



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DE MÉTODOS ALTERNATIVOS O
COMPLEMENTARIOS EN EL CONTROL DE
Monilinia fructicola EN POSTCOSECHA DE DURAZNOS

por

Sandra ALANIZ FERRO
Florescia ALLIAUME MOLFINO

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.
(Orientación Vegetal Intensiva)

MONTEVIDEO
URUGUAY
1998

Tesis aprobada por:

Director:

Diego Maeso

Pedro Mondino

Vivienne Gepp

Fecha:

Autor:

Sandra Alaniz

Florencia Alliaume

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Agr. Pedro Mondino por su importante acompañamiento durante todo el desarrollo de la tesis.

A la Ing. Agr. Stella García por su aporte en la primer etapa de éste trabajo.

Al Ing. Agr. Juan Burgueño por su valiosa ayuda en el análisis estadístico.

A todos lo integrantes de la Cátedra de Fitopatología por su apoyo, así como por el espacio físico brindado.

Al Ing. Agr. Diego Maeso por aceptar la dirección de la tesis a la que debió renunciar la Ing. Agr. Stella García.

A la Ing. Agr. Alicia Feipe por su aporte en la medición de los parámetros de cosecha.

A la Empresa LAGE & Cía. por el producto biológico otorgado.

A la flía. Alaniz por los frutos de duraznos cedidos para la realización de los ensayos.

A nuestras familias.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	IV
1. <u>INTRODUCCION</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA PODREDUMBRE MORENA.....	3
2.2 DIFERENCIAS ENTRE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Monilinia</i>	4
2.3 SÍNTOMAS.....	5
2.4 CICLO DE LA ENFERMEDAD.....	6
2.5 CONTROL TRADICIONAL.....	7
2.5.1 <u>Control químico</u>	8
2.5.2 <u>Control cultural</u>	8
2.6 PROBLEMATICAS DEL CONTROL QUÍMICO.....	9
2.6.1 <u>Contaminación ambiental</u>	9
2.6.2 <u>Toxicidad</u>	10
2.6.3 <u>Resistencia</u>	12
2.7 CONTROLES ALTERNATIVOS.....	13
2.7.1 <u>Tratamientos con calor</u>	13
2.7.2 <u>Manejo del dióxido de carbono</u>	17
2.7.3 <u>Control Biológico</u>	18
2.7.4 <u>Tratamientos con calcio</u>	22
2.7.5 <u>Otros mecanismos</u>	27
2.8 MÉTODOS DE INOCULACIÓN Y EVALUACIÓN DE PODREDUMBRE MORENA.....	28
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	30
3.1 ENSAYO N°1 - AJUSTE DE LA METODOLOGÍA DE INOCULACIÓN.....	30
3.1.1 <u>Instalación del ensayo</u>	30
3.1.2 <u>Preparación del inóculo</u>	30
3.1.3 <u>Tratamientos</u>	31
3.2 ENSAYO N° 2: APLICACIONES DE CaCl ₂ PRECOSECHA Y <i>Bacillus subtilis</i> POSTCOSECHA PARA EL CONTROL DE <i>Monilinia fructicola</i> EN POSTCOSECHA.....	32
3.2.1 <u>Tratamientos precosecha</u>	32
3.2.2 <u>Etapa postcosecha</u>	32
3.2.2.1 Medición de parámetros de cosecha y contenido de calcio.....	33
3.2.2.2 Preparación de inóculo.....	34

3.2.2.3 Tratamientos postcosecha.....	34
3.3 ENSAYO N° 3: BAÑOS CON SALES DE CALCIO PARA EL CONTROL POSTCOSECHA DE <i>Monilinia fructicola</i>	36
3.3.1 Preparación del inóculo.....	36
3.3.2 Tratamientos efectuados.....	36
3.4 EVALUACIÓN DE LOS ENSAYOS.....	37
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
3.6 IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE DEL GÉNERO <i>Monilinia</i> UTILIZADA COMO INÓCULO	39
4. RESULTADOS.....	41
4.1 ENSAYO N° 1.....	41
4.1.1 Incidencia	41
4.1.2 Severidad.....	41
4.2 ENSAYO N° 2.....	42
4.2.1 Parámetros de cosecha.....	42
4.2.1.1 Color de fondo y Sobrecolor.....	42
4.2.1.2 Presión.....	43
4.2.1.3 Contenido de Sólidos Solubles.....	43
4.2.2 Contenido de Calcio.....	43
4.2.3 Incidencia.....	44
4.2.4 Severidad	46
4.3 ENSAYO N° 3.....	47
4.3.1 Contenido de calcio.....	47
4.3.2 Incidencia.....	48
4.3.3 Severidad.....	49
4.4 IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE DEL GÉNERO <i>Monilinia</i>	49
5. DISCUSIÓN.....	52
5.1 ENSAYO N° 1.....	52
5.2 ENSAYO N° 2.....	52
5.3 ENSAYO N° 3.....	54
6. CONCLUSIONES.....	56
7. RESUMEN.....	58
8. SUMMARY.....	59
9. BIBLIOGRAFÍA.....	60

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

CUADRO	Página
1- Aplicaciones de CaCl_2 en monte a dosis de 0,5% (10 Kg./ha.).....	32
2- Tratamientos efectuados en el ENSAYO N° 2.....	35
3- Tratamientos efectuados en el ENSAYO N° 3.....	37
4- Porcentaje promedio de fruta infectada por <i>Monilinia</i> sp. en cada tratamiento en las diferentes fechas y promedio de todas las fechas para cada tratamiento.....	41
5- Diámetro promedio de las manchas por tratamiento en las diferentes fechas	42
6- Valores promedios $L^* a^* b^*$ determinantes del color de fondo y porcentajes promedio de sobrecolor por tratamiento precosecha.....	42
7- Presión promedio de cosecha	43
8- Contenido de sólidos solubles.....	43
9- Contenido de calcio promedio en cáscara y pulpa para los diferentes Tratamientos precosecha.....	44
10- Porcentaje promedio de fruta infectada por <i>M. fructicola</i> en cada tratamiento en las diferentes fechas.....	44
11- Diámetro promedio de las manchas por tratamiento en las diferentes fechas	46
12- Contenido de calcio promedio en cáscara y pulpa para los diferentes tratamientos precosecha.....	48
13- Porcentaje promedio de fruta infectada por <i>M. fructicola</i> en cada tratamiento en las diferentes fechas.....	48
14- Diámetro de las manchas por tratamientos en la diferentes fechas.....	49
FIGURA	
1- Instalación del ENSAYO N° 2.....	40

2- Embolsado de las bandejas	40
3- Evolución de la incidencia por tratamiento a través de las fechas de evaluación.....	45
4- Evolución del diámetro de manchas a través de las fechas de evaluación por tratamiento	47
5- Manchas en frutos tratados con MBI600.....	50
6- Deshidratación en frutos tratados con MBI600.....	50
7- Manchas en frutos tratados con silicato de calcio.....	51
8- Identificación de la especie del género de <i>Monilinia</i> utilizada en los ENSAYOS N° 2 y 3.....	51

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo al Censo General Agropecuario (Uruguay, 1990), el cultivo de duraznero (*Prunus persica* L.), presenta en Uruguay una producción anual promedio de 30.000 toneladas, siendo el de mayor importancia dentro de los frutales de hoja caduca. Este cultivo se desarrolla en un total de 2.200 explotaciones, ubicándose principalmente en la zona Sur del país (95 % del total). Si bien la mayor parte de la producción se destina al mercado interno, cada vez cobra mayor importancia la necesidad de la exportación. La saturación del mercado nacional, y la búsqueda de mejores precios explican esta tendencia.

Dentro de los factores que afectan la producción, las enfermedades toman un rol fundamental, siendo la podredumbre morena la que causa mayores pérdidas. Esta enfermedad, causada por hongos del género *Monilinia*, afecta la producción desde el momento de floración causando atizonamiento, canchales en ramas, así como podredumbres en frutos previo a cosecha. Las podredumbres pueden cobrar gran importancia en el período postcosecha debido a la mayor susceptibilidad de los frutos y condiciones más propicias para el desarrollo de infecciones que generalmente ocurren en esta etapa, ya sea originadas en el campo, así como infecciones secundarias.

Durante la etapa de cultivo, en años húmedos, se han observado daños de podredumbre morena del orden de 50%; e incluso llegado al punto de hacer no rentable la cosecha (Pedro Mondino com. pers.). Cuando existe un alto potencial de inóculo, las condiciones ambientales son propicias, y en ausencia de buenos métodos de control, en el monte ya se pueden dar infecciones del orden del 50 al 75%, y el resto de los frutos se infectan antes de que lleguen al mercado, llegando así a un 100% de pérdidas (Agrios, 1995).

Según Talice et al (1978), las mayores pérdidas entre cosecha y consumo se deben al ataque de hongos, principalmente de los géneros *Monilinia* y *Rhizopus*. Es común encontrar daños del 20%, y hasta de un 100% si las condiciones se presentan favorables para el desarrollo de los patógenos. La conservación frigorífica no logra eliminar el desarrollo de las infecciones, sino que solo la retarda.

Tradicionalmente, la podredumbre morena se ha controlado mediante aplicaciones de fungicidas, en el monte y en baños postcosecha, acompañado con algunos manejos culturales, pero de poca relevancia real.

La concientización a nivel mundial del elevado costo ecológico ocasionado por el uso indiscriminado de agroquímicos, las crecientes demandas en los mercados por frutos libres de residuos, y la resistencia desarrollada por el patógeno a determinados productos químicos, desencadenan la búsqueda y desarrollo de alternativas de control. Este proceso se ve aún más acelerado, debido a la prohibición de algunos de los fungicidas normalmente usados.

Toda esta situación se ve claramente reflejada en la tendencia mundial hacia la adopción de un esquema de Producción Integrada, donde se recurre a todas las técnicas posibles de control, dándole prioridad a las no químicas, enfatizando la protección de la salud humana y el medio ambiente. En nuestro país se están realizando los primeros esfuerzos para lograr una Producción Integrada (Pautas Sanitarias para los cultivos de Manzano, Peral y Duraznero, 1998).

Por otro lado, en el esquema tradicional de control de *Monilinia* sp., el uso de fungicidas en las etapas próximas a cosecha y postcosecha, puede ser problemático. Esto se debe a que, algunas veces el tiempo que transcurre entre estas etapas y el consumo del durazno, puede no ser suficiente para completar los tiempos de espera de algunos de los productos utilizados (Wilson et al, 1996).

El aumento del contenido de calcio en los tejidos de algunos frutos, ha mejorado su conservación y disminuido las podredumbres postcosecha causadas por hongos. Un ejemplo de esto es en manzana, donde mediante aplicaciones de calcio se ha logrado alargar la vida postcosecha (Conway et al, 1987b). Recientemente se ha comenzado a evaluar el efecto del calcio sobre duraznos, lográndose algunos resultados positivos (Berton et al, 1992).

El control biológico es una herramienta que históricamente se ha intentado desarrollar como alternativa al uso de agroquímicos, lográndose incluso, desarrollar formulaciones a nivel comercial. Para el caso del género *Monilinia*, existen varios agentes de control que han logrado frenar a estos patógenos. Uno de ellos es *Bacillus subtilis* (Pusey, 1988).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de aplicaciones de calcio, y del antagonista *Bacillus subtilis*, solos o combinados con Rovral (iprodione), como métodos alternativos o complementarios al químico para el control de podredumbre morena en postcosecha de duraznos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA PODREDUMBRE MORENA

La podredumbre morena ocurre en todo el mundo, en particular en países donde se cultivan frutales de carozo, y en condiciones de clima templado y húmedo. Afecta a los durazneros, ciruelos, damascos, cerezos y almendros con similar severidad, ocurriendo también en manzanos, perales, membrilleros, y en menor importancia otros hospederos (Agrios, 1995; Byrde et al, 1977; Fernández, 1978).

Como citan Byrde et al (1977), las primeras referencias de esta enfermedad aparecen en Europa, hace ya más de 250 años. Posteriormente, los patógenos causantes de la podredumbre morena fueron reportados y descritos por diferentes autores, en el resto del mundo.

Los agentes causales de esta podredumbre son un grupo de hongos superiores, pertenecientes a la subdivisión Ascomycotina, clase Discomycetes. Se clasifican dentro del orden Helotiales, familia Sclerotiniaceae, género *Monilinia* (forma imperfecta *Monilia*). Las especies que incluyen este grupo son:

- 1- *Monilinia laxa*
- 2- *Monilinia fructicola*
- 3- *Monilinia fructigena*

Las dos primeras atacan principalmente frutales de carozo, aunque pueden afectar también a las pomáceas y vid, en tanto la *M. fructigena* es patógena fundamentalmente de manzanos, perales y membrilleros (Byrde, 1977; Fernandez, 1978).

En nuestro país, aparentemente estarían presente solamente *M. laxa* y *M. fructicola*. Esto coincide con el resultado de un relevamiento donde se determinaron las especies presentes en una de las zonas frutícolas de mayor importancia del país (Melilla). En ninguna de las muestras se encontró *M. fructigena* (Mondino et al, 1997c). Sin embargo, Fernández (1978), menciona a Uruguay como uno de los sitios donde estaría presente esta especie.

2.2 DIFERENCIAS ENTRE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Monilinia*

Las diferentes *Monilinia* spp. no son identificables sólo con la observación de síntomas y signos sobre el tejido infectado. Es necesario apoyarse en una serie de características y técnicas útiles a este fin. Éstas a su vez, no pueden ser interpretadas separadamente para lograr una correcta identificación. Éstas son:

- 1) Huéspedes y partes de las plantas afectada: *M. fructigena* ataca principalmente a pomáceas, en tanto las otras dos especies afectan fundamentalmente a frutales de carozo. A su vez, aparentemente *M. laxa* predomina en la floración, en tanto *M. fructicola* es más patógena de fruto (Byrde et al, 1977).
- 2) Inoculación en peras maduras verdes: mientras que *M. fructicola* esporula abundantemente sobre peras verdes maduras, *M. laxa* lo hace en forma más dispersa (Ogawa et al, 1995).
- 3) Producción de conidios: tanto *M. fructigena* como *M. fructicola*, producen conidios a partir de 15°C, *M. laxa* es capaz de esporular ya desde los 5°C (Byrde et al, 1977).
- 4) Color y forma de conidios: las esporas de *M. laxa* y *fructicola* presentan coloraciones grisáceas, mientras que las de *M. fructigena* son amarillentas y su forma es más alargada (Byrde et al, 1977).
- 5) Crecimiento de la colonia en PDA (agar papa dextrosa): *M. laxa* crece más lentamente, y sus colonias son típicamente lobadas, con poca producción de esporas. *M. fructicola* forma colonias con márgenes enteros, abundante producción de conidios y usualmente formando círculos concéntricos. *M. fructigena* tiene también borde entero y algunas veces presenta anillos concéntricos al producir las esporas (Fernández, 1978).
- 6) Interacción en medio O.A. (agar avena molida): al sembrar *M. laxa* con una especie desconocida, si se produce interacción en la zona de contacto (línea negra) entre micelios, la especie desconocida corresponde a *M. fructicola* (el autor no menciona a *M. fructigena*) (Sonoda et al, 1982).
- 7) Ramificación de los tubos germinativos: *M. fructigena*, al igual que *M. fructicola*, produce un largo tubo germinativo antes de ramificarse. *M. laxa* ramifica rápidamente, adquiriendo una forma escorpioide. Las observaciones deben realizarse antes de las 20 horas a partir de la germinación (Byrde et al, 1977)..
- 8) Técnica en desarrollo: PCR (reacciones en cadena de polimerasa), (Fulton et al, 1997).

2.3 SÍNTOMAS

Los síntomas más típicos provocados por esta enfermedad, son: atizonamiento de flores, canchros en ramas jóvenes, y podredumbres en frutos.

Atizonamiento de flores- En todas las estructuras florales aparecen manchas café, que se extienden rápidamente atizonando toda la flor, y a su pedúnculo. Cuando se dan condiciones de humedad, aparece el signo del hongo, que consiste en conidios color pardo-grisáceos. Más tarde se arrugan y secan, desprendiéndose de la rama, pudiendo quedar algunas adheridas.

Canchros en ramas jóvenes- En las ramitas donde hubo ataque de flor, generalmente se desarrollan canchros elípticos, deprimidos, y amarronados, que se originan a partir de los pedúnculos de estas flores. Estos canchros, a su vez, pueden anillar la rama provocando su muerte en forma lenta, ocurriendo fundamentalmente en ramitas débiles. También aquí, en condiciones de alta humedad, se pueden observar ramilletes grises de conidios y exudado gomoso. En montes con ataques severos, es común observar gran número de ramitas muertas.

Podredumbres en frutos- Es el ataque más común y destructivo de estos patógenos. Los síntomas aparecen principalmente cuando estos se aproximan a la madurez. Comienzan por un pequeño punto de color marrón, que crece rápidamente en todas direcciones, pudiendo en pocos días cubrir todo el fruto. La podredumbre es típicamente de color castaño claro. Dependiendo del nivel de humedad, la mancha se puede cubrir lenta o rápidamente, con ramilletes de conidios grisáceos, que forman a menudo anillos concéntricos. Finalmente la piel se arruga y el fruto comienza a encogerse hasta quedar como una masa momificada, la cual puede caer o quedar adherida al árbol.

Estos síntomas fueron redactados en base a las descripciones que presenta Agrios (1995), Domínguez et al (1989), Fernández et al (1978) y Ogawa et al (1995).

Durante el período 1993-1996, se realizó un ensayo con el fin de determinar la sintomatología, causada por *Monilinia* sp., presente en nuestro país. Montes de durazneros de distintas especies, fueron observados a partir de floración, confirmando la existencia de la sintomatología descrita anteriormente (Mondino et al, 1997d).

2.4 CICLO DE LA ENFERMEDAD

El hongo sobrevive el invierno como micelio en los frutos momificados que se encuentran aún en los árboles, en las ramitas muertas, canchales y en los pedúnculos atiznados. También inverna en forma de seudoesclerocios en los frutos momificados que cayeron al suelo (Agrios, 1995).

En la primavera, las estructuras del árbol donde inverna el hongo, producen nuevos conidios. En tanto los seudoesclerocios producen apotecios, los cuales forman ascas y ascosporas. Ambos son fuente de inóculo primario para el inicio de un nuevo período de la enfermedad (Agrios, 1995), no estando determinada la importancia relativa de cada uno, para la producción de infecciones primarias (Pedro Mondino com. pers.). La presencia de la forma sexual en Uruguay no está comprobada, excepto para *M. fructicola* (Mondino et al, 1997b).

Ogawa et al (1995), mencionan que los canchales pueden esporular durante cuatro temporadas o más. Por otro lado Agrios (1995), afirma que los frutos momificados que cayeron al suelo, pueden persistir allí al menos dos años manteniendo su viabilidad para producir ascosporas.

La temperatura óptima para la esporulación es de 25°C, aunque Smith (1992), menciona que *M. laxa* esporula con facilidad ya con temperaturas de 10°C y condiciones de humedad. Sin embargo, Byrde et al (1977) sostiene que ésta es aún menor (5°C). Este mismo autor establece para las otras dos especies una temperatura mínima de esporulación de 15°C; sugiriendo además para los tres patógenos, una temperatura óptima para la formación de apotecios más baja que para la formación de conidios. Los conidios pueden mantener su viabilidad por varios meses, si no son expuestos a la luz solar directa y altas temperaturas (Ogawa, 1991).

El viento, el agua de lluvia y los insectos, son los encargados de diseminar a los conidios; en tanto las ascosporas son transportadas por corrientes de aire. Luego de algunas horas, los conidios y ascosporas germinan y producen infección al tomar contacto con los verticilos florales (Agrios, 1995). Según García (1997a) en condiciones de alta humedad (lluvias o humedad relativa superior a 85%) y una temperatura de 24°C, el período necesario para que ocurra infección es de cinco horas. Ogawa (1995) menciona que la temperatura óptima para que se produzca la infección y desarrollo de la enfermedad es de 24°C, aunque se pueden llevar a cabo en un amplio rango de temperatura, éste autor cita además que la infección se da desde 5 a 30°C. Mientras que Byrde et al (1977) menciona que el desarrollo ocurre desde 0°C a tasas muy bajas,

parando el crecimiento a los 30-35°C. En cuanto a la humedad, según el mismo autor, para que el avance de la enfermedad sea ininterrumpido, se requiere superar el 96%; por debajo del 93% se ve retardado.

El micelio del hongo, en condiciones de humedad, emerge de las flores atizonadas y forma ramilletes conidiales, liberándose así nuevas masas de conidios. Al mismo tiempo, el micelio avanza hacia los tejidos de los pecíolos y de ahí a las ramitas. En éstas, se produce el colapso de las células y se forman canchales; pudiendo el micelio llegar a anillar y matar a dichas ramitas. La superficie del canchal, también se cubre de conidios. Estas esporas, al igual que las originadas a partir de las flores infectadas, sirven de inóculo secundario para atacar nuevas flores, y más tarde infectar los frutos (Agrios, 1995).

La susceptibilidad de los frutos a la infección, aumenta con el estado de madurez de los mismos (Agrios, 1995). Los atacados en etapas tempranas, permanecen con la infección latente, desarrollándose a medida que se acercan a la madurez (Mondino et al, 1997a; Fernández, 1978). Es común que el hongo penetre a los frutos por heridas (rameados, insectos, daños de granizo, etc.), aunque también puede penetrar a través de estomas, o directamente a través de la cutícula (Agrios, 1995). Al principio el hongo crece intercelularmente, y produce una maceración y empardecimiento de los tejidos mediante la liberación de enzimas. Si las condiciones ambientales son apropiadas, se forman conidios sobre la piel. En pocos días el fruto puede llegar a descomponerse totalmente, y puede ocurrir que se mantenga en forma de momia colgado al árbol; o que caiga al suelo (Agrios, 1995).

Luego de la cosecha al almacenarlos, transportarlos y hasta su llegada al consumidor, los frutos infectados continúan pudriéndose, afectando los frutos sanos que entren en contacto con ellos (Agrios, 1995).

2.5 CONTROL TRADICIONAL

El esquema básico que se ha utilizado para el manejo de esta podredumbre, utiliza como herramienta principal la aplicación de productos químicos tanto en el monte, como luego de la cosecha. Esta medida se complementa con una serie de manejos culturales, pero que han sido poco adoptadas por los productores. Si las aplicaciones de fungicidas se realizan en el momento adecuado, con el producto y dosis correctas, y con una buena cobertura, se puede lograr un muy buen control.

2.5.1 Control químico

Durante la etapa del cultivo, éste se mantiene protegido mediante aplicaciones preventivas en los momentos más susceptibles. En floración, se recomienda aplicar en emergencia de estambres, caída de pétalos y rotura de envolturas florales; y dos o tres aplicaciones previo a cosecha, dependiendo de las condiciones ambientales.

Inmediatamente a la cosecha, generalmente la fruta se baña o asperja con fungicidas, sobre todo si las condiciones ambientales fueron favorables para el desarrollo del hongo.

Se dispone de una gama de fungicidas normalmente eficaces. Éstos son: muchos de los Inhibidores de la Biosíntesis del Ergosterol "I.B.E." (ciproconazol, hexoconazol, propiconazol, etc.) y los Benzimidazoles (benomil, carbendazim, etc.), algunas las Dicarboxímidas (iprodione, vinclozolin-no presente en el país-), y otros como captan, clorotalonil, diclorán y tiram. Algunos de éstos se pueden usar tanto durante el cultivo, como en postcosecha (Modernel, 1996).

Tanto los I.B.E. como los Benzimidazoles, son de tipo sistémico (Modernel, 1996). Cuando se aplican en los baños o aspersiones postcosecha, es común que se mezclen con otros fungicidas que tengan otros sitios de acción, para evitar el surgimiento de poblaciones resistentes (por ejemplo Carbendazim + Captan).

Cuando los productos químicos son aplicados en baños postcosecha se pueden alcanzar niveles de prácticamente 100% de frutos sanos. Berton et al (1992), bañando con dosis de 75gr. de iprodione cada 100lt. de agua, alcanzaron a los cuatro días 14% de frutos enfermos. García et al (1997b), aplicando dosis de Rovral de 100gr./100lt. de agua sobre frutos inoculados, obtuvieron a los cinco días tan solo un 7,5% de frutos afectados. Duraznos inoculados y bañados con benomil a dosis de 70gr./100lt. de agua, tuvieron 0% de incidencia a los cuatro días de evaluados (Pusey et al , 1988).

2.5.2 Control cultural

Consiste en una serie de manejos que se van efectuando a lo largo del ciclo del cultivo, extendiéndose al periodo postcosecha.

Al final de la cosecha o durante el invierno, eliminar los frutos podridos o momificados tanto del árbol como los caídos en el suelo. Durante la poda, en lo posible,

eliminar las ramas con canchales. Estas medidas apuntan a la reducción del inóculo inicial. Luego, durante el cultivo los insectos que sirven como vectores y/o causan heridas en frutos, deberían ser controlados. En la cosecha es importante ser cuidadosos con los frutos, para evitar machucones y heridas, manteniéndolos a la sombra hasta que son transportados al lugar de almacenaje. Los lugares de almacenaje deberán estar bien aireados y secos evitando condiciones de humedad (Agrios, 1995).

2.6 PROBLEMAS DEL CONTROL QUÍMICO

Los fungicidas han jugado un rol fundamental en el manejo de las enfermedades de los cultivos. Algunas de las razones que justifican este hecho son: efectividad en el control de las enfermedades, bajo costo en relación a los beneficios obtenidos, disponibilidad de los productos, facilidad de aplicación, entre otros.

Sin embargo, junto a los beneficios que derivan del uso de los fungicidas, existen riesgos de: contaminación ambiental originada a partir de la no adecuada eliminación de los envases, acumulación del producto en los suelos, así como su llegada a aguas superficiales y subterráneas; toxicidad para el aplicador, al estar en contacto con el fungicida, así como para el consumidor, por los residuos que puedan quedar en los productos cosechados.

EXTOXNET (Trabajos de Extensión Toxicológica), es un proyecto de información sobre pesticidas, a cargo de importantes universidades de EEUU, apoyado además el USDA (Departamento de Agricultura de los EEUU). Este programa ha presentado datos concretos que fundamentan las consecuencias antes mencionadas.

Por otro lado el uso permanente de fungicidas, ha determinado la aparición de poblaciones resistentes a algunos de los productos utilizados.

2.6.1 Contaminación ambiental

El impacto ambiental debido al uso de plaguicidas toma cada vez mayor importancia. Existen datos que determinan el efecto nocivo hacia el ambiente, a partir de algunos de los fungicidas usados contra la podredumbre morena.

EXTOXNET (1998b) señala que iprodione es levemente tóxico a las aves silvestres y moderadamente a los peces, aunque el compuesto se degrada rápidamente en

agua en condiciones aeróbicas. La misma publicación menciona que la vida media de iprodione en los suelos, puede llegar a casi seis meses. También comunica, que un suelo tratado durante diez años o más con iprodione, tiene una lenta degradación de vinclozolin.

En un ensayo con peces, EXTOXNET (1998a) encontró que captan es altamente tóxico para los mismos. También encontró que en aguas con pH cercano al neutro, es rápidamente degradado, siendo la vida residual efectiva de dos semanas.

Respecto a benomil, éste fungicida es rápidamente degradado en animales, pero resulta altamente tóxico a los peces (EXTOXNET, 1996). Esta misma bibliografía expresa que, bajas dosis de este producto aplicado durante un período largo de tiempo al suelo, es muy letal para las lombrices que habitan en él.

El agua que se utiliza en los baños postcosecha, resulta un problema a causa del contenido de fungicida que éste presenta. La eliminación de esta agua puede ser una causa más de contaminación del suelo y aguas tanto superficiales, como subterráneas.

2.6.2 Toxicidad

Éste término como es sabido, incluye dos tipos de toxicidad: toxicidad aguda y toxicidad crónica. Si bien ambas son importantes, la primera, tomando las precauciones adecuadas, se puede evitar. Sin embargo, es la toxicidad crónica la que más preocupa, no solo porque toda la población está expuesta, sino además porque es más compleja su prevención.

Coscolla (1993), cuenta que en una encuesta realizada a los consumidores en Estados Unidos en 1984, lo que preocupaba en primer lugar dentro de las sustancias dañinas en los alimentos, eran los residuos de plaguicidas (77%). Otra encuesta realizada en Reino Unido en 1990, encontró que al 80% de los entrevistados, les preocupaban los residuos de sustancias químicas.

Entre reciente información extranjera, aparecen reportes que muestran la existencia de efectos nocivos para animales (y que podrían serlo también para el hombre), a partir de algunos de los productos usados contra podredumbre morena. Éstos además, muestran restricciones de uso, así como aumentan los tiempos de espera de los mismos.

El programa de Producción Integrada que se desarrolla en la región Emilia-Romagna, prohibió la intervención en postcosecha con productos químicos en duraznos (Disciplinare di produzioni integrata frutticola, 1997).

En el caso de iprodione informes de instituciones extranjeras (Cornell Cooperative Extension Publication 1996; Willoughby, 1993), determinan que el tiempo de espera para este producto es de tan solo cero a un día. Sin embargo, la compañía Rhone-Poulenc (productora de Rovral), publica en la revista Good Fruit en 1996 que, no solo se extiende el tiempo de espera de cero a siete días, sino que cancela su uso en postcosecha; además solo se pueden realizar hasta cuatro aplicaciones en monte. La razón que condujo a esto, fue la sugerencia de la E.P.A. (Agencia de Protección Ambiental de EEUU) de tomar medidas de reducción de riesgos por la sospecha de los efectos cancerígenos que puede producir iprodione (Hansen, 1996). Modernel (1996) publica en la Guía Sata Uruguay, que Rovral tiene 14 días de espera en aplicaciones de campo, no apareciendo recomendado para baños postcosecha en duraznos.

EXTOXNET (1998b) cuenta que perros alimentados durante un año con dosis relativamente bajas de iprodione (de 15 a 90mg./kg./día), sufrieron pérdidas de peso de la próstata y cambios en los glóbulos rojos (daño en las moléculas de hemoglobina) con las menores dosis. Con las mayores dosis, exhibieron incrementos en el peso del hígado y los riñones.

Otro de los productos utilizados, captan, según la Guía Sata Uruguay (Modernel, 1996), así como la Cornell Cooperative Extension Publication (1996) y Willoughby (1993), afirman que el tiempo de espera de este producto es de cero días. En contradicción a esto, las dos últimas publicaciones comunican que el tiempo de re-entrada al monte, es de cuatro días luego de aplicado el producto.

EXTOXNET (1998a), menciona que ratas que consumen captan, eliminan la mayor parte de éste dentro de las 24 horas. También comunica que existen evidencias de que el captan causa cáncer en ratas y ratones a bajas dosis (300 mg./kg./día). La EPA clasifica a captan como un posible cancerígeno humano. Otra consecuencia en ratones y es la mortalidad fetal y pérdida de peso corporal en ratas. Se debe considerar que captan es químicamente similar a captafol, que ha demostrado producir cáncer.

Ratas alimentadas con triforine, eliminan hasta un 96% de los ingredientes activos en 168 horas. Uno de los metabolitos encontrados en la orina provoca efectos cardiovasculares nocivos (EXTOXNET, 1998c).

Según Flores et al (1986), absorciones prolongadas en animales de clorotalonil y carbendazím, producen tumores malignos.

Es importante tener en cuenta que el nivel de residuos de plaguicidas, entre ellos de fungicidas, ha sido utilizado como barrera no arancelaria en muchos de los países importadores. Esto determina que la utilización de fungicidas, sobretodo previo a cosecha y postcosecha, puede significar una traba para la exportación de durazno.

2.6.3 Resistencia

Es sabido que aquellos fungicidas que presentan un solo sitio de acción, cuando se usan de forma continuada, corren el riesgo de perder efectividad en el control de las enfermedades. Esto se debe a la facilidad con que se generan poblaciones resistentes a este tipo de productos.

De hecho, los Benzimidazoles han provocado la aparición de poblaciones resistentes de distintos patógenos, entre ellos *Monilinia* sp. Los primeros reportes datan de la década de los setenta.

Sanoamuang (1995), señala que el primer reporte de surgimiento de resistencia a carbendazím, surge en Australia en el año 1976 y luego en diferentes lugares del mundo.

Szkolnik et al (1977), citan que en 1976 en el oeste de New York, aparecieron en cultivos de cereza dulce, poblaciones de *Monilinia fructicola* resistentes a benomil. Estos autores expresan que el uso de benomil y de Benzimidazoles relacionados, dieron inicialmente un buen control de enfermedades, pero luego de tan solo 3 años de uso disminuyeron o perdieron su efectividad a los niveles de dosis usados. En un ensayo sobre podredumbre morena, concluyeron que la causa de la disminución del control de esta enfermedad en floración se debió al surgimiento de poblaciones resistentes a benomil. Esto ocurrió en cultivos de duraznos al Oeste de Nueva York, cuatro años después del uso continuado y casi exclusivo de éste producto.

Si bien la aparición de resistencia a Benzimidazoles se cita en diferentes regiones del mundo, es importante resaltar que este efecto es de tipo local. Es decir, el surgimiento de una población resistente queda restringido a la zona donde ésta ocurrió. La aparición de resistencia a los Benzimidazoles implica resistencia a otros fungicidas del mismo grupo por tener un solo sitio de acción, lo que se conoce como resistencia cruzada. Jones et al (1976), comprobaron que aislamientos de *M. fructicola* tolerantes a benomil, lo eran también a otros Benimidazoles.

Hoy día la aparición de poblaciones de *Monilinia* sp. resistentes, sobre todo a los Benzimidazoles y a los IBE, es un hecho. En EEUU, está tan ampliamente distribuida, que benomil no se recomienda más para frutales de carozo, excepto en áreas aisladas (Cornell Cooperative Extension Publication, 1996).

El problema del surgimiento de poblaciones resistentes, no se restringe sólo a la resistencia a los Benzimidazoles e I.B.E., también las Dicarboximidias han perdido su efectividad en el control de algunas poblaciones de *Monilinia* sp. Hacia fines de la década de los 70, ya aparecen reportes que confirman el surgimiento de resistencia hacia estos productos. Sztejnberg en 1978 citado por Ritchie (1983), encontró que aislamientos de *M. fructicola*, eran resistentes a las Dicarboximidias, esporulando en floraciones de damascos y cerezos dulces. En contraste a la de los Benzimidazoles, la resistencia a las Dicarboximidias en el campo, permanece menos tiempo.

Sanoamuang (1995), en un trabajo de campo encontró que aislamientos resistentes a Dicarboximidias compiten de igual manera contra los aislamientos sensibles en flores y frutos, pero no en los canchros. En éstos, los aislamientos resistentes tuvieron menor sobrevivencia durante el invierno.

2.7 CONTROLES ALTERNATIVOS

Los efectos negativos originados a partir del uso de fungicidas, han llevado a la concientización de la necesidad urgente de eliminar, o por lo menos reducir la utilización de los mismos. En los últimos años, este suceso ha tomado mayor trascendencia, lo cual se ve claramente reflejado en los esfuerzos que existen a nivel mundial para lograr una Producción Integrada.

Muchos investigadores desde hace ya varias décadas, han intentado desarrollar métodos alternativos de control. La postcosecha es una de las etapas donde más se ha estudiado, dado que es aquí donde las aplicaciones químicas provocan mayores riesgos para la salud de los consumidores. En particular, para podredumbre morena, se han realizado importantes esfuerzos en este sentido.

2.7.1 Tratamientos con calor

Los primeros ensayos fueron realizados en 1922 en naranjas, y usados muchos años en citrus para el control de hongos del género *Penicillium* (Couey, 1989). También han sido usados por mucho tiempo para el control de *Phytophthora* sp. en frutos de citrus y *Colletotrichum* sp. en papaya y mango (Sommer et al, 1967).

Con el surgimiento de fungicidas más efectivos y baratos, los tratamientos con calor quedaron en desuso (Couey, 1989). Luego, en la década de los sesenta y principios

de los setenta, hubo intentos de ajustar esta técnica para los géneros *Monilinia* y *Rhizopus* entre otros. A causa de los daños que el calor provocaba en los frutos de carozo, nuevamente se perdió interés por este tipo de tratamiento (Stella García com. pers.). Actualmente hubieron nuevos intentos respecto a éste método de control.

El tratamiento de calor consiste en exponer la fruta a altas temperaturas. Phillips (1991), afirma que exposiciones de tres a cinco minutos son suficientes para inactivar a los patógenos, dado que la mayoría de los patógenos postcosecha se ubican en la superficie o en las capas más externas. Según el mismo autor, la forma en que el calor afecta a los patógenos es: desnaturalización de proteínas, liberación de lípidos, destrucción de hormonas, asfixia de tejidos con o sin acumulación de toxinas.

El efecto que el calor ejerce sobre los patógenos depende del grado de humedad de las esporas, siendo mayor al aumentar la hidratación de las mismas; también depende de la actividad metabólica de las esporas, edad del inóculo, estado de germinación de las esporas entre otros (Phillips, 1991). Este autor menciona que esporas de *Rhizopus* sp. dormantes, requieren 49° C y las no dormantes, solo 39° C para inactivarlas.

También Smith (1971), cita que el efecto del calor depende del grado de germinación de las esporas. En un ensayo realizado por este autor, los frutos fueron inoculados 24 horas antes de aplicado el tratamiento, permitiendo así la germinación de las esporas. En este ensayo se obtuvo un buen control.

La aplicación de calor se puede realizar mediante distintos métodos, los más utilizados son agua caliente y vapor caliente. Otros métodos son irradiación infrarroja, microondas. El agua caliente es más efectivo que el vapor caliente, y éste a su vez, más efectivo que el aire seco, a igual temperatura y tiempo de exposición. Esto se debe a que el agua es más eficaz como transmisor de calor (Phillips, 1991; Couey, 1989). Además, las esporas húmedas presentan una mayor actividad fisiológica (Phillips, 1991).

Los tratamientos con agua caliente efectivos son usualmente entre 46 y 60°C y entre 30 segundos y 10 minutos. En tanto con vapor caliente se requieren de 43 a 50°C y de 10 a 60 minutos para obtener buenos resultados (Phillips, 1991).

Es común que se combinen los tratamientos de calor con fungicidas. Aparentemente ambos en conjunto, presentan un mayor efecto que por separado. Phillips (1991), menciona que el calor potencia el efecto del químico otorgándole mayor actividad física, más penetración, y mayor deposición en los tejidos. Duraznos y nectarinos bañados durante 1,5 a 2,0 minutos con agua caliente a 46°C más 100mg/lt. de benomil, tuvieron un mayor control que los tratados sólo con agua a 53°C, por el mismo período de tiempo.

Sin embargo, los tratamientos de calor presentan la gran desventaja de ocasionar daños en la superficie de la fruta que se expresan a través de heridas y amarronamientos. Existen otros efectos secundarios que consisten en pérdida de agua, decoloraciones, aumento de susceptibilidad a otros microorganismos contaminantes (Phillips 1991); enlentecimientos en la maduración de los nectarinos (Anthony et al, 1989). Aparentemente el vapor caliente provoca menos daños que el agua caliente a igual temperatura (Phillips, 1991 ; Couey, 1989)

Couey (1989), con los datos obtenidos de diferentes autores, creó una gráfica donde optimiza la combinación de temperaturas y tiempos de aplicación de agua caliente efectivo, que no provoca daño. En este gráfico se observa que las frutas tropicales, por ejemplo banana, papaya, mango, soportan mayores temperaturas y tiempos sin sufrir daños. En tanto las frutas de zonas templadas como el durazno, frambuesas y melón, son más susceptibles al calor. Para el caso de durazno, las combinaciones óptimas serían 52° C por 2,5 minutos o 56° C durante 50 segundos. Estos datos no necesariamente concuerdan con las respuestas encontradas por otros autores.

Spalding et al (1972), lograron el control de antracnosis en un ensayo sobre mangos, con tratamientos de baños de agua a 54,5° C, con o sin fungicida, durante cinco minutos. Este tratamiento provocó daños en la fruta.

Wells et al (1970), probaron tratamientos de agua caliente a diferentes temperaturas, con distintos tiempos y combinando con dosis de DCNA (2,6-Dichloro-4-Nitroaniline); para el control de *M. fructicola* y *Rhizopus* sp. en duraznos, ciruelos y nectarinos. En frutas inoculadas, un baño de 6,0 minutos a 54,5° C, controló a *M. fructicola*, pero provocó escaldado en la fruta. Este daño aumentó al combinar este tratamiento con DCNA. Se observaron leves daños en tratamientos de 3,0 minutos a 49° C y 1,5 minutos a 51,5° C, con 450 ppm de DCNA en ambos casos, en cultivares tardíos. No se observaron daños sobre fruta tratada durante 1,5 minutos a 51,5° C más 225 ppm de DCNA, pero sólo hubo un retraso en el desarrollo de la enfermedad de seis días, en fruta inoculada. Este autor midió además el nivel de residuos de fungicidas, concluyendo que al ser aplicado con agua caliente, se aumenta en gran medida el nivel de residuos.

Smith (1971), realizó ensayos sobre duraznos para el control de *Monilinia* sp. y *Rhizopus* sp. mediante baños de agua caliente sola, o combinados con benomil y DCNA. Baños de 51,5° C durante 2,5 minutos de agua sola o con químicos, tuvieron un buen control de las enfermedades. En tanto, en baños de 46° C durante 2,0 a 4,0 minutos, hubo sólo cierto control, el cual fue mayor al agregar químicos al agua, aumentando a medida que aumentaba el tiempo de exposición.

Phillips et al (1982), probaron baños de agua caliente sobre duraznos a temperaturas de 45, 50 y 55° C, durante 1,5, 2,5 y 5 minutos para el control de *M.*

fructicola. Ya en el tratamiento de 45°C y 1,5 minutos se observaron amarronamientos externos en los frutos.

En ensayos realizados recientemente en INIA Las Brujas, todos los tratamientos de agua caliente que lograron controlar la podredumbre morena, dañaron la fruta provocando manchas amarronadas en la piel (Stella García com. pers.)

Según Phillips (1991), los tratamientos de calor pueden ser afectados por las condiciones precosecha. Esta característica puede utilizarse para disminuir los efectos negativos del calor mediante acondicionamiento previo de la fruta. Houck (1967) antes del tratamiento con calor en limones, los acondicionó manteniéndolos a 15,5°C durante 7 a 8 días en caso de limones verdes de invierno ó 2 a 3 días en caso de limones verdes de verano. En ambos casos no se observaron daños luego del tratamiento.

Otra alternativa para disminuir los daños fue probada por Anthony et al (1989). Esta consistió en la envoltura individual de los duraznos con nylon previo a los tratamientos con vapor caliente. La duración de los mismos fue de 15, 30 y 45 minutos a 52°C. Las envolturas disminuyeron los daños y pérdidas de peso respecto a la fruta no envuelta. Sin embargo, el control de podredumbre morena fue menor.

Otra importante limitante de los tratamientos de calor, es que no presentan efecto residual. Esto significa que ante la presencia de inóculo y condiciones favorables, la fruta puede ser infectada luego de haber sido tratada. Por esta razón es que el uso de calor es más recomendado para fruta que llega rápidamente al consumidor (Phillips, 1991).

En la búsqueda de obtener buenos resultados, se realizaron combinaciones de los tratamientos de calor, no sólo con fungicidas, sino además con otros factores. Sommer et al (1967), combinaron baños de agua caliente con irradiación de rayos gamma en frutos de carozo. Si bien el control de *M. fructicola* fue efectivo cuando se realizaron ambos tratamientos por separado, éste fue óptimo (0% de infección) al combinarlos. Los frutos tratados con agua caliente durante 3,0 minutos a 55°C, sufrieron daños; éste no fue mayor cuando además se irradió con rayos gamma. Sin embargo según este autor, existen antecedentes de muerte localizada en el tejido, cambios en el aroma, sabor y textura, al irradiar con rayos gamma.

Wells (1972), realizó ensayos con DCNA y benomil, aplicados en baños y pulverizaciones, suspendidos en emulsiones de cera sobre frutos de duraznos y nectarinos. Dichos ensayos se realizaron con agua sin calentar (24°C) y calentada (52°C) durante 10, 20 y 30 segundos. Los resultados obtenidos consistieron en mayores efectividades al suspender los fungicidas en la cera, independientemente del método de aplicación, temperatura o fungicida usado. No se observó ningún daño o efectos indeseables en la apariencia de la fruta tratada.

Margosan et al (1997), probaron la combinación de calor con etanol sobre frutos de duraznos y nectarinos para el control del decaimiento postcosecha. Los tratamientos consistieron en aplicaciones de 2,5 a 20 % de etanol con temperaturas de 46 y 50°C de 1,0 a 8,0 minutos. El etanol incrementó significativamente el control del decaimiento comparado con agua sola, no ocurriendo heridas u otros trastornos, constatándose un aumentando en la firmeza de la fruta. Los tratamientos con etanol no depositaron residuos antifúngicos persistentes, lo cual implica que la fruta podría infectarse luego del tratamiento.

2.7.2 Manejo de dióxido de carbono

Smith et al 1975, encontraron en una revisión que una manera de retrasar el decaimiento de la pulpa de los frutos, podría ser mediante su almacenamiento a 0°C en atmósfera controlada. Estos investigadores evaluaron el efecto de almacenar duraznos y nectarinos en atmósfera controlada para el control de *M.fructicola*. Luego de cosechar la fruta, parte era bañada con benomil a temperatura de 21°C y 46°C, en tanto otras solo recibieron baños de agua a temperaturas de 21, 46 y 52°C. Toda la fruta fue almacenada durante seis semanas en atmósfera comercial a 0°C ó a atmósfera controlada a 0°C con 1% de O₂ y 5% de CO₂. Al retirar de cámara se procedió a la evaluación. El mismo ensayo fue realizado sobre fruta inoculada y sin inocular. En los resultados no hubo diferencia significativa al almacenar la fruta con otro tipo de atmósfera aunque sí se notó una tendencia a disminuir el porcentaje de fruta afectada cuando fueron bañados con altas temperaturas. Los tratamientos que recibieron benomil tuvieron claramente menor número de frutas afectadas.

De Vries et al (1991), en una revisión encontraron que varios investigadores lograron reducir las pérdidas de decaimiento causadas por *M. fructicola* mediante la adición de CO₂ a la atmósfera que rodea las cerezas dulces.

De Vries et al (1991), evaluaron el porcentaje de decaimiento luego de dejar la fruta siete días a 20°C, ya sea en atmósfera común, o en atmósfera que contenía de 12 a 50% de CO₂. En otro ensayo probaron los mismos tratamientos, pero con un previo almacenamiento de la fruta durante 14 días a 0° bajo las condiciones de atmósfera correspondientes a cada tratamiento. La fruta que recibió CO₂, se mantuvo sin decaimiento por más tiempo, y las lesiones que ocurrieron se desarrollaron más lentamente respecto al testigo. Este efecto fue mayor al aumentar las concentraciones de CO₂. Los autores concluyen que el CO₂ actúa como fungistático ya que retarda pero no elimina la enfermedad, logrando de esta manera, un efecto similar al frío.

Chambroy et al (1991), tomaron frutas de damasco y les aplicaron CO₂ en diferentes tratamientos. Observaron que cuando se mantuvo la fruta durante 48 hs. con 20% de CO₂, ésta presentó menor decaimiento, y con dosis mayores ocurrieron

desviaciones metabólicas como fermentaciones. Observaron además, que el CO₂ tuvo una acción fungistática.

García et al (1995) evaluaron la aplicación de CO₂ sobre duraznos. Los tratamientos consistieron en shocks de 20 y 40% de CO₂ sobre frutos inoculados con *M. fructicola* durante dos días. Luego fueron llevados a atmósfera controlada (O₂ 1,0-1,5% y CO₂ 3,5-4,0%; 0-1°C). No se logró controlar efectivamente la podredumbre morena con ninguno de los tratamientos.

2.7.3 Control Biológico

El control biológico ha sido una de las herramientas que históricamente se ha intentado desarrollar como alternativa para el control de las enfermedades.

Según Larking (1998), el control biológico se basa en la utilización de uno o más organismos vivos, incluido el hombre, para el control de insectos plagas, enfermedades y malezas. Estos organismos se extraen generalmente del medio en donde están actuando, y son específicos para un patógeno o un grupo de estos.

En una revisión hecha por el mismo autor, se describen cuatro mecanismos distintos a través de los cuales los antagonistas actúan sobre los patógenos :

- 1) competencia con el patógeno por recursos limitados, nutrientes y espacio
- 2) antibiosis, inhibiendo o destruyendo al patógeno por distintos metabolitos producidos por el antagonista
- 3) predación o parasitismo, que consisten en la destrucción directa de los propágulos o estructuras del patógeno
- 4) inducción de resistencia por activación de mecanismos de defensa físicos y químicos del huésped frente al patógeno, resultando en una resistencia parcial o completa a la enfermedad.

Todos los biocontroladores conocidos presentan uno o más de estos mecanismos. Para asegurar un buen resultado, es deseable que presenten varios mecanismos de acción. Por esta misma razón, la combinación de dos o más agentes de biocontrol en un producto único, podrían mejorar la acción y ampliar el rango de actividad en uno o más huéspedes (Larking, 1998).

Uno de los grandes inconvenientes para la utilización de microorganismos en el control de enfermedades, es que las condiciones ambientales pueden afectar profundamente su sobrevivencia y efectividad. Sin embargo hay razones para encarar con mayor optimismo el control biológico en condiciones de postcosecha, en parte porque los resultados de laboratorio son más fáciles de trasladar a tratamientos postcosecha que a tratamientos de campo (Wilson, 1994).

Kretzshmar (1991), hace referencia a tres factores sugeridos por Wilson y Pusey en 1991 que asegurarían un mayor éxito del control biológico en la etapa postcosecha : a) mayor control de condiciones ambientales, b) área limitada de aplicación, c) justificación económica por mayor valor agregado del producto a este nivel.

No obstante, esto no significa que no se pueda lograr un control exitoso a nivel de campo, y de hecho existen ensayos citados más adelante, que así lo demuestran.

Los primeros reportes de control biológico postcosecha datan de 1953, cuando Gutter y Littane demostraron una acción antagonista de *Bacillus subtilis* contra patógenos de citrus. Sin embargo fue recién a partir de 1970 cuando se intensificaron las investigaciones sobre este tema (Kretzshmar, 1991).

El control biológico para la podredumbre morena en los frutales de carozo, se ha intentado desarrollar con mayor o menor éxito por varios investigadores. Existen algunos microorganismos que han probado tener efecto antagonista contra *Monilinia* sp., involucrando bacterias, hongos y en estudios más recientes, levaduras.

Pusey et al (1984), realizaron un ensayo sobre frutos de carozo inoculados con *M. fructicola*, evaluando el efecto de diferentes bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* para el control de podredumbre morena. Todas las especies demostraron antagonismo in vitro, pero sólo *Bacillus subtilis* logró un buen control sobre frutos, comparable al obtenido con el fungicida benomil. Cuando se aplicó una concentración de 10^8 u.f.c./ml. de *B. subtilis* sobre frutos de duraznos, éstos no fueron atacados durante todo el período de evaluación (9 días), aunque sucumbieron a *Penicillium expansum* y *Rhizopus stolonifer*. Cuando esta concentración fue menor, los duraznos fueron afectados antes de finalizar este período.

También se estudió el efecto de la temperatura en el antagonismo de *B. subtilis*, observándose que su acción es afectada por las mismas temperaturas que afectan a *M. fructicola*; aunque *B. subtilis* podría actuar a temperaturas aún menores. Estos autores resaltan la importancia de éste hecho, si se considera que la fruta normalmente queda expuesta a amplios rangos de temperatura.

Si bien *B. subtilis* logró un buen control en todos los frutales de carozo, éste fue mayor en duraznos y damascos. Los mismos autores sugieren que la pilosidad de éstos frutos podrían estar favoreciendo la adherencia de las bacterias y/o incrementando el área donde se ubican las mismas.

Leibinger et al (1997) afirman que *B. subtilis* es habitante común de la superficie de hongos y frutos de manzanos y tienen alta tolerancia a la desecación e irradiación.

Mc. Keen et al (1986), aislaron el extracto de *B. subtilis* el cual contenía antibióticos. Éste fue probado contra *M. fructicola* y otros hongos fitopatógenos, entre ellos *P. expansum* y *Rhizopus* sp., siendo tan efectivo como la propia bacteria. Reilly et al (1988) citado por Wilson (1996), descubrieron que *B. subtilis* (B-3) produce el antibiótico iturín, posible responsable del antagonismo contra podredumbre morena.

Con el objetivo de implementar el uso de *B. subtilis* a nivel comercial para el control postcosecha de esta enfermedad, Pusey et al (1988) realizaron ensayos donde aplicaron antagonista, ceras, benomil y dicloran, solos o combinados en diferentes tratamientos. Estos se realizaron en tres líneas de packing. Los frutos eran bañados o asperjados con concentraciones del orden de 10^7 u.f.c./ml. de *B. subtilis*, producidas en medio NYDB (caldo nutriente levadura dextrosa), ó 10^9 u.f.c./ml. en caso del antagonista formulado. Aunque se obtuvieron resultados positivos, los autores concluyen que se requieren mayores investigaciones para lograr formulados comerciales exitosos.

Kim et al (1997) evaluaron el control que *B. subtilis* tenía sobre tres enfermedades de raíz del trigo, enfatizando la ventaja de éstas por el amplio espectro de acción de sus antibióticos y la mayor longevidad a causa de la formación de endosporas.

Mitidieri (1998) evaluó la eficacia de dos formulaciones de *B. subtilis*, MBI600 (concentrado de esporas) y MBI600F (concentrado de esporas mas un activo metabolito) para el control de *M. fructicola* en duraznos con infecciones naturales del campo. Los tratamientos consistieron en sumergir la fruta en 2,5 g./lt. de formulado solos o combinados con productos químicos. Luego de retirados de cámara, se dejaron una semana a 24°C. La formulación MBI 600 F alcanzó los niveles del control químico. En este ensayo se menciona además que la conservación no afectó a los formulados.

Leinbinger et al (1997) realizaron un ensayo para evaluar la efectividad y en particular la colonización de la superficie de fruta de manzana por microorganismos antagonistas, entre ellos *B. subtilis*. Se hicieron aplicaciones de diferentes antagonistas solos o mezclados sobre las frutas en el campo ó inmediatamente después de la cosecha, previo a su inoculación con patógenos postcosecha. Todos los tratamientos fueron efectivos en reducir el diámetro de la lesión comparado al testigo; y entre ellos, las mezclas de antagonistas tuvieron aún un notorio mejor comportamiento. En cuanto a la colonización, si bien hasta el momento de ingreso a la cámara todos los antagonistas habían colonizado la superficie de la fruta, durante el almacenamiento las poblaciones bajaron, y *B. subtilis* no fue detectado.

Actualmente entre los formulados comerciales de microorganismos antagonistas registrados por EPA existen dos *B. subtilis*: 6B03 y MBI600 recomendados para patógenos de suelo (Kim et al; 1997). Este último fue importado a nuestro país por la empresa Lage y Cia. S.A. *, habiendo sido evaluado positivamente sobre varios cultivos para el control de diferentes patógenos.

Entre los hongos antagonistas, existen varias especies promisorias. Melgarejo et al (1985), aisló cinco especies residentes en ramas y flores de duraznero, que inhibían el crecimiento de *M. laxa* in vitro tanto por zona de inhibición como por inhibición por contacto. Estas especies fueron: *Aspergillus flavus*, *Epicoccm nigrum*, *Penicillium chrysogenum*, *P. frequentants* y *P. purpurugenum*.

Melgarejo et al (1989), probaron el efecto de *P. frequentants* y sus antibióticos contra *M. laxa* en ensayos in vitro. En ambos casos hubo efecto antagónico, produciendo iguales cambios morfológicos. Se concluye pues, que el efecto de este antagonista se basa en la antibiosis. Estos antibióticos inducen la formación de un estroma en el micelio del patógeno. Las paredes de este estroma poseen gran cantidad de melaninas que le confieren resistencia a la degradación química y biológica, protegiendo además al patógeno de la radiación ultravioleta.

De Cal et al (1990), probaron el efecto de *P. frequentants* en el mismo medio de donde fue aislado. Para ello utilizaron montes de durazneros de dos y cinco años de edad. Los tratamientos consistieron en varias aplicaciones de esporas y/o micelio del antagonisata en ramas, antes y después de ser inoculadas con *M. laxa*. En la evaluación se observaron resultados positivos.

Madrigal et al (1994), evaluaron el efecto de *E. nigrum* durante cuatro años en árboles de durazneros inoculados con *M. laxa*. Las aplicaciones del antagonista consistían en soluciones de esporas y/o micelio. Si bien se logró control sobre podredumbre morena, éste dependió de las condiciones ambientales de cada año.

El modo de acción de este organismo fue estudiado por Madrigal et al (1995). Para ello evaluó in vitro al antagonista y al antibiótico flavipín producido por éste. El efecto antagónico de ambos fue similar. También en este caso, la *M. laxa* reacciona produciendo estroma como medida de defensa.

Mondino et al (1997e) probaron *P. rigulosum* contra *M. laxa* mediante cultivos duales. Los resultados obtenidos mostraron una disminución del crecimiento del patógeno. Se observaron alteraciones en la zona de crecimiento, que posiblemente se deben a la acción de enzimas y/o antibióticos producidos por el antagonista.

El efecto de los hongos antagonistas puede ser favorecido al agregar nutrientes a las soluciones. En todos los ensayos mencionados anteriormente (excepto los tratamientos in vitro), se agregaron diferentes nutrientes que mejoraron el efecto del antagonista. Estos nutrientes aseguran un crecimiento más rápido de los agentes de biocontrol, que se traduce en un mayor control.

*LAGE y Cia S.A. MBI 600, un nuevo biofungicida para uso en protección vegetal (comunicación personal).

La utilización de antagonistas que actúan mediante la producción de antibióticos, presentan el riesgo de provocar la aparición de resistencia entre los patógenos que están antagonizando (Wilson et al 1996). Por otro lado, los antibióticos podrían tener un efecto toxicológico sobre los consumidores (Kretschmar, 1991).

Por todo esto, Wilson et al (1996), se volcaron a la búsqueda de antagonistas que actuaran por otros mecanismos. Ellos lograron aislar levaduras de la superficie de manzanas que actuaban sobre patógenos postcosecha. Estas levaduras involucraban diferentes modos de acción consistiendo en competencia por nutrientes y espacio, entre otros. Además, éstos investigadores señalan que las levaduras presentan una serie de ventajas como: ser efectivos colonizadores aún en condiciones adversas; producir materiales como los polisacáridos que mejoran su sobrevivencia y restringen los sitios de colonización y germinación de otros propágulos; utilizar rápidamente los nutrientes disponibles; y parecen ser mínimamente afectados por pesticidas.

La utilización del control biológico, si bien tiene grandes ventajas, también presenta inconvenientes que han limitado la generalización de su uso. Larking (1998), menciona que éste es un método de control natural y ecológico que puede eliminar, o al menos disminuir el uso de pesticidas. Agrega que mediante su utilización, se aprovecha la naturalidad biológica, favoreciendo la estabilidad y balance del medio, sin afectar microorganismos benéficos. Este autor, comenta además que tal vez la primer gran desventaja para el buen resultado del control biológico, sea la necesidad de tener conocimientos especializados sobre la interacción entre antagonista-patógeno-planta huésped, antes de poder implementarlo correctamente.

Estas interrelaciones sumado al hecho de que las condiciones ambientales afectan la sobrevivencia y efectividad de los agentes de control, hacen que la potencialidad de un antagonista, no siempre se exprese en condiciones comerciales. Kretschmar (1991), resalta que muchos antagonistas que logran éxito in vitro, fracasan cuando son aplicados sobre productos vegetales.

Otra dificultad para la adopción de este tipo de control es el logro de formulados comerciales efectivos y baratos. Kretschmar (1991), destaca la importancia de desarrollar formulaciones que compitan con fungicidas y que permitan un uso combinado de ambos, para poder utilizar en programas de Control Integrado.

2.7.4 Tratamientos con calcio

El calcio ha sido asociado a los procesos de regulación de la vida postcosecha de la fruta, ya sea mediante un enlentecimiento en la maduración, como en una menor incidencia de los patógenos.

Según Ferguson (1984), un alto contenido de calcio en los tejidos de las frutas resulta en una lenta tasa de maduración como causa de una disminución en la respiración, menor producción de etileno y un lento ablandamiento de la pulpa. Bateman et al (1965), señalan que la resistencia de las plantas a ciertos hongos patógenos ha sido frecuentemente asociado a un aumento en la nutrición de calcio ó a un aumento en los contenidos de calcio en los tejidos resistentes a dichos patógenos.

Debido al largo período de almacenamiento de la manzana, ésta es la fruta donde más se ha estudiado y utilizado el calcio con el fin de mantener por más tiempo la calidad de la fruta. Conway (1982), evaluó el efecto de CaCl_2 en tratamientos postcosecha de manzana para el control de *P. expansum* mediante aplicaciones en baños, infiltración a presión e infiltración al vacío. Solo se observaron resultados positivos cuando se aplicó CaCl_2 por infiltración a presión. A medida que aumentaba la concentración de CaCl_2 en la solución disminuía el área de decaimiento, esto estaba relacionado con un incremento en el contenido de calcio en la pulpa de la fruta. Aún en este caso, la menor área de decaimiento correspondió a una mancha de $3,5 \text{ cm}^2$.

El mismo investigador junto a otros (1987b), evaluaron el efecto de aplicaciones de CaCl_2 postcosecha en manzanas mediante tratamientos a presión para el control del mismo patógeno. Evaluaron además diferentes concentraciones de inóculo. Los resultados obtenidos fueron similares a los del ensayo anterior. Además se observó que a medida que se incrementaba la concentración de inóculo, la tendencia en los resultados se mantenía pero con manchas de mayor tamaño. No obstante, aún con las menores concentraciones (10^4 esporas/ml.), el 100% de las frutas fueron afectadas. Otra observación resultante de este ensayo, fue que aplicaciones de CaCl_2 mayores al 4%, no aumentaron demasiado la incorporación de calcio a la fruta. Esto se debe seguramente, a que los lugares de ubicación del calcio son limitados, por tanto no se justifica una aplicación mayor al 4% de la sal, pudiendo además provocar daños en la fruta.

Los mecanismos mediante los cuales el calcio aumenta la resistencia de la fruta al ataque de los patógenos no se ha clarificado totalmente aún. Sin embargo, algunos investigadores han tratado de encontrar explicaciones de su forma de acción.

En una revisión realizada por Bateman et al (1965), éstos encontraron que las poligalacturonasas producidas por varios hongos patógenos no hidrolizan fácilmente al pectato de calcio. Además encontraron que varios investigadores demostraron que los cationes multivalentes, en particular el calcio retardan la tasa de maceración de los tejidos por la poligalacturonasa. Presumiblemente, esta resistencia al ataque por dicha enzima a tejidos con altas concentraciones de calcio, se deba a complejos de calcio formados con sustancias pécticas.

Conway et al (1984) expresan que, aparentemente el calcio fortalece o estabiliza las paredes celulares. El mecanismo de acción consistiría en la formación de puentes de

calcio entre los ácidos pécticos de las paredes celulares vegetales, haciéndolas más resistentes a la digestión por las poligalacturonasas.

El mismo autor junto a otros investigadores (1987b), basados en revisiones y en estudios propios, realizan nuevos aportes acerca de la acción del calcio. Las cadenas de ácidos poligalacturónicos que se ubican en las paredes celulares, normalmente se encuentran unidas a azúcares neutros como la ramnosa. Como resultado de esta unión, se forman huecos en la estructura que normalmente son ocupados por iones, existiendo una preferencia por el catión Ca^{+2} . De esta manera se forman puentes que hacen a las paredes celulares menos accesibles a las enzimas que causan el ablandamiento de la fruta, o la degradación de las paredes celulares por las enzimas producidas por hongos patógenos.

Debido a los resultados positivos que se han obtenido con aplicaciones de calcio en manzanas, varios investigadores han evaluado el efecto del mismo sobre frutos de durazno. Según Walt y Merrill (1963) citados por Westwood (1982), el contenido de calcio de la porción comestible del durazno es de 0,082 gr./100 gr. de peso seco.

Conway et al (1987a), realizaron una revisión donde encontraron que aplicaciones de nitrato de calcio precosecha sobre duraznos, aumenta la vida de almacenamiento de la fruta, manteniendo la firmeza de la misma por más tiempo, retardando o disminuyendo la tasa de respiración y reduciendo el decaimiento.

Estos autores realizaron un ensayo sobre duraznos cultivar 'Jerseyland' donde aplicaron CaCl_2 en tratamientos pre y postcosecha para el control de *M. fructicola*. Los tratamientos precosecha consistieron en diez aplicaciones semanales utilizando dosis de 0, 34, 68 y 102 kilos de CaCl_2 por hectárea, en montes que habían recibido aplicaciones de benomil en floración. Los tratamientos de CaCl_2 postcosecha se realizaron mediante infiltración a presión durante dos minutos a dosis de 2 y 4%. En ambos casos la fruta fue almacenada a 0°C durante tres semanas y luego retirada de cámara e inoculada con *M. fructicola* en baños en una solución de 10^4 esporas por mililitro durante 15 segundos. Por último, fueron dejadas tres días a temperaturas de 20°C, y posteriormente se procedió a la evaluación.

Los tratamientos precosecha no fueron efectivos en la disminución del decaimiento, y solo hubo un aumento en el contenido de calcio de la pulpa, en los duraznos que recibieron mayores dosis. En los tratamientos postcosecha hubo una disminución del orden de 40 a 60% en la severidad de la mancha con respecto al testigo, en todos los tratamientos hubo un incremento en el contenido de calcio de la pulpa respecto al testigo, y éste fue mayor a medida que aumentaba la dosis. Los tratamientos postcosecha provocaron daño a algunos de los frutos en forma de moteados marrones en la piel, quemaduras y áreas decoloradas.

Campos et al (1991), también aplicaron CaCl_2 en este caso sobre nectarinos y evaluaron su efecto sobre la fruta al momento de cosecha (firmeza, contenido de sólidos solubles, tamaño y peso), y luego de almacenados por 30 días en frío (sólidos solubles, firmeza y color de fondo). También en este momento evaluaron desórdenes fisiológicos como amarronamiento interno. Los tratamientos consistieron en seis pulverizaciones de CaCl_2 a dosis de 0,25 y 0,50% desde comienzo de endurecimiento de carozo hasta pocos días antes de cosecha. Los resultados mostraron que en ninguno de los tratamientos hubo efecto de las aplicaciones de CaCl_2 para los parámetros evaluados.

Berton et al (1992), también realizaron un ensayo donde evaluaron aplicaciones de CaCl_2 sobre duraznos en tratamientos de campo. El monte tenía cuatro años de edad, y los durazneros eran cultivar 'Cai'. Dicho monte había recibido previamente las siguientes aplicaciones: benomil en floración y precosecha, y oxiclورو de cobre en floración. Los tratamientos con calcio consistieron en aplicaciones semanales en el último período previo a cosecha, realizándose 0, 1, 2, 3 y 4 aplicaciones a dosis de 0,5%. Luego la mitad de los frutos de cada uno de los tratamientos recibieron baños postcosecha con iprodione a una dosis de 75g/100 lts.. Todos los frutos fueron llevados a cámara a 3°C durante 25 días, luego fueron retirados y permanecieron a temperatura ambiente durante cuatro días.

Los frutos que recibieron iprodione tuvieron un porcentaje de frutos sanos superior al 85%. Este nivel aumentó significativamente al combinar con CaCl_2 , siendo superior al 96%, no existiendo efectos significativos en cuanto al número de aplicaciones. Los tratamientos que no incluían baños con el fungicida tuvieron un porcentaje de fruta sana notablemente menor. El testigo tuvo apenas un 45% de frutos sanos, mientras que con una aplicación de CaCl_2 hubo un incremento significativo a 59%, y al realizar dos aplicaciones hubo 72% de fruta sana. Sin embargo, un mayor número de aplicaciones no significó estadísticamente un mejor control, aunque sí se observó una tendencia a disminuir la incidencia.

García et al (1995), evaluaron el efecto de tratamientos de aplicaciones de CaCl_2 en campo sobre frutos de duraznos para el control de podredumbre morena en postcosecha. Los tratamientos consistieron en una o dos aplicaciones precosecha a dosis de 0,5% solas o combinadas con baños de Rovral. Los duraznos fueron inoculados y almacenados por 12 días a 1°C y a los cinco días de retiro de cámara se procedió a su evaluación. Los tratamientos que solo recibieron CaCl_2 en campo, no fueron efectivos en reducir la enfermedad, aunque se detectó una tendencia a un mejor control cuando se combinó Rovral con calcio (una aplicación de CaCl_2 , 0% y dos, 2,5% de incidencia), que cuando se aplicó solo Rovral (7,5% incidencia).

Biggs et al (1997), basados en investigaciones donde encontraron que incrementos en el contenido de calcio de frutas y verduras con el uso de sales de calcio,

alargan la vida de almacenamiento; realizaron el estudio del efecto de diferentes sales de calcio aplicadas sobre duraznos en tratamientos postcosecha.

De acuerdo a sus antecedentes, seleccionaron 18 sales y probaron su efecto frente a *M. fructicola* en los medios PDA (papa dextrosa agar), y PDB (caldo papa dextrosa). Los resultados fueron variables. Algunas de las sales no difirieron del testigo, mientras que con otras se lograron muy buenos resultados. En PDA el propionato de calcio fue el más inhibitorio, reduciendo en un 90% el crecimiento del hongo respecto al testigo; en tanto el hidróxido de calcio, óxido de calcio, silicato de calcio y pirofosfato de calcio, lo redujeron en un 65%. En PDB el pirofosfato de calcio y el propionato de calcio disminuyeron el peso del hongo en un 64 y 54% respectivamente al comparar con el testigo. Todas las sales excepto dos, inhibieron la actividad de la poligalacturonasa del hongo. La mayor inhibición (85% con respecto al testigo) se obtuvo cuando se usó propionato de calcio, mientras que sulfato de calcio, fosfato de calcio tribásico, gluconato de calcio y succinato de calcio lo redujeron en un 75%, a éstas lo siguieron cloruro de calcio con 65%, hidróxido de calcio con 61% y óxido de calcio con 55%. La actividad de la poligalacturonasa se correlacionó más con el crecimiento del hongo en PDA para todas las sales y sólo se correlacionó con seis de ellas en PDB. De estos resultados se concluye que existe un efecto directo de supresión de la actividad del patógeno por una acción fungistática del calcio.

Moline (1994) hace mención a una investigación donde se aplicó en forma combinada pequeñas cantidades de un antagonista junto con calcio para el control de *Botrytis* sp. y *Penicillium* sp. Atribuye al calcio una acción directa en la reducción de la germinación de las esporas de patógenos y elongación de los tubos germinativos. Conway et al (1984) al evaluar el efecto del calcio sobre *Penicillium expansum* cuando éste se pone en contacto con jugo de fruta extraída de manzanas tratadas con CaCl_2 , no logró disminuir el crecimiento de dicho patógeno.

Biggs et al (1997) seleccionaron en la misma investigación ya comentada, seis sales de calcio por su mejor comportamiento y correlación de su actividad poligalacturonasa con el control en ambos medios de cultivo, y se evaluaron sobre frutos que no habían recibido ningún tratamiento químico en precosecha. Las frutas fueron sumergidas durante cinco minutos en solución de 600 y 1000 mg. de calcio/litro de las diferentes sales seleccionadas, luego de que se secaron se asperjaron con una solución conteniendo 3×10^6 conidios/ml. de *M. fructicola*. Se dejaron durante 24 horas en condiciones de alta humedad relativa y temperatura de 22°C por cuatro días, posteriormente se procedió a la evaluación.

A los cuatro días, a dosis de 600 mg., las sales que tuvieron mejor comportamiento fueron: propionato de calcio y silicato de calcio, con una incidencia y severidad aproximada de 20 y 40 % menor respectivamente comparado al testigo, mientras que hidróxido, óxido, formato y pirofosfato de calcio fueron estadísticamente

igual al testigo. A dosis de 1000 mg. de calcio/litro las tendencias de los efectos de las diferentes sales se mantuvieron, pero con mayor efectividad. En este caso, a los ocho días de evaluación, todas las sales tuvieron estadísticamente menor porcentaje de incidencia respecto al testigo, pero solo propionato logró menor severidad. A medida que transcurrió el tiempo, el efecto supresivo fue disminuyendo y a los 12 días tanto la incidencia como la severidad eran prácticamente similares al testigo.

En una tercer etapa se probaron cuatro de las seis sales: óxido de calcio, hidróxido de calcio, propionato de calcio y silicato de calcio en tres ensayos. Los tratamientos consistieron en bañar la fruta durante 15 minutos en soluciones de 1200 mg. de calcio/litro. Una hora después se inoculó la fruta con una gota de 30 ul de suspensión conteniendo 10^5 conidios/ml. de *M. fructicola* y se incubaron a oscuridad durante dos días a 25°C. Uno de los ensayos se evaluó a los siete días y los otros dos, cuatro días después. El promedio de los resultados fue el siguiente: el hidróxido de calcio fue el mejor tratamiento, reduciendo la incidencia más de un 50% respecto al testigo, y en cuanto a la severidad también ésta sal, junto al óxido de calcio fueron los de mejor comportamiento, presentando un tamaño de mancha menor al 20% del tamaño del testigo.

2.7.5 Otros mecanismos

Algunos compuestos volátiles producidos naturalmente por las plantas, han sido implicados en mecanismos de resistencia (Shaw, 1969 citado por Wilson, 1987).

Wilson (1987), evaluó la capacidad in vitro de 16 compuestos volátiles como inhibidores de *M. fructicola*. Se colocó en cajas de petri con medio PDA un trozo de colonia de dicho patógeno y lo cubrieron con un papel embebido con los diferentes compuestos volátiles. De los 16 compuestos, nueve redujeron el diámetro de la colonia y de éstos tres fueron completamente inhibitorios (benzaldehyde, ethil benzoate y methyl salicylate), no observándose ningún tipo de crecimiento. De éstos últimos se transfirió un pequeño trozo de colonia a una nueva placa con PDA, para determinar si aun continuaba vivo el hongo., verificándose la muerte de los mismos. Se concluye entonces que estas sustancias fueron fungicidas y no fungistaticas.

Aparentemente el benzaldehyde puede ser oxidado sobre la fruta a ácido benzoico, compuesto muy usado para la conservación de alimentos (Anonyman, 1976 citado por Wilson, 1987).

2.8 MÉTODOS DE INOCULACIÓN Y EVALUACIÓN DE PODREDUMBRE MORENA

En los ensayos donde se evalúan métodos de control de enfermedades postcosecha, generalmente la fruta es inoculada con el patógeno y puesta en condiciones que favorecen la infección del inóculo para asegurar el potencial desarrollo de la enfermedad. La comparación de la efectividad de los métodos de inoculación no siempre es factible debido a que no todos los autores evalúan la incidencia.

Existen diferentes métodos de inoculación; en el caso particular de *Monilinia* sp. sobre frutos de durazno, el método más comúnmente utilizado es provocar una herida promedialmente de dos milímetros de diámetro y otros dos de profundidad y aplicar una gota de 20 a 30 μ l con una concentración de 10^4 a 10^6 esporas/ml (Wells, 1972; Biggs et al, 1997; García et al, 1995; García et al, 1993, entre otros). Estos autores, para lograr condiciones de incubación mantienen la fruta en un ambiente con temperaturas de 20 a 25°C y humedades relativas mayores a 95%. Algunos autores para lograr altas humedades, envuelven la fruta en bolsas de polietileno (García et al, 1997b; Wells, 1972). La mayor diferencia radica en el tiempo que mantienen la fruta en temperatura y humedad óptima; pudiendo ser menos de un día como García et al (1995 y 1997b), quienes ya a las seis horas llevan la fruta a cámara logrando en el testigo porcentajes de infección que van desde 60 a 80% a los cinco días de retirados de cámara; en tanto Wells (1972) deja los frutos en estas condiciones durante 16 a 20 horas. Los restantes investigadores mantienen dichas condiciones por lo menos un día.

Otro método frecuentemente utilizado es la inoculación a través del uso de pulverización, utilizando las mismas concentraciones de esporas que en el método anterior. Algunos de los investigadores que utilizan este mecanismo de inoculación son Margosan et al (1997); Pussey et al (1988); Sanoamuang et al (1995) y Biggs et al (1997). Sólo los dos últimos autores mencionan que después de inocular, en ambos casos mantienen los frutos durante 24 horas en condiciones de temperatura de 22 a 25°C y alta humedad relativa. Los porcentajes de infección logrados en el testigo por Margosan et al (1997) y Biggs et al (1997) a los cuatro días fueron aproximadamente 70%, llegando en el último caso a 100% de infección a los ocho días. En el ensayo realizado en una línea de packing por Pussey et al (1988), los porcentajes de infección son muy bajos probablemente debido a que no se había logrado remover totalmente a los productos químicos de los cepillos de la línea de packing.

Biggs et al (1997), en otro ensayo de la investigación anteriormente citada, utiliza como método de inoculación, la aplicación de una suspensión de inóculo a través de una gota de 30 μ l sin previa herida del fruto, logrando a los cuatro días 93-94% de fruta infectada.

Los mismos autores observaron que cuando se inoculaba por aspersión, los porcentajes de infección fueron menores a la inoculación por gota. Ellos atribuyen este hecho a que la localización de una gota concentra mayor cantidad de inóculo en un punto de la fruta, y seguramente el potencial inhibitorio de las diferentes sales, fue superado por tanta concentración de inóculo. Bateman et al (1965) citado por Conway et al (1987b) sugieren que la resistencia conferida por los pectatos de calcio podrían ser alterados por una alta concentración de inóculo, lo que indica que el tejido sería resistente a bajas concentraciones de poligalacturonasa, pero sería macerado por una alta actividad de dicha enzima.

Finalmente, otro método utilizado es mediante el bañado de la fruta en una suspensión de inóculo con concentraciones de esporas algo menores, que van de 10^3 a 10^4 esporas/ml., ya sea provocando heridas a la fruta previamente de dos milímetros de diámetro y profundidad (Wells et al, 1970; Conway et al, 1987a), o sin hierla (Smith et al, 1975 y Pussey et al, 1988). Este último investigador obtuvo en el testigo un porcentaje de infección del 69% a los ocho días.

Como se observa en párrafos anteriores, muchos investigadores evalúan la podredumbre morena a través de la incidencia, la cual consiste en cuantificar la fruta infectada en cada tratamiento y expresarla en porcentaje. Otro método de evaluación es cuantificar la severidad de la enfermedad en los frutos afectados. Ésta medición puede ser expresada como diámetro de mancha en centímetros (Anthony et al, 1989; Wells et al, 1970), o como área de la mancha en milímetros cuadrados (Conway, 1982; Conway et al, 1987b). Algunos investigadores como Biggs et al (1997), utilizan ambas variables, incidencia y severidad, para evaluar la enfermedad.

3. MATERIALES Y METODOS

La investigación se llevó a cabo mediante la realización de tres ensayos separados en el tiempo, conducidos durante la temporada 97/98. Los ensayos se realizaron en las instalaciones de la Estación Experimental INIA "Las Brujas".

Para la realización de los ensayos se utilizaron duraznos de las variedades "Red Haven" y "Rey del Monte" provenientes de montes adultos con manejo standard de un establecimiento de la zona Cuchilla de Sierra, Dpto. de Canelones.

3.1 ENSAYO N°1 - AJUSTE DE LA METODOLOGÍA DE INOCULACION

En este ensayo se evaluaron diferentes mecanismos de inoculación con el fin de seleccionar un método efectivo, práctico y que provoque poco daño sobre la fruta, para ser utilizado en los siguientes dos ensayos.

3.1.1 Instalación del ensayo

Para esta prueba se emplearon 150 frutos de duraznos Red Haven cosechados y clasificados (según uniformidad de tamaño, madurez y sanidad) el día 15/12/97. Estos fueron almacenados hasta el día siguiente en la cámara de frío de atmósfera regular del establecimiento, a 0°C. El día 16/12/97 se retiraron los frutos de cámara y se trasladaron a las instalaciones de INIA "Las Brujas", procediendo a la instalación y realización de los tratamientos, en uno de los laboratorios de fitopatología.

Se distribuyeron al azar sobre la mesa 15 maples de cartón. Sobre cada uno se depositaron al azar diez frutos, colocándolos con el cachete más rojo hacia arriba. Cada fruto fue marcado luego con un círculo de aproximadamente cuatro a cinco centímetros de diámetro con un marcador indeleble para identificar claramente la zona donde se realizarían los tratamientos y evaluación.

3.1.2 Preparación del inóculo

La suspensión de inóculo fue preparada el mismo día en que se realizó el ensayo a partir de frutos de durazno infectados seis días antes. Para infectar dichos duraznos se utilizó como fuente de inóculo inicial un fruto esporulado con *Monilinia* sp., seleccionado de un monte de INIA "Las Brujas". Luego se tomaron seis duraznos sanos variedad "Junegold", los cuales se desinfectaron de la siguiente manera: primero se sumergieron unos segundos en alcohol 70° para romper la tensión superficial,

inmediatamente se sumergieron durante un minuto en hipoclorito de sodio al 2% y por último, un minuto en agua estéril. Se dejaron secar y se hirieron con una aguja desinfectada con alcohol y llama; finalmente se inocularon con la misma aguja, tomando esporas del fruto enfermo seleccionado inicialmente. Para crear condiciones de humedad, a cada fruto se le colocó una bolsa de nylon y un trozo de algodón embebido en agua, y se dejaron a temperatura ambiente.

Para preparar la suspensión de inóculo se colocó en un Erlenmayer, agua estéril y con un anza se fueron trasladando esporas de los frutos previamente infectados al Erlenmayer. La concentración final se ajustó a 4×10^5 esporas/ml. de agua estéril utilizando la cámara de Neubauer. La dispersión de las esporas se favoreció agregando una gota de tween 20 a la solución, agitándolo aproximadamente un minuto.

3.1.3 Tratamientos

Se seleccionaron cuatro tratamientos que además de simular las condiciones más comunes a las que naturalmente está expuesta la fruta, son de los más comúnmente utilizados en los ensayos revisados en bibliografía. Junto con el testigo, el ensayo quedó compuesto por cinco tratamientos de tres repeticiones con diez frutos cada uno, considerando cada maple una repetición.

Las formas de inoculación probadas fueron las siguientes:

- 1) TESTIGO - sin inocular
- 2) PULVERIZACIÓN - con un pulverizador manual de 550cc de capacidad, se aplicó una pulverización a cada fruto, simulando condiciones de lluvia inmediatamente antes de la cosecha, y/o duchas dentro del packing.
- 3) GOTA - con una micropipeta se colocó en cada fruto una gota de 30 ul, utilizando un puntero de la micropipeta por repetición.
- 4) CEPILLO + GOTA - se pasó a cada fruto un cepillo de cerdas blandas dos o tres veces, imitando los cepillos de una máquina de packing. Luego se procedió como en tratamiento tres.
- 5) HERIDA + GOTA - Con una aguja se realizó una herida de 2-3 mm de profundidad, simulando heridas que recibe el fruto durante la cosecha, clasificación, transporte, venta, y sobre la herida se procedió como en tratamiento tres.

Para efectuar cada tratamiento se tomaron bandejas al azar identificándolas inmediatamente. Luego de realizados los tratamientos, a cada bandeja se le colocó una bolsa de nylon (cuidando que no tomara contacto con la fruta) para asegurar condiciones de alta humedad. A los tres días se comenzó la evaluación tal como se detalla en el ítem 3.4.

3.2 ENSAYO N° 2: APLICACIONES DE CaCl₂ PRECOSECHA Y *Bacillus subtilis* POSTCOSECHA PARA EL CONTROL DE *Monilinia fructicola* EN POSTCOSECHA

En este ensayo se realizaron aplicaciones de CaCl₂ en el monte, previo a cosecha con el fin de evaluar su capacidad para controlar la ocurrencia de podredumbre morena en postcosecha. Además se efectuaron baños con *Bacillus subtilis* en postcosecha con el mismo fin. Ambos tipos de tratamientos fueron evaluados solos o en aplicaciones combinadas con Rovral.

3.2.1 Tratamientos precosecha

Esta prueba se llevó a cabo en un monte variedad "Rey del Monte". Se estimó una fecha probable de cosecha y se proyectaron aplicaciones de CaCl₂ quincenales, a partir de un mes antes de la misma (Cuadro 1). Cada tratamiento fue realizado sobre una fila de 32 plantas en la zona central del monte, dejando una fila libre entre ambos. Para las aplicaciones se utilizó una pulverizadora con puntero manual. El caldo fue aplicado a punto de goteo (2000 lts/há) con una dosis de 0.5% de CaCl₂. El producto comercial utilizado fue Stippen.

Cuadro 1: Aplicaciones de CaCl₂ en monte a dosis de 0,5% (10 kg./ha.)

Tratamiento	N° aplicaciones	Fecha de aplicación		Fecha probable de cosecha
1	0	----	----	13/01/98
2	1	----	30/12/97	13/01/98
3	2	17/12/97	30/12/97	13/01/98

3.2.2 Etapa postcosecha

La primer semana de enero se comenzó a cosechar la fruta (adelantándose respecto a lo previsto), considerando como parámetros de cosecha fundamentalmente color de fondo y además tamaño y presión al tacto. Inmediatamente al repase realizado el día 8/01/98, se seleccionaron por uniformidad de tamaño, madurez y sanidad, 320 frutos de la fila que había recibido una aplicación de CaCl₂, la misma cantidad de frutos de la fila que había recibido dos aplicaciones de este producto y 400 del resto del monte (sin aplicaciones de CaCl₂). Posteriormente fueron trasladados a INIA "Las Brujas".

Al llegar a la estación experimental, se distribuyeron los frutos de a 20 sobre maples de cartón. Las frutas con una y dos aplicaciones se distribuyeron en 16 maples cada uno, en tanto el resto en 20 maples. De cada grupo (sin, una y dos aplicaciones de CaCl_2 en campo), los frutos de cuatro maples se utilizaron para medir parámetros de cosecha y contenido de calcio. Todos los maples fueron previamente sorteados para asegurar una distribución al azar de los tratamientos. La fruta para los tratamientos postcosecha fue puesta con el cachete más rojo hacia arriba, dibujándole un círculo similar al ensayo anterior con el mismo objetivo.

Los maples para dichos tratamientos fueron colocados de a dos, en cajas de plástico y llevadas a una de las cámaras de frío de INIA "Las Brujas" de atmósfera regular (0°C y 95-100% de HR) hasta el día siguiente.

3.2.2.1 Medición de parámetros de cosecha y contenido de calcio

Los frutos asignados a estos objetivos, se trasladaron al laboratorio de postcosecha para realizar las mediciones. Cada tratamiento precosecha (sin aplicación de CaCl_2 , 1 aplicación de CaCl_2 y 2 aplicaciones de CaCl_2) consistió en cuatro repeticiones de 20 frutos cada uno.

Los parámetros de cosecha medidos fueron:

1. Sobrecolor (rojo y rojo difuso)
2. Color de fondo
3. Presión
4. Contenido de sólidos solubles

Los frutos de cada bandeja se numeraron del 1 al 20. Primeramente a cada fruto se le estimó visualmente el porcentaje de sobrecolor rojo y/o rojo difuso. Con un colorímetro MINOLTA se midió color de fondo. Este colorímetro utiliza el sistema $A(L^*a^*b^*)$ CIE 1976 (Commission Internationale de L'Éclairage). Este sistema mide diferencias donde L^* es un factor de luminosidad y a^* y b^* , coordenadas colorimétricas. El área de medición es de tres milímetros de diámetro, con un ángulo de iluminación de 45° .

Con un pelador manual se extrajo un trozo de cáscara de cada cachete y de la sutura. Luego se midió la presión en los tres puntos con un presiómetro de mesa con un émbolo de seis milímetros de diámetro. Inmediatamente se recogió con un refractómetro el jugo que quedaba en el émbolo para medir el contenido de sólidos solubles, limpiando el émbolo luego de cada medición con papel y lavándolo con agua después de cada repetición. El refractómetro utilizado fue ATAGO, con una escala de 0 a 32°Brix .

Para determinar el nivel de calcio, al finalizar estas mediciones cada fruta fue cuidadosamente lavada con agua corriente y luego pelada lo más fino posible, extrayendo y picando un trozo de pulpa de la zona de la sutura. Con éste material se formaron muestras compuestas de las cáscaras por un lado (40 g.), y las pulpas por otro (80 g.), para cada repetición. Éstas muestras se colocaron en cajas de petri y se llevaron a estufa de aire forzado a 75°C. Luego de lograr una total deshidratación (aproximadamente cinco días), las muestras fueron retiradas de la estufa y se molieron con un mortero mecánico, hasta obtener un polvo. Entre cada muestra, el mortero era cuidadosamente limpiado. Las muestras molidas se colocaron en bolsitas de nylon y se enviaron al laboratorio de suelos de para realizar la medición. El análisis consistió en calcinación de la muestra, dilución en reactivos y lectura en espectrofotómetro de absorción atómica.

3.2.2.2 Preparación de inóculo

La suspensión de inóculo para los tratamientos postcosecha fue preparado el mismo día en que se realizaron dichos tratamientos, a partir de seis frutos de duraznos variedad "Rey del Monte" infectados cuatro días antes, de igual forma que en el ensayo N° 1. En este caso el inóculo inicial fue obtenido de un fruto enfermo extraído de un monte comercial de la variedad "Rey del Monte".

La suspensión de inóculo fue preparada de forma similar al ensayo N° 1, quedando finalmente una concentración de 3×10^5 esporas por mililitro.

3.2.2.3 Tratamientos postcosecha

El día 9/1/98 (al otro día de la cosecha) se retiraron las cajas con los maples de la cámara y fueron llevados a los laboratorios de fitopatología, distribuyéndose las maples al azar sobre las mesas y mesadas (figura 1). En este momento se efectuaron los baños postcosecha completando los tratamientos del ensayo, siendo un total de 10 *tratamientos* con cuatro repeticiones de 20 frutos cada uno (cuadro 2).

Cuadro 2: Tratamientos efectuados en el ENSAYO N° 2

N°	Tratamientos	Dosis en baños (g/10 lt.)	Tiempo de baño (min.)
1	Testigo (Sin aplicación de CaCl ₂ en campo + baño de agua sola)	-----	1
2	Sin aplicación de CaCl ₂ en campo + baño de Rovral	10,0 *1	1
3	1 aplicación de CaCl ₂ en campo + baño con agua sola	-----	1
4	1 aplicación de CaCl ₂ en campo + baño 1/2 dosis de Rovral	5,0	1
5	1 aplicación de CaCl ₂ en campo + baño con Rovral	10,0	1
6	2 aplicaciones de CaCl ₂ en campo + baño con agua sola	-----	1
7	2 aplicaciones de CaCl ₂ en campo + baño con 1/2 dosis de Rovral	5,0	1
8	2 aplicaciones de CaCl ₂ en campo + baño con Rovral	10,0	1
9	Sin aplicación de CaCl ₂ en campo + baño de <i>B. subtilis</i>	100,0 *2	1
10	Sin aplicación de CaCl ₂ en campo + baño con 1/2 dosis de <i>B. subtilis</i> y 1/2 dosis de Rovral	50,0 5,0	1

*1 La dosis de Rovral utilizada es la recomendada por la Guía Sata para baños postcosecha (Modernel, 1996).

*2 La dosis de *B. subtilis* (MB1600) utilizada fue la recomendada por LAGE y Cía S.A; cada gramo del formulado contiene 1×10^{10} esporas

Para efectuar cada baño se procedió de la siguiente forma: un balde de 20 litros de capacidad fue llenado con 10 litros de agua corriente medidos con una probeta de un litro de capacidad. Luego se diluyó el producto correspondiente revolviendo con una varilla para favorecer la dilución. Los diferentes productos fueron pesados con una balanza de precisión. En una bolsa de rejilla se colocaron los frutos de una repetición y se sumergieron en la solución preparada o agua sola (según el tratamiento) el tiempo establecido; posteriormente se colocaron nuevamente en el maple. Al cambiar de tratamiento el balde y la rejilla eran enjuagados con abundante agua.

Terminados los baños, se esperaron dos horas y luego se procedió a la inoculación. El método de inoculación utilizado fue el correspondiente al tratamiento N° 4 del ensayo anterior, cepillo + gota, cambiando el puntero de la micropipeta al cambiar de tratamiento.

Inmediatamente a la inoculación se embolsó cada maple con una bolsa de nylon para otorgar condiciones de alta humedad, permaneciendo en este estado de cinco a seis horas (figura 2). Finalmente se retiraron las bolsas, se colocaron los maples de a dos en las chatas y se llevaron a la cámara nuevamente durante una semana.

El día 16/01/98 se retiró el ensayo de la cámara y se efectuó la primer evaluación como se detalla en el ítem 3.4, la cual se continuó cada dos días hasta el 24/01.

3.3 ENSAYO N° 3: BAÑOS DE SALES DE CALCIO PARA EL CONTROL POSTCOSECHA DE *Monilinia fructicola*

Este último ensayo fue realizado con el fin de evaluar la capacidad de diferentes sales de calcio aplicadas en baños para controlar el desarrollo de podredumbre morena en postcosecha .

Se emplearon 480 frutos de la variedad "Rey del Monte" seleccionados de la cosecha del día 15/01/98 (utilizando los mismos criterios del ensayo anterior). Inmediatamente fueron transportados a uno de los laboratorios de fitopatología de la estación experimental donde se instaló el ensayo.

Los frutos fueron colocados de a 10 en 48 maples de cartón agrupándolos por uniformidad de tamaño. Los maples habían sido previamente sorteados para asegurar una distribución al azar de los tratamientos.

3.3.1 Preparación de inóculo

El inóculo fue preparado de forma similar al ensayo anterior.

3.3.2 Tratamientos efectuados

El número de tratamientos realizados fue de seis, cada tratamiento incluyó ocho maples de 10 frutos cada uno. De los ocho, cuatro fueron utilizados para evaluar el efecto de las sales de calcio en el control de *M. fructicola* y los cuatro restantes para evaluar el contenido de calcio de la fruta luego de efectuados los tratamientos. De esta forma quedaron establecidos seis tratamientos con cuatro repeticiones de 10 frutos para cada uno de los objetivos. El cuadro 3 especifica los tratamientos efectuados.

Cuadro 3: Tratamientos efectuados en el ENSAYO N° 3

N°	Tratamientos	Dosis de la Sal (g/10 lt.)	Dosis de Calcio (g/10 lt.)	Tiempo de Baño (min.)
1	Testigo (baño de agua sola)	0,0	0,0	10
2	Oxido de calcio	12,0	8,5	10
3	Hidróxido de calcio	12,0	6,5	10
4	Silicato de calcio	12,0	4,1	10
5	Propionato de calcio	12,0	3,7	10
6	Cloruro de calcio	12,0*	4,3	10

*unidades: cc/10 lt.

Los baños fueron efectuados siguiendo los mismos pasos que en el ensayo N° 2, excepto el tiempo de exposición que fue de 10 minutos. En cada baño se sumergieron conjuntamente los duraznos para evaluar el control de la enfermedad y los duraznos para estimar el contenido de calcio, correspondientes a cada repetición.

Finalizados los baños, se dejó transcurrir 1:30 horas antes de iniciar la inoculación de la fruta, la cual se realizó con la misma metodología que en el ensayo anterior.

Los maples fueron inmediatamente embolsados y mantenidos así durante cinco a seis horas. Para evitar que las bolsas tocan los frutos, se colocó en cada maple una varilla en el centro. Retiradas las bolsas, toda la fruta (inoculada y no inoculada) fue llevada a la cámara de frío en chatas higienizadas con dos maples cada una, durante siete días.

El día 22/01 se retiraron de cámara y se trasladaron a uno de los laboratorios de fitopatología donde se comenzó la evaluación, la cual se realizó cada dos días siendo la primera al momento de salida de cámara, y la última el 30/01. El día de retirados de cámara también se procesaron las muestras para determinar el contenido de calcio.

3.4 EVALUACIÓN DE LOS ENSAYOS

Los parámetros medidos para cuantificar la cantidad y evolución de la enfermedad fueron: incidencia (% de fruta infectada) y severidad (tamaño de la mancha).

Para evaluar la incidencia se cuantificó en cada fecha el número de duraznos que presentaban mancha, en tanto la severidad fue evaluada a través de la medición del diámetro de cada mancha. Ésta última medida fue obtenida promediando el diámetro

mayor con el menor, utilizando una regla con una precisión de un milímetro, la cual se desinfectaba con alcohol luego de cada medición. En el ensayo N° 1 para evaluar la severidad, se promedió el diámetro de todas las manchas que se ubicaban dentro del círculo en el caso de pulverización.

En cada maple, las frutas fueron medidas siguiendo siempre el mismo orden, teniendo de este modo correctamente identificado cada durazno en cada fecha de evaluación; descartando las manchas que aparecían fuera del círculo. Los frutos que se infectaban totalmente con *Monilinia* sp. u otro patógeno, eran eliminados.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar la evaluación estadística de los ensayos, se utilizó el programa estadístico S.A.S (Statistical Analysis System, v.6.12. 1997; S.A.S. Institute, Cary, N.C. U.S.A.).

Para la variable severidad, así como los parámetros de calidad y contenido de calcio, no hubo efecto significativo de las repeticiones (con un nivel de significancia de 0,1). Las repeticiones no se consideraron en los análisis.

La variable discreta incidencia, presenta una distribución binomial, tomando los valores 0 ó 1. Para poder evaluar esta variable, se hizo una transformación logística para obtener un modelo lineal y evitar el problema de varianzas heterogéneas.

Transformación logística:

$$\text{Log}(p/1-p) = u + \text{tra.} + \text{día} + \text{tra.} \times \text{día}$$

$$p = \frac{e^{u + \text{tra.} + \text{día} + \text{tra.} \times \text{día}}}{1 + e^{u + \text{tra.} + \text{día} + \text{tra.} \times \text{día}}}$$

Tanto para el análisis de varianza, como para la separación de medias (cuando existió efecto de tratamiento), se usó la prueba de razón de verosimilitud (χ^2 cuadrado). En ambos casos el nivel de significancia utilizado fue de 0,1.

Las variables continuas, severidad, parámetros de cosecha y contenido de calcio, se aproximan a una distribución normal. Los modelos utilizados para evaluar estas variables fueron los siguientes:

Severidad: $y = u + \text{tra.} + \text{día} + \text{tra.} \times \text{día} + E$

Parámetros de cosecha y contenido de calcio: $y = \bar{u} + tra. + E$

El análisis de varianza se realizó utilizando la prueba F. Cuando ésta detectó efecto tratamiento, se realizó la prueba T para detectar diferencias entre efectos, utilizando también para ambas pruebas un nivel de significancia de 0,1.

En las variables discretas, se usó máxima verosimilitud como método de estimación, mientras que para las continuas se usó máxima verosimilitud restringida.

3.6 IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE DEL GÉNERO DE *Monilinia* UTILIZADA COMO INÓCULO

Para determinar la especie de *Monilinia* utilizada como inóculo en los ensayos dos y tres, se utilizó la prueba OA. Para ello se sembró en una placa de petri con medio OA la especie desconocida y se rodeó con *M. laxa* llevándolo a estufa a 20°C. Luego de 10 días se observó el resultado.

Figura 1: Instalación del ENSAYO N° 2



Figura 2: Embolsado de las bandejas



4. RESULTADOS

4.1 ENSAYO N° 1

4.1.1 Incidencia

Todos los métodos de inoculación evaluados fueron efectivos, logrando niveles de infección cercanos al 100% a los seis días de efectuados. Los tratamientos herida + gota, pulverización y cepillo + gota tuvieron el mejor comportamiento en el promedio de todas las fechas. Sin embargo se destaca que el tratamiento herida + gota ya en la primer evaluación alcanzó el 100% de incidencia.

Cuadro 4: Porcentaje promedio de fruta infectada por *Monilinia* sp. en cada tratamiento en las diferentes fechas y promedio de todas las fechas para cada tratamiento .

Tratamientos	Incidencia (%)			
	19/12/97	20/12/97	22/12/97	Promedio*2
1) Testigo	3,3	3,3	6,7	4,4 c
2) Pulverización	86,7	93,3	100,0	93,3 a
3) Gota	46,7	53,3	90,0	63,3 b
4) Cepillo + Gota	70,0	83,3	96,7	83,3 a
5) Herida + Gota	100,0	100,0	100,0	100,0 a

*Porcentajes seguidos por la misma letra, no difieren estadísticamente (prueba ji cuadrado; 0,10)

*2 Al no existir interacción fecha-tratamiento, se realizó el análisis de separación de medias para el promedio de todas las fechas

4.1.2 Severidad

En la tercer fecha de evaluación (22/12) no se midió severidad debido a que la mayoría de los frutos estaban casi totalmente cubiertos por podredumbre morena.

El tratamiento herida + gota alcanzó el mayor tamaño de mancha, con un diámetro de casi 6,0 cm. a los cuatro días de efectuados las inoculaciones. El resto de los tratamientos tuvieron igual nivel de severidad al comienzo, pero luego el tratamiento pulverización sufrió un mayor crecimiento, superándolos en 2,0 cm. aproximadamente.

Existió dificultad en la evaluación del tratamiento pulverización a causa del desarrollo de más de una mancha en la mayoría de los frutos evaluados.

Cuadro 5: Diámetro promedio de las manchas por tratamiento en las diferentes fechas

Tratamientos	Severidad (cm.)		
	19/12/97	20/12/97	22/12/97* ²
1) Testigo* ¹	2,0 a	3,0 a	-----
2) Pulverización	2,7 a	4,7 b	-----
3) Gota	2,4 a	2,6 a	-----
4) Cepillo + Gota	2,1 a	2,7 a	-----
5) Herida + Gota	4,2 b	5,8 c	-----

* Diámetros seguidos por la misma letra, no difieren estadísticamente (prueba T; 0,10)

*¹ Este diámetro corresponde a un solo fruto

*² No se midió severidad debido a que la mayoría de los frutos se encontraban casi totalmente cubiertos por la podredumbre

4.2 ENSAYO N° 2

4.2.1 Parámetros de cosecha

Las aplicaciones de CaCl₂ no modificaron los parámetros de cosecha, con excepción de los Sólidos Solubles.

4.2.1.1 Color de fondo y Sobrecolor

Los valores L* a* b* estimados determinaron que el color de fondo de cosecha fue verde-amarillento. El sobrecolor rojo correspondió a un porcentaje promedio de 27%, en tanto para rojo difuso este promedio fue algo menor, 23%. Prácticamente todos los frutos presentaban ambos tipos de sobrecolor.

Cuadro 6: Valores promedios L* a* b* determinantes del color de fondo y porcentajes promedio de sobrecolor por tratamiento precosecha

Tratamientos	Color de Fondo			Sobrecolor (%)	
	L*	a*	b*	Rojo	Rojo Difuso
1) sin aplicación CaCl ₂ en campo	68,85 a	-7,81 a	51,59 a	28,5 a	23,6 a
2) 1 aplicación CaCl ₂ en campo	68,15 a	-8,51 a	51,01 a	26,8 a	22,8 a
3) 2 aplicaciones CaCl ₂ en campo	67,95 a	-8,44 a	50,61 a	25,5 a	23,5 a

*Valores seguidos por la misma letra, no difieren estadísticamente (prueba T; 0,10)

4.2.1.2 Presión

Si bien no hubo diferencias significativas entre tratamientos, se destaca que aquellos que recibieron aplicaciones de CaCl_2 , tienden a soportar mayor presión tanto en la zona de cachete como de sutura (aproximadamente una libra).

Cuadro 7: Presión promedio de cosecha

Tratamientos	Presión de cachete (lb.)	Presión de sutura (lb.)
1) Sin aplicación CaCl_2 en campo	11,76 a	9,96 a
2) 1 aplicación CaCl_2 en campo	12,84 a	10,85 a
3) 2 aplicación CaCl_2 en campo	12,74 a	10,96 a

*Valores seguidos por la misma letra, no difieren estadísticamente (prueba T; 0,10)

4.2.1.3 Contenido de Sólidos Solubles

Los duraznos que recibieron una aplicación de CaCl_2 en campo, alcanzaron el menor contenido de sólidos solubles al momento de la cosecha. Con dos aplicaciones, la tendencia observada fue la misma, aunque no llegó a ser significativa.

Cuadro 8: Contenido promedio de sólidos solubles

Tratamientos	Sólidos solubles (° Brix)
1) Sin aplicación CaCl_2 en campo	10,16 a
2) 1 aplicación CaCl_2 en campo	9,45 b
3) 2 aplicación CaCl_2 en campo	9,88 a

*Valores seguidos por la misma letra, no difieren estadísticamente (prueba T; 0,10)

4.2.2 Contenido de Calcio

El contenido de calcio de la cáscara se vio incrementado en los duraznos que recibieron CaCl_2 . Este efecto fue mayor en los frutos con dos aplicaciones, diferenciándose en 0,030% del testigo. En la pulpa, si bien no ocurrieron diferencias estadísticas, existe una tendencia a un mayor nivel cuando se realizaron las aplicaciones.

Cuadro 9: Contenido de Calcio promedio en cáscara y pulpa para los diferentes tratamientos precosecha

Tratamientos	Calcio en cáscara (%)	Calcio en pulpa (%)
1) Sin aplicación CaCl ₂ en campo	0,135 a	0,080 a
2) 1 aplicación CaCl ₂ en campo	0,150 ab	0,095 a
3) 2 aplicación CaCl ₂ en campo	0,165 b	0,085 a

*Porcentajes seguidos por la misma letra, no difieren estadísticamente (prueba T; 0,10)

4.2.3 Incidencia

La mayoría de los tratamientos lograron disminuir el porcentaje de frutos afectados en relación al testigo, lo que se vio acentuado con el transcurso del tiempo.

Cuadro 10: Porcentaje promedio de fruta infectada por *M. fructicola*. en cada tratamiento en las diferentes fechas

Tratamientos	Incidencia (%)				
	16/01/98	18/01/98	20/01/98	22/01/98	24/01/98
1) Testigo (baño agua sola)	7,59 c	32,91 ab	43,04 bcd	59,49 f	74,68 d
2) Sin aplic. CaCl ₂ campo + baño Rovral	2,50 bc	47,50 cd	47,50 cd	48,75 cdef	48,75 b
3) 1 aplic. CaCl ₂ campo	0,00 a	36,25 abc	43,75 bcd	55,00 ef	66,25 cd
4) 1 aplic. CaCl ₂ campo + baño 1/2 dosis Rovral	6,25 c	41,25 bcd	41,25 bcd	45,00 bcde	46,25 b
5) 1 aplic. CaCl ₂ campo + baño Rovral	0,00 a	26,92 a	26,92 a	26,92 a	29,49 a
6) 2 aplic. CaCl ₂ campo	1,27 ab	26,58 a	37,97 abc	56,96 ef	62,03 c
7) 2 aplic. CaCl ₂ campo + baño 1/2 dosis Rovral	2,50 bc	35,00 ab	35,00 ab	35,00 ab	37,50 ab
8) 2 aplic. CaCl ₂ campo + baño Rovral	0,00 a	36,25 abc	36,25 abc	38,75 bc	38,75 ab
9) Sin aplic. CaCl ₂ campo + baño <i>B. Subtilis</i>	1,28 ab	48,72 d	52,56 d	53,85 def	61,54 c
10) Sin aplic. CaCl ₂ campo + baño 1/2 dosis <i>B. Subtilis</i> y 1/2 dosis Rovral	2,50 bc	38,75 bcd	40,00 bcd	42,50 bcd	45,00 b

*Porcentajes seguidos por la misma letra, no difieren estadísticamente (prueba ji cuadrado; 0,10)

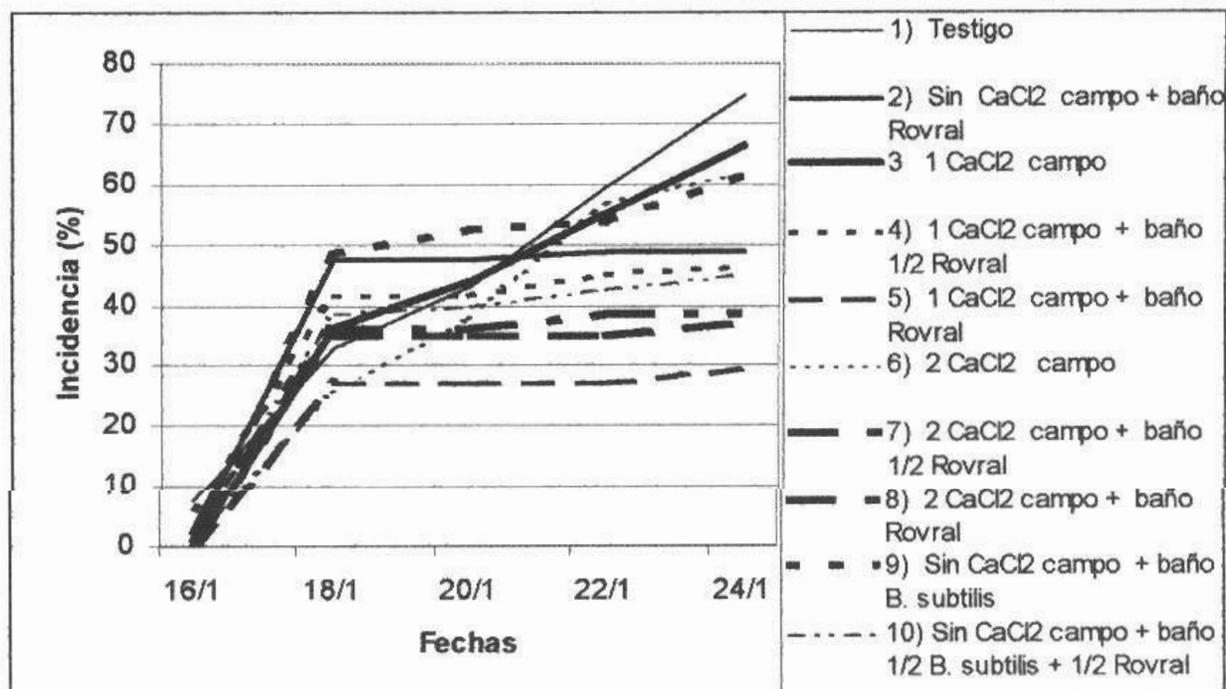
Los tratamientos más efectivos del ensayo fueron los que combinaron Rovral a dosis entera con aplicaciones de CaCl_2 y media dosis de Rovral más dos aplicaciones de CaCl_2 , con un promedio de 35,3 % de frutos infectados.

No ocurrieron diferencias estadísticas entre el nivel de incidencia de la combinación de media dosis de Rovral con una o dos aplicaciones de CaCl_2 , o media dosis de *B. subtilis*, y Rovral a dosis entera.

Las pulverizaciones de CaCl_2 si bien lograron una tendencia a un mejor comportamiento, no se diferenciaron del testigo, excepto el tratamiento con dos aplicaciones en la última evaluación (12,5% menor).

El baño con *B. subtilis* tampoco disminuyó la cantidad de frutos afectados, con excepción de la última fecha donde logró un 13,1% menos de incidencia. Sobre éstos frutos además, quedó visible el residuo del producto utilizado observándose manchas de polvo blanquecino (figura 5). Al momento de retirados de cámara presentaban cierto grado de deshidratación que se fue acentuando a medida que transcurrían los días (figura 6). Ambos efectos también ocurrieron en el tratamiento con media dosis de *B. subtilis* y media de Rovral, pero menos pronunciados.

Figura 3: Evolución de la incidencia por tratamiento a través de las fechas de evaluación



Al momento de retirados de cámara, todos los tratamientos presentaron escasos o nulos niveles de infección, sufriendo un importante incremento entre la primer y segunda evaluación (mínimo 24%). A partir de esta fecha la incidencia de los tratamientos con Rovral se estabilizó, mientras que continuó incrementándose en el resto (figura 3).

4.2.3 Severidad

Todos los tratamientos se diferenciaron del testigo. Los que recibieron baño de Rovral, ya sea media o dosis entera (independientemente de haber recibido previamente una, dos o ninguna aplicación de CaCl₂ o *B. subtilis*), tuvieron la menor severidad del ensayo, llegando a un diámetro máximo de mancha de 0,6 cm. en la última fecha evaluada. Se resalta además que estas manchas no presentaban el típico aspecto acuoso de las manchas de podredumbre morena, sino que tendían a ser secas. El resto de los tratamientos alcanzaron tamaños de mancha superiores a 2,0 cm. Los frutos bañados con *B. subtilis* tuvieron finalmente un diámetro de 2,12 cm., siguiéndole a estos los pulverizados con CaCl₂ con un promedio de 3,6 cm. Por último el testigo alcanzó la mayor severidad superando 5,0 cm de diámetro.

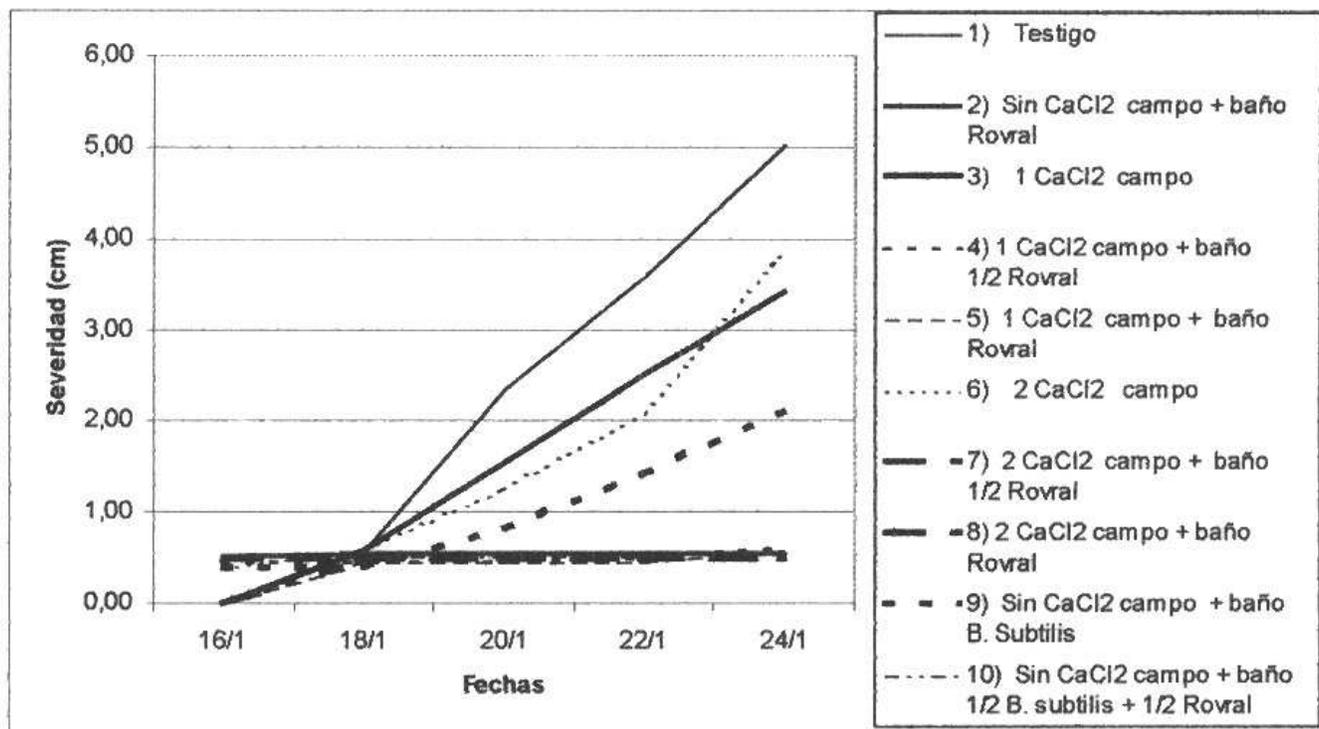
Cuadro 11: Diámetro promedio de las manchas por tratamiento en las diferentes fechas

Tratamientos	Severidad (cm.)				
	16/01/98	18/01/98	20/01/98	22/01/98	24/01/98
1) Testigo (baño agua sola)	0,48 b	0,55 bc	2,35 c	3,56 d	5,02 d
2) Sin aplic. CaCl ₂ campo + baño Rovral	0,52 b	0,53 bc	0,53 a	0,53 a	0,53 a
3) 1 aplic. CaCl ₂ campo	0,00	0,59 c	1,54 d	2,50 c	3,41 c
4) 1 aplic. CaCl ₂ campo + baño 1/2 dosis Rovral	0,44 ab	0,44 ab	0,45 a	0,49 a	0,60 a
5) 1 aplic. CaCl ₂ campo + baño Rovral	0,00	0,44 ab	0,44 a	0,45 a	0,57 a
6) 2 aplic. CaCl ₂ campo	0,37 a	0,59 c	1,26 c	2,07 c	3,83 c
7) 2 aplic. CaCl ₂ campo + baño 1/2 dosis Rovral	0,50 b	0,50 abc	0,50 a	0,50 a	0,50 a
8) 2 aplic. CaCl ₂ campo + baño Rovral	0,00	0,49 ab	0,49 a	0,49 a	0,49 a
9) Sin aplic. CaCl ₂ campo + baño <i>B. Subtilis</i>	0,41 ab	0,41 a	0,82 b	1,43 b	2,12 b
10) Sin aplic. CaCl ₂ campo + baño 1/2 dosis <i>B. Subtilis</i> y 1/2 dosis Rovral	0,51 b	0,51 bc	0,51 a	0,51 a	0,56 a

*Diámetros seguidos por la misma letra, no difieren estadísticamente (prueba T; 0,10)

La figura 4 muestra cómo aquellos tratamientos que recibieron Rovral, no sufrieron un crecimiento en el tamaño de mancha al transcurrir los días, mientras que los restantes fueron aumentando el tamaño con diferentes tasas de crecimiento.

Figura 4: Evolución del diámetro promedio de manchas a través de las fechas de evaluación por tratamiento



4.3 ENSAYO N° 3

4.3.1 Contenido de calcio

Los frutos bañados con las sales alcanzaron mayores contenidos de calcio en cáscara en relación al testigo. Óxido, hidróxido y cloruro de calcio, fueron los que se diferenciaron más, superando al testigo en 0,030% en promedio. El contenido de calcio de la pulpa fue similar en todos los tratamientos.

Cuadro 12: Contenido de Calcio promedio en cáscara y pulpa para los diferentes tratamientos precosecha

Tratamientos	Calcio en cáscara (%)	Calcio en pulpa (%)
1) Testigo	0,115 c	0,073 a
2) Oxido de calcio	0,143 ab	0,073 a
3) Hidróxido de calcio	0,155 a	0,078 a
4) Silicato de calcio	0,135 b	0,073 a
5) Propionato de calcio	0,135 b	0,075 a
6) Cloruro de calcio	0,142 ab	0,080 a

*Valores seguidos por la misma letra, no difieren estadísticamente (prueba T; 0,10)

4.3.2 Incidencia

El análisis de varianza no encontró diferencias entre las incidencias de los tratamientos. Los baños con sales de calcio no fueron efectivos en disminuir el porcentaje de frutos afectados respecto al testigo.

Cuadro 13: Porcentaje promedio de fruta infectada por *M. fructicola* en cada tratamiento en las diferentes fechas

Tratamientos	Incidencia (%)				
	22/1/98	24/1/98	26/1/98	28/1/98	30/1/98
1) Testigo	5,1	15,4	38,5	41,0	53,9
2) Oxido de calcio	5,4	8,1	32,4	40,5	40,5
3) Hidróxido de calcio	7,8	13,2	23,7	31,6	34,2
4) Silicato de calcio	2,8	11,1	27,8	33,3	44,8
5) Propionato de calcio	0,0	13,5	40,5	40,5	43,2
6) Cloruro de calcio	2,5	15,0	25,0	37,5	47,5

Si bien estadísticamente los tratamientos fueron iguales, exceptuando la primer evaluación, existe una tendencia a un mejor comportamiento de los frutos bañados con las sales, siendo más notorio en los tratamientos óxido e hidróxido de calcio en la última evaluación.

Luego de los baños se observó sobre los frutos tratados con silicato y óxido de calcio, un polvillo blanquecino como consecuencia de la deposición del producto, pero de mucho menor notoriedad que lo provocado por MBI600 (figura 7).

4.3.3 Severidad

El análisis de varianza tampoco detectó diferencias entre las severidades de los tratamientos. Ninguna de las sales fue efectiva en disminuir el tamaño de mancha.

Cuadro 14: Diámetro promedio de las manchas por tratamiento en las diferentes fechas

Tratamientos	Severidad(cm.)				
	22/01/98	24/01/98	26/01/98	28/01/98	30/01/98
1) Testigo	0,50	0,66	2,13	3,13	3,55
2) Oxido de calcio	0,37	0,70	1,69	1,82	3,17
3) Hidróxido de calcio	0,99	1,23	1,68	2,62	4,70
4) Silicato de calcio	0,94	0,82	1,24	1,78	2,79
5) Propionato de calcio	0,00	0,94	1,58	2,67	4,53
6) Cloruro de calcio	0,00	0,73	2,84	3,12	4,81

4.4 IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE DEL GÉNERO DE *Monilinia*

El resultado indica que la especie utilizada como inóculo en los ensayos dos y tres fue *M. fusicola*. En la zona de contacto entre *M. laxa* y la especie de *Monilinia* desconocida, se observó una nítida línea negra de interacción, la cual se fue acentuando a medida que transcurrían los días (figura 8).

Figura 5: Manchas en frutos tratados con MBI600



Figura 6: Deshidratación en frutos tratados con MBI600

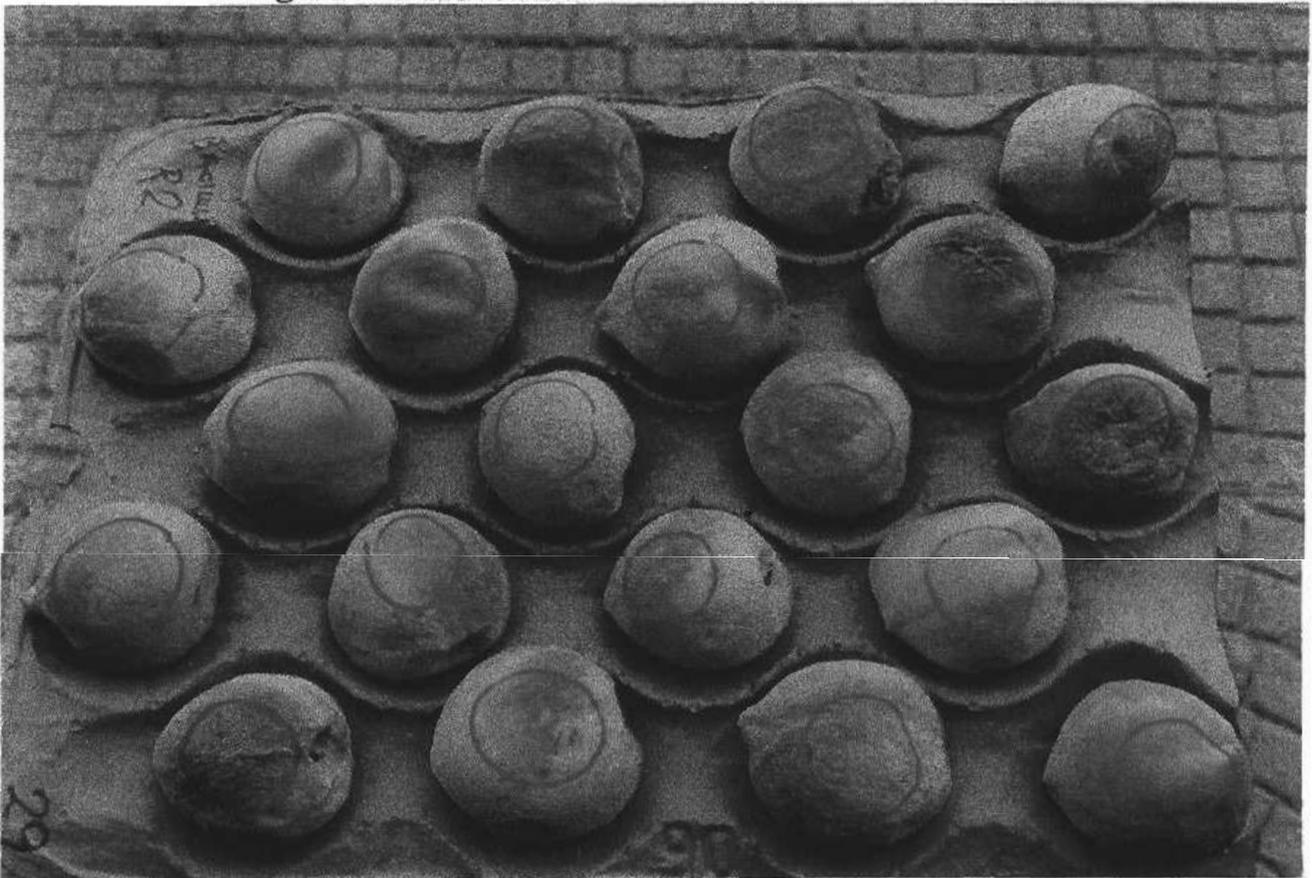
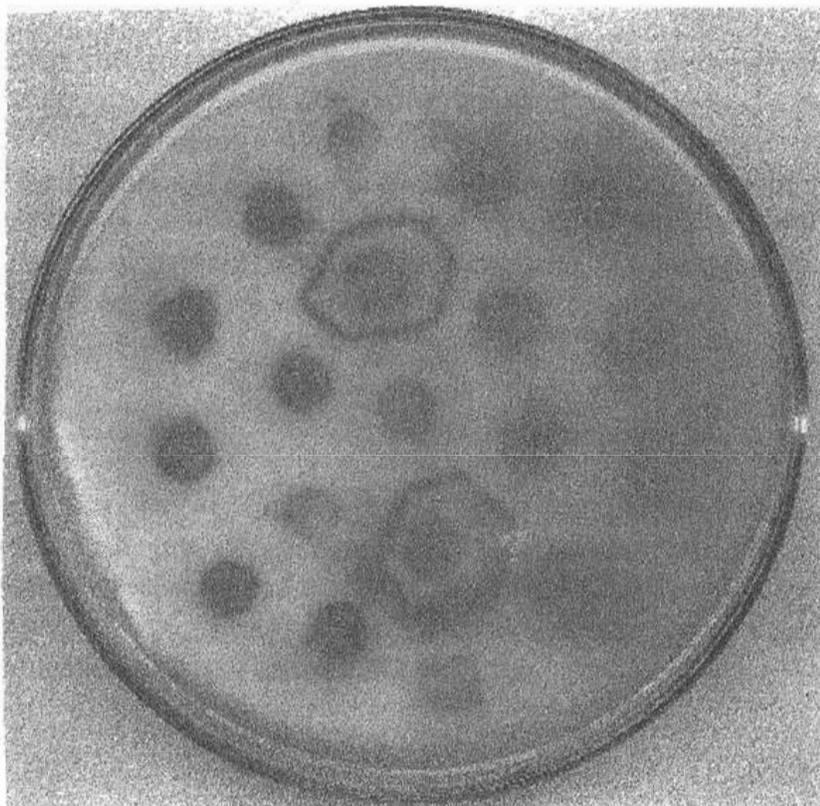


Figura 7: Manchas en frutos tratados con silicato de calcio



Figura 8: Identificación de la especie de *Monilinia* utilizada en los ensayos 2 y 3



5. DISCUSIÓN

5.1 ENSAYO N°1

El mejor comportamiento del tratamiento herida + gota, se debió seguramente a que la herida provocada facilitó la penetración del hongo (Agrios, 1995), esto explica por qué, ya desde la primer fecha, el porcentaje de frutos infectados fue de 100% y las manchas fueron las de mayor tamaño. En el tratamiento cepillo + gota, las heridas imperceptibles provocadas por el cepillo seguramente también facilitaron la penetración del hongo, aunque no lo suficiente como para alcanzar el máximo porcentaje de infección ni tamaños de mancha tan grandes como en el caso anterior.

En el tratamiento pulverización, si bien la concentración de inóculo utilizada fue igual que en el resto de los tratamientos, se aplicó un mayor número total de conidios, cubriendo en cada pulverización prácticamente la totalidad del área encerrada en el círculo marcado. Esto aumentó la posibilidad de ocurrencia de infección en cada fruto, lo que se tradujo en casi un 100% de incidencia en la última fecha. La mayor severidad registrada se puede explicar por la coalescencia de manchas cercanas entre sí al pasar de la primera a la segunda evaluación.

La infección por *Monilinia* sp. que ocurrió en la fruta no inoculada (testigo) se debió seguramente a infecciones latentes (Mondino et al, 1997; Fernández, 1978) y/o a esporas que provenían del campo.

Todos los tratamientos fueron efectivos en lograr altos porcentajes de infección. El tratamiento cepillo + gota se seleccionó como el más adecuado para ser utilizado en los siguientes ensayos debido a: -los altos niveles de infección alcanzados desde la primer fecha de evaluación (70%), -el grado de agresividad de la herida se asemeja más a lo que normalmente ocurre sobre los frutos en una producción comercial, -permite una evaluación práctica al desarrollarse sólo una mancha, -la cantidad de inóculo a preparar es menor que en el caso de pulverización.

5.2 ENSAYO N°2

Las aplicaciones de CaCl_2 no afectaron los parámetros de cosecha, lo cual coincide con lo citado por Campos et al (1991) donde aun con seis aplicaciones e igual dosis no lograron afectar el color de fondo, el sobrecolor ni la presión. Los sólidos solubles en este ensayo, sí se vieron afectados disminuyendo su nivel, lo que no concuerda con lo obtenido por estos autores.

El incremento en el contenido de calcio en la cáscara de los tratamientos que recibieron las pulverizaciones con CaCl_2 , indican que la piel de la fruta logró absorber este nutriente. La no ocurrencia de incrementos en la pulpa, concuerda con lo obtenido por Conway et al (1987a), donde aún con dosis de 68 kg./ha. y diez aplicaciones de CaCl_2 obtuvieron el mismo resultado, y sólo con la dosis más alta (102 kg./ha.) lograron aumentarlo. Sin embargo la tendencia a un mayor nivel estaría indicando que una parte del calcio absorbido puede haber pasado a la pulpa. Es posible que se haya incorporado a las paredes celulares fortaleciéndolas (Conway et al 1984), lo que se reflejó en un mayor nivel de presión tanto en cachete como sutura. El nivel de calcio medido en la pulpa de los duraznos sin aplicación, coincide con el valor normal de este nutriente en la porción comestible del durazno (0,082% en peso seco) citado por Westwood (1982).

La combinación de Rovral con CaCl_2 , potenció el efecto del Rovral traduciéndose en un control más efectivo. Este resultado coincide con la tendencia observada por García et al (1995). Este efecto no se vio acentuado cuando se hicieron dos pulverizaciones, Berton et al (1992) obtuvieron el mismo resultado.

El comportamiento similar entre los tratamientos media dosis de Rovral combinado con CaCl_2 y Rovral a dosis completa, muestran la posibilidad de disminuir a la mitad la dosis de Rovral al combinarla con éste producto.

El nivel de incidencia alcanzado en el tratamiento Rovral a dosis entera fue mayor a lo esperado, superando en 40% lo obtenido por García et al (1997b). Ésto podría deberse a que las pequeñas heridas provocadas por el cepillo fueron realizadas después del baño con Rovral, no cubriéndose éstas con el producto. Otra posible explicación puede ser el surgimiento de cierto grado de resistencia del patógeno hacia este producto. A nivel de campo existen reportes de la ocurrencia de poblaciones de *Monilinia* sp. resistentes a las dicarboximidias (Ritchie, 1983).

Sin embargo, independientemente de haber sido aplicado solo o combinado, el Rovral no permitió que estas manchas se desarrollaran, alcanzando un diámetro máximo de 0,6 cm. otorgándoles además un aspecto seco. Esto hizo que los frutos fueran viables para la comercialización. El efecto del Rovral sobre la severidad fue tan importante que no permitió expresar la capacidad del CaCl_2 y *B.subtilis* que sí ocurrió cuando éstos se aplicaron solos.

A pesar de que el tratamiento con dos aplicaciones de CaCl_2 logró diferencias estadísticas en la última evaluación, y a la tendencia a un mejor comportamiento en todas las fechas, el CaCl_2 no fue efectivo en disminuir el porcentaje de incidencia. Esto concuerda con lo obtenido por Conway et al (1987a) donde aún con dosis de 102 kg./ha. y diez aplicaciones tampoco lo lograron. Sin embargo Berton et al (1992), utilizando las mismas dosis y aplicaciones que en este ensayo, obtuvieron resultados positivos.

La tendencia a disminuir el número de frutos afectados, y el menor tamaño de mancha indican, como citan Conway et al (1994), que el calcio incorporado a las paredes celulares volvió a éstas más resistentes al ablandamiento y degradación por las enzimas poligalacturonasas producidas por *M. fructicola*.

En base a lo aquí presentado y a pesar de las contradicciones encontradas en la bibliografía, se podría en nuevos ensayos, aumentar el número de aplicaciones y dosis. En la revisión realizada no se encontraron estudios del o los momentos en que el fruto de durazno puede absorber más fácilmente calcio. Una investigación de este tema, permitiría además ajustar la etapa más adecuada para realizar las pulverizaciones.

A pesar de que *B. subtilis* en la última fecha tuvo cierto efecto antagonico, en general no fue efectivo, aunque si disminuyó el tamaño de mancha. Mitidieri (1998) utilizando menor dosis del producto MBI600F (esporas + un activo metabolito) logró controles comparables al químico, aunque fue sobre frutos sin inocular; en el mismo ensayo evaluó MBI600 (solo esporas) no mencionando los resultados. Cuando se combinó media dosis *B. subtilis* con media de Rovral, sí se lograron resultados comparables al químico.

Más allá de los controles logrados con la utilización de éste antagonista combinado con Rovral, el manchado y sobretodo la deshidratación que MBI600 provocó sobre la fruta volviéndola no viable para la comercialización, impide el uso de éste producto. En la bibliografía revisada no se cita que *B. subtilis* pueda provocar deshidratación. Este efecto al igual que el manchado, se pueden deber a la formulación y/o dosis. Mitidieri (1998) utilizando la mitad de MBI600 de lo evaluado en éste ensayo en el tratamiento con media dosis, no menciona que esto ocurriese. Para poder continuar evaluando este producto, se debe en primer lugar estudiar y solucionar él o los factores que provocan la deshidratación y manchado.

Los escasos niveles de infección desarrollados durante el almacenamiento en frío se debieron a que la conservación frigorífica si bien no elimina la enfermedad, la retarda (Talice et al, 1978). Al retirar los frutos de cámara y dejarlos a temperatura ambiente, fueron expuestos a un rango de temperaturas alrededor del óptimo (24°C según Ogawa, 1995) para ocurrencia de infección y desarrollo de la enfermedad, lo que se tradujo en un incremento mínimo de 24% en los dos primeros días.

5.3 ENSAYO N° 3

Los incrementos en el contenido de calcio en la cáscara indican que la fruta logró absorber este nutriente. Ésta absorción fue más notoria en los tratamientos donde la sal aportaba más calcio (óxido, hidróxido y cloruro de calcio). Contrario a lo ocurrido en el

ensayo anterior, aparentemente el calcio no logró llegar a la pulpa, siendo éstos valores similares a los normales citados por Westwood (1982).

Este mayor contenido de calcio de la cáscara, no se reflejó en una disminución de la incidencia o severidad. La no efectividad de las sales óxido e hidróxido de calcio, coincide con lo obtenido por Biggs et al (1997), donde con aproximadamente las mismas cantidades de calcio (6 gr./10 lt. de agua) tampoco lograron reducir la incidencia. Sin embargo éstas dos sales, que son de las que contienen mayor proporción de calcio y alcanzaron los mayores niveles de éste en la cáscara, fueron las que tendieron a lograr finalmente los menores porcentajes de incidencia.

Considerando los resultados positivos obtenidos por Biggs et al (1997), además de las tendencias del presente ensayo, se propone para próximas investigaciones homogeneizar la cantidad de calcio a aplicar y evaluar dosis más altas.

La diferencia en el nivel de incidencia del testigo respecto a lo obtenido en el primer ensayo, se puede deber a que en éste caso, luego de retirados de cámara, los frutos no se embolsaron, manteniendo condiciones de comercialización, mientras que en el primer ensayo los frutos permanecieron embolsados durante todo el período de evaluación.

6. CONCLUSIONES

- Las pulverizaciones con CaCl_2 en campo, no lograron controlar la podredumbre morena en las condiciones ensayadas. Sin embargo, las tendencias a una menor incidencia y severidad así como el hecho de no haber afectado los parámetros de cosecha (con excepción de una leve disminución de los sólidos solubles), permiten considerar la posibilidad de continuar evaluando éste producto, aumentando el número de aplicaciones y dosis, evaluando además el momento de mayor absorción de calcio para realizar las aplicaciones.

- La combinación de CaCl_2 con Rovral, mejoró el control comparado con el químico sólo, en tanto la combinación con media dosis, igualó su resultado. Sería posible entonces, disminuir a la mitad la dosis de Rovral al combinarla con CaCl_2 . En este caso hay que tener presente la posibilidad de surgimiento de resistencia.

- El baño con *B. subtilis* tampoco logró controlar la podredumbre morena, sin embargo su combinación con media dosis de Rovral obtuvo el mismo nivel de incidencia que Rovral a dosis completa. A pesar de esto, no sería posible el uso de ésta combinación a causa del manchado y deshidratación que MBI600 provocó en los frutos. Se propone en primer lugar estudiar y solucionar estos efectos para poder continuar evaluando el biocontrolador.

- Los baños con las sales de calcio no tuvieron efectividad, aunque se observó una tendencia a un menor número de frutos infectados con las sales que aportaban más calcio (óxido e hidróxido de calcio). En próximas investigaciones habría que homogeneizar la cantidad de calcio a aplicar, evaluando dosis más altas.

- Ajustar métodos alternativos o complementarios al químico, implica muchos esfuerzos de investigación a causa de la gran cantidad de factores que están afectando los diferentes procesos.

- El análisis estadístico determinó que no hubo efecto significativo de las repeticiones para las variables evaluadas, se consideró entonces a cada fruto una repetición. En próximas investigaciones se aconseja no diseñar el experimento tomando como repetición a un grupo de frutos.

- El ajuste de la metodología de inoculación, permitió seleccionar un método efectivo, que simula las condiciones a las que normalmente se expone el fruto, fácil de implementar y práctico de evaluar. Se recomienda continuar utilizando cepillo + gota en nuevas investigaciones.

- La metodología utilizada para realizar los diferentes ensayos fue adecuada. Se recomienda continuar efectuando los mismos procedimientos en futuros ensayos.

7. RESUMEN

Podredumbre morena es la enfermedad que causa las mayores pérdidas de frutos de duraznos, pudiendo cobrar gran importancia luego de la cosecha. Tradicionalmente se ha controlado con aplicaciones de fungicidas tanto en monte como en baños postcosecha. La problemática que ocasiona el uso de agroquímicos tanto al hombre como al medio ambiente, así como el surgimiento de resistencia a varios de los productos normalmente utilizados, determinan la búsqueda de métodos alternativos o complementarios al químico. En éste trabajo se evaluaron diferentes métodos para el control de *Monilinia* sp. en postcosecha sobre frutos inoculados. Previamente se ajustó un método de inoculación, siendo seleccionado cepillo + gota como el más adecuado. En un monte standard se realizaron una y dos aplicaciones de CaCl_2 (0,5%) durante el período precosecha. Parte de éstos duraznos fueron además bañados con Rovral a dosis de 5,0 y 10,0 g./10 lts. Otros duraznos sin tratamiento de campo, fueron bañados con *Bacillus subtilis* (MBI600-concentrado de esporas) o combinado con Rovral (50,0 g./10 lts. + 5,0 g./10 lts.) y finalmente Rovral a dosis entera (10,0 g./10 lts.). Al momento de cosecha se evaluaron color de fondo, sobrecolor, presión y sólidos solubles, estos parámetros no fueron afectados por las aplicaciones de CaCl_2 con excepción de una leve disminución en los sólidos solubles. Las combinaciones de CaCl_2 con Rovral a dosis entera, lograron menor incidencia que Rovral sólo. Al combinarlo con media dosis el resultado fue similar al químico, lo que haría posible disminuir a la mitad la dosis normalmente utilizada, teniendo presente el riesgo de surgimiento de resistencia. Las aplicaciones de CaCl_2 no fueron efectivas, aunque sí hubo una tendencia a un mejor comportamiento, logrando además aumentar el contenido de calcio en la cáscara y algo en pulpa. El MBI600 combinado con Rovral también igualó al químico, en tanto aplicado sólo no tuvo efecto. Éste producto provocó deshidratación y manchado en la fruta, volviéndolas no viables para la comercialización lo que impide la utilización de éste formulado en estas condiciones. En otro ensayo se evaluaron diferentes sales de calcio (óxido, hidróxido, silicato, propionato y cloruro de calcio) aplicadas en baños a dosis de 12,0 g./10 lts.. Ninguna de las sales tuvo efecto en disminuir la incidencia, aunque se observó una tendencia a un menor número de frutos enfermos entre los tratados, logrando en todos los casos un mayor contenido de calcio en la cáscara. Ambos comportamientos fueron más notorios en los duraznos bañados con sales que aportaban más calcio (óxido e hidróxido de calcio).

8. SUMMARY

Brown rot is the disease that causes the greatest losses of peaches fruits; it can gain great importance at postharvest. Traditionally it has been controlled with fungicide applications both in the field and in postharvest dips. The problematic that agrochemical use causes both to human being and to the environment, and resistant appear to many of the commonly used products, determine the search of chemical alternative or complementary methods. In this work different methods to *Monilinia* sp. postharvest control on inoculated fruit were evaluated. It was previously adjusted an inoculation method, being brush + drop chose as the more adequate. There were made one and two CaCl_2 (0,5%) applications during preharvest time in a standard orchard. Some of these peaches were also dipped in a Rovral solution at 5,0 and 10,0 g./10 lt. Other peaches without field treatment, were dipped in a *Bacillus subtilis* suspension (MBI600-spores concentration) alone, or combined with Rovral (50g./10lt. + 5.0g./10lt.), and finally Rovral at complete dose (10g./10lt.). At harvest time, ground colour, over colour, pulp firmness and soluble solids were evaluated, these parameters were not affected by CaCl_2 applications, except a light soluble solids decrease. CaCl_2 and Rovral at complete dose combinations achieved fewer incidences that Rovral alone. When it was combined at half dose the result was similar to the chemical, so it could be possible to reduce one half dose used normally, taking into account the risk of resistant appearance. CaCl_2 applications were not effective, however there was some better behaviour tendency, and it could be possible to increase the calcium skin content and a little increase in the flesh. When MBI600 were combine whit Rovral, it was also equal to the chemical, but it had not effect if it was applicated alone. This product caused deshidratation and stained on the fruit, so these fruit commercialisation was impossible, which don't allow this formulation use at these conditions. In another trial different calcium salts applications in dips at dose of 12 g./10lt. were evaluated (calcium propionate, calcium hydroxide, calcium oxide and calcium silicate). None of the salts had effect on decrease the incidence, however a less number of infected fruit between dipped fruit were observed, reaching in all cases a greatest calcium skin content. Both behaviours were more obvious on peaches dipped in salts that contained more calcium (calcium hydroxide and calcium oxide)

9. BIBLIOGRAFÍA

- 1- AGRIOS, G.N. 1995. Fitopatología. 2ª ed. México, Limusa. 838 p.
- 2- ANTHONY, B.; PHILLIPS, D.; BADR, S.; AHARONI, Y. 1989. Decay control and quality maintenance after moist air heat treatment of individually plastic-wrapped nectarines. J.Amer.Soc.Hort.Sci. 114(6): 946-949
- 3- BATEMAN, D.F.; LUMSDEN, R.D. 1965. Relation of calcium content and nature of pectic substances in bean hypocotyls of different ages to susceptibility to an isolate of *Rhizoctonia solani*. Phitopathology 55: 734-738
- 4- BERTON, O.; SCHROEDER, A.; BLEICHER, J. 1992. Controle de pudridoes em pessegos atraves de tratamentos em pré e pós-colheita. Agrop. Catarinense 5(3): 4-5
- 5- BIGGS, A.R.; EL-KHOLI, M.M.; EL-NESHAWY, S.; NICKERSON, R. 1997. Effects of calcium salts on growth, poligalacturonase activity, and infection of peach by *Monilinia fructicola*. Plant disease 81(4): 399-403
- 6- BYRDE, R.J.; WILLETTS, H.J. 1977. The brown rot fungi of fruit, their biology and control. Great Britain, A. Wheaton & Co. Exeter. 169 p.
- 7- CAMPOS, C ; LORENZO, J. 1991. Effect of calcium chloride aspersions on the fruit quality of nectarines. Chile Univ., Santiago. Escuela de Agronomía : 79p. Tomado de AGRIS 1993-8/1995
- 8- CHAMBROY, Y., SOUTY, M; REICH, M.; BREUILS, L.; JACQUMIN, G.; AUDERGON, M. 1991. Effects of different CO₂ treatments on pos-harvest changes of apricot fruit. Acta Horticulturae. 293(2): 675-684
- 9- CONWAY, W.S. 1982. Effect of postharvest calcium treatment on decay of delicious apples. Plant Disease 66(5): 402-403
- 10- _____. SAMS, S.E. 1984. Possible mechanisms by postharvest calcium treatment reduces decay in apples. Phytopathology 74 (2): 208-210
- 11- _____. GREENE, G.M.; HICKEY, K.D.. 1987a. Effects of preharvest and postharvest calcium treatment of peaches on decay caused by *Monilinia fructicola*. Plant disease 71(12): 1084-1086

- 12- _____, GROSS, K.C. 1987b. Relationships of bound calcium and inoculum concentration to the effect of postharvest calcium treatment on decay of apples by *Penicillium expansum*. *Plant Disease* 71(1): 78-80
- 13- CORNELL COOPERATIVE EXTENSION PUBLICATION. 1996. pest management recommendations for commercial tree-fruit production. pmep.cce.cornell.edu/recommends/trfrecomends-lib.
- 14- COSCOLLA, R. 1993. Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales. Madrid, Mundi-Prensa. pp 23.
- 15- COUEY, H.M. 1989. Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pest of fruits. *Hort. Science*. 24(2): 198-202
- 16- DE CAL, A.; SAGASTA, E.M. 1990. Biological control of peach twig blight (*Monilinia laxa*) with *Penicillium frequentans*. *Plant Pathology* 39: 612-618
- 17- DE-VRIES-PATERSON, R.M.; JONES, A.L.; CAMERON, A.C. 1991. Fungistatic effects of carbon dioxide in a package environment on the decay of Michigan sweet cherries by. *Plant Disease*. 75(9): 943-946
- 18- DISCIPLINARE DI produzioni integrata frutticola: fase di pos raccolta. 1997. Emilia- Romagna, Italia, ERSO. pp. 32-35
- 19- DOMÍNGUEZ, F.; GARCÍA. 1989. Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas. 8ª ed. Madrid, Mundi-Prensa. pp. 654-655
- 20- EXTTOXNET. 1996. Benomil. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/exttoxnet/24d-captan/benomil-ext.html>.
- 21- _____. 1998a. Captan. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/exttoxnet/24dcaptan/captan-ext.html>
- 22- _____. 1998b. Iprodione. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/exttoxnet/haloxfop-methylparathion/iprodione-ext.html>
- 23- _____. 1998c. Triforine. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/exttoxnet/pyethlins-ziram/triforine-ext.html>
- 24- FERGUSON, F.B.. 1984. Calcium in plant senescence and fruit ripening. *Plant Cell and Environment* 7: 477-489

- 25- FERNÁNDEZ, M.V. 1978. Introducción a la fitopatología. 3ª ed. Bs. As., I.S.A.G. v. 3, pp. 587-600
- 26- FLORES, E.; RODRIGUEZ, F.; MARTINEZ, M.; UNGARO, M.; FERREIRA, M.; YOKOMIRO, Y.; ALMEIDA, W. 1986. Impacto dos Agrotóxicos. Brasil. ICONTE Editora Ltda. pp 75.
- 27- FULTON, C.E.; BROWN, A.E. 1997. Use of SSU rDNA group-I intron to distinguish *Monilinia fructicola* from *M. laxa* and *M. fructigena*. FEMS Microbiology Letters. 157: 307-312
- 28- GARCÍA, S.; FEIPPE, A. 1995. Evaluación de métodos no químicos para el control postcosecha de Podredumbre Morena (*Monilinia fructicola*). INIA Las Brujas. Serie de Actividades de Difusión N° 70. pp 42-44
- 29- _____. 1997a. Enfermedades del duraznero. INIA, Las Brujas. Serie de Actividades de Difusión N° 147. pp 37-40.
- 30- _____. LASALA, G.; WALLASEK, V.; PISANO, J.; RODRIGUEZ, P. 1997b. Evaluación de fungicidas para el control postinfección de la podredumbre morena causada por *Monilinia fructicola*. INIA, Las Brujas. Serie de Actividades de Difusión N° 150. pp 66-67
- 31- HANSEN, M. 1996. Rovral's postharvest use Canceled for stone fruits. http://www.godfruit.com/archive/May_15-16/special6.html
- 32- HOUCK, L. 1967. Hot water treatment for control of *Penicillium digitatum* green mold of Eureka lemons. Phytopathology 57(2): 99
- 33- JONES, L.; EHRET, G. 1976. Isolation and characterization of Benomil – tolerant strains of *Monilinia fructicola*. Plant Diseases Reporter. 60(9): 765-771
- 34- KIM, D.; COOK, J.; WELLER, D.M. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. Phytopathology 87(5): 551-558
- 35- KRETZSCHMAR, A. 1991. Controle Biológico de Patógenos que ocorrem em pós-colheita. In Controle Biológico de doenças de plantas. W. Bettiol. Brasília. EMBRAPA. pp 53-69.
- 36- LARKING, P.P. 1998. Plant disease and biocontrol FAQ <http://www.barc.usda.gov/psi/bpdl/FAQ.htm>

- 37- LEIBINGER, W.; BREUKER, B.; HAHN, M.; MENDGEN, K. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phitopathology* 87(11): 1103-1109
- 38- MADRIGAL, C.; PASCUAL, S.; MELGAREJO, P. 1994. Biological control of peach twig blight (*Monilinia laxa*) with *Epicocum nigrum*. *Plant Pathology* 43: 554-561
- 39- _____ MELGAREJO, P. 1995. Morphological effects of *Epicocum nigrum* and its antibiotics flavipin on *Monilinia fructicola*. *Con. J. Box* 73: 425-431
- 40- MARGOSAN, D.; SMLANICK, J.; SIMMONS, G.; HENSON, D. 1997. Combination of hot water and ethanol to control postharvest decay of peaches and nectarines. *Plant Disease*. 81(12): 1405-1409
- 41- MC. KEEN, C.; REILLY, C.; PUSEY, P. 1986. Production and partial characterization of antifungal substancies antagonistix to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phitopathology* 76(2): 136-139
- 42- MELGAREJO, P.; CARRILLO, R.; SAGASTA, E. 1985. Mycoflora of peach twigs and flowers and its possible significance in biological control of *Monilinia laxa*. *Trans-Br-Mycol-Soc.* 85(2):313-317
- 43- _____ DE CAL, A.; SAGASTA E.M.. 1989. Influence of *Penicillium frecuentans* and two of its antibiotics on production of stromato by *Monilinia laxa* in culture. *Can. J. BOT* 67: 83-87
- 44- MITIDIERI, I.M. 1998. Control biológico del moho verde de los citrus (*Penicillium digitatum*) y de la podredumbre morena del durazno (*Monilinia fructicola*) con *Bacillus subtilis*. In Congreso Argentino de control biológico de enfermedades de las plantas (1998, Bs. As.). Acta de resúmenes. Buenos Aires.. Universidad de Bs. As., Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. pp 18
- 45- MODERNEI, R. 1996. Guía Uruguay para la protección y fertilización vegetal. 6° ed. Montevideo. SATA.. 367 p.
- 46- MOLINE, H.E.. 1994. Preharvest managment for postharvest biological control. In Biological control of postharvest diseases. WILSON, C.H.L.; WISNIEWISKI, M.E. U.S.A, CRS PRESS. pp 57-62.

- 47- MONDINO, P.; PÉREZ, E.; GEPP, V.; GARCÍA, S.. 1997a. Detección de infecciones latentes de *Monilinia* sp sobre frutos verdes de duraznos en Uruguay. INIA Las Brujas. Serie de Actividades de Difusión N° 150, pp 53-55
- 48- _____. SILVERA, E.; GEPP, V.; GARCÍA, S.. 1997b. Determinación de la presencia de la reproducción sexual de *Monilinia fructicola* mediante la producción de apotecios. INIA Las Brujas. Serie de Actividades de Difusión N° 150. pp 50-52.
- 49- _____. SILVERA, E.; LEITES, L.; GEPP, V.; GARCÍA, S.. 1997c. Determinación de la incidencia de las diferentes especies de *Monilinia* sp. En la zona de Melilla. INIA Las Brujas. Serie de Actividades de Difusión N° 150. pp. 56-57.
- 50- _____. SILVERA, E.; PÉREZ, E.; GEPP, V.; GARCÍA, S. 1997d. Estudio epidemiológico de *Monilinia* sp. causante de la podredumbre morena sobre *Prunus* sp. INIA Las Brujas. Serie de Actividades de Difusión N° 150. pp. 48-49.
- 51- _____. LEITES, L.; GEPP, V.; GARCÍA, S.. 1997e. Efecto antagónico in vitro de *Penicillium rugulosum* sobre *Monilinia laxa*. INIA Las Brujas. Serie de Actividades de Difusión N° 150. pp 58-59.
- 52- OGAWA, J.M.; ENGLISH, H. 1991. Diseases of temperate zone tree fruit and nut crops. United States of America, University of California. pp 142-229.
- 53- _____. ZEHR, E.I.; BIRD, G.W.; RITCHIE, D.F.; URIU, K.; UYEMOTO, J.K. 1995. Compendium of Stone Fruit Diseases. U.S.A. St. Paul MN APS. pp 7-10.
- 54- PAUTAS SANITARIAS PARA LOS CULTIVOS DE MANZANO, PERAL Y DURAZNERO. 1998. Facultad de Agronomía; I.N.I.A.; JUNAGRA; PREDEG-GTZ; Productores Fructícolas. Montevideo. s/p. (programa piloto de Producción Integrada de Frutas)
- 55- PHILLIPS, D.; AUSTIN, R. 1982. Changes in peaches after hot-water treatment. *Plant Disease* 66(6): 487-488.
- 56- _____. 1991. Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. *Plant Disease* 75(11): 1085-1089

- 57- PUSEY, L.; WILSON, C. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 68: 753-756
- 58- _____, HOTCHKISS, M.; DULMAGE, H.; BAUMGARDNER, R.; ZEHR, E.; REILLY, C.; WILSON, C. 1988. Pilot test for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (B-3) for postharvest control of peach brown rot. *Plant Disease* 72(7): 622-626
- 59- RITCHIE, D. 1983. Mycelial growth, peach fruit- rotting, and sporulation of strains of *Monilinia fructicola* resistant to Dichloran, Iprodione, Procymidione, and Vinclozolin. *Phitopathology* 73(1):44-47
- 60- SANOAMUANG, N.; GAUNT, R. 1995. Persistence and fitness of carbendazin – and dicarboximide – resistant isolates of *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey in flowers, shoots and fruit of stone fruit. *Plant Pathology* 44(3): 448-456
- 61- SMITH, I.M.; DUNEZ, J.; LELLIOTT, R.A.; PHILLIPS, D.H.; ARCHER, S.A. 1992. *Manual de enfermedades de las plantas*. Madrid, Mundi-Prensa. pp. 497-499.
- 62- SMITH, W. 1971. Control of brown rot and rhizopus rot of inoculated peaches with hot water or hot chemicals suspensions. *Plant Disease Reporter*. 55(3): 228-230
- 63- _____, ANDERSON, R.E. 1975. Decay control of peaches and nectarines during and after controlled atmosphere and air storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100(1): 84-86
- 64- SOMMER, N.; FORTALAGE, R.; BUCKLEY, P.; MAXIE, E. 1967. Radiation-heat synergism for inactivation of market disease fungi of stone fruit. *Phitopatology* 57(4): 428-433
- 65- SONODA, R.; OGAWA, J.; MANJI, B. 1982. Use of interaction of cultures to distinguish *Monilinia laxa* from *M. fructicola*. *Plant Disease* 66(4):325-326
- 66- SPALDING, D.; REEDER, W. 1972. Postharvest disorders of mangos as affected by fungicides and heat treatments. *Plant Disease Reporter* 56(9): 751-753
- 67- SZKOLNIK, M.; GILPATRICK, J. 1977. Tolerance of *Monilinia fructicola* to Benomil in Western New York State orchards. *Plant Disease Reporter* 61(8): 654-657

- 68- TALICE, R.; FORMENTO, A.; CHESTER, W. 1978. Control pos-cosecha de podredumbres en duraznos. Centro de Investigaciones agrícolas E.E. Las Brujas. M.G.A.P. Hoja de divulgación N° 46. 1 p.
- 69- URUGUAY. M.G.A.P., Dirección de censos y encuestas (Ex. D.I.E.A.). 1994. Censo Gral. Agropecuario. Montevideo. 239 p.
- 70- WELLS, J.M. ; HARVEY, J.M. 1970. Combination heat and 2,6-Dichloro-4-Nitroaniline treatments for control of *Rhizopus* and brown rot of peaches, plums, and nectarines. *Phitopayhology* 60(1):116-120
- 71- _____. 1972. Heated Wax- Emulsions with Benomil and 2,6-Dichloro-4-Nitroaniline for control of postharvest decay of peaches and nectarines. *Phitopathology*. 62(1): 129-133.
- 72- WESTWOOD, M.N. 1982. Fruticultura de zonas templadas. 2ª edición. Madrid, Mundi Prensa. pp 308-309
- 73- WILLOUGHBY, O.H. 1993. Plant health guide: complete product listings for more than 47 crops. Agricola. 178 p.
- 74- WILSON, C.L.; FRANKLIN, J.D.; OTTO, B.E. 1987. Fruit volatiles inhibitory to *Monilinia fructicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 71(4): 316-319
- 75- WILSON, C.H.; WISNIEWSKI, M. 1994. Biological control of postharvest diseases. USA, CRS Press. 182p.
- 76- _____. WISNIEWSKI, M.; GHAOUTH, A.; DROBY, S.; CHALUTZ, E.. 1996 Commercialization of antagonistic yeast for the biological control of postharvest disease of fruits and vegetables. *Feature article* 46(5): 237-242