color de la cáscara restringida a la zona peduncular, aunque en muy baja incidencia (menor al 1%) en frutos con infección natural, y en el 20% de los frutos inoculados artificialmente con el patógeno. La incidencia de pudrición del pedúnculo por *Fusarium* fue alta (22,5%) en frutos cosechados con color de exportación, provenientes de un lote con antecedentes de la enfermedad sin aplicación de fungicidas de poscosecha o con la aplicación de solo un tratamiento de inmersión con hipoclorito de sodio, en la dosis utilizada en los empaques comerciales. En fruta de color más avanzado (amarillo más fuerte, cubriendo todo el fruto), la incidencia fue significativamente mayor, llegando al 41,0%.

La mayor eficacia para inhibir el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum in vitro* se obtuvo con carbendazim y propiconazole (con valores de EC<sub>95</sub> de 0,7 mg/L y 7,2 mg/L, respectivamente). Azoxistrobina+fludioxonil, imazalil, tiabendazol e imazalil+pirimetanil fueron menos eficaces, con valores de EC<sub>95</sub> de 46,6 mg/L, 56,3 mg/L, 84,6 mg/L y 93,9 mg/L, respectivamente.

Aunque en Tucumán *Fusarium* se presenta como

una enfermedad de baja prevalencia, identificar el agente causal y conocer sus daños puede contribuir al desarrollo de estrategias eficaces para su manejo.

### BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Brown, G. E.; M. Schiffmann-Nadel and J. W. Eckert. 2000.** Fusarium Rot. En: Timmer, L. W.; Garnsey, S. M. and Graham J. H. (eds.), Compendium of Citrus Diseases, APS PRESS, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 40.
- Edel, V.; C. Steinberg; N. Gautheron and C. Alabouvette. 2000.** Ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probe and PCR assay specific for *Fusarium oxysporum*. Mycol. Res. 104 (5): 518-526.
- Fawcett, H. S. 1936.** Citrus diseases and their control. 2nd edition. McGraw-Hill Book Co., New York and London, pp. 656.
- Federcitrus. 2016.** La Actividad Citrícola Argentina. [En línea]. Disponible en: <http://www.federcitrus.org/fruta.asp> (consultado el 21 de marzo de 2017).
- Joffe, A. Z. and M. Schiffmann-Nadel. 1971.** Les espèces de *Fusarium* isolées des fruits d'agrumes d'Israël. Fruits 27 (2): 117-119.
- Nelson, P. E.; T. A. Toussoun and W. F. O. Marasas. 1983.** Fusarium species An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London, pp. 142-145.
- Raeder, U. and P. Broda. 1985.** Rapid preparation of ADN from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology 1: 17-20.
- Schiffmann-Nadel, M. 1969.** Stem-end rot diseases in refrigerated and non-refrigerated storage of citrus fruits. En: Chapman, H. D. (eds.). Proc. 1st Int. Citrus Symp., Riverside, pp. 1295-1299.
- Schiffmann-Nadel, M.; E. Chalutz; J. Waks; E. Lomaniec and A. Z. Yoffe. 1987.** Increase of

- Fusarium* Rot in Stored Citrus Fruit. J. Phytopathology 120: 154-157.
- Tuset, J. J. 2000.** Podredumbre por *Fusarium* (*Fusarium* Rot). En: Duran-Vila N. y Moreno P. (eds.), *Enfermedades de los Cítricos*, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 101.
- White, T. M.; T. Burns; S. Lee and J. Taylor. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. *In*: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*, pp. 315-321.