

**MANEJO DE LA PUDRICION NEGRA DEL TOMATE CAUSADA
POR *Alternaria alternata***

6043)63
203

10332

ALEJANDRA K. YOMMI

Tesis presentada como requisito para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS - UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

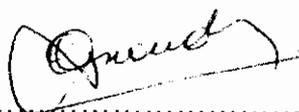
Balcarce, Argentina

Noviembre, 2006

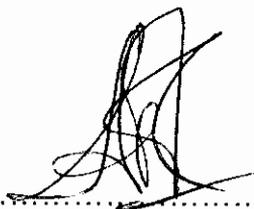
**MANEJO DE LA PUDRICION NEGRA DEL TOMATE CAUSADA
POR *Alternaria alternata***

ALEJANDRA K. YOMMI

Aprobada por



.....
Dr Alberto Escande
Director de Tesis



.....
Dr Andrés F. López Camelo
Miembro del Comité Consejero

.....
M.Sc. Gabriela Cendoya
Miembro del Comité Consejero

**MANEJO DE LA PUDRICION NEGRA DEL TOMATE CAUSADA
POR *Alternaria alternata***

Alejandra K. Yommi

.....
Dr Gabriel Sozzi

Miembro del Comité Consejero


.....
Dr Sergio Lenardón

Representante de la Junta Asesora

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mi familia, especialmente a mis hijos, Francisco y Mateo y a mi esposo, Guillermo. Quiero agradecerles por la paciencia y por el tiempo que han tenido que ceder para que pudiera completar mis estudios.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que han colaborado conmigo, cuando inicié mis primeros pasos en la Fitopatología, que hasta ese momento era para mí algo casi desconocido. Muy especialmente a Gladys y a Facundo, que me han ayudado y asistido cada vez que los necesité. También a Oscar, Caro, Azucena y Alicia, por su gran predisposición. A Gabriela, por su incansable colaboración con los análisis estadísticos. A Gabriel, que a la distancia ha sabido contribuir con este trabajo. Al grupo de trabajo al que pertenezco, a Andrés, Sandra, Natalia, que directa o indirectamente me han apoyado durante este tiempo. A Rubén por ayudarme cuando estaba con mi estado de embarazo de 8 meses y con las observaciones de los ensayos a pleno. También a Gustavo Fernández, que me abrió las puertas de su establecimiento para que realizara los experimentos y cedió amablemente los tomates que hicieran falta. A todos los colegas de la OIT Mar del Plata, Alfredo, Enrique y a Enrique Manzo de la Cooperativa de Horticultores. Finalmente, quiero agradecer con especial énfasis a Alberto, que a pesar de sus múltiples funciones laborales, ha estado siempre que lo he necesitado y me ha sabido guiar y ha contribuido en mi formación profesional. A todos, muchas gracias.

INDICE

INTRODUCCION	1
REVISION BIBLIOGRAFICA	4
Estrategias de manejo de la enfermedad	6
Protección del fruto.....	8
<i>Quitosano</i>	11
Inmunización.....	13
<i>Resistencia inducida</i>	15
Erradicación.....	16
MATERIALES Y METODOS.....	20
Obtención del inóculo.....	20
Desarrollo de un método de inoculación y selección de aislamientos <i>in vivo</i> ...	20
Aplicación de oligosacarinas de quitosano en pre-cosecha.....	22
Evaluación de la firmeza de diferentes híbridos de tomate almacenados a 21°C.....	28
Susceptibilidad a <i>A. alternata</i> en tomates que difieren en su firmeza estructural	29
Uso de erradicantes clorados.....	30
<i>En un cultivar de baja firmeza</i>	30
<i>En cultivares de diferente firmeza estructural</i>	32
RESULTADOS.....	35
Desarrollo de un método de inoculación y selección de aislamientos <i>in vivo</i>	34
<i>Método de inoculación</i>	34
<i>Selección de aislamientos in vivo</i>	34
Aplicación de oligosacarinas de quitosano en pre-cosecha.....	35
Evaluación de la firmeza de diferentes híbridos de tomate almacenados a 21°C.....	40
Susceptibilidad a <i>A. alternata</i> en tomates que difieren en su firmeza estructural	41
Uso de erradicantes clorados.....	48
<i>En un cultivar de baja firmeza</i>	48
<i>En cultivares de diferente firmeza estructural</i>	53
DISCUSION	65
Aplicación de oligosacarinas de quitosano en pre-cosecha.....	65

Evaluación de la firmeza de diferentes híbridos de tomate almacenados a 21°C.....	68
Susceptibilidad a <i>A. alternata</i> en tomates que difieren en su firmeza estructural	71
Uso de erradicantes clorados.....	72
<i>En un cultivar de baja firmeza</i>	72
<i>En cultivares de diferente firmeza estructural</i>	76
CONCLUSIONES.....	80
BIBLIOGRAFIA.....	81
APENDICE.....	87
Figura I. Conidiosporas de <i>A. alternata</i> en cadenas.....	87
Figura II. Conidiosporas de <i>A. alternata</i>	87
Figura III. Aislamientos de <i>A. alternata</i> creciendo en condiciones controladas de temperatura y duración de fotoperíodo	88
Figura IV. Pinche utilizado para hacer las heridas en los frutos control inoculado sobre heridas	88
Figura V. Tomates inoculados con distintos métodos	89
Figura VI. Aplicación de quitosano en plantas de tomate 'Superman', un día antes de la cosecha.....	89
Figura VII. Preparación de la suspensión de esporas instantes previos a la inoculación	90
Figura VIII. Tomate inoculado con 10µl de inóculo en cuatro sitios	90
Figura IX. Humidificador utilizado dentro de la cámara de incubación para mantener altos niveles de humedad.....	91
Figura X. Condiciones de temperatura y humedad relativa durante el período de incubación, correspondiente al experimento de uso de quitosano en..... precosecha.....	91
Figura XI. Sin lesión (Valor de la escala = 0).....	92
Figura XII. Mancha (Valor de la escala = 1, 2, 4, según grado de cobertura de micelio en el área de la lesión).....	92
Figura XIII. Lesión con pudrición (Valor de la escala = 7, 8 y 10, según grado de cobertura de micelio en el área de la lesión).....	93
Figura XIV. Condiciones de temperatura y humedad relativa durante el período de incubación, correspondiente al experimento de evaluación de firmeza de diferentes híbridos de tomate.....	93

Figura XV. Condiciones de temperatura y humedad relativa durante el período de incubación, correspondiente al experimento relacionado con la susceptibilidad a la podredumbre negra de diferentes híbridos de tomate.	94
Medición del cloro libre activo (LAC) por titulación.....	94
Figura XVI. Frutos tratados con erradicantes colocados sobre papel absorbente para su secado.....	95
Figura XVII. Condiciones de temperatura y humedad relativa durante el período de incubación, correspondiente al experimento relacionado al uso de..... erradicantes clorados en 'Superman'.....	95
Figura XVIII. Condiciones de temperatura y humedad relativa durante el período de incubación, correspondiente al experimento relacionado al uso de erradicantes clorados en 'Superman' y 'Nixel'.....	96
Figura XIX. Bandejas de frutos correspondientes a todos los tratamientos de un mismo bloque antes y después de ser embolsadas (Experimento de erradicantes clorados en 'Superman' y 'Nixel')	97
Figura XX. Proporción de frutos de los híbridos 'Superman', 'Anahí' y 'Badro', inoculados con <i>A. alternata</i> , en los que hubo evolución de la mancha o lesión durante el almacenamiento a $20.8\pm 0.6^{\circ}\text{C}$ y $92\pm 8\%$ de humedad relativa.....	98

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Escala asignada al tipo de lesión, según el síntoma y signo observado.....	25
Cuadro 2. Valor p de los contrastes realizados entre híbridos y R^2 del modelo para proporción de frutos en los que hubo crecimiento de la lesión a los 8, 12, 14 y 17 días post-inoculación.....	45
Cuadro 3. Valores p de cada fuente de variación y R^2 del modelo para la proporción de frutos en los que el diámetro superó el valor de 0,4 cm, a los 10, 14, 18 y 22 días post-desinfección.....	61
Cuadro 4. Valor p de las fuentes de variación y R^2 del modelo para proporción de frutos con pudrición a los 14, 16, 18 y 22 días post-desinfección.....	64

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Tomate inoculado con 10µl de la cepa Aa-070414 (sin heridas) en cuatro sitios, luego de 14 días a 20°C..... 35
- Figura 2. Incidencia de enfermedad en tomates 'Superman' tratados y sin tratar con quitosano un día antes de la cosecha e inoculados con *A. alternata*, durante 19 días de almacenamiento a 20±1°C y 86±4% de humedad relativa..... 37
- Figura 3. Diámetro de la mancha o lesión en tomates 'Superman' tratados y sin tratar con quitosano un día antes de la cosecha e inoculados con *A. alternata*, durante 19 días de almacenamiento a 20±1°C y 86±4% de humedad relativa..... 38
- Figura 4. Severidad de enfermedad en tomates 'Superman' durante 19 días de almacenamiento a 20±1°C y 86±4% de humedad relativa (promedio de frutos tratados y sin tratar con quitosano, ambos inoculados con *A. alternata*)..... 39
- Figura 5. Intensidad de enfermedad en tomates 'Superman' durante 19 días de almacenamiento a 20±1°C y 86±4% de humedad relativa (promedio de frutos tratados y sin tratar con quitosano, ambos inoculados con *A. alternata*)..... 39
- Figura 6. Firmeza de frutos de tomate de diferentes híbridos en el día de la cosecha y durante la permanencia a 21,5±1°C y 86,3±6% de humedad relativa (todos con hasta un 10% de color rojo en superficie a la cosecha)..... 40
- Figura 7. Proporción de frutos enfermos de los híbridos 'Anahí', 'Badro' y 'Superman', inoculados con *A. alternata*, durante el almacenamiento a 20,8±1°C y 92±8% de humedad relativa..... 42
- Figura 8. Tomates 'Superman' inoculados (sin herir) con *A. alternata* a los 12 días a 20,8±1°C y 92±8% de humedad relativa..... 42

Figura 9. Tomates ‘Anahí’ y ‘Badro’ inoculados (sin herir) con *A. alternata* a los 12 días a 20,8±1°C y 92±8% de humedad relativa..... 43

Figura 10. Diámetro (log) de la mancha o lesión (cm) en tomates sanos y enfermos de los híbridos ‘Anahí’, ‘Badro’ y ‘Superman’, inoculados con *A. alternata*, durante el almacenamiento a 20,8±0.6°C y 92±8% de humedad relativa..... 44

Figura 11. Diámetro (log) de lesión (cm) en tomates enfermos de los híbridos ‘Anahí’, ‘Badro’ y ‘Superman’, inoculados con *A. alternata*, durante el almacenamiento a 20,8±1°C y 92±8% de humedad relativa..... 45

Figura 12. Intensidad de enfermedad en tomates de los híbridos ‘Anahí’, ‘Badro’ y ‘Superman’, inoculados con *A. alternata*, durante el almacenamiento a 20,8±1°C y 92±8% de humedad relativa..... 46

Figura 13. Severidad de enfermedad en tomates de los híbridos ‘Anahí’, ‘Badro’ y ‘Superman’, inoculados con *A. alternata*, durante el almacenamiento a 20,8±1°C y 92±8% de humedad relativa..... 47

Figura 14. Tomates ‘Superman’ control inoculados sobre heridas con síntomas de podredumbre negra a los 5 días post-desinfección..... 48

Figura 15. Proporción de frutos enfermos en tomates inoculados y lavados con agua, desinfectados con hipoclorito o trocloseno de sodio y en el control agua sin inóculo, almacenados a 21,9 ±1°C y 90,8±3% de humedad relativa..... 49

Figura 16. Diámetro de la mancha o lesión (cm) en tomates inoculados y lavados con agua, desinfectados con hipoclorito o trocloseno de sodio y en el control agua sin inóculo, almacenados a 21,9 ±1°C y 90,8±3% de humedad relativa..... 51

Figura 17. Intensidad de la enfermedad en tomates inoculados y lavados con agua, desinfectados con hipoclorito o trocloseno de sodio y en el control agua sin inóculo, almacenados a 21,9 ±1°C y 90,8±3% de humedad relativa..... 52

- Figura 18. Severidad de la enfermedad en tomates inoculados y lavados con agua, desinfectados con hipoclorito o trocloseno de sodio y en el control agua sin inóculo, almacenados a $21,9 \pm 1^\circ\text{C}$ y $90,8 \pm 3\%$ de humedad relativa..... 53
- Figura 19. Proporción de frutos enfermos en tomates 'Superman', inoculados y lavados con agua, desinfectados con hipoclorito o trocloseno de sodio, durante el almacenamiento a $19,6 \pm 0,6^\circ\text{C}$ y $98,5 \pm 2\%$ de humedad relativa..... 55
- Figura 20. Proporción de frutos enfermos en tomates 'Nixel', inoculados y lavados con agua, desinfectados con hipoclorito o trocloseno de sodio, durante el almacenamiento a $19,6 \pm 1^\circ\text{C}$ y $98,5 \pm 2\%$ de humedad relativa..... 57
- Figura 21. Días post-desinfección en que se detectó la enfermedad en tomates de los tratamientos hipoclorito, control lavado con agua y trocloseno de sodio, de los híbridos 'Nixel' y 'Superman'. Los frutos fueron inoculados con *A. alternata*, tratados y almacenados a $19,6 \pm 1^\circ\text{C}$ y $98,5 \pm 2\%$ de humedad relativa..... 58
- Figura 22. Diámetro (log) de la mancha o lesión (cm) de tomates sanos y enfermos, de los tratamientos trocloseno de sodio, control lavado con agua e hipoclorito, de los híbridos 'Nixel' y 'Superman'. Los frutos fueron inoculados con *A. alternata*, tratados y a $19,6 \pm 1^\circ\text{C}$ y $98,5 \pm 2\%$ de humedad relativa..... 59
- Figura 23. Porcentaje de frutos 'Nixel' y 'Superman', inoculados y lavados con agua, desinfectados con hipoclorito o trocloseno de sodio, en los que el diámetro de lesión (cm) fue superior a 0.4 cm. Los tomates fueron almacenados a $19,6 \pm 1^\circ\text{C}$ y $98,5 \pm 2\%$ de humedad relativa..... 60
- Figura 24. Intensidad (log) de la enfermedad en los tratamientos trocloseno de sodio, control lavado con agua e hipoclorito, de los híbridos 'Nixel' y 'Superman'. Los frutos fueron inoculados con *A. alternata*, tratados y almacenados a $19,6 \pm 1^\circ\text{C}$ y $98,5 \pm 2\%$ de humedad relativa..... 62

- Figura 25. Severidad (log) de la enfermedad en los tratamientos trocloseno de sodio, control lavado con agua e hipoclorito, de los híbridos 'Nixel' y 'Superman'. Los frutos fueron inoculados con *A. alternata*, tratados y almacenados a $19,6\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $98,5\pm 2\%$ de humedad relativa..... 63
- Figura 26. Proporción de frutos con pudrición en los tratamientos trocloseno de sodio, control lavado con agua e hipoclorito, de los híbridos 'Nixel' y 'Superman'. Los frutos fueron inoculados con *A. alternata*, tratados y almacenados a $19,6\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $98,5\pm 2\%$ de humedad relativa..... 64
- Figura 27. Tomates 'Superman' con podredumbre negra a los 21 días de almacenamiento a 20°C 70
- Figura 28. Tomates 'Badro', 'Acuario' y 'Mondial' con diferente incidencia de podredumbre negra a los 21 días a 20°C 70
- Figura 29. Tomates 'Colt45', 'Anahi' y 'Superman' con diferente incidencia de podredumbre negra a los 21 días a 20°C 71

RESUMEN

MANEJO DE LA PUDRICION NEGRA DEL TOMATE CAUSADA POR *Alternaria alternata*

Se evaluaron estrategias para el manejo de la podredumbre negra del tomate causada por *Alternaria alternata* (PN). Plantas del cultivar 'Superman' (50 por parcela) fueron tratadas un día antes de la cosecha con quitosano. Los frutos cosechados en inicio de color, fueron inoculados con conidios de una mezcla de cepas de *A. alternata* patógenas y almacenados a $20\pm 1^\circ\text{C}$ y $86\pm 4\%$ de humedad relativa por 19 días. Se utilizó un diseño en bloques completos aleatorizados con cuatro repeticiones. Regularmente se midió: número de frutos enfermos, tipo de mancha (en una escala de 0 a 10) y diámetro mayor de la mancha. Se calcularon incidencia, intensidad y severidad de PN. Los datos se analizaron mediante modelos no lineales mixtos. Frutos de los híbridos 'Anahí', 'Badro' y 'Superman' fueron evaluados ante PN, inoculando y evaluando como se describió. Para el estudio de erradicantes, fue necesario inocular e incubar los frutos por 72 hs, antes de sumergirlos en hipoclorito o trocloseno de sodio (500 ppm) o agua destilada. Se probaron por duplicado en 'Superman' (susceptible) y en una oportunidad, en 'Nixel' (resistente). El quitosano redujo la incidencia entre 1 y 4% a los 5 y 6 días post-inoculación. La incidencia de PN en 'Anahí' y 'Badro' fue 66% a 50% menor que en 'Superman', respectivamente. El trocloseno fue ineficaz en 'Superman' y redujo en 39% la incidencia de PN en 'Nixel'. El hipoclorito resultó eficaz en ambos cultivares, disminuyendo 10 y 17% la incidencia en 'Superman' y en hasta 51% en 'Nixel'.

Palabras clave: *Lycopersicon esculentum*, manejo de enfermedades, susceptibilidad de cultivares, desinfección con cloro

SUMMARY

MANAGEMENT OF TOMATO BLACK ROT CAUSED BY *Alternaria alternata*

Strategies to manage tomato black rot (TBR) were tested. The day before harvesting, tomato plants cv 'Superman' (50 plants per plot) were treated with chitosan. Fruits initiating ripening were harvested, inoculated without wounding with conidia of a mix of pathogenic *A. alternata* strains and stored at $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ and $86\pm 4\%$ relative humidity for 19 days. A complete randomized block design was used. The number of diseased fruits, lesion type (0 to 10 scale), and the largest diameter of the lesion were recorded. Incidence, intensity and severity of TBR were calculated. Fruits of 'Anahí', 'Badro' and 'Superman' hybrids were compared for resistance to TBR by assisted inoculation. For eradication strategies, fruits were inoculated and incubated for 72 h before immersion in sodium hypochlorite, sodium troclosene (500 ppm) or distilled water. Cultivars 'Superman' (susceptible) and 'Nixel' (resistant) were used in two or one experiment, respectively. Chitosan reduced TBR incidence in 1 to 4%, 5-6 days after inoculation. Cultivars 'Anahí' and 'Badro' had 66 to 55% less disease incidence than 'Superman'. Sodium troclosene was not efficient in 'Superman' and reduced TBR incidence in 39%, in 'Nixel'. Sodium hypochlorite was effective in both cultivars, decreasing the TBR incidence between 10 and 17% in 'Superman' and 51%, in 'Nixel'.

Key words: *Lycopersicon esculentum*, disease control, cultivar susceptibility, chlorine disinfection.

INTRODUCCIÓN

Alternaria spp. causa la tercera parte de las podredumbres registradas en frutos de tomate en el Mercado Central de Buenos Aires (MCBA) (Sánchez & Mangione, 1995). Esta información ha sido confirmada en un nuevo estudio del MCBA no publicado, donde se analizaron muestras del período 1994-2002. La producción de tomate para la venta en fresco es una de las actividades de mayor importancia económica y social del sector hortícola argentino. La superficie con invernaderos en el partido de Gral Pueyrredón es de alrededor de 154 has y el 40% de la misma es ocupada en la producción de tomate, siendo el tipo redondo el más cultivado (INDEC, 2005). Aunque ciertos factores han disminuido la estacionalidad en el mercado (Ghezán, 2000), el tomate es altamente perecedero y cualquier intento de alargar su vida en estante favorecerá la comercialización y la reducción de pérdidas postcosecha.

Alternaria spp. es un hongo omnipresente y es normal su detección en el ambiente. Tiene alta habilidad para competir como saprófito y es patógeno facultativo, favorecido por el estrés, la madurez y la senescencia del hospedero. En el tomate, los conidios del hongo germinan y penetran por heridas (Agríos, 1997) y la infección se mantiene latente hasta que el fruto madura y los tejidos se debilitan (Mitidieri, 1998). En caquis (*Diospyros kaki* L.), el patógeno puede ingresar directamente cuando hay condiciones de alta humedad relativa durante el crecimiento del fruto (Pérez et al, 1995). La enfermedad se manifiesta generalmente después de la cosecha, con síntomas que corresponden a manchas negras o castañas, fundamentalmente en la zona de los hombros del fruto de tomate, que pueden ser deprimidas y que se extienden hacia el interior de los mismos (Agríos, 1997).

Una forma de minimizar las pérdidas por pudriciones es a través del uso de diferentes herramientas o estrategias que actúan como “barreras” para el desarrollo de la enfermedad (Leistner & Gorris, 1995). Según este enfoque, el manejo de una enfermedad debe basarse en el uso de técnicas que minimicen la susceptibilidad del hospedante combinadas con otras que impidan que el microorganismo infecte y colonice los tejidos.

Incrementar la resistencia del hospedante representa una barrera para la infección. El quitosano (polímero de glucosamina con unión β , 1-4) induce la producción de risitina, fitoalexina que actuaría como mecanismo de defensa (Reddy et al, 2000a) y tendría efectos erradicantes al activar la síntesis de quitinasas (El Ghaouth et al, 1992).

La erradicación de inóculo presente en la superficie del fruto constituiría otra estrategia para el manejo de la PN. La utilización de agroquímicos presenta inconvenientes por las restricciones de uso que imponen los tiempos de carencia y la falta de productos autorizados (SENASA, 1998). Una herramienta erradicante que podría considerarse es el lavado de los frutos en una solución clorada (Beuchat & Ryu, 1997). El cloro actúa por contacto y tiene un control instantáneo del inóculo, pero encuentra limitantes cuando el patógeno ha penetrado en los tejidos (Boyette et al, 1993). Una forma orgánica del cloro, el trocloseno de sodio, ha sido eficaz en el control de *A alternata* en caquis (Prusky et al, 2001) y mangos (*Mangifera indica* L.) (Prusky et al, 2002).

Dos barreras naturales relacionadas con la susceptibilidad del fruto son el grado de madurez de cosecha y el material genético. La barrera al desarrollo de podredumbre negra en los tomates verdes se basa, fundamentalmente, en una mayor firmeza y mayor contenido de saponinas (Agrios, 1997). Algunos cultivares se cosechan cuando han iniciado la maduración, teniendo buen contenido de saponinas, pero tienen un

ablandamiento excesivo cuando completan la maduración. Los tomates con 'firmeza estructural' y de 'larga vida' pueden representar un obstáculo para la enfermedad porque no se ablandan excesivamente aunque estén totalmente rojos (INTA, 1998). Se debe encontrar la mejor combinación híbrido y manejo para reducir las pérdidas por podredumbre negra.

Objetivo general

- Seleccionar herramientas y estrategias adecuadas para el manejo de podredumbres por *A. alternata* en frutos de tomate.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto del quitosano aplicado en pre-cosecha sobre la pudrición de frutos de tomate por *A. alternata*.
- Estudiar el efecto del cultivar sobre la incidencia e intensidad de pudrición.
- Evaluar el efecto erradicante del hipoclorito y del trocloseno de sodio sobre la pudrición de frutos de tomate por *A. alternata*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Alternaria spp. es frecuente causal de enfermedades de postcosecha y nuclea a un gran número de especies, siendo relativamente pocas las que han desarrollado la capacidad de infectar atravesando la cutícula de los frutos (en forma directa). Pertenece al *filum* de los hongos imperfectos, es decir que no tiene una fase sexual conocida, clase *Hifomicetes*, orden *Moniliales*, familia *Dematiaceae*. En general, los conidios son grandes, multicelulares, melanizados, septados longitudinal y transversalmente, con forma de botella. Son denominados dictiosporas y pueden estar solos o en cadenas, sobre conidióforos cortos y erectos. Un tipo de clasificación en especies, propuesto por Neergaard (1945) (citado por Thomma, 2003), se basa en la presencia de conidios en cadena. Dentro de una especie también se pueden distinguir patotipos o *formae speciales*, cuando existen cepas con un grado de patogenicidad diferencial (Nishimura y Kohmoto, 1983, citado por Thomma, 2003). Otro ordenamiento sostiene que las especies deben agruparse y que el grupo sea representado por la más relevante (Simmons, 1992, citado por Thomma, 2003). Más recientemente, Andersen et al (2001, citado por Carrillo, 2003) separó las especies en tres secciones que alcanzan seis grupos. Una sección pertenece a las que tienen conidios raramente en cadena. Otra, comprende especies que forman conidios en cadenas no ramificadas. Las especies de una tercera sección tienen cadenas ramificadas. *Alternaria alternata* pertenece a esta última sección, produciendo largas cadenas, muy ramificadas, que le otorgan un aspecto abierto y que se asientan sobre conidióforos cortos.

A. alternata causa la podredumbre negra en los frutos del tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). Los síntomas de la enfermedad corresponden a lesiones amarronadas o negras, que pueden ser deprimidas y que se extienden hacia el interior de los mismos (Agrios, 1997). En el Mercado Central de Buenos Aires, 35% de las

alteraciones que se detectaron en tomate fueron debidas a daños en los hombros del fruto, asociados posteriormente al desarrollo de *Alternaria* spp. (Sánchez & Mangione, 1995). En este mismo estudio, se analizaron los tomates enfermos y se detectaron al menos ocho agentes causales, apareciendo *Alternaria* spp. con una frecuencia de 0.34. Si bien estos autores no determinaron la especie, las podredumbres causadas por *Alternaria* spp., muy probablemente estén asociadas a *A. alternata*.

A. alternata es una especie de hábito saprófito, que sobrevive como micelio o conidios en restos vegetales y causa enfermedades policíclicas. Es común su presencia en el aire; cuando las condiciones son favorables, los conidios germinan y se inicia el proceso de infección. El tubo germinativo ingresa a los tejidos del hospedante en forma indirecta, a través de estomas o heridas. Esta instancia es favorecida por condiciones de estrés, madurez y senescencia en los tejidos vegetales (Agrios, 1997). No obstante, *A. alternata* puede ingresar directamente en frutos de caqui cuando hay condiciones de alta humedad relativa durante el crecimiento del mismo (Pérez et al, 1995). *A. alternata* es capaz de sintetizar endopoligalacturonasas, endoglucanasas y exo-glucanasas, enzimas degradativas de la pared celular que constituyen factores de patogenicidad (Eshel et al, 2000, 2002a, 2002b), y que serían activadas según el pH del hospedero (Eshel et al, 2002b). También produce toxinas no específicas que contribuyen con los mecanismos de penetración, predisponiendo a los tejidos para el desarrollo de la enfermedad, pero que no son imprescindibles para la infección (Ballio, 1991, citado por Thomma, 2003). Algunas cepas de *A. alternata* sintetizan toxinas específicas (fundamentalmente alternariol y alternariol monometileter) y ácidos orgánicos (oxálico y fumárico) (Reddy et al, 2000a).

Generalmente, *Alternaria* spp. produce infecciones latentes que permanecen inactivas hasta que las condiciones favorecen el desarrollo de la enfermedad (Thomma, 2003). En mangos, la incidencia y la severidad de las podredumbres por *A.*

alternata se encuentran altamente correlacionadas con el nivel de infección latente en el momento de la cosecha (Prusky et al, 1983; Prusky et al, 2002). El grado de infección latente en mangos depende fundamentalmente de la humedad relativa, siendo muy alto cuando esta se encuentra en el rango de 85 a 90% (Prusky et al, 1992). En tomates, los conidios necesitan de 3 a 5 horas de humedad para germinar e invadir la cutícula del fruto (Davis et al, 2005). La penetración del hongo también está favorecida por la ocurrencia de daños por frío y por escaldaduras, rajaduras de la piel, entre otras (Pearson & Hall, 1975, citado por Reddy et al, 2000a). El estado de latencia se pierde cuando el fruto madura y los tejidos se debilitan¹. Ello explica porque las podredumbres se manifiestan en su mayoría durante la comercialización. La manifestación de las podredumbres se incrementa considerablemente en frutos expuestos a temperatura ambiente. *A. alternata* es capaz de crecer en el rango de 0 a 35°C, siendo 27°C la temperatura óptima para la formación de conidios (Carrillo, 2003).

Estrategias de manejo de la enfermedad

El manejo sanitario preventivo puede condicionar la manifestación de la enfermedad durante la postcosecha, ya que la infección se produce fundamentalmente durante el cultivo. Las hifas de *A. alternata* penetran en forma directa la cutícula de mangos y caquis en estados tempranos de desarrollo del fruto y permanecen en forma quiescente y lo mismo podría ocurrir en tomates.

Los tratamientos con fungicidas de contacto o sistémicos durante el cultivo reducen el inóculo presente y permiten disminuir el grado de infecciones provenientes del campo. Con dos a tres pulverizaciones de iprodione entre los 40 y 15 días previos a la cosecha, se logra disminuir la incidencia de podredumbres causada por *A. alternata* en

¹ Martinengo de Mitidieri, I., comunicación personal

frutos de caqui (Pérez et al, 1995). Otros fungicidas como el miclobutanil y triforine son indicados como promisorios para el control de esta enfermedad en tomates conservados en frío (Mitidieri, 1998). La azoxistrobina está indicada para el control y prevención de *Alternaria* spp., y por su acción traslaminar y tiempo de carencia de sólo un día, es un producto interesante y que puede tenerse en cuenta (Syngenta, 2003). No obstante, de todos los principios activos mencionados anteriormente, que tienen control sobre *Alternaria* spp., sólo la azoxistrobina está registrada en el país para su uso en tomate (Resolución SENASA 256/03). Muchos de ellos tienen el inconveniente adicional de los días de carencia entre la aplicación y la cosecha, que suelen ser no menores a 7 días. Este periodo resulta excesivo para el tomate, ya que por su fructificación característica, requiere de una cosecha diaria en su momento de máxima producción.

Algunos antecedentes demuestran la posibilidad de controlar la podredumbre negra mediante fungicidas de postcosecha. El uso de prochloraz junto al cepillado han reducido las podredumbres causadas por *A. alternata* en frutos de mango (Prusky et al, 2002). El imazalil logró disminuir el número de lesiones en tomates inoculados con *A. alternata* y conservados 30 días a 13°C (Mitidieri, 1998). Sin embargo, los fungicidas aplicados en postcosecha tampoco se encuentran permitidos en la legislación nacional para su uso en tomate (SENASA, 1998).

Las restricciones de uso que imponen los tiempos de carencia, la falta de productos autorizados y las exigencias cada vez mayores de los consumidores por adquirir productos inocuos y obtenidos de manera "amigable con el ambiente", conllevan a la búsqueda de nuevas alternativas de manejo. Una estrategia de control es utilizar una combinación de técnicas, algunas con efecto directo sobre el patógeno y otras que contribuyen con una menor susceptibilidad del fruto (Leistner y Gorris, 1995). También denominada "tecnología de barreras", la misma pretende establecer

una o más dificultades para que el patógeno pueda desarrollarse. Actualmente, este concepto es aplicado en productos frutihortícolas frescos con algún tipo de transformación (cuarta gama o precortados). En ellos, el uso de baja temperatura, bajo potencial redox y atmósferas modificadas, son barreras que evitan el desarrollo de microorganismos y prolongan el período de comercialización.

En línea con esta estrategia de manejo, en los últimos años se están evaluando diferentes herramientas para el control directo del patógeno o para la activación de mecanismos de defensa del hospedero o resistencia inducida (Droby et al, 2001). Entre los posibles agentes antifúngicos, se encuentran aceites esenciales y extractos de plantas, biocontroladores y fungicidas biológicos no selectivos, como carbonato y bicarbonato de sodio, cloro activo y ácido ascórbico (Droby et al, 2001). La resistencia inducida puede comprender la deposición de lignina, ceras y otras barreras estructurales a la penetración del hongo, síntesis de compuestos antifúngicos o fitoalexinas, proteínas de shock térmico (HSP), quitinasas o glucanasas (Wisniewski et al, 2001).

Protección del fruto

Mientras los frutos permanecen verdes, resultan más resistentes a las enfermedades respecto a los maduros, porque poseen barreras naturales más efectivas, compuestos antifúngicos preformados y en general, son más firmes y sus células ofrecen mayor resistencia a la infección. Durante la maduración organoléptica una serie de procesos provocan en el tomate cambios en el color, firmeza, textura y sabor (Kinet y Peet, 1997). La modificación de la textura y la firmeza se deben a la pérdida de turgencia de los tejidos y a la degradación de las pectinas y hemicelulosas y en menor medida, de la celulosa (Huber y O'Donoghue, 1993; Maclachlan y Brady, 1994; citados por Brummel et al, 1999).

La cutícula es la primera barrera que el patógeno debe sortear para infectar los tejidos y la pérdida de su integridad conlleva a aumentar los riesgos de infecciones quiescentes. La misma ha sido descrita como un biopolímero complejo de amplias propiedades físicas, químicas, mecánicas y morfológicas, que minimiza la pérdida de agua de los tejidos y protege ante agentes bióticos o abióticos (Heredia, 2003). Durante la maduración y senescencia del fruto, la cutícula se hace más delgada y ofrece menor resistencia a la ruptura, debido a cambios en la composición química y en la estructura física (Allende et al, 2004). Los cambios de peso de la cutícula y el contenido de ceras epicuticulares aumentan con la madurez del fruto, mientras que los lípidos solubles disminuyen (Mendoza-Wilson et al, 1995). En línea, por ejemplo se ha determinado que la superficie de la piel de las tunas presenta cambios en la estructura y morfología de las ceras y sufre ciertas disrupciones a partir de la maduración que conllevan a la ocurrencia de pequeñas rajaduras, asociadas a la senescencia (Chessa et al, 1992, citado por Schirra et al, 1999). Además, la cutícula tiende a romperse en mayor medida cuando se humedece, porque tiende a plastificar la superficie (Allende et al, 2004). Esta condición de alta humedad, favorable para el desarrollo de los patógenos, es coincidente con las recomendaciones para el almacenamiento de la mayor parte de los frutos.

El glicoalcaloide conocido como tomatina es un metabolito secundario presente en tomates, que posee propiedades antibióticas y podría cumplir un rol importante de resistencia a las enfermedades. La tomatina comprende dos compuestos, α -tomatina y dehidrotomatina, que se encuentran en niveles de 48 ppm (mg/kg de peso fresco) en tomates verdes y se reducen a 0,4 ppm en tomates rojos (Friedman, 2002). A medida que transcurre la maduración, estos compuestos que inhiben el desarrollo fúngico, son degradados enzimáticamente por la tomatinasa, que es producida por el fruto e incluso sintetizada por algunos patógenos (Prusky, 1996). Por consiguiente, a medida que

avanza el cambio de color del verde al rojo, el fruto se vuelve más susceptible a las enfermedades.

En la pared celular de algunos frutos existen compuestos denominados “proteínas inhibidoras de la poligalacturonasa” (PGIPS). Su presencia inhibe y modifica la acción de la poligalacturonasa sintetizada por el hongo. Cuando la proteína PGIP está presente, la actividad enzimática del hongo produce fragmentos de oligogalacturónidos, que actúan como disparadores de los mecanismos de defensa de la célula (De Lorenzo et al, 2001). Se ha determinado en tomate, que las PGIPS fueron capaces de proteger de la acción de enzimas degradativas de la pared celular producidas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Jones et al, 1972, citado por De Lorenzo et al, 2001). Coincidiendo con un aumento de la susceptibilidad del fruto a las enfermedades a medida que avanza su estado de madurez, se ha determinado durante dicho período una disminución del contenido de PGIPS (Johnston et al, 1993, citado por De Lorenzo et al, 2001; Abu-Goukh et al 1983, citado por Prusky, 1996).

El etileno es un activador de la síntesis de las enzimas involucradas en la síntesis de licopeno (principal pigmento que otorga al tomate su color rojo característico) y en la degradación de la pared celular (poligalacturonasa, pectinmetilesterasa, celulasa). El etileno producido en el hospedero también podría significar una señal para el hongo para iniciar la invasión (Prusky, 1996). Los cambios fisiológicos asociados a la presencia de etileno que ocurren en el fruto son tan numerosos, que es difícil separar los efectos y determinar la existencia de una única señal para el patógeno. La actividad de las enzimas degradativas de la pared celular del fruto, promovidas por el etileno durante el climaterio, podrían activar los factores de patogenicidad y de esa manera, romper el período de quiescencia del hongo. En este mismo sentido, se ha encontrado que la severidad de enfermedad producida por *A. alternata* en tomates transgénicos está en función de la expresión de la poligalacturonasa. Esta podría ser

una de las razones para vincular el ablandamiento del fruto en la postcosecha con la susceptibilidad a enfermedades.

La protección del fruto debe estar basada en el uso de estrategias que eviten la infección o permitan modular los mecanismos de quiescencia, de modo de evitar que el patógeno pueda avanzar en los tejidos (Prusky et al, 1996). Como la ruptura del estado de quiescencia de la hifa invasora puede deberse a la disminución de la concentración de compuestos preformados que ocurren durante la maduración, como también a la presencia de etileno sintetizado por el hospedero que representa una señal para la producción de enzimas y toxinas del hongo, cualquier estrategia que retrase la maduración del fruto podría ser valiosa para protegerlo.

Quitosano. La quitina es el segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Los caparazones de cangrejo y exoesqueletos de camarones y langostinos molidos constituyen la materia prima para obtener quitosano por deacetilación alcalina (Sigma, 2005). El quitosano es un polímero de glucosamina con unión β , 1-4, con un peso molecular que puede variar dependiendo de las condiciones de extracción y conversión de la quitina, pero que en promedio es de 1 MDa (Baxter et al, 2004). Cuanto menor es el peso molecular de la molécula de quitosano, mayor es el grado de deacetilación y menor es la viscosidad (Aldrich, 2005); estas características determinan que el compuesto tenga determinadas propiedades físicas y sea adecuado para ciertos usos (Sigma, 2005). Al evaluar moléculas de quitosano de 4.1×10^5 a 1.96×10^6 Da, Kasaii et al (1999, citado por Baxter et al, 2004) determinaron que las de menor peso tienen mayor actividad antifúngica, fundamentalmente a bajas concentraciones de uso y también encontraron que *A. alternata* es más sensible al quitosano que *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* y *Rhizopus stolonifer*.

El quitosano tiene múltiples propósitos, ya que se utiliza para el tratamiento de aguas, fabricación de films, cromatografía, medicina humana y la industria cosmética, del papel y textil (Aldrich, 2005). También se ha probado su uso en alimentos y en el control de enfermedades de diferentes cultivos, ya que presenta efectos antifúngicos y antibacterianos. Su aplicación como cobertura comestible ha sido aprobada por Estados Unidos (Hirano, S., citado por Baxter et al, 2004). Actualmente, la Food & Drug Administration (FDA) estadounidense se encuentra evaluando la inclusión de un producto que contiene quitosano, llamado Primex (Primex, Islandia), en el listado de sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS) para su uso en alimentos.

Diversas empresas proveedoras de insumos de laboratorio ofrecen quitina, quitosano con diferente peso molecular e incluso, oligosacarinas de quitosano. Estas últimas se producen por hidrólisis enzimática o ácida del quitosano y tienen como característica un mayor grado de deacetilación y menor viscosidad (Aldrich, 2005). Algunas industrias relacionadas con la actividad agrícola, han recientemente fabricado productos a base de quitosano u oligosacarinas de quitosano, algunos de los cuales se denominan comercialmente: Biopol (Actigen S.A., Chile), Biorend (ABF Chemical SL, España), OS Sterling (Gofar Agro, China). Estos productos están indicados para proteger a los cultivos desde la implantación y por su particularidad de ser amigable con el ambiente y no tóxico, su uso se ajusta a las producciones de tipo integrado u orgánico.

Al ser una molécula policatiónica, el quitosano tiene cierta habilidad para interactuar con proteínas y quelatarlas a pH menores a 6, inhibiendo el crecimiento microbiano al secuestrar elementos esenciales (Skjak-Braek et al, 1989, citado por Roller y Covill, 1999). Roller y Covill (1999) sugirieron que el crecimiento restringido de hongos filamentosos como *Mucor racemosus* en un medio agar malta con quitosano, se debió

a la menor disponibilidad de Ca^{+2} y otros nutrientes esenciales, capturados por el quitosano. La actividad antibacteriana del quitosano ha sido relacionada con las características de la pared celular de cada microorganismo (Chung et al, 2004). Ellos demostraron que interactúa con la superficie celular del microorganismo, alterando la estructura de la pared y la permeabilidad de la membrana, produciendo el colapso bacteriano. También sugieren que cuanto más ácida sea la solución de quitosano y mayor sea el grado de deacetilación, probablemente mayor será su poder biocida. Otros autores sostienen que el quitosano promueve la síntesis de quitinasas en los tejidos del hospedero (El Ghaouth et al, 1992). En frutos de pimiento tratados e inoculados con *Botrytis cinerea*, se observó que el quitosano produjo desórdenes en las células de las hifas invasoras del hongo, desde vacuolización a desintegración protoplasmática (El Ghaouth et al, 1997). En experimentos *in vitro*, el quitosano afecta el crecimiento del micelio, la esporulación y la morfología de las esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* (Bautista-Baños et al, 2003).

Inmunización

Como la firmeza a la cosecha y el ritmo de ablandamiento en postcosecha es variable con el material genético, en alguna medida, también lo es la resistencia a las enfermedades de postcosecha. Los tomates tradicionales pierden firmeza rápidamente cuando completan la maduración y en consecuencia, son recolectados apenas han iniciado el cambio de color del verde al rojo y se comercializan rápidamente, cerca del lugar de producción. Si son enviados a otros destinos, es muy probable que las pérdidas por sobremadurez y podredumbres sean muy elevadas. Como alternativa para superar este inconveniente, a partir de la década del '90 se introdujeron en el mercado los tomates de 'larga vida' en estante y posteriormente, materiales mejorados llamados 'firmes estructurales'.

Los tomates 'larga vida' son portadores de genes mutantes de la maduración, *nin* o *nor*, tienen una maduración más lenta y deben cosecharse más maduros para que resulten más sabrosos (INTA, 1998). Estos genes afectan la producción de etileno y la actividad de la poligalacturonasa y pectinmetilesterasa (Buescher et al, 1976); los híbridos portadores del gen *nor* se ablandan menos que los tomates portadores del gen *nin*, y ambos, menos que los tomates sin estos genes. Los genotipos 'larga vida' tienen la capacidad de mantenerse firmes después de 20 días a 20°C, aún cuando los frutos se hayan cosechado completamente rojos (Richardson y Hobson, 1987). Los híbridos 'firmes estructurales' tienen una firmeza de fruto que puede resultar similar a la de los 'larga vida', exigiendo un manejo similar de cosecha (INTA, 1998). La firmeza en estos cultivares está dada por un mayor espesor del pericarpio, de la cutícula o un mayor número de uniones carpelares que aumentan la estructura del fruto, o una combinación de estos factores.

La capacidad de mantener la integridad de la cutícula también difiere con el genotipo. Los cultivares de tomate pueden presentar diferentes propiedades mecánicas, dadas por el espesor de la cutícula, de la hipodermis y por la proporción del perímetro de células epidérmicas en contacto con la cutícula (Allende et al, 2004). Matas et al (2004) determinaron que la elasticidad y la rigidez de la membrana cuticular en tomates tipo cherry, están relacionadas con la composición de la cutícula, siendo el espesor de la misma una medida orientativa de la susceptibilidad a las rajaduras del fruto. Los tomates sin genes larga vida sufren un aumento de la permeabilidad de la cutícula mientras que ello no ocurre en los portadores del gen *nin* (Mendoza-Wilson et al, 1995). Este aumento de la permeabilidad podría estar asociado a un estado más avanzado de senescencia disparado por la mayor producción de etileno en los cultivares tradicionales.

Resistencia inducida. El proceso de resistencia inducida requiere de la presencia de promotores, la emisión de señales y la activación de los genes de defensa (Heil y Bostock, 2002). Los oligogalacturónidos y oligosacáridos liberados en las células dañadas, pero más específicamente en tomate, la sistemina (Pearce et al, 1991), son promotores que se unen a receptores de membrana y promueven la producción de ácido linolénico y linoleico. Ambos ácidos grasos activan la denominada “cascada de señales octadecanoides” y son sustrato para la síntesis enzimática de ácido jasmónico (JA). El JA actúa como mensajero, activando los genes asociados a los mecanismos de defensa, que en tomate están relacionados con la síntesis de inhibidores de las proteinasas (Sivasankar et al, 2000). Junto al jasmónico, el ácido salicílico y el etileno cumplen un rol fundamental en la activación de los genes de defensa de las plantas (Thomma et al, 2001, citado por Díaz et al, 2002).

Similares mecanismos de defensa, ocurrirían ante la presencia de quitosano (Hadwiger et al, 1980, citado por Benhamou y Nicole, 1999). Se ha demostrado que el quitosano es capaz de retrasar la aparición de la enfermedad causada por *A. alternata* en frutos de tomate, a la vez de reducir el diámetro de las lesiones (Reddy et al, 2000a). Estos autores encontraron que el quitosano activa los mecanismos de defensa del fruto (resistencia inducida), ya que promueven un aumento de risitina y además, actúa sobre los factores de patogenicidad del hongo, debido a la menor concentración de ácidos orgánicos y de enzimas degradativas de la pared celular en los frutos tratados.

Aplicado en postcosecha, el quitosano al 1% logró retrasar la aparición de podredumbres en frutos de litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) conservados a 4°C durante 33 días, aunque en menor medida que el tiabendazol (Zhang y Quantick, 1997). Además, la pérdida de antocianinas, fenoles y flavonoides en la piel de los frutos tratados fue menor durante el almacenamiento, al igual que el pardeamiento. El uso de

quitosano forma una capa delgada sobre la superficie del fruto que actúa como una película semipermeable, deprimiendo los niveles de oxígeno, elemento necesario para el pardeamiento enzimático por un lado, y protegiendo al fruto de la deshidratación, por otro (Zhang y Quantick, 1997). Otras investigaciones indican un gran potencial de uso de quitosano como película comestible, para prolongar la vida comercial y retardar la aparición de enfermedades (Romanazzi et al, 2003; El Ghaouth et al, 1991). Las películas comestibles, son semipermeables a los gases (entre ellos el oxígeno, dióxido de carbono, vapor de agua) y modifican el ambiente gaseoso en el fruto tratado. Los bajos niveles de oxígeno y altos de dióxido de carbono, retrasan la maduración y senescencia, por lo que las coberturas tienen un efecto indirecto sobre el desarrollo fúngico (Bancroft, 1995). Por su parte, El Ghaouth et al (1997) encontraron menor secreción de poligalacturonasas en *Botrytis cinerea* inoculada sobre frutos de pimiento tratados con quitosano.

Erradicación

El agua clorada es el método de desinfección de frutas y hortalizas más ampliamente utilizado (Cherry, 1999, citado por Parish et al, 2003). El cloro actúa por contacto y tiene un control instantáneo del inóculo que se encuentra en la superficie del producto, pero encuentra limitantes cuando el patógeno ha penetrado en los tejidos (Boyette et al, 1993). Además, su actividad fungistática es alterada por numerosos factores (Parish et al, 2003). Tratando de superar los resultados obtenidos con el cloro, otros métodos alternativos han sido considerados, entre ellos, el uso de fosfato trisódico, bromo, compuestos de amonio cuaternario, ácidos orgánicos, irradiación, ozono, peróxido de hidrógeno, biocontroladores (Parish et al, 2003). Muchos de ellos tienen limitantes en su aplicación por el alto costo (compuestos de amonio cuaternario), debido al espectro de patógenos que puede controlar (ácidos orgánicos, fosfato trisódico, biocontroladores), por la escasa información de sus efectos y de los

productos que genera en contacto con la materia orgánica (clorito sódico acidificado, bromo), o porque afectan en alguna medida el color o el sabor del producto desinfectado (peróxido de hidrógeno, ozono) (Parish et al, 2003). Por consiguiente, el uso de soluciones cloradas para el lavado de los frutos continúa siendo la herramienta más utilizada para la desinfección y control de diversos microorganismos (Beuchat & Ryu, 1997).

Las principales fuentes de cloro utilizadas para desinfección de hortalizas y frutas son el hipoclorito de sodio (NaOCl), el hipoclorito de calcio (Ca(OCl)_2) y el gas cloro (Cl_2) (Ritenour et al, 2002). El hipoclorito de sodio es el más comúnmente aplicado en operaciones de pequeña escala, aunque en Estados Unidos sólo sus formulaciones registradas y no las lavandinas de uso doméstico, pueden ser empleadas para productos frutihortícolas frescos (Suslow, 2005). La fuente de cloro empleada con mayor frecuencia para la desinfección es el hipoclorito de calcio, que generalmente se presenta como polvo o tableta (Suslow, 2005). No tiene una completa disolución en agua fría y, para evitar que pequeños gránulos en suspensión causen fitotoxicidad con la parte del producto con la que esté en contacto, debe disolverse en agua caliente antes de ser agregado al tanque de desinfección. El cloro gaseoso es el menos costoso de los tres, pero es el que requiere mayores cuidados en el manipuleo e inversión en equipos para monitorear la concentración deseada, aplicándose sólo en escalas muy grandes y para el clorado de agua potable.

Otra fuente de cloro es el dióxido de cloro, un gas con un potencial oxidante 2.5 veces mayor al gas cloro (Bernarde et al, 1967, citado por Parish et al, 2003), teniendo mayor actividad antimicrobiana que el hipoclorito, a la vez que reacciona menos con la materia orgánica (Parish et al, 2003) y tiene gran efectividad en un rango de pH de 6 a 10 (Suslow, 2005). Tiene la desventaja de ser más costoso, presentar riesgos de explosión en concentraciones mayores al 10% o cuando la temperatura excede 130°C

(Suslow, 2005) y tener deficiente estabilidad, además de no estar permitido para hortalizas y frutas precortadas (Parish et al, 2003).

Un producto novedoso a base de cloro es el trocloseno de sodio, cuya molécula es: 1, 3 dicloro – 1, 3, 5 triazina, 2, 4, 6 triona. Este compuesto tiene una estructura anillada que alterna átomos de hidrógeno y carbono y en el que dos átomos de cloro se encuentran unidos al nitrógeno en posición 1 y 3 (Taharsept, Concept, Israel). Es una fuente orgánica de cloro utilizada para la potabilización del agua de consumo, con mayor estabilidad y persistencia que el hipoclorito de calcio hidratado (Prusky et al, 2001). Es escasa la información de su aplicación como desinfectante de hortalizas y frutas frescas; los únicos trabajos encontrados relacionados con el trocloseno de sodio han sido desarrollados recientemente por el Dr Prusky y su equipo, pertenecientes al Volcani Center de Israel. Ellos han demostrado que el trocloseno de sodio ha resultado eficaz en el control de *A. alternata* durante almacenamientos prolongados en frutos de caqui (Prusky et al, 2001). En otro trabajo, han encontrado un buen control de *A. alternata* en mangos, utilizando trocloseno de sodio en combinación con el cepillado con agua caliente (Prusky et al, 2002).

Cualquiera sea la fuente de cloro utilizada, el grado de efectividad de los tratamientos depende fundamentalmente de la concentración de cloro libre y de la proporción en que el cloro se encuentre como ácido hipocloroso (HClO) (Ritenour et al, 2002). Todas las formulaciones de cloro mencionadas liberan ácido hipocloroso al hidrolizarse y éste a su vez, se encuentra en equilibrio con su forma disociada: hipoclorito (ClO⁻). El 95 a 97% del cloro liberado del hipoclorito de sodio en agua, se encuentra como hipocloroso a pH 6, mientras que a pH 7,5, sólo lo está cerca del 50% (Ritenour et al, 2002). Como el HClO tiene una actividad antimicrobiana 20 a 300 veces mayor que el ClO⁻ (White, 1992, citado por Bartz et al., 2001), el pH de la solución desinfectante debería mantenerse entre 6 y 7.5 para lograr un buen control

(Suslow, 2001). El trocloseno de sodio también libera HClO cuando es disuelto en agua, siendo su poder biocida dependiente también del pH de la solución. Similar a lo que ocurre en las formas de cloro inorgánicas, el cloro liberado del trocloseno en agua se encuentra en un 99,7 a 92,4% como HClO cuando el pH es de 5 a 6,5 y en un 54,8%, si el pH es de 7,5 (Taharsept, Concept, Israel).

Aunque el lavado con agua clorada constituya el método de desinfección más utilizado, las recomendaciones de la concentración de cloro libre así como de otros factores que inciden sobre el tratamiento (duración, profundidad, temperatura del agua, etc.), aún no han sido completamente establecidas (Bartz et al, 2002). Generalmente, la concentración de cloro libre debe mantenerse entre 100 y 150 ppm, el pH entre 6 a 7,5 y la temperatura del agua, al menos 10°C mayor respecto a la del producto a desinfectar (Bartz et al, 2002). Tanto el ácido hipocloroso como el ión hipoclorito, reaccionan con la materia orgánica del suelo, restos vegetales y cualquier otro elemento que contenga oxígeno y se encuentre depositado en la superficie del producto a ser desinfectado. Estas reacciones reducen la cantidad de cloro libre disponible y conllevan a hacer un riguroso monitoreo de la concentración de cloro y del pH para asegurar una suficiente disponibilidad de HClO para la desinfección. Los sistemas modernos utilizan el potencial de óxido-reducción (ORP) para conocer y controlar la concentración de cloro libre. Los sensores de ORP, sumado al uso de inyectores de cloro, permiten automatizar el proceso de desinfección asegurando los niveles de cloro deseados (Suslow, 2005).

MATERIALES Y METODOS

Obtención del inóculo

El inóculo fue obtenido a partir de frutos de tomate del híbrido 'Superman' con síntomas de podredumbre negra, procedentes de diferentes productores del cinturón hortícola de Mar del Plata. Las esporas del hongo (Figuras I y II, Apéndice) fueron cultivadas en placas de Petri conteniendo medio de agar papa glucosado (APG) 2%, incubadas a 20°C y aproximadamente 16 horas de luz natural indirecta (Figura III, Apéndice). A los 7 días de crecimiento, se agregó agua estéril a cada placa con APG, se removieron las esporas de la superficie del medio con un rastrillo de vidrio y 10 µl de la solución obtenida, fueron transferidos a una nueva placa conteniendo agar agua (AA). Al día siguiente y por observación al microscopio, se identificaron esporas germinadas que fueron posteriormente aisladas con un microsacabocados y cultivadas en medio APG. En total se obtuvieron 40 aislamientos monospóricos que se conservaron a 4°C en tubos conteniendo APG 2%.

Desarrollo de un método de inoculación y selección de aislamientos *in vivo*

Las primeras pruebas de inoculación se hicieron hiriendo los tomates en cuatro sitios del hombro y aplicando sobre cada herida, 40µl de una suspensión acuosa de 10⁶ conidios/ml. Las heridas consistieron en 10 orificios de 1 mm de ancho y 3 mm de profundidad por cada sitio de inoculación. Las mismas se realizaron con un pinche fabricado a partir de una tapa metálica, a la que se le hicieron 10 perforaciones con un clavo y por cuyo lado interno se atravesaron 10 alfileres, dejando hacia el lado opuesto sólo 3 mm de largo de cada uno. La cara interna de la tapa se selló con silicona para evitar el movimiento de los alfileres al realizar las heridas. Posteriormente, la tapa se

recubrió con varios pliegues de papel metálico para aislar la silicona del calor de la llama de flameo durante las esterilizaciones previas a practicar las heridas en los frutos (Figura IV, Apéndice).

Para comprobar el efecto de las estrategias fue imprescindible desarrollar un método de inoculación en el que no fuera necesario herir los frutos. Se realizó una prueba en la que se evaluó el uso de discos de agar con micelio y a partir de una suspensión acuosa de 3×10^6 conidios/ml, la utilización de motas de algodón embebidas en inóculo y la inoculación con 40 μ l. También se evaluó la aplicación de 40 μ l de inóculo a una suspensión de conidios a la que se había agregado glicerol al 30% ($2,7 \times 10^6$ conidios/ml) (Figura V, Apéndice). El monospórico utilizado fue el Aa-070414 (cultivado en medio APG 2% durante 8 días a 18°C y aproximadamente 16 horas de luz natural indirecta). Frutos heridos con el pinche, fueron inoculados con 40 μ l de la misma suspensión de conidios y otros frutos considerados controles, recibieron 40 μ l de agua estéril en cada sitio de inoculación. Cada método se probó por triplicado, incubándose los frutos durante 14 días a 20°C y alrededor del 90% de humedad relativa.

Posteriormente, se decidió probar una reducción del volumen de inoculación de 40 a 10 μ l, para evitar escurrimiento del inóculo. Utilizando el mismo aislamiento y bajo las mismas condiciones de crecimiento, se hizo una prueba inoculando frutos sin herir con 10 μ l de una suspensión de $3,2 \times 10^6$ conidios/ml, contando como controles con frutos inoculados con heridas y frutos sin herir a los que se colocó 10 μ l de agua estéril en cada sitio de inoculación.

Para seleccionar las cepas más patogénicas a ser utilizadas como inóculo en los experimentos, se realizó una prueba de patogenicidad con 18 de los 40 aislamientos monospóricos, para lo cual cada uno fue cultivado en APG 2% a 20°C, recibiendo luz

fluorescente continua durante 7 días. Durante la incubación de los mismos se hicieron observaciones de la velocidad de crecimiento diaria y del color del micelio. Para preparar la suspensión de conidios se procedió como se ha descrito, ajustando la concentración final en orden de 10^6 esporas/ml, mediante el recuento de cada aislamiento con un eritrocitómetro. La patogenicidad de cada monospórico fue probada inoculando dos tomates en cuatro sitios de la zona del hombro, uno con heridas y otro sin herir. Se utilizaron frutos del tipo redondo tradicional, de variedad no identificada y con un color rojo pálido (correspondiente al Grado 5; THE CALIFORNIA TOMATO BOARD, 1975), adquiridos en un supermercado local. Los mismos fueron lavados con una solución de hipoclorito de sodio 200 ppm y colocados sobre papel absorbente hasta su secado. Cada sitio se inoculó con 10 μ l de dicha suspensión, conteniendo aproximadamente 10000 conidios. Los tomates permanecieron 14 días a 20°C y con humedad relativa cercana al 100%. Desde el segundo día de inoculación y con una frecuencia diaria hasta el séptimo día, se observó presencia o no de lesión, cantidad de sitios inoculados por fruto con síntomas de la enfermedad y el diámetro máximo de la lesión.

Aplicación de oligosacarinas de quitosano en pre-cosecha

El tratamiento con oligosacarinas de quitosano se realizó el 14/4 del año 2004, sobre tomates del híbrido 'Superman', cultivados en invernadero en el Establecimiento 'El Panqueque', ubicado en el paraje 'El Dorado', Partido de General Pueyrredón. El producto utilizado, OS-Sterling-I (Amino Oligosaccharin bio-fungicide, Gofar Agro Specialties, Beijing, China), fue provisto por la empresa fabricante y se encuentra recientemente disponible en el mercado. Es un líquido ligeramente amarillento que contiene oligosacarinas de quitosano (polímero de glucosamina con unión β , 1-4) 0,5%, de un peso molecular de alrededor de 3000 Da y de pH entre 4 y 5, que sólo requiere ser diluido para su uso. Las especificaciones de marbete indican que la

aplicación foliar durante el período de crecimiento de los frutos permite controlar numerosas enfermedades causadas por hongos.

Siguiendo las instrucciones de uso, la dilución utilizada fue de 1:500 (v/v; OS-Sterling-I:agua), logrando una solución de oligosacarinas de quitosano 0,001%. El tratamiento se realizó con mochila sobre cuatro parcelas distribuidas al azar de 50 plantas de tomate, asperjando toda la planta hasta punto de goteo (0,125 litros/planta) (Figura VI, Apéndice). Otras cuatro repeticiones de 50 plantas, pulverizadas solo con agua, fueron consideradas control sin tratar con quitosano. En todos los casos, el pH del agua se corrigió a 6,2, mediante el agregado de HCl 10 N (pH inicial del agua: 8.2).

El día posterior al tratamiento en el invernadero, se cosecharon 50 frutos sanos de cada parcela, de tamaño y madurez uniforme (presentando hasta un 10% de color rojo en superficie). Se conformaron cuatro repeticiones de 20 frutos por tratamiento, que se identificaron y colocaron en bandejas plásticas apilables. El mismo día en que fueron cosechados, frutos tratados con quitosano y controles sin tratar, se inocularon con *A. alternata*. Para la inoculación se utilizó una suspensión conteniendo conidios de tres cepas del patógeno en igual proporción, seleccionadas entre 18 aislamientos por desarrollar síntomas en frutos sin herir: Aa-080408, Aa-070413 y Aa-070414. Las cepas selectas fueron repicadas a partir de cultivos conservados a 4°C, 8 días previos a la cosecha de los frutos, creciendo en APG 2% (acidificado con ácido láctico) a 20°C y luz fluorescente 24 h diarias. La preparación de las esporas en agua se realizó inmediatamente antes de la inoculación, a partir del agregado de agua estéril en cada caja de Petri y posterior filtrado con una malla de tela, del tipo que se utiliza en la industria casera de quesos para filtrar el suero, a los fines de retener residuos de agar (Figura VII, Apéndice). Los conidios suspendidos en agua fueron colectados en un vaso de precipitado estéril y finalmente, se ajustó la concentración mediante el

agregado de agua estéril hasta alcanzar 10^6 conidios/ml, utilizando un eritrocitómetro para el conteo.

Cada fruto fue inoculado con 10 μ l de dicha suspensión de *A. alternata* en cuatro sitios del hombro (Figura VIII, Apéndice). Estos sitios de inoculación fueron previamente marcados con tinta indeleble, para permitir el seguimiento de las lesiones debidas al inóculo depositado sobre cada uno y distinguirlas de las infecciones naturales. Se contó con un control tratado con quitosano y otro sin tratar, ambos inoculados con heridas, para detectar fallas en la viabilidad del inóculo. Para ello, cuatro repeticiones de cuatro frutos tratados y no tratados con quitosano, con heridas de 3 mm de profundidad, se inocularon en cada sitio con 10000 conidios. Los controles agua, que constaron de cuatro repeticiones de al menos 10 tomates tratados con quitosano y sin tratar, recibieron 10 μ l de agua estéril en cuatro sitios del hombro y posibilitaron registrar la evolución de las infecciones naturales en los sitios identificados.

Los tomates se incubaron durante 19 días a $20\pm 1^\circ\text{C}$. Mediante el uso de un humidificador (Herrmidifier 707 Series, Trion Inc., Illinois, USA; Figura IX, Apéndice), se mantuvo un nivel de humedad relativa de $86\pm 4\%$ (Figura X, Apéndice). Debido a la desuniformidad en el contenido de humedad del aire en sentido vertical, se decidió bloquear colocando las bandejas correspondientes a un mismo bloque a una misma altura en una estantería metálica. Las bandejas correspondientes a un mismo bloque fueron ordenadas al azar al inicio y cada vez que fueron reintroducidas luego de haber sido evaluada la enfermedad en sus frutos. Se conformaron cuatro bloques completos aleatorizados.

A los 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 16 y 19 días post-inoculación se registró la presencia de frutos enfermos, eliminando sólo aquellos desintegrados, con pérdida de contenido

locular o con un grado de podredumbre tal que impidiera la observación de los sitios inoculados. De cada fruto también se identificó el tipo de mancha y la medida de su diámetro. Los criterios utilizados en las variables medidas fueron:

Sanidad del fruto: se consideró que el fruto estaba enfermo cuando se observó al menos el desarrollo de una mancha necrótica en la piel, en al menos uno de los cuatro sitios de inoculación.

Tipo de lesión: mediante una escala de 0 a 10, en la que se asignó valores más altos cuanto mayor fue la gravedad de la misma (Cuadro 1; Figuras VIII, XI, XII y XIII, Apéndice):

Cuadro 1. Escala asignada al tipo de lesión, según el síntoma y signo observado.

Descripción		Valor de la escala
Sin lesión. Presencia de mancha correspondiente a la gota de inóculo, con o sin presencia del micelio del hongo.		0
Mancha necrótica, no deprimida	con micelio recubriendo menos del 25% de la superficie de la misma	1
	con micelio recubriendo entre un 25 y 50% de la superficie de la misma.	2
	con micelio recubriendo más del 50% de la superficie de la misma	4
Pudrición, con depresión de los tejidos	con micelio recubriendo menos del 25% de la superficie de la misma	7
	con micelio recubriendo entre un 25 y 50% de la superficie de la misma	8
	con micelio recubriendo más del 50% de la superficie de la misma.	10

Diámetro: diámetro mayor de la mancha de la gota de inóculo, del micelio crecido sobre la misma o de la lesión desarrollada sobre el sitio de inoculación. El valor del día de inoculación fue de 0,4cm, correspondiente a la gota de inóculo. Ante la presencia de lesión en alguno de los sitios de inoculación, se registró el valor del diámetro del tipo de mancha más severa. Las pudriciones presentaron bordes definidos, permitiendo la medición en estados muy avanzados de desarrollo.

Con las variables descriptas se calculó:

Proporción de frutos enfermos (incidencia): número de frutos enfermos respecto del total de frutos.

Intensidad de enfermedad: calculada como el producto del diámetro de la mancha o lesión por el tipo de lesión, en los frutos sanos y enfermos.

Severidad de enfermedad: calculada como producto del diámetro de la mancha o lesión por el tipo de lesión, sólo en los frutos enfermos.

Tanto la incidencia, el diámetro de la mancha o lesión, como la severidad e intensidad son variables con evolución no lineal en el tiempo, dependencia entre media y varianza y entre observaciones de un mismo fruto. Dada esas características, se utilizaron modelos no lineales mixtos, con efecto aleatorio de algunos parámetros para modelar la heterogeneidad de varianzas (heterocedasticidad) e incorporando una estructura de autocorrelación entre observaciones sucesivas de un mismo fruto. Se utilizó el paquete NLME (Pinheiro et al, 2004), del software R (R Development Core Team, Viena, Austria, 2004), para modelar la evolución de la incidencia mediante un modelo de tipo logístico y para la intensidad, severidad y diámetro de mancha, con un modelo exponencial:

Modelo del tipo logístico para la proporción de enfermos:

$$y_{ikj} = (A_{ik} + a_k) \cdot \frac{\exp(\beta_{0_{ik}} + \beta_{1_{ik}}(x_j - d_0))}{1 + \exp(\beta_{0_{ik}} + \beta_{1_{ik}}(x_j - d_0))} + e_{ikj}, \text{ donde:}$$

Y_{ikj} = proporción de enfermos observada en el k-ésimo bloque, del tratamiento i en el día j,

x_j =día j post-inoculación,

d_0 = 5, correspondiente al primer día de observación,

A_{ik} $\beta_{0_{ik}}$ $\beta_{1_{ik}}$ = son los efectos fijos de bloque k y tratamiento i en los parámetros del modelo,

a_k = es el efecto aleatorio en la asíntota del k-ésimo bloque,

e_{ikj} = es el error aleatorio de la observación.

Se asumió que a_k y e_{ikj} son independientes con distribución Normal. El efecto aleatorio en la asíntota modela la heterogeneidad de varianzas a lo largo de los días, e introducen una estructura de correlación entre las observaciones de un mismo bloque. La constante d_0 se fijó en un valor de 5 para que las comparaciones entre β_0 correspondiesen a las de la variable respuesta en el día que comenzaron las observaciones.

Modelo del tipo exponencial para diámetro de mancha o lesión, severidad

e intensidad de la enfermedad:

$$y_{ikjs(k)} = \exp\left(\left(\beta_{0_{ik}} + b_{0_{s(k)}}\right) + \left(\beta_{1_{ik}} + b_{1_{s(k)}}\right)(x_j - d_0)\right) + e_{ikjs(k)} \dots \text{dónde}$$

Y_{ikjs} = la respuesta observada en el s-ésimo tomate del Bloque k, Tratamiento i en el día j,

x_j = día j post-inoculación,

d_0 = 5, correspondiente al primer día de observación,

$\beta_{0_{ik}}$ $\beta_{1_{ik}}$ = son los efectos fijos de bloque k y tratamiento i en los parámetros del modelo,

$b_{0_{s(k)}}$ y $b_{1_{s(k)}}$ = son efectos aleatorios, asíntota del s-ésimo tomate del bloque k, en los parámetros $\beta_{0_{ik}}$ y $\beta_{1_{ik}}$ respectivamente,

$e_{ikjs(k)}$ = es el error aleatorio de la observación.

Se asumió que $b_{0_{s(k)}}$, $b_{1_{s(k)}}$ y $e_{ikjs(k)}$ son independientes con distribución Normal. Los efectos aleatorios en los parámetros del exponente implican que la variable respuesta no es normal, su varianza no es constante a lo largo de los días, e introducen una estructura de correlación entre las observaciones de un mismo tomate.

La constante d_0 se fijó en un valor de 5 para que las comparaciones entre β_0 correspondiesen a las de la variable respuesta en el día que comenzaron las observaciones. Las comparaciones entre tratamientos se realizaron mediante pruebas t sobre los parámetros de los modelos.

Evaluación de la firmeza de diferentes híbridos de tomate almacenados a 21°C

Para evaluar la firmeza de tomates de diferentes híbridos, asociada a la susceptibilidad a las enfermedades, se obtuvieron frutos producidos bajo las mismas condiciones de manejo, procedentes de invernaderos del establecimiento 'El Panqueque' (Partido de Gral Pueyrredón, provincia de Buenos Aires). Los materiales

analizados fueron: 'Acuario' y 'Anahí' (BHN Seed, Bonita Springs Florida, USA), 'Badro' y 'Mondial' (Enza Zaden, Enkhuizen, The Netherlands), 'Colt45' (Royal Sluis, Seminis Inc., Oxnard, USA) y 'Superman' (Petoseed, Seminis Inc., Oxnard, USA). De todos ellos, el único cultivar híbrido de 'larga vida' en estante fue 'Acuario'.

El 24/2, 4/3 y 11/3 del año 2004, se cosecharon de cada híbrido cinco frutos sanos, de tamaño similar y en inicio del proceso de maduración, correspondiente al Grado 2 (USDA, 1975), los que constituyeron la unidad experimental. A la cosecha y a los 3, 4, 7, 14 y 21 días de permanencia a $21,5 \pm 1^\circ\text{C}$ y $86,3 \pm 6\%$ de humedad relativa (Figura XIV, Apéndice), se midió la firmeza de cada fruto con un dinamómetro Durofel (Copa-Technologie, Cedex, France). Este método es no destructivo y mide la firmeza en una escala relativa de 0 a 100 (mayor valor corresponde a mayor firmeza), mediante la contracción superficial ejercida por la presión del émbolo de 50mm, simulando la realizada por el tacto. Se realizaron tres mediciones en la zona ecuatorial de cada fruto.

Se utilizó un diseño factorial 6x5 (6 corresponde a los híbridos y 5, a los días desde la cosecha), en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones, en el que se consideró a la fecha de cosecha como factor de bloqueo. Los datos fueron analizados mediante Anova y cuando las diferencias entre los tratamientos fueron significativas al 5%, se utilizó el test de Tukey para la separación de medias.

Susceptibilidad a *A. alternata* en tomates que difieren en su firmeza estructural

Se utilizó la misma metodología que para el experimento de quitosano, con las siguientes modificaciones:

El 28/4/2004, se cosecharon tomates de híbridos de frutos muy firmes ('Badro'), firmes ('Anahí') y poco firmes ('Superman'), para evaluar el comportamiento de cada

uno ante el desarrollo de la podredumbre negra. Los tomates fueron inoculados con una suspensión de $1,5 \times 10^6$ conidios/ml y almacenados durante 17 días a $20,8 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92,5 \pm 8\%$ de humedad relativa (Figura XV, Apéndice). Las observaciones y el registro de la enfermedad se realizaron a los 5, 6, 8, 12, 14, y 17 días post-inoculación. Se utilizó un diseño en bloques completos aleatorizados, con tres repeticiones.

Para incidencia se ajustó un modelo logístico como el descrito para quitosano, pero por falta de convergencia, no fue posible ajustar el modelo exponencial para las restantes variables, con lo que se recurrió a describir la información mediante diagrama de cajas. Estos son construidos a partir de los datos ordenados en forma creciente; el borde inferior y superior de la caja corresponden al valor que se encuentra en el primer y tercer cuartil (q_1 y q_3 , correspondientes al 25 y 75% de las observaciones, respectivamente). Dentro de la caja también se señala la mediana y fuera de ella, se grafica una línea (bigote) que llega hasta la observación con el mínimo valor no extremo. Hacia el otro lado de la caja, se traza otra línea que llega hasta la observación con el máximo valor no extremo. Se consideran valores extremos y muy extremos aquellos datos que se encuentren más allá de los cuartiles en 1,5 veces ($q_3 - q_1$) y 3 veces ($q_3 - q_1$), respectivamente. Los valores extremos o muy extremos son graficados cada uno en forma individual.

También se estudió la proporción de frutos en cada cultivar en los que la lesión superó el valor de 0,4 cm mediante Anova y test de comparaciones múltiples con el paquete 'Multcomp', del software R (Bretz et al., 2004).

Uso de erradicantes clorados

En un cultivar de baja firmeza. Tomates del híbrido 'Superman', cultivados en invernadero, fueron cosechados el 23/3/2004 con los mismos criterios mencionados en

el experimento de quitosano. Luego se siguió la misma metodología descrita en quitosano para la inoculación. Como modificaciones se tuvo que la suspensión fue de $1,28 \times 10^6$ conidios/ml y que los tomates inoculados fueron incubados a 20°C y humedad relativa cercana a 95% durante 72 horas, con el fin de permitir que las esporas pudieran germinar e iniciar la infección y luego fueron sometidos a los siguientes tratamientos:

1. Control lavado con agua destilada, reemplazando el agua luego de la inmersión de los frutos de cada bloque (pH: 5,9 a 6,2)
2. Hipoclorito, con una concentración de 500 ppm de cloro (pH: 6,1)
3. Trocloseno de sodio, con una concentración de cloro activo libre (LAC) de aproximadamente 500 ppm (pH: 5,6).

En todos los casos se tuvo en cuenta que la altura del líquido de inmersión no fuera mayor a 20 cm, que la temperatura fuera próxima a 40°C, el pH estuviera entre 5,6 y 6,2 y la duración fuera de 30 segundos.

Los tratamientos se realizaron primero en las bandejas del primer bloque y luego se siguió en orden creciente hasta finalizar con el cuarto bloque. Para el tratamiento con hipoclorito de sodio se utilizó lavandina de uso doméstico (55 g/l de Cl). El trocloseno de sodio 'Taharsept' (Taharsept, Concept, Israel), es una formulación sólida en pastilla y según instrucciones del fabricante, su disolución en 3 litros de agua rinde alrededor de 500 ppm de cloro activo. La solución desinfectante se preparó siguiendo esta recomendación y por presentar una liberación lenta de cloro, antes de tratar el primer bloque y al finalizar con el tratamiento del último, se tomó una muestra de la solución para medir el contenido de LAC por titulación (Apéndice, pág. 96). Desde el comienzo a la finalización del tratamiento de lavado con la solución de trocloseno de sodio, la concentración de LAC aumentó de 395,8 ppm a 527,8 ppm.

Una vez finalizado cada tratamiento, los frutos fueron colocados sobre papel absorbente hasta su secado (Figura XVI, Apéndice). Posteriormente, se trasladaron en bandejas apilables nuevamente a la cámara de incubación, donde permanecieron un máximo de 20 días a $22\pm 1^\circ\text{C}$ y $91\pm 3\%$ de humedad relativa (Figura XVII, Apéndice). Las observaciones a los 5, 6, 7, 10, 12, 14, 17 y 20 días desde la desinfección. Las variables se analizaron con la misma metodología que en el experimento con quitosano. En este experimento, la variable x_i que interviene en el modelo logístico y exponencial, correspondió a días posteriores a la desinfección. Adicionalmente, se hicieron contrastes entre el hipoclorito y trocloseno de sodio, para comparar su grado de eficacia en el control de la enfermedad.

En cultivares de diferente firmeza estructural. El 4/4/2005 se cosecharon frutos de tomate con hasta un 10% de color rojo en superficie (Grado 2; USDA, 1975) del híbrido 'Superman' (Petoseed, Seminis Inc., Oxnard, USA) y 'Nixel' (Enza Zaden, Enkhuizen, The Netherlands), cultivados en invernadero. 'Nixel' es de una firmeza similar o superior a 'Badro', ya que es un tomate tipo estructural muy firme, pero no tiene genes de 'larga vida'. La metodología utilizada fue similar a la del experimento con quitosano, siendo que en este caso se inoculó con una suspensión de *A. alternata* de $2,09 \times 10^6$ conidios/ml. Las esporas inoculadas se obtuvieron a partir del cultivo de las cepas selectas, que habían sido conservadas en un freezer a -20°C (solución de glicerol al 30%). Posteriormente a la inoculación, se siguió la misma metodología y se probaron los mismos tratamientos que en el experimento de erradicación anteriormente descrito (realizado en 'Superman'), con las siguientes modificaciones:

Una vez finalizados los tratamientos de desinfección, los tomates permanecieron un máximo de 22 días a una temperatura de $19,6\pm 1^\circ\text{C}$ y $98,5\pm 2\%$ de humedad relativa (Figura XVIII, Apéndice).

Para disminuir la heterogeneidad del contenido de humedad del aire dentro del bloque y debido a la gran influencia que este factor tiene sobre el desarrollo de la enfermedad, las bandejas correspondientes a un mismo bloque fueron apiladas con un ordenamiento al azar y recubiertas por una bolsa de polietileno (Figura XIX, Apéndice). Este sistema retrasó la aparición de los síntomas, posiblemente por el menor grado de condensación de agua sobre el fruto; por ese motivo, a partir de los 14 días post-inoculación y en forma diaria, los tomates se sometieron a una nebulización durante 15 minutos, mediante el uso de un humidificador centrífugo. Al finalizar este proceso en todas las bandejas de un mismo bloque, las mismas fueron apiladas y recubiertas con el polietileno para preservar la humedad.

Diariamente hasta el día 11 y a los 14, 16, 18 y 22 días post-inoculación se llevaron registros de la ocurrencia de podredumbres, tipo y diámetro de lesión.

En este experimento, la variable x_j que interviene en el modelo logístico, correspondió a días posteriores a la desinfección. Se le asignó un valor 12 días a la constante d_0 cuando se ajustaron los modelos logístico y exponencial, debido a que la enfermedad retrasó su aparición y se decidió trasladar el modelo hacia un momento en el que la misma ya se hubiese manifestado.

Se estudiaron además las variables 'Días post-desinfección en que se detectó la enfermedad' y 'Proporción de frutos en los que el diámetro de lesión fue superior a 0,4cm', para cada combinación de tratamiento y cultivar. Ambas fueron analizadas mediante Anova y test de comparaciones múltiples con el paquete 'multcomp', del software R (Bretz et al, 2004).

RESULTADOS

Desarrollo de un método de inoculación y selección de aislamientos *in vivo*

Método de inoculación. La inoculación con 10 o 40 μ l de una suspensión acuosa de *A. alternata* del orden de 10^6 conidios/ml sobre heridas fue altamente efectiva, siempre que las condiciones de humedad relativa se mantuvieran por encima del 90%. Este método fue utilizado en todos los ensayos como control, ya que permite evaluar la viabilidad del inóculo.

De las formas de inoculación sin herir, la aplicación de 40 μ l de inóculo suspendido en agua resultó la más efectiva, al observarse mayor número de frutos y de sitios inoculados con síntomas de podredumbre negra (alrededor del 60% de incidencia a los 12 días a temperatura ambiente y al menos dos sitios con síntomas de los cuatro que recibieron inoculación). En los restantes tratamientos, la incidencia fue menor al 25% y fue menos frecuente la aparición de la enfermedad en más de un sitio de inoculación. Al reducir el volumen aplicado de 40 a 10 μ l, al menos el 60% de los tomates desarrollaron la enfermedad a los 14 días de incubación a 20°C y alta humedad relativa, resultando ambos volúmenes de inóculo igualmente efectivos. La inoculación con 10 μ l de una suspensión acuosa de 10^6 conidios/ml fue el método elegido para utilizar en los experimentos.

Selección de aislamientos *in vivo*. Se seleccionaron tres aislamientos: Aa-080408, Aa-070413 y Aa-070414. Estos monospóricos fueron elegidos porque desarrollaron síntomas en los cuatro sitios inoculados en tomates sin herir, demostrando un alto grado de patogenicidad (Figura 1). Las lesiones observadas fueron de al menos 1 cm de diámetro. Otros monospóricos probados no presentaron lesiones (27,8% de los

aislamientos) o desarrollaron lesiones de menor diámetro y en menor cantidad de sitios inoculados (55% de los aislamientos). A los 14 días de incubación, las lesiones fueron de al menos 2,6 cm de diámetro en Aa-080408, Aa-070413 y Aa-070414. Las cepas selectas fueron conservadas en APG al 2% (acidificado con ácido láctico) en tubos pico de flauta y en cajas de Petri a 4°C y en freezer a -20°C, en una solución de glicerol al 30%.



Figura 1. Tomate inoculado con 10 μ l de la cepa Aa-070414 (sin heridas) en cuatro sitios, luego de 14 días a 20°C.

Aplicación de oligosacarinas de quitosano en pre-cosecha

Todos los frutos control inoculados sobre heridas, tanto tratados como sin tratar con quitosano, presentaron síntomas de la enfermedad en el primer día de observación (5 días post-inoculación). Esto indicó que el ambiente fue favorable para el desarrollo de la podredumbre negra. En los controles agua, el primer fruto con síntomas se observó a los 12 días. No fue posible distinguir si las infecciones en estos tomates eran procedentes del campo o fueron debidas a la dispersión de inóculo desde otros frutos enfermos dentro de la cámara de incubación.

Las variables intensidad y severidad presentaron un valor mínimo de 0 y un máximo de 50. Este último valor surgió como consecuencia de multiplicar a 10, el mayor valor de la escala de tipo de lesión, por el diámetro de la lesión, que puede alcanzar 5 cm. Generalmente, frutos con avanzado estado de pudrición presentaron un diámetro de lesión de 4 a 4,5 cm y pocos de ellos, estuvieron en condiciones de permanecer en estudio y alcanzar un diámetro de alrededor de 5 cm. Por esa razón y en base a los registros realizados, se consideró a 5 cm como el diámetro de lesión máximo. Teniendo como referencia la máxima intensidad y severidad, es posible referenciar los valores absolutos estimados por los modelos como porcentaje.

En el modelo logístico ajustado para proporción de frutos enfermos (incidencia de enfermedad) se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para β_0 ($p=0,0005$) y para β_1 ($p=0,0002$), pero no para asintota ($p=0,1956$). La diferencia entre tratamientos en β_0 , significó un retraso en la aparición de la enfermedad en el quitosano respecto al control sin tratar (Figura 2). Sin embargo, las correspondientes a β_1 implicaron un desarrollo más rápido de la podredumbre negra en los tomates con quitosano, resultando mayor la incidencia en éste en relación al control sin tratar a partir del día 8 post-inoculación. Si bien, la incidencia máxima alcanzada por ambos tratamientos fue de 76,4%, el quitosano llegó a ese nivel a los 9 días y el control sin tratar, a los 12 días.

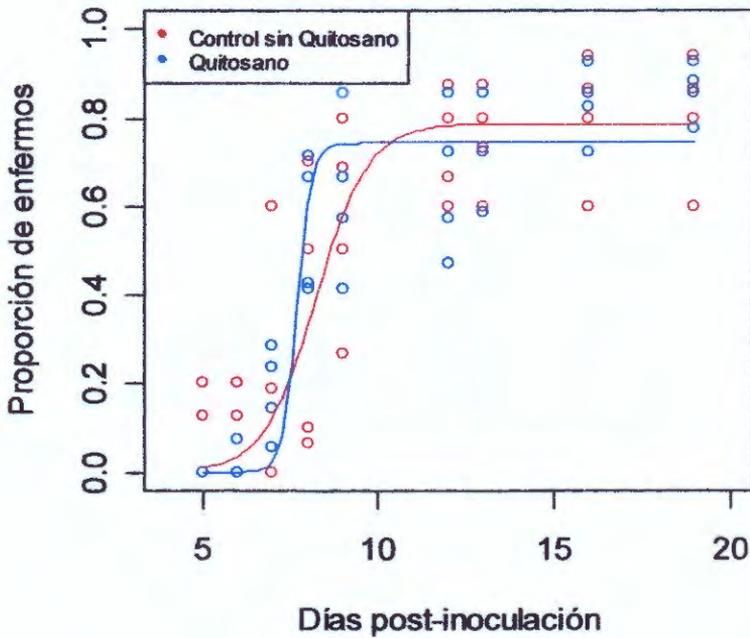


Figura 2. Incidencia de enfermedad en tomates 'Superman' tratados y sin tratar con quitosano un día antes de la cosecha e inoculados con *A. alternata*, durante 19 días de almacenamiento a $20\pm 1^\circ\text{C}$ y $86\pm 4\%$ de humedad relativa.

En el ajuste exponencial de la evolución de la lesión o mancha se detectó diferencia significativa entre el tratamiento y el control sin tratar con quitosano para β_0 ($p=0,0247$) y no para β_1 ($p=0,1570$). El menor β_0 en los frutos tratados con quitosano significó un retraso del crecimiento del diámetro de la mancha respecto al control sin tratar, que se mantuvo hasta alrededor del día 9 post-inoculación (Figura 3). A los 5 días post-inoculación (primer día de observación), el diámetro en los tratados se mantuvo en 0,41 cm, correspondientes a la gota de inóculo, mientras que en el control sin tratar se registró 0,48 cm. La falta de diferencia significativa en β_1 implicó que los tratamientos presentaron una evolución similar del diámetro de la mancha o lesión.

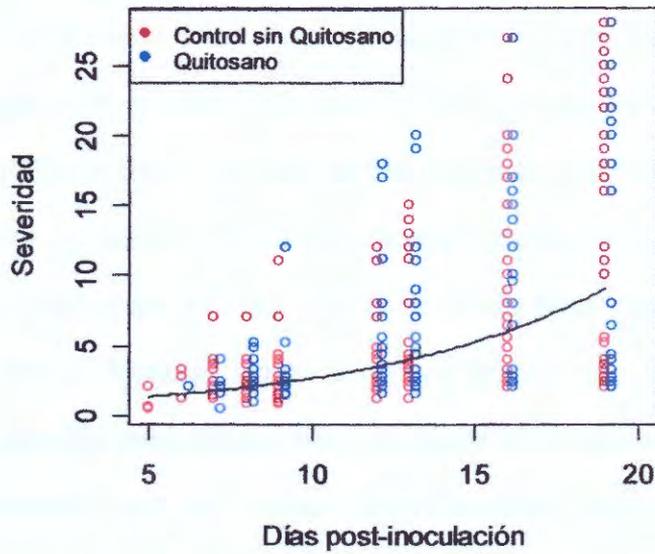


Figura 4. Severidad de enfermedad en tomates 'Superman' durante 19 días de almacenamiento a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $86\pm 4\%$ de humedad relativa (el ajuste se hizo tomando en cuenta los datos de los frutos tratados y sin tratar con quitosano, ambos inoculados con *A. alternata*).

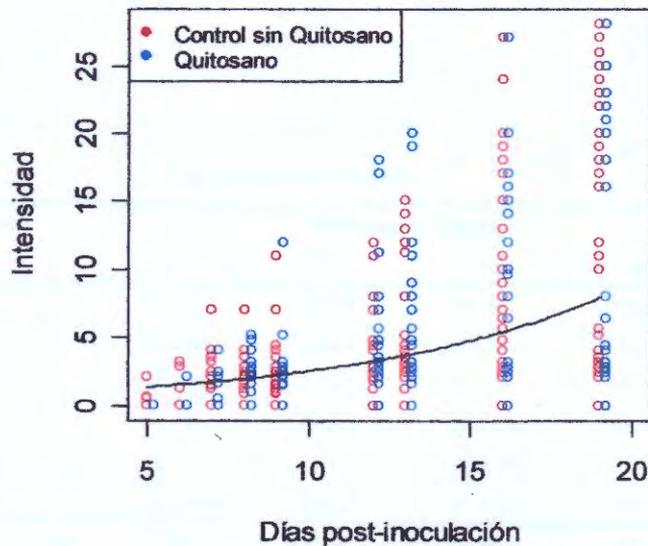
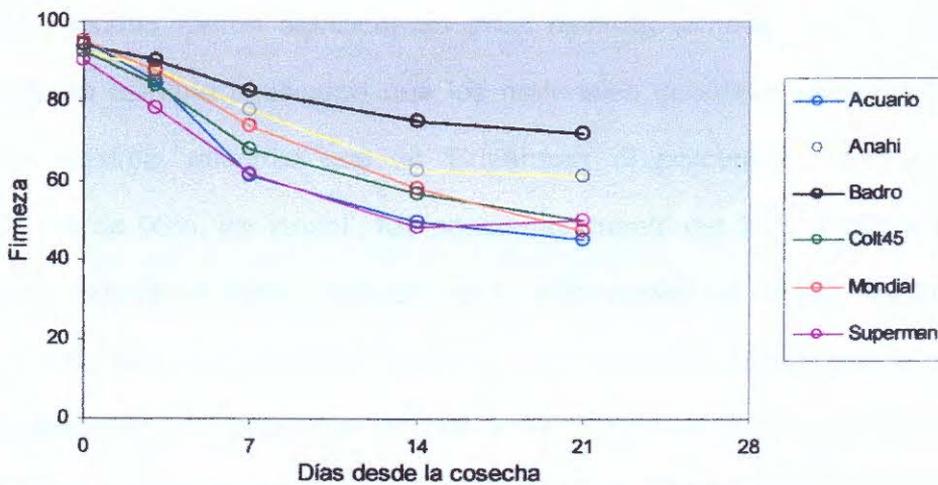


Figura 5. Intensidad de enfermedad en tomates 'Superman' durante 19 días de almacenamiento a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $86\pm 4\%$ de humedad relativa (el ajuste se hizo tomando en cuenta los datos de los frutos tratados y sin tratar con quitosano, ambos inoculados con *A. alternata*).

Evaluación de la firmeza de diferentes híbridos de tomate almacenados a 21°C

La interacción Híbridos x Días desde la cosecha resultó significativa ($p=0,0001$; $R^2=0,88$). En el día de la cosecha, 'Acuario' y 'Mondial' presentaron frutos de firmeza similar a 'Badro' y 'Superman', pero más firmes respecto a 'Colt45' y 'Anahi' (Figura 6). Los tomates 'Badro' se destacaron durante la postcosecha por su alta firmeza, si bien no difirieron de 'Anahi' a los 21 días. 'Anahi' fue más firme que 'Acuario', 'Colt45' y 'Superman', resultando 'Mondial' similar a ambos grupos. Los frutos 'Acuario' fueron muy firmes a la cosecha pero presentaron un rápido ablandamiento a 21°C. 'Badro' y 'Anahi' se destacaron por su menor ablandamiento durante los 21 días de postcosecha.



Híbridos	Días desde la cosecha			
	0	7	14	21
Acuario	91,7 A ¹	59,7 B	51,1 D	48,8 C
Anahi	88,4 BC	70,5 A	59,7 B	58,9 AB
Badro	91,1 AB	75,0 A	67,1 A	65,4 A
Colt45	87,2 C	62,0 B	53,1 CD	47,9 C
Mondial	91,7 A	70,4 A	57,4 BC	52,5 BC
Superman	88,7 ABC	63,1 B	51,9 CD	47,0 C
R ²	0,49	0,52	0,48	0,44

¹ Los promedios de una misma columna seguidos de la misma letra no difieren estadísticamente para Tukey al 5%.

Figura 6. Evolución de la firmeza de frutos de tomate de diferentes híbridos y comparación entre ellos a los 0, 7, 14 y 21 días de almacenamiento a $21,5 \pm 1^\circ\text{C}$ y $86,3 \pm 6\%$ de humedad relativa (todos con hasta un 10% de color rojo en superficie a la cosecha).

Susceptibilidad a *A. alternata* en tomates que difieren en su firmeza estructural

A los 5 y 6 días post-inoculación, sólo se pudo ver desarrollo de pudrición en el 25% de los frutos control inoculado con heridas. Este porcentaje aumentó a 70% en promedio en los tres híbridos a los 8 días y recién a los 12, la totalidad de los tomates en todos los híbridos mostraron síntomas de la enfermedad.

Para proporción de frutos enfermos (incidencia de enfermedad), el valor estimado de β_0 para 'Superman' no difirió significativamente del de 'Anahí' ($p=0,3727$), ni del de 'Badro' ($p=0,1848$). Tampoco hubo diferencias significativas entre el β_1 de 'Superman' y el de 'Anahí' ($p=0,4738$) y 'Badro' ($p=0,0864$). La diferencia entre 'Superman' y los otros dos híbridos fueron significativas para asíntota (ambos con $p<0,0001$). Las diferencias en asíntota implicaron que los materiales genéticos presentaron distinta incidencia máxima; mientras que en 'Superman' el porcentaje máximo de frutos enfermos fue de 90%, en 'Anahí', fue aproximadamente del 30% (Figuras 7 y 8). La proporción máxima de frutos afectada por la enfermedad en 'Anahí' resultó además menor a la de 'Badro' ($p=0,0090$) (Figura 9). Es importante aclarar que la proporción de frutos enfermos en 'Badro' fue del 44% a los 17 días de evaluación, pero que este valor no fue correspondiente al de la asíntota, ya que este híbrido no logró alcanzarla durante el período de estudio. La falta de diferencias en β_0 y β_1 , combinada con una marcada diferencia en asíntotas, explicó que los híbridos 'Anahí' y 'Badro' presentaran un atraso en la aparición de la enfermedad de casi 5 días y que 'Badro' mostrara una evolución más lenta. 'Superman' fue el híbrido con mayor incidencia a partir de los 12 días post-inoculación.

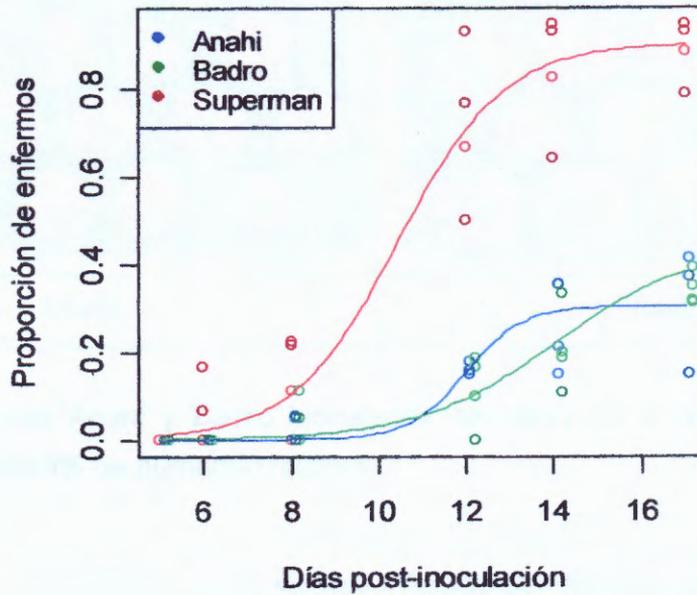


Figura 7. Proporción de frutos enfermos de los híbridos 'Anahi', 'Badro' y 'Superman', inoculados con *A. alternata*, durante el almacenamiento a $20,8\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $92\pm 8\%$ de humedad relativa.



Figura 8. Tomates 'Superman' inoculados (sin herir) con *A. alternata* a los 12 días a $20,8\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $92\pm 8\%$ de humedad relativa.

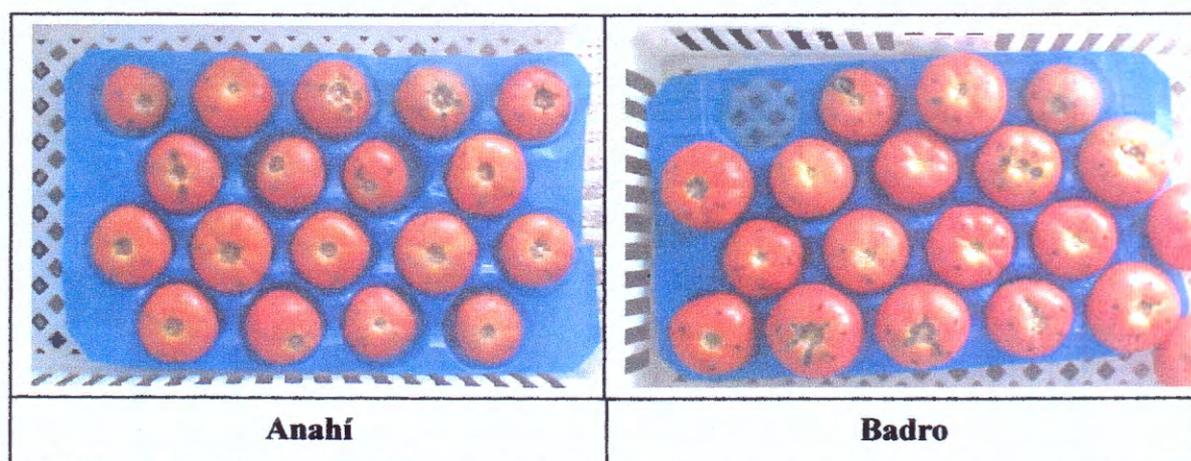


Figura 9. Tomates 'Anahí' y 'Badro' inoculados (sin herir) con *A. alternata* a los 12 días a $20,8 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 8\%$ de humedad relativa.

La falta de variabilidad en los valores iniciales del diámetro de lesión no permitió ajustar un modelo exponencial. Ello mismo se corroboró graficando el logaritmo del diámetro, que no mostró una respuesta lineal en el tiempo (Figura 10). En consecuencia, se estudió la distribución del diámetro de todos los tomates para cada híbrido en cada período post-inoculación evaluado. A los 5, 6 y 8 días post-inoculación, la frecuencia de valores de $-0,9$, resultado del cálculo del log (diámetro), fue cercana a 1 en todos los híbridos y correspondió a la gota de inóculo (0,4 cm). A partir de los 12 días, el diámetro creció en casi la totalidad de los tomates 'Superman' y en menor proporción, en frutos 'Badro' y 'Anahí'. En este último, el log (diámetro) ocasionalmente superó el valor de 0 cm (1 cm) durante los 17 días de estudio, mientras que a los 12 y 14 días, alrededor del 50% de los frutos 'Superman' y menos del 25% de los 'Badro', tomaron valores de log (diámetro) entre 0 y 0,7 (1 a 2 cm).

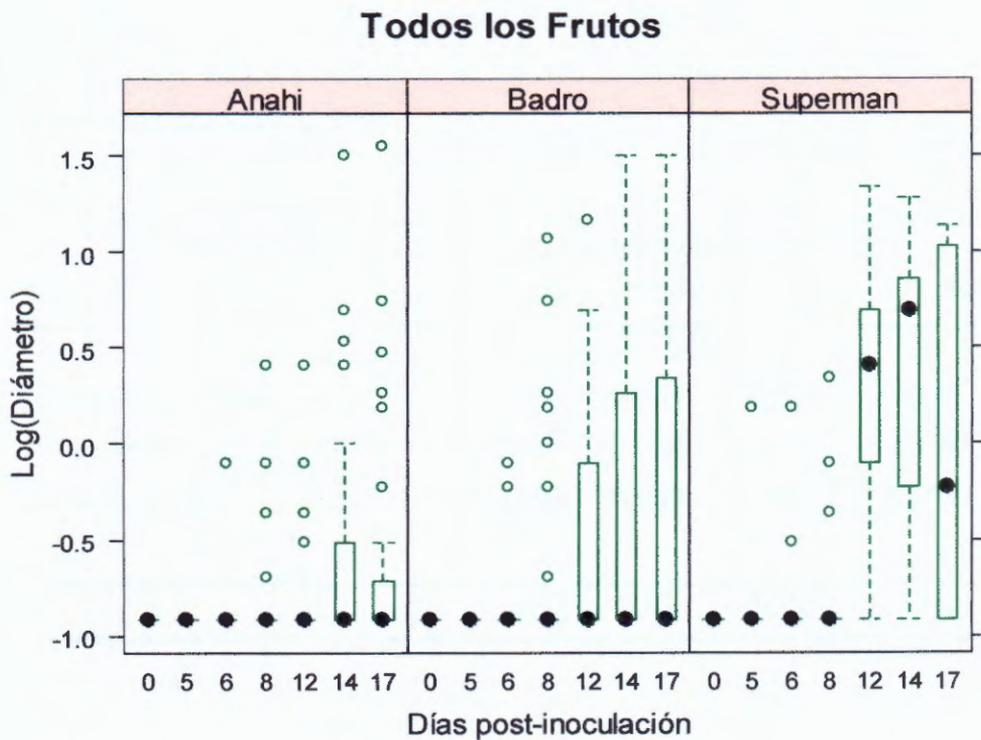


Figura 10. Diámetro (log) de la mancha o lesión (cm) en tomates sanos y enfermos de los híbridos 'Anahí', 'Badro' y 'Superman', inoculados con *A. alternata*, durante el almacenamiento a $20,8 \pm 0,6^\circ\text{C}$ y $92 \pm 8\%$ de humedad relativa.

También se analizó para cada híbrido, la proporción de frutos en los que el diámetro de la mancha o lesión superó el valor mínimo de 0,4 cm (Figura XX, Apéndice). Pudo observarse que la proporción de frutos en los que hubo evolución de la mancha fue mayor en 'Superman' respecto de 'Anahí' y 'Badro' (Cuadro 2). Como estos resultados están altamente influenciados por la incidencia de enfermedad, se analizó la distribución de los valores de diámetro sólo en los frutos enfermos. De esta manera, se pudo determinar que el tamaño de la lesión en los frutos enfermos 'Superman' tendió a ser mayor a partir del día 14 post-inoculación respecto de los restantes híbridos (Figura 11). En al menos el 50% de los frutos enfermos 'Anahí' y 'Badro', el log (diámetro) fue inferior a 0,4 (1,5 cm) a los 17 días post-inoculación, mientras que este valor fue superado por alrededor del 75% de los tomates 'Superman'.

Cuadro 2. Valor p de los contrastes realizados entre híbridos y R^2 del modelo para proporción de frutos sanos y enfermos en los que hubo crecimiento de la lesión a los 8, 12, 14 y 17 días post-inoculación.

Contrastes	Días post-inoculación			
	8	12	14	17
	Valor p			
Superman - Anahí	0,563	0,031	0,015	0,015
Superman - Badro	0,750	0,024	0,013	0,015
Anahí - Badro	0,750	0,909	0,990	0,551
	R^2			
	0,31	0,82	0,86	0,86

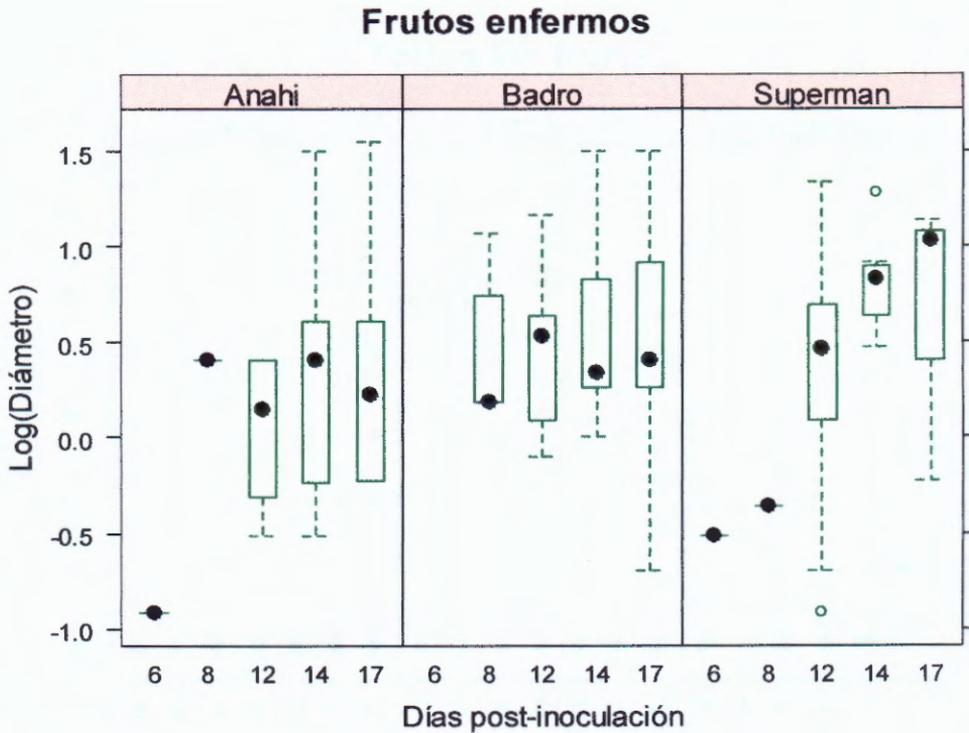


Figura 11. Diámetro (log) de lesión (cm) en tomates enfermos de los híbridos 'Anahí', 'Badro' y 'Superman', inoculados con *A. alternata*, durante el almacenamiento a $20,8 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 8\%$ de humedad relativa.

Al igual que con el diámetro, la alta frecuencia de datos de intensidad igual a 0, correspondiente a frutos sanos y la baja variabilidad hasta los 12 días post-inoculación, no permitió modelar esta variable. Un análisis descriptivo de la distribución de los datos posibilitó determinar que la intensidad de la enfermedad en 'Superman' aumentó considerablemente a partir de los 12 días post-inoculación, mientras que en 'Anahí' y 'Badro', los valores superiores a 0 ocurrieron sólo en frutos que se escaparon del comportamiento de la muestra (outliers) (Figura 12). Si se considera que la intensidad puede alcanzar un valor máximo de 50 y los valores se relativizan a porcentajes, alrededor del 25% de los frutos 'Superman' presentaron una intensidad de enfermedad del 30 al 50% a los 14 días, mientras que esta misma proporción de frutos superó a los 17 días el 50% de intensidad y llegó a un máximo de alrededor del 80%.

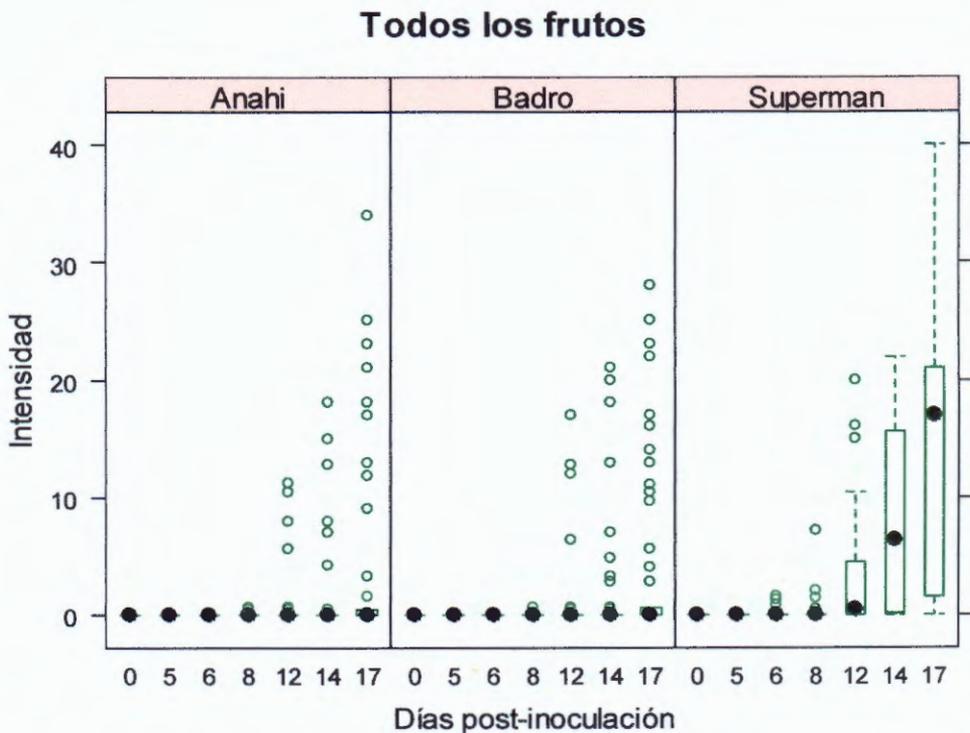


Figura 12. Intensidad de enfermedad en tomates de los híbridos 'Anahí', 'Badro' y 'Superman', inoculados con *A. alternata*, durante el almacenamiento a $20,8 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 8\%$ de humedad relativa.

La falta de convergencia impidió ajustar un modelo exponencial para severidad de la enfermedad. Al igual que para intensidad, un análisis de la distribución de los datos mostró un incremento de la severidad en todos los híbridos a partir del día 12 post-inoculación. Hasta el día 14, la severidad fue inferior a 10 (corresponde a una severidad del 20% si se relativiza al máximo valor alcanzable) en al menos el 50% de los frutos de todos los híbridos probados (Figura 13). A los 17 días, el 50% de los valores de severidad fueron superiores a 20 (severidad del 40%) en 'Superman', mientras que en 'Badro' y 'Anahí' menos del 25% de los tomates presentaron severidades superiores a 20. No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre los híbridos cuando se comparó la severidad promedio a los 12 ($p=0,2612$), 14 ($p=0,5514$) y 17 días post-inoculación ($p=0,1406$).

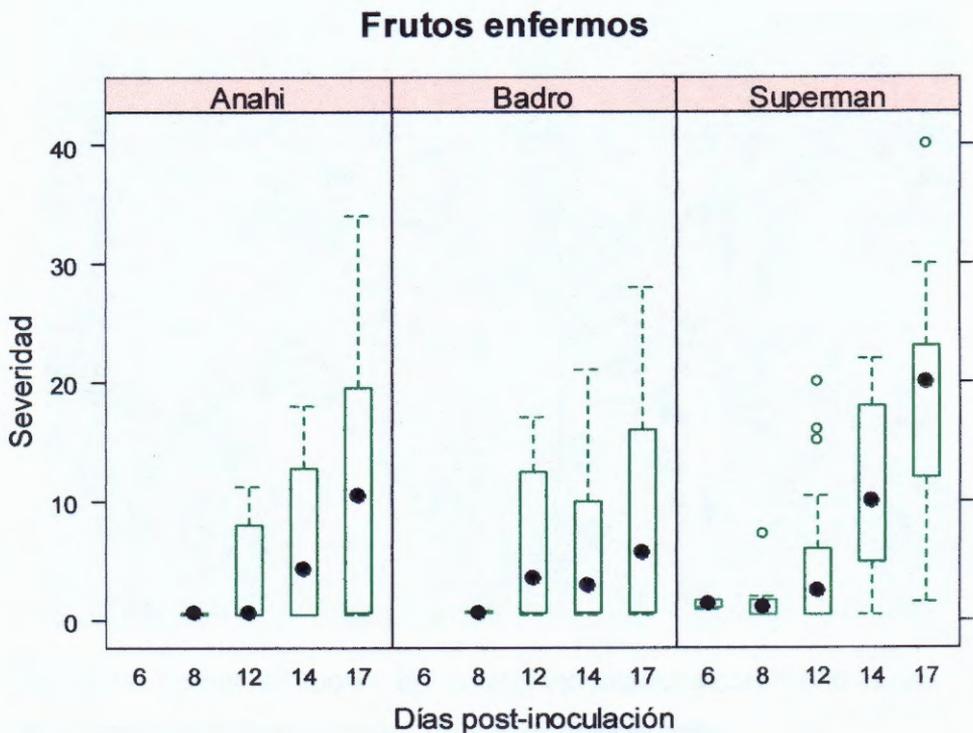


Figura 13. Severidad de enfermedad en tomates de los híbridos 'Anahí', 'Badro' y 'Superman', inoculados con *A. alternata*, durante el almacenamiento a $20,8\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $92\pm 8\%$ de humedad relativa.

Uso de erradicantes clorados

En un cultivar de baja firmeza En el primer día de registro (5 días post-desinfección), el 95% de los tomates control inoculados sobre heridas manifestaron síntomas de podredumbre negra, en al menos tres de los cuatro sitios con inóculo (Figura 14). Los frutos considerados control agua, desarrollaron la enfermedad en un sólo fruto de un sólo bloque a los 6 y 7 días, presentando a los 10 días post-desinfección, una incidencia similar a la de los tratamientos en el día 5 (alrededor del 13%). Con similar período de retraso, el control agua sin inóculo logró una proporción máxima de frutos enfermos que no fue distinta a la de los con inoculación del patógeno.



Figura 14. Tomates 'Superman' control inoculados sobre heridas con síntomas de podredumbre negra a los 5 días post-desinfección

En incidencia de enfermedad no se encontraron diferencias significativas en β_0 ni β_1 entre el control lavado con agua e hipoclorito ($0,2636 < p < 0,9112$) y trocloseno ($0,0750 < p < 0,6054$). La asíntota del control lavado con agua no fue diferente a la de

trocloseno ($p=0,2205$), pero difirió de la del hipoclorito ($p=0,0376$). La falta de diferencias en β_0 y β_1 indicaron que la proporción de frutos enfermos a los 5 días y su evolución posterior fue similar en todos los tratamientos, pero las diferencias en asintota implicaron una distinta pudrición máxima alcanzada (Figura 15). A los 17 días desde la desinfección, el control lavado con agua y trocloseno alcanzaron un nivel de frutos enfermos del 93 y 88%, respectivamente, mientras que en el hipoclorito fue del 84%.

Al no haber diferencias significativas entre los tratamientos en los parámetros β_0 y β_1 para incidencia de enfermedad, tampoco las hubo cuando se compararon los β_0 ($p=0,4917$) y β_1 ($p=0,7020$) del tratamiento con trocloseno de sodio respecto a los del hipoclorito de sodio. Para asintota, no se encontraron diferencias significativas entre las dos fuentes de cloro ($p=0,3876$), implicando que ambas presentaron similar proporción máxima de frutos enfermos.

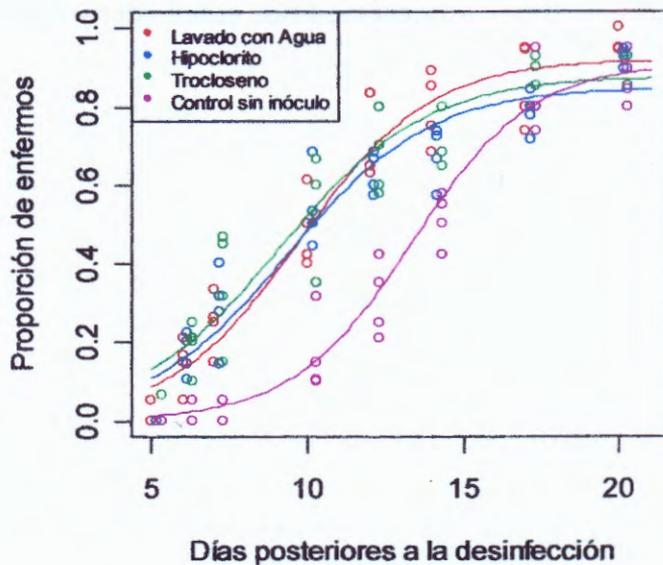


Figura 15. Proporción de frutos enfermos en tomates inoculados y lavados con agua, desinfectados con hipoclorito o trocloseno de sodio y en el control agua sin inóculo, almacenados a $21,9 \pm 1^\circ\text{C}$ y $90,8 \pm 3\%$ de humedad relativa.

Las diferencias en el diámetro de lesión resultaron significativas para β_0 y β_1 entre el control lavado con agua e hipoclorito ($p=0,0311$ y $p=0,018$, respectivamente), pero no lo fueron respecto del trocloseno de sodio ($p=0,8837$ y $p=0,8463$, respectivamente). La diferencia en β_0 implicó un retraso en el crecimiento de la lesión en el hipoclorito respecto del control lavado con agua, ya que los valores del diámetro para el día 5 post-desinfección fueron de 0,40 y 0,56 cm, respectivamente (Figura 16). Para β_1 significó que el diámetro de la lesión presentara un mayor ritmo de crecimiento en el hipoclorito respecto al control lavado con agua. El trocloseno de sodio tuvo similar tamaño de lesión a los 5 días y posteriormente, que el control lavado con agua.

Al comparar el diámetro de la mancha o lesión de las dos formulaciones de cloro probadas, las diferencias resultaron significativas para β_0 ($p=0,0242$) y β_1 ($p=0,0137$). El trocloseno de sodio desarrolló mayor diámetro de mancha respecto al hipoclorito de sodio a los 5 días de desinfección, pero el crecimiento de la mancha resultó significativamente menor en los frutos con trocloseno.

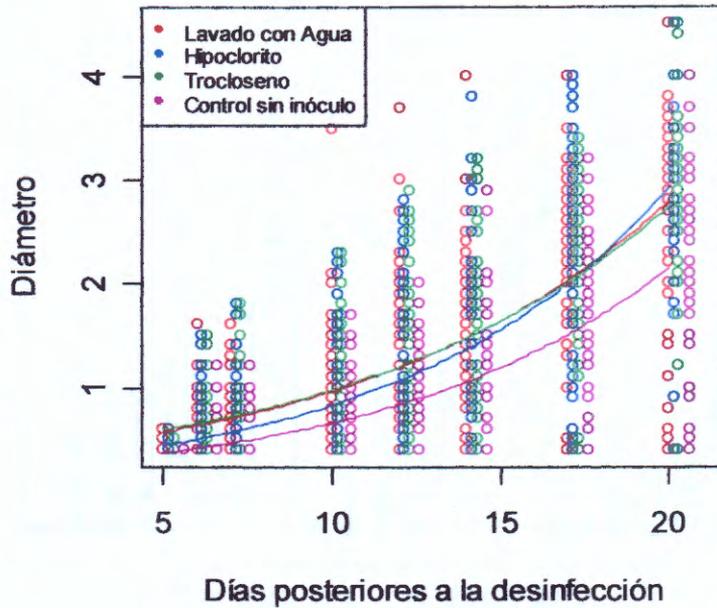


Figura 16. Diámetro de la mancha o lesión (cm) en tomates inoculados y lavados con agua, desinfectados con hipoclorito o troclosenato de sodio y en el control agua sin inóculo, almacenados a $21,9 \pm 1^\circ\text{C}$ y $90,8 \pm 3\%$ de humedad relativa.

Sólo algunos frutos aislados del comportamiento del grupo (outliers), tuvieron una intensidad distinta de 0 a los días 5 y 6 post-desinfección (Figura 17). Posteriormente, los valores registrados de intensidad aumentaron, pero las observaciones presentaron un patrón de crecimiento con asíntota, con lo cual no fue posible ajustar un modelo exponencial. En su reemplazo y habiendo comprobado previamente la homogeneidad de varianzas entre los tratamientos, se decidió determinar si la diferencia entre los mismos a los 14, 17 y 20 días post-desinfección fue significativa, mediante un análisis Anova. Ninguno de los contrastes realizados entre el control lavado con agua y cada desinfectante resultó significativo ($0,3383 < p < 0,4902$). Tampoco hubo diferencias en la intensidad de la enfermedad para dichos períodos de almacenamiento, cuando se compararon las dos formulaciones de cloro ($0,2112 < p < 0,4140$).

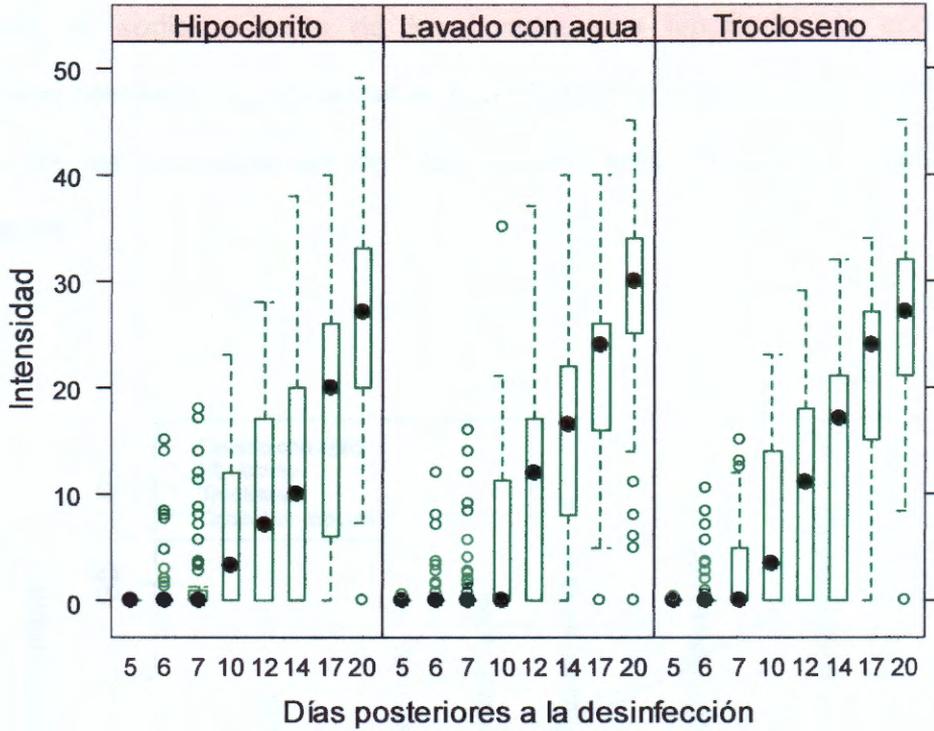


Figura 17. Intensidad de la enfermedad en tomates inoculados y lavados con agua, desinfectados con hipoclorito o troclosenato de sodio y en el control agua sin inóculo, almacenados a 21,9 ± 1°C y 90,8 ± 3% de humedad relativa.

Para severidad de la enfermedad, no se encontraron diferencias significativas para β_0 entre el control lavado con agua y el hipoclorito ($p=0,1119$) o troclosenato ($p=0,8188$). Las diferencias en β_1 entre el control lavado con agua y el hipoclorito fueron significativas ($p=0,0451$), pero no lo fueron respecto del troclosenato ($p=0,8493$). La similitud en β_0 implicó una similar severidad de la enfermedad a los 5 días posteriores al tratamiento (Figura 18). El mayor β_1 en hipoclorito significó un aumento más rápido de la severidad en los tomates desinfectados con esta alternativa respecto al control lavado con agua. El troclosenato se comportó de similar manera al control lavado con agua.

Cuando se contrastó la severidad de la enfermedad en los frutos desinfectados con troclosenol de sodio respecto de los lavados con hipoclorito de sodio, no se encontraron diferencias significativas en β_0 ($p=0,0764$) y β_1 ($p=0,0794$). Ello implicó que ninguna de las formulaciones de cloro resultó más eficaz en el control de la enfermedad.

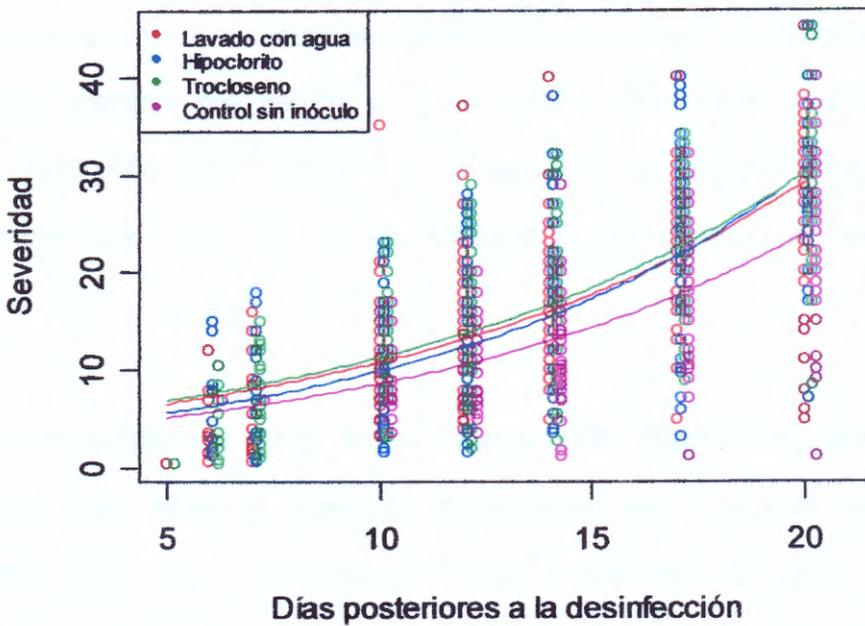


Figura 18. Severidad de la enfermedad en tomates inoculados y lavados con agua, desinfectados con hipoclorito o troclosenol de sodio y en el control agua sin inóculo, almacenados a $21,9 \pm 1^\circ\text{C}$ y $90,8 \pm 3\%$ de humedad relativa.

En cultivares de diferente firmeza estructural En los tomates control inoculados con heridas se observaron síntomas de la enfermedad en el primer día de registro (3 días post-inoculación). Los frutos control sin inóculo del híbrido 'Superman' comenzaron a desarrollar la enfermedad aproximadamente a los 14 días post-desinfección (17 días desde la cosecha), alcanzando una incidencia cercana al 60% a los 22 días post-desinfección. En 'Nixel', este control presentó síntomas de

enfermedad a los 16 días post-desinfección, mientras que menos del 5% de los frutos estuvieron afectados por el patógeno

Para describir la evolución de la proporción de enfermos se probó un modelo con efecto de interacción tratamientos x híbridos para cada uno de los parámetros. En los modelos no lineales mixtos la interacción no puede probarse en forma global, sino en una partición de contrastes ortogonales de un grado de libertad. De esta manera, para β_0 al menos uno de los contrastes de interacción resultó significativo ($p_1 < 0,0001$ y $p_2 = 0,5814$), mientras que ambos lo fueron para β_1 ($p_1 = 0,0004$ y $p_2 = 0,0106$) y para asíntota ($p_1 < 0,0001$ y $p_2 = 0,0003$). Por consiguiente, se comparó la diferencia entre tratamientos para cada uno de los parámetros del modelo en cada híbrido en particular.

Cuando se analizó el efecto de los desinfectantes respecto al tratamiento control lavado con agua sobre la proporción de enfermos en 'Superman', este no resultó significativo en β_0 para hipoclorito ($p = 0.0675$) y trocloseno de sodio ($p = 0.0804$). El hipoclorito difirió del control lavado con agua en β_1 ($p = 0.0053$), pero no así el trocloseno ($p = 0.4481$). Lo mismo ocurrió para asíntota, parámetro en el que el hipoclorito resultó diferente al lavado con agua ($p = 0.0050$), pero no lo fue el trocloseno ($p = 0.6765$). La falta de diferencias en β_0 implicó una incidencia de enfermedad similar a los 12 días post-desinfección en todos los tratamientos. Teniendo similares valores de β_0 , la menor asíntota en el hipoclorito respecto del control lavado con agua implicó que el incremento de la proporción de enfermos asociado al parámetro β_1 , fuera mayor en este desinfectante. En 'Superman', el control lavado con agua y el trocloseno de sodio presentaron un máximo de 99 y 97% de frutos con podredumbre negra, mientras que el hipoclorito alcanzó 82% (Figura 19).

Cuando se comparó la efectividad de las dos fuentes de cloro probadas sobre la proporción de enfermos de tomates 'Superman', no se detectaron diferencias significativas para β_0 ($p=0.9425$), pero si para β_1 ($p=0.0008$) y asíntota ($p=0.0022$). Ello significó un similar comportamiento hasta los 12 días posteriores a la desinfección, un mayor aumento diario de la enfermedad y menor pudrición máxima en el hipoclorito respecto al trocloseneno de sodio.

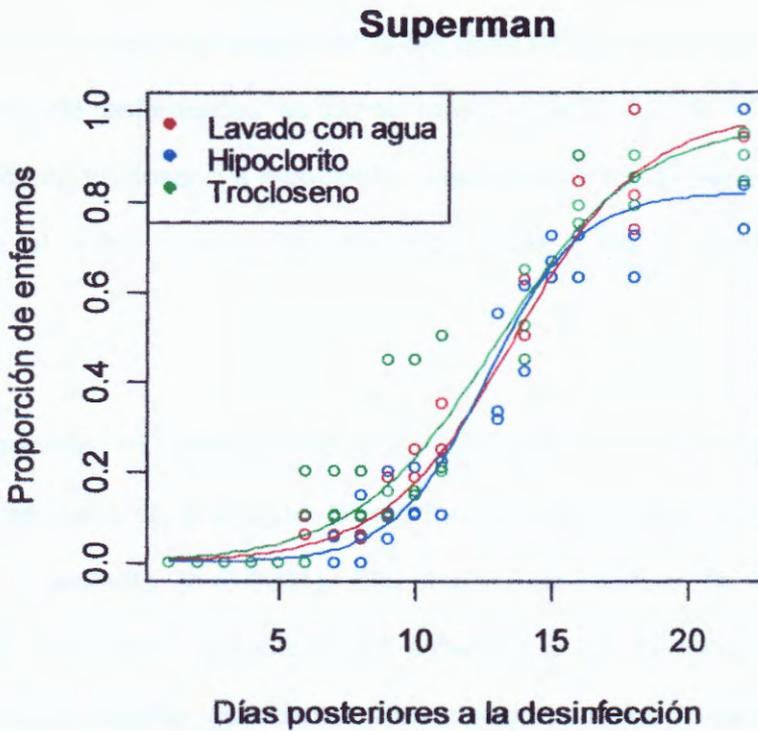


Figura 19. Proporción de frutos enfermos en tomates 'Superman', inoculados y lavados con agua, desinfectados con hipoclorito o trocloseneno de sodio, durante el almacenamiento a $19.6 \pm 0.6^\circ\text{C}$ y $98.5 \pm 2\%$ de humedad relativa.

En 'Nixel', las diferencias en β_0 entre el control lavado con agua e hipoclorito no fueron significativas ($p=0.8060$), pero si lo fueron con respecto al trocloseneno de sodio ($p<0.0001$). Tanto el hipoclorito como el trocloseneno de sodio fueron diferentes del control lavado con agua para β_1 ($p \leq 0.0003$) y para asíntota ($p<0.0001$). Los resultados para β_0 implicaron que la incidencia de enfermos a los 12 días post-desinfección fuera

similar en el hipoclorito y mayor en el trocloseno, respecto al control lavado con agua. Las diferencias en β_1 significaron una evolución más rápida de la enfermedad tanto en el hipoclorito de sodio como en el trocloseno respecto al control lavado con agua. No obstante, las diferencias en asíntota indicaron que los niveles máximos de pudrición alcanzados en ambos tratamientos con cloro fueron significativamente menores respecto al control lavado con agua. El hipoclorito de sodio redujo la incidencia de la enfermedad a 44%, el trocloseno de sodio alcanzó alrededor del 55%, mientras que el control lavado con agua presentó cerca del 90% de frutos con pudrición (Figura 20). Estos niveles de enfermedad se presentaron a partir de los 14 y 16 días en los tratamientos con trocloseno e hipoclorito, respectivamente. El control lavado con agua no alcanzó el valor máximo de incidencia, aún a los 22 días posteriores a la desinfección.

Las diferencias en incidencia de la enfermedad entre el hipoclorito de sodio y el trocloseno de sodio en el híbrido 'Nixel', fueron significativas para β_0 ($p < 0,0001$), β_1 ($p < 0,0001$) y asíntota ($p < 0,0001$). Ello implicó un retraso en la aparición de la enfermedad, una menor proporción de enfermos a los 12 días post-desinfección y menor incidencia máxima, cuando se utilizó hipoclorito respecto de trocloseno.

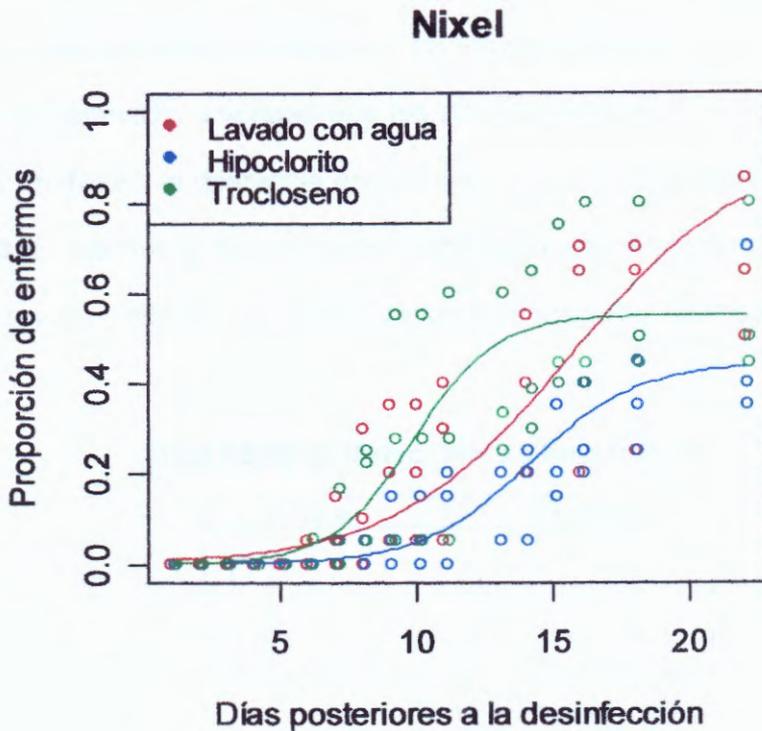


Figura 20. Proporción de frutos enfermos en tomates 'Nixel', inoculados y lavados con agua, desinfectados con hipoclorito o troclosenato de sodio, durante el almacenamiento a $19,6 \pm 1^\circ\text{C}$ y $98,5 \pm 2\%$ de humedad relativa.

Como las proporciones de enfermos se mantuvieron constantes y en cero durante los primeros 5 días, los modelos logísticos ajustaron sobreestimando los valores iniciales. Por ello se decidió analizar también la variable 'Días hasta la detección de la enfermedad', realizando en primer término un diagrama de cajas (Figura 21). Como pareció haber un comportamiento diferente de los tratamientos según el cultivar, se analizó la interacción Tratamientos x Híbridos que resultó significativa ($p=0,0086$). Mientras que en 'Superman' no hubo diferencias entre los tratamientos ($p=0,3218$), si las hubo para 'Nixel' ($p=0,0001$). Al no haber diferencias entre los tratamientos en el híbrido 'Superman', implicando un similar comportamiento de las dos fuentes de cloro probadas. En 'Nixel', el número de días hasta la detección de la enfermedad en el control lavado con agua no difirió del hipoclorito ($p=0,0874$), pero si del troclosenato ($p=0,0046$). La enfermedad fue observada en los frutos del híbrido 'Superman' a los 14

días en promedio en todos los tratamientos. En 'Nixel', los tomates control lavado con agua e hipoclorito mostraron síntomas y signos de podredumbre negra entre los 14 y los 16 días en promedio, mientras que los desinfectados con trocloseno lo hicieron a los 11 días. En 'Nixel', la diferencia en el número promedio de días en que apareció la enfermedad en los frutos desinfectados con hipoclorito respecto de los tratados con trocloseno, fue significativa ($p < 0,0001$), resultando mayor el valor para hipoclorito.

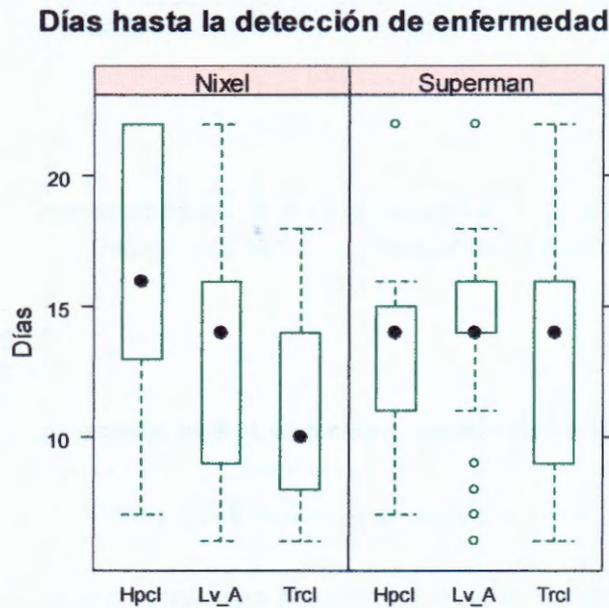


Figura 21. Días post-desinfección en que se detectó la enfermedad en tomates de los tratamientos hipoclorito, control lavado con agua y trocloseno de sodio, de los híbridos 'Nixel' y 'Superman'. Los frutos fueron inoculados con *A. alternata*, tratados y almacenados a $19,6 \pm 1^\circ\text{C}$ y $98,5 \pm 2\%$ de humedad relativa.

El diámetro de la lesión creció sólo ocasionalmente hasta el día 22 post-desinfección. Como se propuso ajustar un modelo exponencial para el diámetro, se graficó el logaritmo, que no mostró una respuesta lineal en el tiempo (Figura 22). Aún a escala logarítmica, el diámetro evolucionó sólo en frutos considerados como outliers, con excepciones en los últimos días de evaluación. En consecuencia, el enfoque utilizado para el estudio del diámetro en otros ensayos no pudo ser aplicado, ya que la

falta de variabilidad durante prácticamente todo el período de análisis, no permitió ajustar un modelo exponencial.

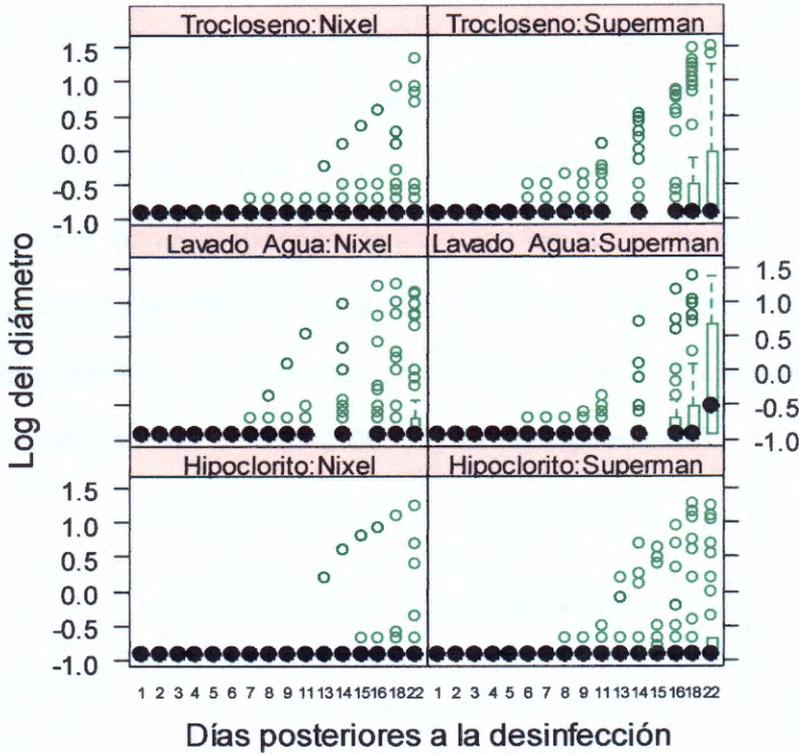


Figura 22. Diámetro (log) de la mancha o lesión (cm) de tomates sanos y enfermos, de los tratamientos trocloseno de sodio, control lavado con agua e hipoclorito, de los híbridos 'Nixel' y 'Superman'. Los frutos fueron inoculados con *A. alternata*, tratados y a $19,6 \pm 1^\circ\text{C}$ y $98,5 \pm 2\%$ de humedad relativa.

Sin embargo, la variabilidad observada en el logaritmo del diámetro de la lesión (Figura 22) sugirió la existencia de diferencias al menos en las últimas evaluaciones. Por ello, se decidió estudiar la evolución de la proporción de tomates en los que hubo un aumento del diámetro de la lesión, graficando el promedio de cada bloque para cada combinación de tratamiento e híbrido (Figura 23). El nivel de significancia estadística para las fuentes de variación tratamientos, híbridos e interacción tratamientos*híbridos, se calculó mediante un análisis Anova para los días 10, 14, 18 y

22 (Cuadro 3). Si bien en algunas combinaciones de tratamiento e híbrido hubo frutos con lesiones superiores a 0,4 cm, los porcentajes no resultaron significativamente diferentes a los 10 y 14 días. A los 18 y 22 días, hubo diferencias entre tratamientos y entre híbridos. En ambos períodos post-desinfección, la proporción de tomates del control lavado con agua en los que había crecido la lesión, fue similar a la del trocloseneno ($p=0,2085$ para el día 18 y $p=0,0721$, para el día 22), pero resultó mayor que la del hipoclorito ($p=0,0008$ para el día 18 y $p=0,0061$, para el día 22). El hipoclorito presentó menor proporción de frutos en los que el diámetro superó el valor de 0,4cm respecto al trocloseneno a los 18 días ($p=0,0090$), pero fue similar a los 22 días ($p=0,2015$). El porcentaje de frutos con crecimiento de la lesión fue menor en 'Nixel' respecto de 'Superman', a los 18 ($p=0,0005$) y 22 días ($p=0,0069$).

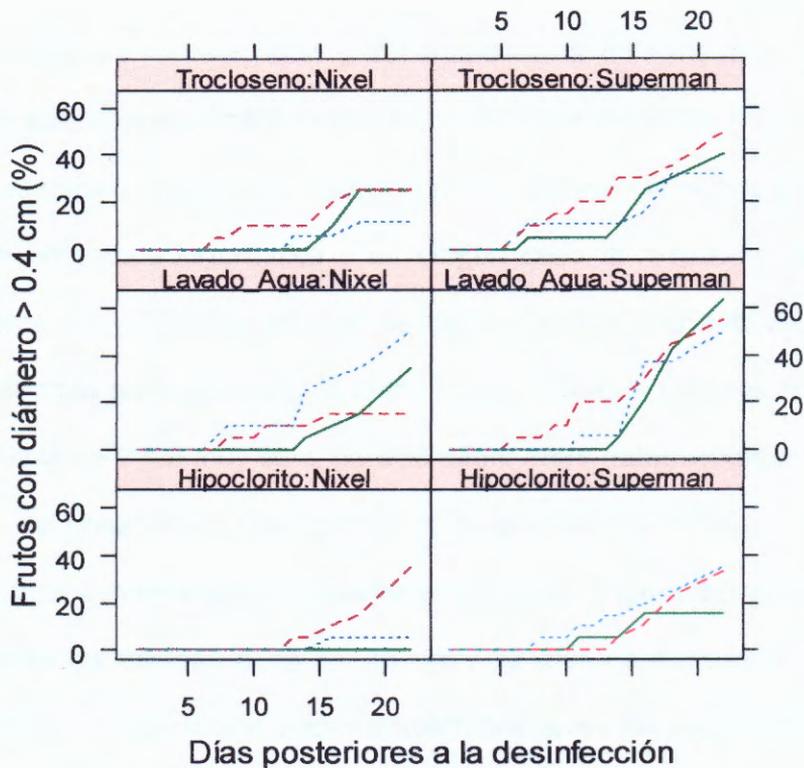


Figura 23. Porcentaje de frutos 'Nixel' y 'Superman', inoculados y lavados con agua, desinfectados con hipoclorito o trocloseneno de sodio, en los que el diámetro de lesión (cm) fue superior a 0.4 cm. Los tomates fueron almacenados a $19,6 \pm 1^\circ\text{C}$ y $98,5 \pm 2\%$ de humedad relativa.

Cuadro 3. Valores p de cada fuente de variación y R^2 del modelo para la proporción de frutos en los que el diámetro superó el valor de 0,4 cm, a los 10, 14, 18 y 22 días post-desinfección.

Fuente de Variación	Días post-desinfección			
	10	14	18	22
	Valor p			
Bloque				
Tratamiento	0,0667	0,2314	0,0049	0,0349
Híbrido	0,2358	0,1381	0,0012	0,0131
Tratamiento*Híbrido	0,2035	0,2296	0,6304	0,8733
	R^2	0,66	0,60	0,81
			0,66	

Quando se estudió la intensidad y severidad de la enfermedad, nuevamente se encontró que sólo algunos frutos presentaron un valor diferente a 0 durante todo el período de evaluación. Como se propuso modelar exponencialmente ambas variables, se graficaron en escala logarítmica y en ningún caso la respuesta fue lineal en el tiempo (Figuras 24 y 25), con lo cual se decidió seguir una estructura de análisis similar a la utilizada para diámetro. Si bien, la proporción de tomates con intensidad y severidad distinta de 0 fue muy baja, pareció diferir entre tratamientos e híbridos en los últimos días de observación. Se graficó la proporción de frutos con lesiones con pudrición en cada combinación de tratamiento e híbrido (Figura 26) y se analizaron las diferencias entre las mismas a los 14, 16, 18 y 22 días posteriores a la desinfección mediante Anova. La interacción tratamientos*híbridos no fue significativa en ninguno de los períodos evaluados ($p > 0,1417$) y tampoco lo fueron los tratamientos ($p > 0,2420$) (Cuadro 4). La proporción de frutos con pudrición entre los cultivares híbridos fue similar a los 14 días ($p = 0,0588$), pero no lo fue a los 16, 18 y 22 días post-desinfección ($0,0225 > p > 0,0155$). Cuando hubo diferencias entre los híbridos, 'Nixel' presentó menor proporción de frutos con pudrición respecto a 'Superman'.

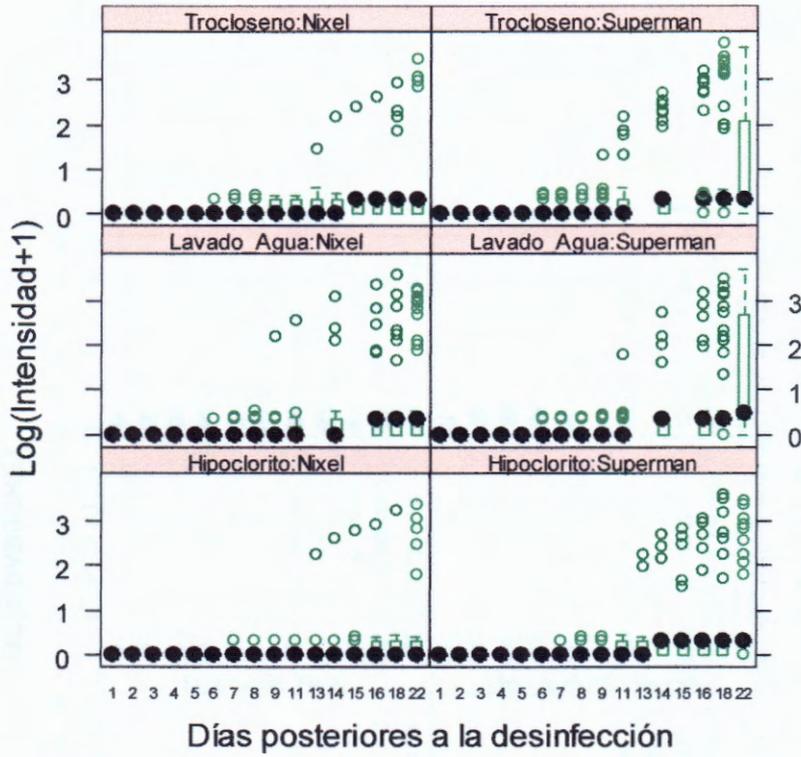


Figura 24. Intensidad (log) de la enfermedad en los tratamientos trocloseno de sodio, control lavado con agua e hipoclorito, de los híbridos 'Nixel' y 'Superman'. Los frutos fueron inoculados con *A. alternata*, tratados y almacenados a $19,6 \pm 1^\circ\text{C}$ y $98,5 \pm 2\%$ de humedad relativa.

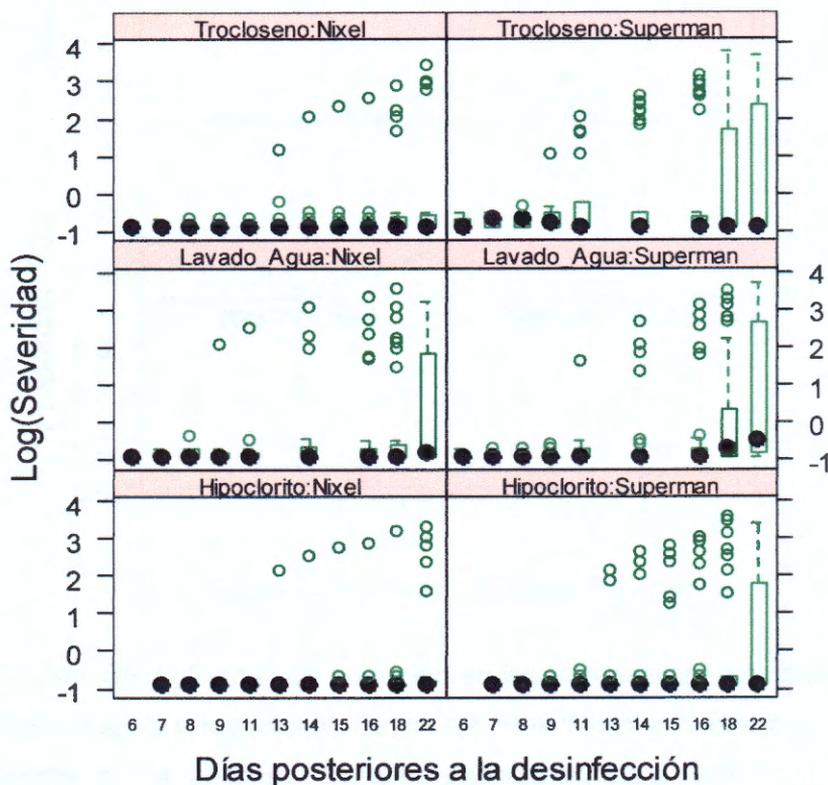


Figura 25. Severidad (log) de la enfermedad en los tratamientos trocloseno de sodio, control lavado con agua e hipoclorito, de los híbridos 'Nixel' y 'Superman'. Los frutos fueron inoculados con *A. alternata*, tratados y almacenados a $19,6 \pm 1^\circ\text{C}$ y $98,5 \pm 2\%$ de humedad relativa.

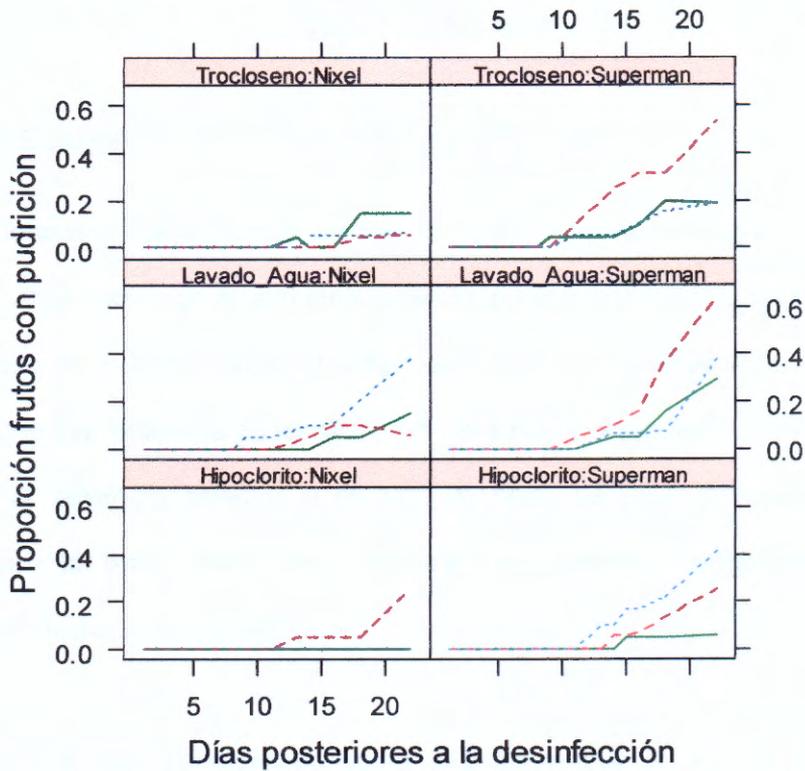


Figura 26. Proporción de frutos con pudrición en los tratamientos troclosenol de sodio, control lavado con agua e hipoclorito, de los híbridos 'Nixel' y 'Superman'. Los frutos fueron inoculados con *A. alternata*, tratados y almacenados a $19,6\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $98,5\pm 2\%$ de humedad relativa.

Cuadro 4. Valor p de las fuentes de variación y R^2 del modelo para proporción de frutos con pudrición a los 14, 16, 18 y 22 días post-desinfección.

Fuentes de variación	Días post-desinfección				
	14	16	18	22	
	Valor p				
Bloques					
Tratamientos	0,5304	0,4772	0,2397	0,2420	
Híbridos	0,0588	0,0155	0,0225	0,0172	
Tratamientos x Híbridos	0,4249	0,1417	0,8479	0,8912	
	R^2	0,56	0,66	0,56	0,60

DISCUSIÓN

Aplicación de oligosacarinas de quitosano en pre-cosecha

El rápido desarrollo de síntomas en los controles inoculados sobre heridas confirmó que el experimento contó con el ambiente adecuado para el desarrollo de la podredumbre negra. El retraso en la aparición de la enfermedad en los controles agua, aseguraron en gran medida que los síntomas observados en los sitios inoculados fueron originados por las cepas de *A. alternata* selectas y de esta manera, permitió comparar el efecto del quitosano sobre la enfermedad ante similares condiciones del patógeno (genotipo, cantidad y edad de esporas del patógeno).

El quitosano ha sido considerado como una alternativa al uso de fungicidas para controlar enfermedades de postcosecha (El Ghaouth et al, 1997). La mayor parte de los estudios comprenden aplicaciones luego de la cosecha, siendo escasos los antecedentes del uso en precosecha (Reddy et al, 2000b; Romanazzi et al, 2002, 2003). En este trabajo de tesis, se determinó menor incidencia de podredumbre negra a los 5 y 6 días en los frutos tratados con quitosano en precosecha respecto de los provenientes de plantas sin tratar. Una vez vencidas las barreras ofrecidas por el fruto tratado con este producto, el patógeno ingresó a los tejidos y hubo desarrollo de síntomas. Tanto en los frutos tratados como en los controles sin tratar, la enfermedad se manifestó inicialmente como una mancha necrótica que derivó en una pudrición durante el almacenamiento a 20°C.

Otros estudios coinciden con una demora en la aparición de la enfermedad causada por *A. alternata* en frutos de tomate tratados con quitosano (Reddy et al, 2000a). Estos autores demostraron que este compuesto activa los mecanismos de defensa del fruto, al detectar un aumento de risitina en tomates tratados. Romanazzi et al (2002) mencionaron

que encontraron mayor actividad de la fenilalanin amonio-liasa (PAL) en la piel de uvas tratadas con quitosano. Esta enzima está involucrada en la síntesis de compuestos fenólicos, muchos con actividad antifúngica. Además, el quitosano actúa sobre los factores de patogenicidad del hongo, disminuyendo la concentración de ácidos orgánicos y enzimas degradativas de la pared celular en los frutos tratados (Reddy et al, 2000a).

El quitosano tiene la particularidad de formar una película semipermeable, lo que incrementa la defensa estructural del fruto (Averbach, 1978, citado por Wong et al, 1992). Se ha demostrado que el film se forma con dosis de 1% (Wong et al, 1992). Fornes et al (2005) determinaron la presencia de estomas sin recubrir por la película de quitosano en la piel de frutos de mandarina cuando se aplicó al 0.0125%. De esta manera, el proceso de infección pudo verse impedido temporalmente por una mayor barrera al ingreso, aún cuando la dosis fue de 0,001%, prolongando el período de incubación en algunos frutos de tomate tratados con quitosano.

El quitosano tuvo un efecto significativo sobre la incidencia de podredumbres sólo detectable a los 5 y 6 días post-inoculación. Posteriormente, tuvo un resultado no deseado, ya que la cantidad de frutos enfermos durante la permanencia a 20°C aumentó más rápidamente respecto al control sin tratar. Sin embargo, algunos antecedentes demuestran una alta efectividad dada por el quitosano aplicado antes de la cosecha. Dosis de 0.2 a 0.6% de quitosano controlaron podredumbres causadas por *Botrytis cinerea* en frutillas, reduciendo en alrededor del 50% la incidencia respecto al testigo (Reddy et al, 2000b). En uvas, aplicaciones de 0.1 a 1% de quitosano en precosecha redujeron el índice de infección de *Botrytis cinerea* de similar manera que el procimidone (Romanazzi et al, 2002). En general, las concentraciones de quitosano utilizadas en la bibliografía son de al menos 0.1%, 100 veces mayor a la aplicada en el presente trabajo

de tesis. La dosis utilizada corresponde a la sugerida por el fabricante y crea, de todas maneras, cierta expectativa dada la respuesta causada con la misma y en una sola aplicación.

Por otro lado, es necesario considerar que los resultados obtenidos están referidos al producto utilizado OS-Sterling-I (Gofar Agro Specialties, Beijing, China), no pudiendo generalizar los mismos a otros productos formulados a base de quitosano o al ingrediente activo puro. El OS-Sterling-I ha sido aprobado por ICAMA (China) para su uso como fungicida en el 2003 y está indicado para producciones orgánicas.

Los cultivares de tomate con menor firmeza como 'Superman' podrían resultar más sensibles a las podredumbres. Si el cultivar tiene una marcada susceptibilidad, la respuesta ante la aplicación de diferentes estrategias de control puede ser escasa o nula. En 'Superman', el efecto del quitosano estuvo limitado sólo a una leve demora en la aparición de la enfermedad, pero esta respuesta podría ser más importante si esta estrategia de control fuera combinada con un cultivar resistente.

En general las enfermedades que afectan los frutos en postcosecha son estudiadas mediante la incidencia y severidad luego de transcurrido un determinado período de conservación. En estudios relacionados con el uso de quitosano, sólo se han hecho observaciones repetidas en el tiempo para evaluar la evolución de *Botrytis cinerea* en frutillas (Reddy et al, 2000b) y de *Alternaria alternata* en tomates (Reddy et al, 2000a). En este trabajo de tesis se ajustaron modelos descriptivos para incidencia, diámetro de la lesión, intensidad y severidad de la podredumbre negra del tomate, constituyendo un aporte al conocimiento de la enfermedad. El modelado permite estimar la evolución del desarrollo de la podredumbre negra y establecer el período durante el cual el riesgo de

podriciones podría ser nulo o alcanzar un nivel prefijado como máximo admisible cuando se ha utilizado alguna estrategia de control.

No obstante, para la transferencia y la adopción de los resultados obtenidos es necesario contar con una validación. En este estudio se utilizó una elevada carga de esporas de una mezcla de aislamientos altamente patogénicos, a la vez de un ambiente con temperatura y humedad tendientes al desarrollo de la enfermedad, en un cultivar de tomate susceptible. Estas condiciones, considerablemente inclinadas a favor la enfermedad, pueden no presentarse en la práctica, con lo cual es necesario hacer experimentaciones semi-comerciales o comerciales para arribar a una conclusión adecuada a nivel productivo.

El quitosano es una alternativa que puede ser utilizada en combinación con otras para controlar enfermedades durante el cultivo y la postcosecha. Es un producto inocuo para el consumo humano y amigable con el ambiente y puede ser considerado en sistemas de producción orgánica o integrada. Las pruebas a nivel semi-comercial o comercial, sumadas al uso de mayores dosis, abren una línea de investigación que puede generar información valiosa y aplicable a corto plazo.

Evaluación de la firmeza de diferentes híbridos de tomate almacenados a 21°C

Tanto la peste negra (Tomato spot wild virus, TSWV) como los nematodos, constituyen una limitante para la producción de tomate en invernadero en la zona del sudeste bonaerense, que en gran medida puede superarse cultivando materiales híbridos resistentes. Todos los híbridos evaluados han sido seleccionados por su buen comportamiento a peste negra y excepto 'Colt45', todos poseen resistencia a nematodos.

Además, presentan resistencia a *Verticillium* sp., *Fusarium* sp. raza 1 y 2 y virus del mosaico del tabaco (TMV) (Cartillas informativas de BHN Seed, Petoseed, Royal Sluis, Enza Zaden).

Las empresas semilleras difunden mediante cartillas informativas la descripción de cada híbrido que ofrecen, tanto de las resistencias como de la calidad del fruto relacionada al tamaño y firmeza. Presentan especificaciones cualitativas, poco precisas y no mencionan el comportamiento de postcosecha. También es muy escasa o inexistente la investigación en instituciones públicas, que abarque tanto de la calidad a la cosecha como en la postcosecha. Esta información permitiría contar con resultados imparciales y adecuar la producción de tomate según la distancia a los mercados.

Según información del criadero, 'Superman' es un material con frutos achatados, de 220 a 250 g, descriptos como muy firmes. Esta reseña resultó válida para la firmeza a cosecha, pero no para la de postcosecha, ya que 'Superman' fue uno de los materiales menos firme a partir de los 7 días a 21°C. Para 'Colt 45' también se ha informado que sus frutos son de buen tamaño (200 a 230 g) y buena firmeza. Sin embargo, fue el menos firme a la cosecha y también durante el almacenamiento, junto con 'Acuario' y 'Superman'. A pesar de poseer genes de larga vida, 'Acuario' fue uno de los híbridos de mayor ablandamiento. Entre los híbridos evaluados se destacaron 'Badro' y 'Anahí' por una alta firmeza a la cosecha y un buen mantenimiento de la misma durante los 21 días a 21°C; 'Mondial' tuvo un comportamiento intermedio. Se observó desarrollo de podredumbres a los 14 días a 21°C, fundamentalmente producidas por *A. alternata*, siendo 'Superman' uno de los materiales más afectado (Figuras 27, 28 y 29). Ello valida, en parte, la asociación entre firmeza del fruto y susceptibilidad a las podredumbres.



Figura 27. Tomates 'Superman' con podredumbre negra a los 21 días de almacenamiento a 21°C

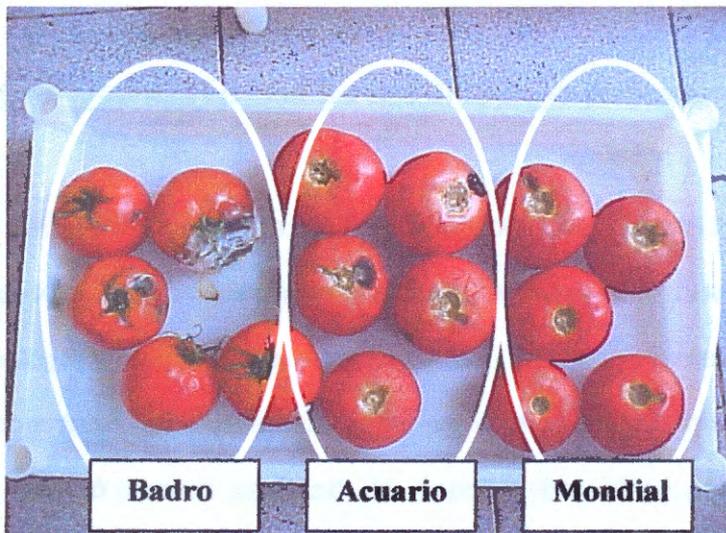


Figura 28. Tomates 'Badro', 'Acuario' y 'Mondial' con diferente incidencia de podredumbre negra a los 21 días a 21°C

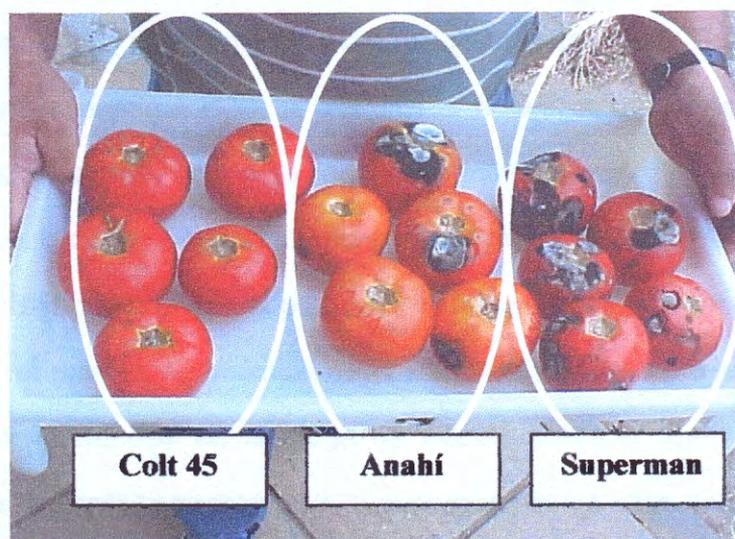


Figura 29. Tomates 'Colt45', 'Anahí' y 'Superman' con diferente incidencia de podredumbre negra a los 21 días a 21°C

Susceptibilidad a *A alternata* en tomates que difieren en su firmeza estructural

El desarrollo de las infecciones en los frutos control inoculado con heridas fue lento en comparación con los ensayos anteriormente mencionados. Para que la enfermedad se produzca, el patógeno requiere la presencia de un hospedante susceptible y de condiciones ambientales favorables. Si bien se cultivaron las mismas cepas de *A. alternata* y se inoculó similar cantidad de esporas por sitio, por alguna razón la enfermedad se produjo más lentamente, pero logrando altos niveles de pudrición final. La temperatura se mantuvo en valores similares a los anteriores experimentos realizados, pero la humedad relativa resultó algo inferior, fundamentalmente durante los primeros días de incubación de los frutos. También puede suponerse que las cepas hayan perdido, en alguna medida, parte de su patogenicidad. Independientemente de ello, los resultados permitieron determinar un alto grado de resistencia a *A. alternata* en 'Anahí' y 'Badro', ya que la incidencia de enfermedad alcanzada en estos híbridos, fue entre 50 y 65% menor a

la de 'Superman'. Ello posiblemente esté asociado a la mayor firmeza de los frutos durante el almacenamiento a 21°C, ya que ambos materiales se destacaron como los más firmes (resultado obtenido en el experimento anteriormente discutido), mientras que 'Superman' se encontró entre los híbridos menos firmes. 'Anahí' incluso resultó aún más resistente que 'Badro', dado que el patógeno causó enfermedad en menor proporción de frutos. Aunque el manejo agronómico haya sido similar para los tres híbridos, también pudieron ocurrir diferencias en la carga de inóculo sobre el fruto, ya sea porque la arquitectura de la planta favorezca o no la condensación de agua sobre los frutos, por la forma del mismo, barreras cuticulares, etc.

Estos resultados mostraron la importante influencia que tiene la elección del híbrido en el esquema de manejo de la enfermedad. El uso de un híbrido resistente en combinación con una o más estrategias de pre o postcosecha, podrían resultar en un exitoso control de la podredumbre negra.

Uso de erradicantes clorados

En un cultivar de baja firmeza El rápido desarrollo del patógeno en los tomates con heridas demostró la viabilidad del mismo y que el ambiente le fue favorable. Los frutos control agua manifestaron la enfermedad, a pesar de no haber sido inoculados con *A. alternata*, demostrando la ocurrencia de inoculación natural en pre y postcosecha. Estos frutos alcanzaron una incidencia cercana al 11%, similar a la de los tratamientos en el día 5, recién entre los días 9 y 10 posteriores al día de desinfección. Ese defasaje de alrededor de 4 días entre el control agua y los tratamientos, se presentó hasta niveles de pudrición de alrededor del 60%. Posteriormente, los incrementos de la incidencia en los tratamientos fueron relativamente menores a los del control agua. Aunque no fue posible

distinguir cuanto de las pudriciones en el control agua estuvieron debidas a infecciones latentes originadas en el invernadero y cuanto a la dispersión de inóculo de otros frutos enfermos dentro de la cámara de incubación, es importante remarcar que este control alcanzó una pudrición de alrededor del 90%, similar a lo calculado en los frutos inoculados con 40000 conidios del patógeno y lavados con agua, aproximadamente 2 a 3 días más tarde.

Ningún desinfectante fue capaz de retrasar el momento de aparición de la enfermedad. Los frutos tratados con hipoclorito presentaron menor diámetro de mancha respecto al control lavado con agua hasta el día 12. Posteriormente, la lesión aumentó en mayor medida en hipoclorito respecto al control lavado con agua. De las dos formulaciones de cloro evaluadas, sólo el hipoclorito de sodio redujo la proporción de enfermos en relación al control lavado con agua, aunque el efecto fue limitado sólo a la incidencia máxima alcanzada, que fue 9% menor que la del control. La escasa eficacia de los desinfectantes, o nula en algunos casos, posiblemente se encuentre relacionada con el tiempo transcurrido entre inoculación y tratamiento. En este experimento los frutos inoculados permanecieron 72 horas en condiciones controladas de temperatura y humedad para permitir la infección, ya que ante la presencia de gotas de agua sobre la piel del fruto, los conidios de *A. alternata* germinan y pueden ingresar a los tejidos sin heridas (Pérez et al, 1995). Debido a que los frutos se encontraban en un grado de incipiente madurez, es posible que el patógeno haya encontrado cierta resistencia natural, como la tomatina, para continuar con el proceso de invasión. La tomatina comprende dos glicoalcaloides: α -tomatina y dehidrotomatina, que confieren resistencia al hospedante ante el ataque de hongos, bacterias, virus e insectos (Friedman, 2002). No obstante, estos compuestos naturales de defensa disminuyen a concentraciones no detectables en frutos rojos (Kozukue et al, 2004). Dado que la madurez se desencadena rápidamente a 20°C (Wills

et al, 1998), es posible que las 72 horas transcurridas desde la inoculación hayan sido suficientes para la degradación de estos alcaloides y en consecuencia, para que el patógeno pueda superar esa barrera y comenzar la invasión de los tejidos.

El agua clorada es el método de desinfección más comúnmente utilizado para hortalizas y frutos (Cherry, 1999, citado por Parish et al, 2003). El cloro elimina fácilmente hifas de los hongos, pero tiene una dificultad 10 a 1000 veces mayor con las esporas, a menos que se encuentren germinando (Boyette et al, 1993). El tratamiento con hipoclorito elimina el inóculo por contacto, con lo cual tiene un buen efecto sobre el patógeno suspendido en agua y el que se encuentra en la superficie del producto. Por esta razón, es posible que el lavado con cloro haya resultado de limitada efectividad, dada la dificultad que tiene de controlar las hifas del hongo que se encuentran por debajo de la piel del fruto o las que ya han invadido sus tejidos. El cloro inorgánico no tiene acción sistémica y tampoco efecto residual (Boyette et al, 1993) y por consiguiente, el fruto estaría expuesto a reinfecciones durante el período en que se encuentre con otros frutos enfermos. Se ha demostrado que el trocloseno tiene una liberación lenta de cloro, pero resulta más estable que el hipoclorito (Prusky et al, 2001). A los pocos minutos de disolución de la pastilla de trocloseno en agua, la concentración fue de alrededor de 400 ppm y en el término aproximadamente de 2 horas, aumentó a 530 ppm. Contrariamente a lo determinado en este trabajo de tesis, Prusky et al (2001) encontraron mayor efectividad del trocloseno respecto del hipoclorito (de calcio hidratado).

Generalmente, una concentración de cloro activo 55 a 70 ppm a pH de 7,0, es la recomendada para la desinfección de la mayoría de las frutas y hortalizas frescas (Boyette et al, 1993). Para el control fúngico, son necesarios cloro 30 a 40 ppm, cuando la temperatura del agua es de 25°C y 10 ppm, si es de 40°C (a pH 7 y durante 1 minuto).

Ello indicó que las dosis utilizadas de cloro fueron más que suficientes y que no serían motivo de la falta de respuesta a la desinfección. La duración del proceso de desinfección también tiene influencia sobre los resultados obtenidos. Tiempos muy cortos son menos efectivos, pero el efecto más importante se ejerce dentro de los primeros minutos de exposición. Mientras que algunos recomiendan un período de contacto entre 1 y 2 minutos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1998), otros sugieren reducirlo a menos de un minuto, para evitar la infiltración de agua al interior del fruto y por consiguiente, los riesgos de contaminación con los patógenos en suspensión (Ritenour et al, 2002). En este trabajo de tesis, se decidió efectuar el tratamiento con trocloseno de sodio por 30 segundos, tomando como referencia lo realizado por Prusky et al (2001) y por consiguiente, los restantes tratamientos también se hicieron con la misma duración. Este corto tiempo de exposición podría estar compensado por la alta concentración de cloro utilizada.

Un componente importante para que la enfermedad ocurra es la existencia de un hospedante susceptible relacionado con su genética. Los tipos de tomate con menor firmeza son más sensibles a las podredumbres. En estudios previos ya descritos, el híbrido de tomate 'Superman' perdió firmeza más rápidamente que otros materiales evaluados durante un período de 21 días a alrededor de 21°C. El ablandamiento más rápido que presentó 'Superman' podría ser relacionado con una alta susceptibilidad a las podredumbres. El uso de un hospedante de marcada susceptibilidad puede ocasionar menores o nulas respuestas ante la aplicación de diferentes estrategias de control de enfermedades.

Un concepto general sostiene que si puede evitarse el uso de agua en el proceso de preparación de los tomates para el mercado, es aconsejable hacerlo, porque el

humedecimiento del producto aumenta la susceptibilidad a las podredumbres. Provengan o no de invernadero, los tomates deben ser lavados para remover restos de agroquímicos o de cualquier otra índole. Por otro lado, la descarga de los bins en agua contribuye a evitar daños físicos en los frutos, fundamentalmente cuando se han cosechado en estados tempranos de madurez. También y no menos importante, el lavado y la desinfección aseguran la obtención de un producto inocuo para el consumo. En 1993, se han detectado dos brotes de salmonelosis asociados a tomates frescos provenientes de un empaque de Carolina del Norte. En el 2004, tres casos de *Salmonella* sp. fueron detectados en tomates en Estados Unidos y Canadá (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2005). El agua puede transmitir muchos microorganismos, incluyendo cepas patógenas de *Escherichia coli*, *Salmonella* ssp., *Vibrio cholerae*, *Shigella* spp., así como *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii* y los virus de Norwalk y de la hepatitis A (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1998). Las contaminaciones también pueden originarse durante la cosecha, el empaque, la distribución y en el hogar (Beuchat & Ryu, 1997). Durante los procesos de postcosecha, estos autores resaltaron el importante rol que la desinfección y el control de la temperatura tienen sobre la inocuidad de los productos frescos. Ello implica que el método de desinfección no debe pensarse sólo para resolver el problema de podredumbres durante la postcosecha, sino que también debe apuntar a minimizar los riesgos de contaminación con patógenos asociados a enfermedades en el humano y asegurar la inocuidad del producto.

En cultivares de diferente firmeza estructural La rápida manifestación de síntomas en los controles inoculados sobre heridas confirmó que el experimento contó con el ambiente adecuado para el desarrollo de la podredumbre negra. Cuando los frutos fueron inoculados sin herir, la enfermedad se desarrolló más lentamente y ello podría en parte

estar debido a la modificación incorporada en este experimento, que incluyó la cobertura con una bolsa plástica de la pila de bandejas correspondientes a cada bloque. Este sistema impidió en gran medida la presencia de gotas de agua sobre el fruto, requisito necesario para la infección. Los frutos control agua sin inóculo manifestaron la enfermedad, a pesar de no haber sido inoculados con *A. alternata*, demostrando la ocurrencia de infecciones latentes originadas en el invernadero y posiblemente a inoculaciones ocurridas por la dispersión de conidios de otros frutos enfermos durante los 22 días de incubación. Los frutos control sin inóculo del híbrido 'Superman' comenzaron a manifestar la enfermedad dos días antes que 'Nixel', alcanzando una incidencia cercana al 60% y 5%, respectivamente. Estos bajos niveles de enfermedad natural registrados en 'Nixel' podrían ser controlados mediante el lavado con trocloseno o hipoclorito de sodio, ya que aún con alta carga de inóculo, ambos redujeron la incidencia entre el 40 y el 50%, respectivamente. En Superman, en cambio, sólo el hipoclorito sería efectivo, con un resultado limitado, ya que controló la aparición de la enfermedad en tomates inoculados con el patógeno sólo en un 16%.

La baja eficacia de los desinfectantes, observada fundamentalmente en el híbrido susceptible, posiblemente se encuentre relacionada con el tiempo entre la inoculación y el tratamiento. Los frutos fueron inoculados con el patógeno y permanecieron 72 horas en almacenamiento en condiciones controladas de temperatura y humedad, para permitir la infección. Como la misma puede ocurrir dentro de las 5 horas en que el patógeno se encuentra en contacto con el hospedante (Davis et al, 2005), el tiempo transcurrido hasta que los frutos fueron desinfectados pudo resultar excesivo y permitir que las hifas progresen en la invasión de los tejidos y en consecuencia, disminuyendo la eficacia de ambos erradicantes clorados. Similarmente a lo ocurrido en el experimento relacionado al uso de erradicantes en 'Superman', es posible que los frutos hayan ofrecido en principio

cierta resistencia natural, asociada a la presencia de tomatina, pero que a 20°C rápidamente este compuesto se haya reducido a concentraciones indetectables, al virar el color del fruto del verde al rojo (Kozukue et al, 2004). No fue posible determinar cuáles fueron los mecanismos por los que 'Nixel' resultó más resistente a la enfermedad y qué procesos, infección o invasión, se vieron temporalmente impedidos. Dado que uno de los desinfectantes probados, el hipoclorito de sodio, fue de alta efectividad en 'Nixel' pero no en 'Superman' y actúa por contacto, puede suponerse que la resistencia en este híbrido se relacionó fundamentalmente con la infección.

Sólo en pocos tomates se observó crecimiento del diámetro de la mancha o lesión durante el período evaluado y en todos los casos afirmativos, estuvo asociado a lesiones causadas por el patógeno. Aún en el control lavado con agua, la lesión evolucionó fundamentalmente a partir de los 16 días. El escaso aumento del diámetro de la lesión, similar a lo observado en el experimento correspondiente a la susceptibilidad y a su vez, la mayor ocurrencia de tipos de lesión menos severos, pudo estar relacionado con una pérdida de patogenicidad de las cepas de *A. alternata*. Esto mismo explicaría la menor intensidad y severidad de la enfermedad en 'Superman' respecto a ensayos anteriores. No obstante, fue posible detectar que el hipoclorito logró reducir la proporción de frutos en los que la lesión superó el diámetro de la gota, lo que estuvo estrecha relación con la reducción de la incidencia de la enfermedad cuando se utilizó este desinfectante.

Las condiciones apropiadas de desinfección relacionadas con la concentración de cloro, pH, temperatura del agua, profundidad, tiempo de exposición, se encuentran desarrolladas en la Revisión Bibliográfica (páginas 16 a 19). La metodología utilizada para la desinfección fue coincidente con la del experimento anterior del uso de erradicantes clorados en 'Superman'. También ya han sido descritas anteriormente las características

de ambos desinfectantes clorados evaluados. En coincidencia con lo observado en el experimento anterior de erradicantes clorados, la baja efectividad del hipoclorito cuando se trataron los tomates del cultivar 'Superman', pudo estar relacionada con la imposibilidad de controlar al hongo cuando ya ha invadido los tejidos del fruto. El tiempo entre inoculación y desinfección podría haber resultado excesivo en 'Superman', cultivar cuya menor resistencia pudo haber permitido la infección y el comienzo de la invasión, y por esa razón, los desinfectantes que actúan por contacto como los que se probaron tuvieron menor efecto que en 'Nixel'. Además, el cloro inorgánico no tiene acción sistémica y tampoco efecto residual (Boyette et al, 1993) y por consiguiente, el fruto estaría expuesto a reinfecciones durante el periodo estudiado. Su efectividad fue mayor en 'Nixel', aunque indirectamente, ya que el menor desarrollo de la enfermedad estaría más asociada con la resistencia de este cultivar de tomate. El hipoclorito, además, retrasó el momento de aparición de la enfermedad en 'Nixel', pero no en 'Superman'. La eficacia del trocloseno en el control de la enfermedad fue prácticamente nula en 'Superman' y generalmente menor respecto a la lograda con el hipoclorito de sodio en 'Nixel'.

CONCLUSIONES

El tratamiento de las plantas de tomate 'Superman' con oligosacarinas de quitosano 0.001% en el día anterior a la cosecha, redujo la incidencia de podredumbre negra hasta los 6 días post-inoculación, no afectó al tamaño y tipo de lesión y retrasó la aparición de la enfermedad.

'Superman' fue uno de los híbridos menos firme y 'Anahí' y 'Badro', los que mejor mantuvieron su firmeza durante 21 días a 21°C. La incidencia de la enfermedad fue muy alta en 'Superman' (90%), mientras que 'Anahí' y 'Badro' no superaron el 30 y 44%, respectivamente.

'Nixel' fue más resistente a la penetración e infección inicial, retrasó el crecimiento en diámetro de las lesiones y redujo la pudrición de los frutos en comparación con 'Superman'.

La eficacia para reducir la podredumbre negra con trocloseno o hipoclorito de sodio como erradicantes fue dependiente del cultivar. El trocloseno fue ineficaz en 'Superman' y redujo en 39% la incidencia de enfermedad en 'Nixel'. El hipoclorito fue eficaz en ambos cultivares, disminuyendo entre 10 y 17% la incidencia en 'Superman' y en hasta 51%, en 'Nixel'.

BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS, G. N. 1997. Plant Pathology. 4° ed., Academic Press, USA, 635 p.
- ALDRICH, 2005. Chitosan – A Technologically Important Biomaterial. Disponible en: <http://www.sigma-aldrich.com> [Consultado el 17/03/2005].
- ALLENDE, A., M. DESMET, E. VANSTREELS, B. E. VERLINDEN and B. M. INCOLA. 2004. Micromechanical and geometrical properties of tomato skin related to differences in puncture injury susceptibility. *Posth. Biol. and Technol.* 34:131–141.
- BANCROFT, R. D. 1995. The use of surface coating to ameliorate the rate of spread of post-harvest fungal diseases of top fruit. *International Biodeterioration and Biodegradation* 36 (3-4):385-405.
- BARTZ, J. A., C. G. EAYRE, M. J. MAHOVIC, D. E. CONCELMO, J. K. BRECHT and S. A. SARGENT. 2001. Chlorine concentration and the inoculation of tomato fruit in packinghouse dump tanks. *Plant Disease* 85(8):885-889.
- BARTZ, J., K. SCHNEIDER, S. SARGENT and K. FELKEY. 2002. Addressing microbial hazards in tomato fruit after harvest. Florida Tomato Institute, Proceedings. Disponible en: <http://gcrec.ifas.ufl.edu/vegetables.htm> [Consultado el: 20/09/2005].
- BAUTISTA-BAÑOS, S., M. HERNÁNDEZ-LÓPEZ, E. BOZQUEZ-MOLINA and C. L. WILSON. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22:1087-1092.
- BAXTER, S., S. ZIVANOVIC and J. WEISS. 2004. Molecular weight and degree of acetylation of high-intensity ultrasonicated chitosan. *Food Hydrocolloids* 20:1-10.
- BENHAMOU, N. and M. NICOLE. 1999. Review: Cell biology of plant immunization against microbial infection. The potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiol. Biochem* 37(10):703-719.
- BEUCHAT, L. R. and J. H. RYU. 1997. Produce handling and processing practices. *Emerging Infectious Diseases* 3 (4):459-465.
- BOYETTE, M. D., D. F. RITCHIE, S. J. CARBALLO, S. M. BLANKENSHIP and D. C. SANDERS. 1993. Chlorination and postharvest disease control. North Carolina Cooperative Extension Service, Serie AG-414-6. Disponible en: <http://www.bae.ncsu.edu> [Consultado el: 20/09/2005].
- BRETZ, F., T. HOTHORN and P. WESTFALL. 2004. Multcomp: Multiple Tests and Simultaneous Confidence Intervals. R package version 0.4-8.
- BRUMMELL, D. A., M. H. HARPSTER, P. M. CIVELLO, J. M. PALYS, A. B. BENNETT and P. DUNSMUIR. 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* 11: 2203–2216.

- BUESCHER, R. W., W. A. SISTRUNK, E. C. TIGCHELAAR and T. J. NG. 1976. Softening, pectolytic activity and storage-life of rin and nor tomato hybrids. *HortScience* 11(6):603-604.
- CARRILLO, L. 2003. *Alternaria*. En su: Carrillo, L. Los hongos de los alimentos y forrajes. Disponible en: <<http://www.unsa.edu.ar/matbib/>> [Consultado el 11/7/2005].
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2005. Outbreaks of *Salmonella* infections associated with eating Roma tomatoes- United States and Canada, 2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 54(13):325-328. Disponible en: <<http://www.cdc.gov>> [Consultado el 30/09/2005].
- CHUNG, Y. C., SU. Y., CH. CHEN, G. JIA, H. WANG, J. C. G. WU and J. LIN. 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristic of cell wall. *Acta Pharmacol. Sin.* 25(7):932-936.
- DAVIS, R. M., G. MIYAO, K. SUBBARAO and J. J. STAPLETON. 2005. UC Pest Management Guidelines: Tomato. Univ. of California and Agriculture and Natural Resources. Publication 3470. Disponible en: <<http://www.ipm.ucdavis.edu>> [Consultado el 25/07/05]
- DE LORENZO, G., R. D'OIDIO and F. CERVONE. 2001. The role polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annu. Rev. of Phytopathol.* 39:313-335
- DÍAZ, J., A. ten HAVE and A. L. van KAN. 2002. The role of ethylene and wound signalling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 129:1341-1351.
- DROBY, S., L. COHEN, B. WIESS, A. DAUS and M. WISNIEWSKI. 2001. Microbial control of postharvest diseases of fruits and vegetables – current status and future outlook. *Acta Hort.* 553:371-376.
- EL GHAOUTH, A., J. ARUL, R. PONNAMAPALAM and M. BOULET. 1991. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Science* 56:1618-1620.
- EL GHAOUTH, A., J. ARUL, J. GRENIER and A. ASSELIN. 1992a. Antifungal activity of chitosan on two post harvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology* 82:398-402.
- EL GHAOUTH, A., J. ARUL, C. L. WILSON and N. BENHAMOU. 1997. Biochemical and cytochemical aspects of the interaction of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. *Posth. Biol. and Technol.* 12:183-194.
- ESHEL, D., R. BEN-ARIE, A. DINOOR and D. PRUSKY. 2000. Resistance of gibberellin-treated persimmon fruit to *Alternaria alternata* arises from the reduced ability of the fungus to produce endo-1,4-glucanase. *Phytopathology* 90:1256-1262.
- ESHEL, D., A. LICHTER, A. DINOOR and D. PRUSKY. 2002a. Characterization of *Alternaria alternata* glucanase genes expressed during infection of resistant and susceptible persimmon fruits. *Mol. Plant Pathol.* 3:347-358.

- ESHEL, D., I. MIYARA, T. AILING, A. DINOOR and D. PRUSKY. 2002b. pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:774-779
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 1998. Guía para Reducir al Mínimo el Riesgo Microbiano en los Alimentos, en el Caso de Frutas y Vegetales Frescos. Disponible: <<http://www.fda.gov>> [Consultado el 30/09/2005].
- FORNES, F., V. ALMELA, M. ABAD and M. AGUSTÍ. 2005. Low concentrations of chitosan coating reduce water spot incidence and delay peel pigmentation of clementine madarine fruit. *J. Sci. Food Agric.* 85(7):1105-1112.
- FRIEDMAN, M. 2002. Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. *J. Agric. Food Chem.* 50:5751-5780.
- GHEZÁN, G. 2000. Trayectoria y demandas tecnológicas de las cadenas agroindustriales en el MERCOSUR ampliado. Hortalizas: tomate fresco y procesado. Procisur; BID 2000, 140 p.
- HEIL, M. and R. M. BOSTOCK. 2002. Induced Systemic Resistance (IRS) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defenses. *Ann. Bot.* 89:503-512.
- HEREDIA, A. 2003. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim. Biophys. Acta* 1620:1-7.
- INDEC, 2005. Censo Nacional Agropecuario 2002 Disponible en: <<http://www.indec.mecon.ar>> [Consultado el 5/08/05]
- INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA. 1998. Informe Anual del Proyecto Estratégico de "Desarrollo de la Tecnología de Postcosecha de Tomate y Durazno".
- KINET, J. M. and M. M. PEET. 1997. Tomato. In: H. C. WIEN ed. *The Physiology of Vegetable Crops*. H. C. Wien, Ed., CAB International, pp 207-258.
- KOZUKUE, N., J. HAN and M. FRIEDMAN. 2004. Dehydrotomatine and tomatine content in tomato fruits and vegetative plant tissues. *J. Agric. Food Chem.* 52:2079-2083.
- LEISTNER, L. and L. G. M. GORRIS. 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. and Technol.* 6:41-46.
- MATAS, A.J., E.D. COBB, D.J. PAOLILLO JR. and K.J. NIKLAS. 2004. Crack resistance in cherry tomato fruit correlates with cuticular membrane thickness. *HortScience* 39(6):1354-1358.
- MENDOZA-WILSON, A., J. SILLER. E. BRINGAS, J. OJEDA, J. M. BÁEZ and R. BÁEZ-SAÑUDO. 1995. Cuticle Differences during Ripening of Normal and *rin* Tomato Fruits (Abstract). *HortScience* 30(4):647
- MITIDIERI, I. 1998. Informe Anual del Proyecto Estratégico de "Desarrollo de la Tecnología de Postcosecha de Tomate y Durazno". INTA, PEI 80-027.

- PARISH, M. E., L. R. BEUCHAT, T. V. SUSLOW, L. J. HARRIS, E. H. GARRETT, J. N. FARBER and F. F. BUSTA. 2003. Chapter 5: Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2 (Supplement):161-173.*
- PEARCE, G., D. STRYDOM, S. JOHNSON and C. A. RYAN. 1991. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253:895-898.
- PÉREZ, A., R. BEN-ARIE, A. DINOOR, A. GENIZI and D. PRUSKY. 1995. Prevention of black spot disease in persimmon fruit by gibberellic acid and iprodione treatments. *Phytopathology* 85 (2):221-225.
- PINHEIRO, J., D. BATES, S. DEBROY, D. SARKAR. 2004. NLME: Linear and nonlinear mixed effects models. Disponible en: <http://lib.stat.cmu.edu/> [Consultado el 5/08/05]
- PRUSKY, D., Y. FUCHS and U. YANKO. 1983. Assessment of latent infections as a basis for control of postharvest disease of mango. *Plant Dis.* 67:816-818.
- PRUSKY, D., Z. GAT and P. BURD. 1992. Effect of relative humidity during mango growth on the incidence of quiescent infections of *Alternaria alternata*. *Plant Dis.* 77, 249-252.
- PRUSKY, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:413-434.
- PRUSKY, D., D. ESHEL, I. KOBILER, N. YAKOBY, S. BENO-MOUALEM, M. ACKERMAN, Y. ZUTHJI and R. BEN ARIE. 2001. Postharvest chlorine treatments for the control of the persimmon black spot disease caused by *Alternaria alternata*. *Posth. Biol. and Technol.* 22:271-277.
- PRUSKY, D., Y. SHALOM, I. KOBILER, M. AKERMAN and Y. FUCHS. 2002. The level of quiescent infection of *Alternaria alternata* in mango fruits at harvest determines the postharvest treatment applied for the control of rots during storage. *Posth. Biol. and Technol.* 25:339-347.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2004. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: <http://www.R-project.org> [Consultado el 5/08/05]
- REDDY, M. V., P. ANGERS, F. CASTAIGNE and J. ARUL. 2000a. Chitosan effects on blackmold rot and pathogenic factors produced by *Alternaria alternata* in postharvest tomatoes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125(6):742-747.
- REDDY, M. V., K. BELKACEMI, R. CORCUFF, F. CASTAIGNE and J. ARUL. 2000b. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. *Posth. Biol. and Technol.* 20:39-51.
- RESOLUCIÓN SENASA 256/03. Tolerancias o límites máximos de residuos de plaguicidas en productos y subproductos agropecuarios. Listado de productos fitosanitarios químicos y biológicos, y de aptitudes de los mismos que por su naturaleza o característica se hallan exentos del requisito de fijación de tolerancias. Listado de principios Activos Prohibidos y Restringidos en la

legislación vigente. Disponible en: <<http://www.senasa.gov.ar>> [Consultado el 15/08/03]

- RICHARDSON, C. and G. E. HOBSON. 1987. Compositional changes in normal and mutant tomato fruit during ripening and storage. *J. Sci. Food Agric.* 40:245-252
- RITENOUR, M. A., S. A. SARGENT and J. A. BARTZ. 2002. Chlorine use in produce packing lines. Document HS-761, Horticultural Sciences Department, University of Florida. Disponible en: <<http://edis.ifas.ufl.edu>> [Consultado el 3/10/2004].
- ROLLER, S. and N. COVILL. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International J. Food Microbiol.* 47:67-77.
- ROMANAZZI, G., F. NIGRO, A. IPPOLITO, D. DI VENERE and M. SALERNO. 2002. Effects of pre and postharvest chitosan treatments to control storage grey mould of table grapes. *J. Food Sci* 64:1862-1867.
- ROMANAZZI, G., F. NIGRO and A. IPPOLITO. 2003. Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan in reducing storage decay of sweet cherries. *Posth. Biol. and Technol.* 29:73-80.
- SANCHEZ, M. G. and J. L. MANGIONE. 1995. Enfermedades de poscosecha de tomate en el Mercado Central de Buenos Aires. 1° Jornada de Actualización Técnica: Poscosecha y Comercialización de tomate, MCBA.
- SCHIRRA, M., G. D'HALLEWIN, P. INGLESE and T. LA MANTIA. 1999. Epicuticular changes and storage potential of cactus pear [*Opuntia ficus-indica* Miller (L.)]. fruit following gibberellic acid preharvest sprays and postharvest heat treatment. *Posth. Biol. and Technol.* 17:79-88.
- SENASA, 1998. Límites máximos de residuos de plaguicidas: Argentina, Brasil, EE.UU., Mercado Común Europeo. SENASA, SAGPyA, 429 p.
- SIGMA, 2005. Chitosan from crab shells. Product Information. Disponible en: <<http://www.sigma-aldrich.com>> [Consultado el 17/03/05]
- SIVASANKAR, S., B. SHELDRIK and S. J. ROTHSTEIN. 2000. Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiol.* 122:1335-1342.
- SUSLOW, T. V. 2001. Water disinfection. A practical approach to calculating dose values for preharvest and postharvest applications. Publication 7256. Univ. of California, 4 p.
- SUSLOW, T. V. 2005. Chlorination in the production and postharvest handling of fresh fruits and vegetables. Disponible en: <<http://ucgaps.ucdavis.edu>> [Consultado el 17/2/2004].
- TAHARSEPT, CONCEPT, ISRAEL. Klor De B and Taharsept. Disponible en: <<http://www.Concept-Rx.co.il>> [Consultado el 27/5/2004].
- THE CALIFORNIA TOMATO BOARD. 1975. Ripening stages for tomatoes. USDA visual aid.

- THOMMA, B. P. H. J. 2003. *Alternaria* spp: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4 (4):225-236.
- WILLS, R., B. McGLASSON, D. GRAHAM and D. JOYCE. 1998. Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales. 2ª Ed., Acribia, España, 240 p.
- WISNIEWSKY, M., C. WILSON, A. EL-GAHOUTH and S. DROBY. 2001 Non-chemical approaches to postharvest disease control. *Acta Hort.* 553:407-412.
- WONG, W.S., F. A. GASTINEAU, K. S. GREGORSKI, S. J. TILLIN and A. E. PAVLATH. 1992. Chitosan-lipid films: microstructure and surface energy. *J. Agric. Food Chem* 40:540-544.
- ZHANG, D. and P. C. QUANTICK. 1997. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. *Posth. Biol. and Technol.* 12:195-202.

APENDICE

Figura I. Conidiosporas de *A. alternata* en cadenas (10X)



Figura II. Conidiosporas de *A. alternata* (10X)



Figura III. Aislamientos de *A. alternata* creciendo en condiciones controladas de temperatura



Figura IV. Pinche utilizado para hacer las heridas en los frutos control inoculado sobre heridas



Figura V. Tomates inoculados con distintos métodos



Figura VI. Aplicación de quitosano en plantas de tomate 'Superman', un día antes de la cosecha



Figura VII. Preparación de la suspensión de esporas instantes previos a la inoculación

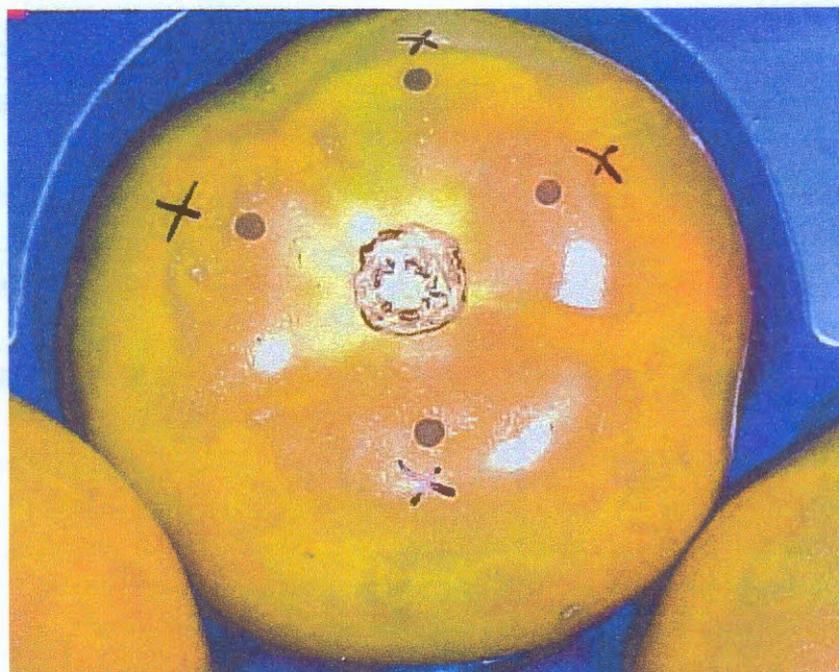


Figura VIII. Tomate inoculado con 10 μ l de inóculo en cuatro sitios

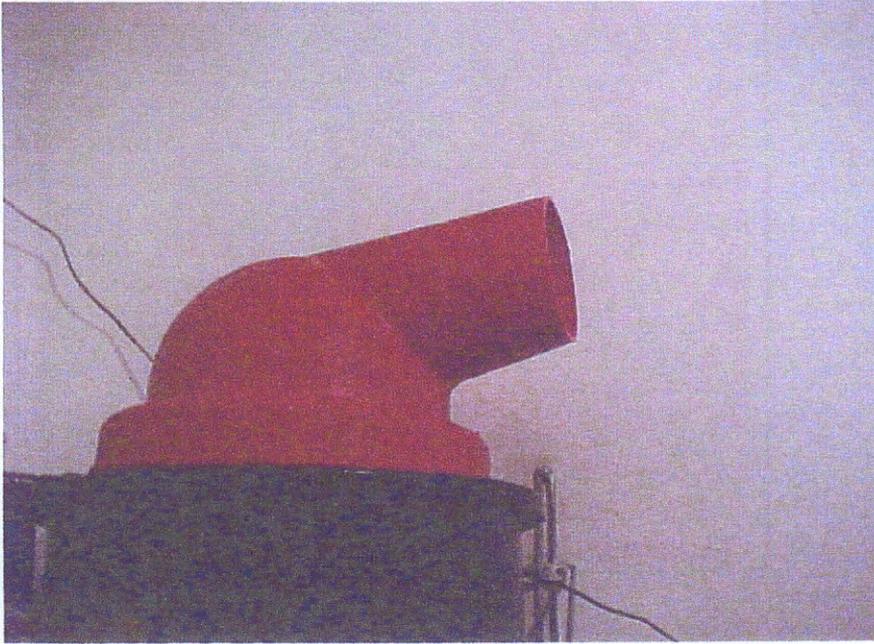


Figura IX. Humidificador utilizado dentro de la cámara de incubación para mantener altos niveles de humedad.

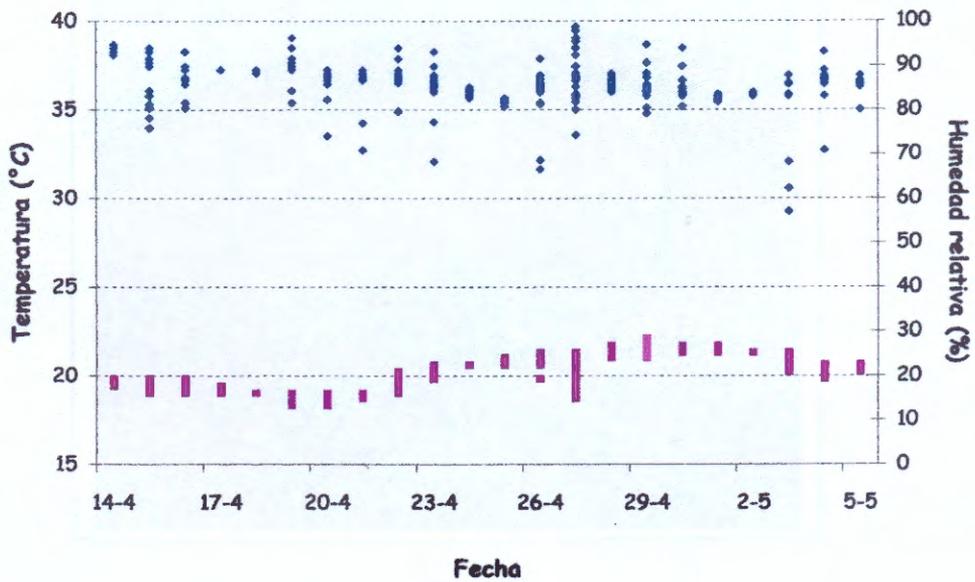


Figura X. Condiciones de temperatura y humedad relativa durante el período de incubación, correspondiente al experimento de uso de quitosano en precosecha



Figura XI. Sin lesión (Valor de la escala = 0)

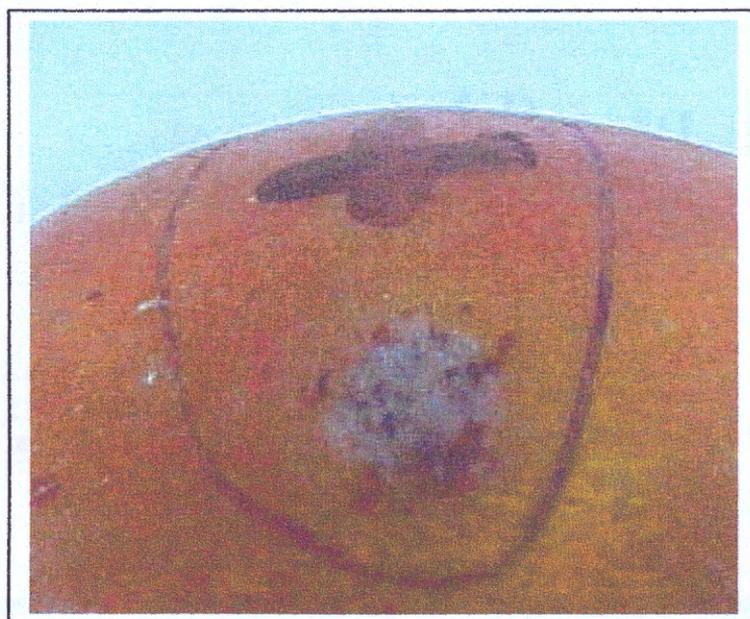


Figura XII. Mancha (Valor de la escala = 1, 2, 4, según grado de cobertura de micelio en el área de la lesión)



Figura XIII. Lesión con pudrición (Valor de la escala = 7, 8 y 10, según grado de cobertura de micelio en el área de la lesión)

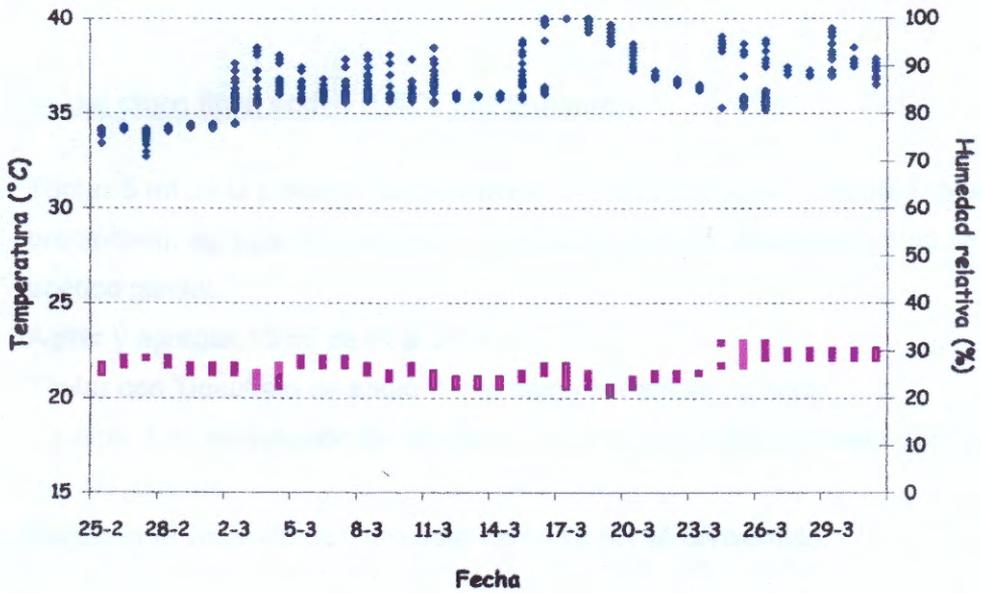


Figura XIV. Condiciones de temperatura y humedad relativa durante el período de incubación, correspondiente al experimento de evaluación de firmeza de diferentes híbridos de tomate

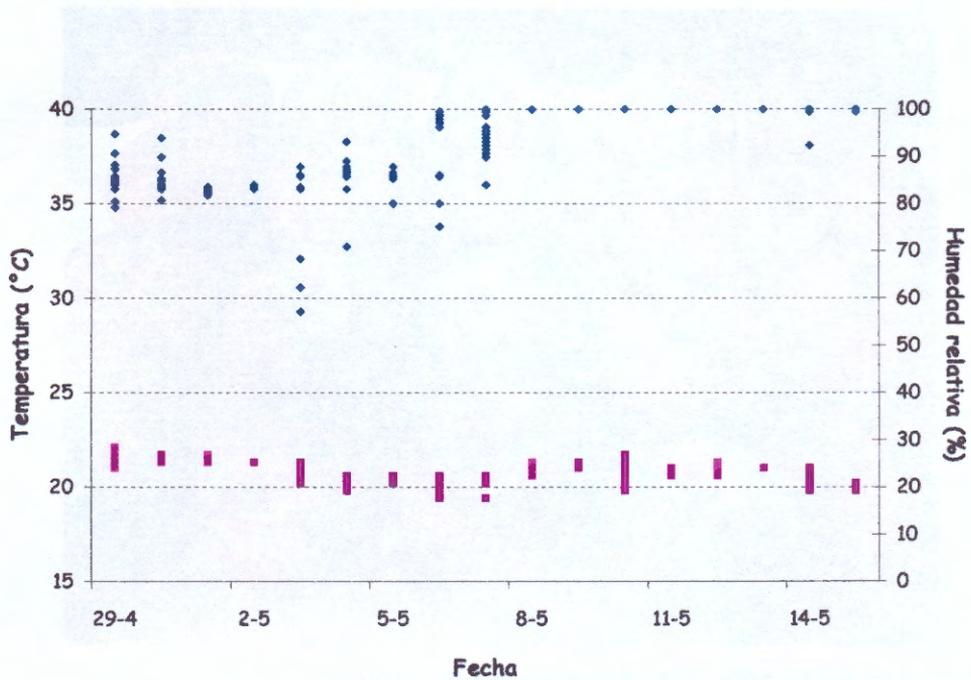


Figura XV. Condiciones de temperatura y humedad relativa durante el período de incubación, correspondiente al experimento relacionado con la susceptibilidad a la podredumbre negra de diferentes híbridos de tomate

Medición del cloro libre activo (LAC) por titulación

- Tomar 5 ml de la solución de trocloseno de sodio en agua y transferir a un vaso de precipitado, agregando posteriormente 20 ml de agua destilada y 5 ml de ácido acético glacial.
- Agitar y agregar 10 ml de IK al 20%.
- Titular con Tiosulfato de sodio 0.1 M hasta el cambio de color.
- Agregar 1 ml de solución de almidón y continuar la titulación hasta que la solución resulte incolora.
- Registrar el volumen de Tiosulfato de sodio 0.1 M consumido.

Luego se calcula:

LAC en solución (ppm) = ml de Tiosulfato de sodio 0.1 M x 659,7



Figura XVI. Frutos tratados con erradicantes colocados sobre papel absorbente para su secado. Los mismos habían sido inoculados e incubados durante 72 h.

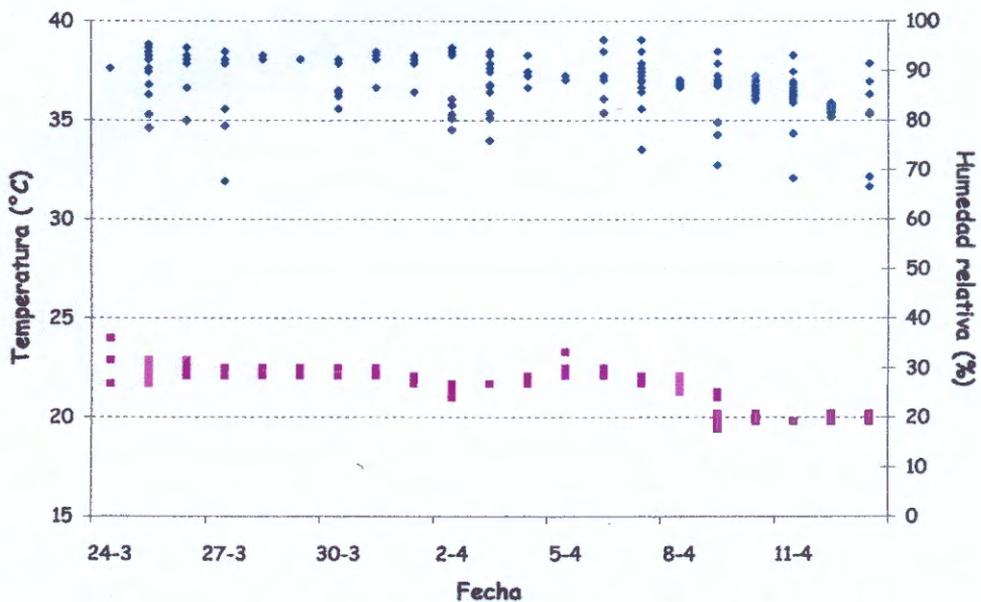


Figura XVII. Condiciones de temperatura y humedad relativa durante el período de incubación, correspondiente al experimento relacionado al uso de erradicantes clorados en 'Superman'

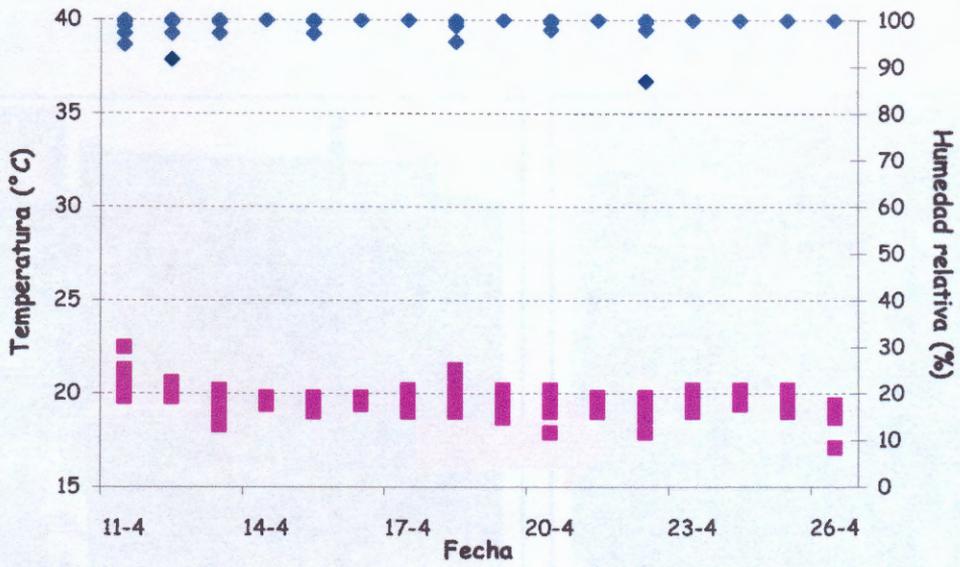


Figura XVIII. Condiciones de temperatura y humedad relativa durante el período de incubación, correspondiente al experimento relacionado al uso de erradicantes clorados en 'Superman' y 'Nixel'.

Figura XIX. Rendimiento de frutos correspondientes a Tronco, los tratamientos con fungicidas y después de ser controlados con Eradicantes clorados en 'Superman' y 'Nixel'.



Figura XIX. Bandejas de frutos correspondientes a todos los tratamientos de un mismo bloque antes y después de ser embolsadas (Experimento de erradicantes clorados en 'Superman' y 'Nixel')

Proporción de tomates donde la mancha evoluciona

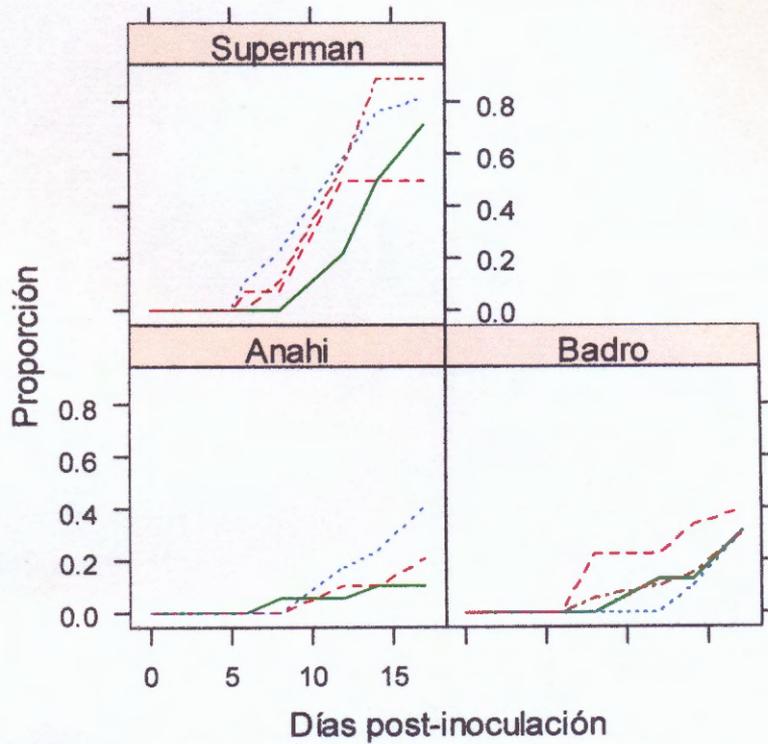


Figura XX. Proporción de frutos de los híbridos 'Superman', 'Anahi' y 'Badro', inoculados con *A. alternata*, en los que hubo evolución de la mancha o lesión durante el almacenamiento a $20.8 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 8\%$ de humedad relativa. Para cada híbrido se muestra la proporción por bloque en la que se produce evolución de la mancha.