

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Ingeniería en Recursos Naturales Renovables



Etiología, manejo y monitoreo de *Alternaria* spp. en uva de mesa

TESIS DE GRADO

Tesista: STOCCO, ANTONELLA FABIA

Directora: Dra. María Lorena Ponsone

Co-directora: MSc. Ing. Agr. Mariela Rodriguez Romera

2016

*A mis padres, **Omar y Adriana,**
por hacer de mí lo que soy.*

AGRADECIMIENTOS:

A *Dios*, por bendecirme con la dicha de vivir esta vida.

A *San Expedito*, por alumbrar siempre mi camino.

A mis padres, mis queridos padres, *Omar* y *Adriana*; son mi guía y mi ejemplo de lucha. Gracias por confiar en mí y no dejarme aflojar, por alentarme, por alegrarse conmigo. Les debo todo; este logro es tanto mío como de ustedes. Los amo con todo mi corazón.

A mi directora de tesis, *Dra. María Lorena Ponsone*, y a mi co-directora, *MSc. Mariela Rodríguez Romera*; por iniciarme en la investigación científica y transmitirme su pasión por este fascinante mundo. Han estado siempre dispuestas a ayudarme, a escuchar mis dudas y a brindarme sus conocimientos, para hacer de mí una mejor profesional. Gracias por su complicidad y por hacerme sentir tan cómoda.

Al amor de mi vida, *Emanuel*. Por ser mi compañero incondicional desde siempre, quien me mantiene ilusionada, sueña conmigo y me hace inmensamente feliz. Gracias por no soltarme nunca la mano.

A mis hermanos: *Andrés*, por tus palabritas de aliento, por el aguante y tu sincera felicidad frente a mis logros. *Franco*, por tus “¿Y, cómo va eso?”, “Dale, vos podés” y “Te felicito, piba”; por el orgullo que se te dibuja en los ojos. *Bruno*, por nuestra complicidad en las noches de estudio y por tus locuras que siempre me hacen sonreír. *Agostina*, por tus cartelitos, por esperarme ansiosa a que vuelva de rendir y por nuestros festejos.

A mi compañero de laboratorio, *Mariano Díaz*, por permitirme aprender de vos, por las charlas risueñas y tu hermosa amistad.

A *Valeria Longone*, *Sabrina Moyano*, *Raúl Cuello* y *Sebastián Gómez Talquenca*, por su ayuda invaluable.

Al *INTA*, mi segundo hogar a lo largo de este año, por darme la oportunidad de desarrollar mi tesis, por brindarme todo el material necesario, y permitir mi enriquecimiento personal y académico.

A mis amadas abuelas, *Mercedes* y *Norma*, por recibirme en mis días de estudio, por los mates compartidos, por cuidarme, por su amor.

A mis abuelos, *Miguel y Silvio*, por iluminarme desde el cielo.

A *María Emilia y Constanza*, mis compañeras de estudio, de carrera, de sueños... mis queridas amigas de la Facu.

A *mis amigos y a mi hermosa familia*, mis tíos, primos, suegra, cuñados...gracias por embellecer mí camino.

RESUMEN

En estudios previos realizados en la Estación Experimental INTA Mendoza durante la postcosecha en uvas de mesa cv. Red Globe se observó un tipo de podredumbre negra que no había sido previamente citada para la Argentina; la misma se caracteriza por lesiones firmes, superficiales, marrones oscuras a negras en bayas. Al inicio, las lesiones son tipo cancro y se observan cerca del pedicelo. A veces, puede haber presencia de micelio verdoso amarronado en raquis y pedicelos. Estudios posteriores permitieron determinar que dicha podredumbre es causada por hongos del género *Alternaria*. Si bien los síntomas de podredumbre se observan durante la conservación de la fruta, la hipótesis es que el patógeno proviene de campo, pero el ciclo de la enfermedad no ha sido aún caracterizado para esta fruta. El objetivo de este trabajo fue detectar y cuantificar la presencia del patógeno en distintas etapas del ciclo de la vida, desde floración hasta postcosecha, en el cv. Red Globe de un viñedo del departamento de Junín, Mendoza; para luego, identificar morfológica y molecularmente las cepas aisladas. Por otra parte, dado que la tendencia actual es reemplazar los productos de síntesis química para controlar patógenos en alimentos, se realizó una primera aproximación a la utilización de productos de origen natural en conservación. Durante esta etapa, se evaluó la efectividad de *Metschnikowia pulcherrima* y quitosano como posibles agentes de control. El presente trabajo representa un primer informe tanto de la incidencia de grupos especies de *Alternaria* spp. en el ciclo fenológico y en postcosecha de uva de mesa cv. Red Globe, como de la evaluación de estrategias alternativas al uso de SO₂ para el control de podredumbre causada por *Alternaria* spp. durante la etapa de postcosecha.

Palabras clave: uva de mesa, postcosecha, *Alternaria* spp.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La vid (<i>Vitis vinífera</i> L.).....	1
1.1.1. Fases del crecimiento	1
1.1.1.1. Ciclo vegetativo	2
1.1.1.2. Ciclo reproductivo	2
1.1.1.3. Postcosecha	4
1.1.2. Principales destinos comerciales	4
1.2. Uva de mesa.....	4
1.2.1. Regiones productoras de Argentina	5
1.2.2. Estructura productiva nacional	5
1.2.2.1. Estructura productiva de la provincia de Mendoza	7
1.2.3. Conservación de uvas de mesa.....	8
1.3. Enfermedades en vid	9
1.3.1. Género <i>Alternaria</i>	12
1.3.1.1. Taxonomía del género <i>Alternaria</i>	13
1.3.1.2. Micotoxinas	19
1.4. Control de enfermedades en postcosecha	20
1.4.1. Tratamiento tradicional con dióxido de azufre (SO ₂).....	20
1.4.2. Tratamientos con controladores de origen natural.....	21
1.4.2.1. Tratamiento con recubrimientos de quitosano	24
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
2.1. Hipótesis	27
2.2. Objetivo General	27
2.3. Objetivos Específicos	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1. Muestreo	28
3.2. Aislamiento de <i>Alternaria</i> spp.....	30
3.3. Conservación de aislados de <i>Alternaria</i> spp.	30
3.4. Identificación morfológica y molecular de los aislados de <i>Alternaria</i> spp.	31
3.4.1. Identificación morfológica	31
3.4.2. Identificación molecular	33
3.4.2.1. Extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico	33
3.4.2.2. Reacciones de PCR	34
3.4.2.2.1. Identificación de género	34

3.4.2.2.2. Identificación de los grupos especies de <i>Alternaria</i> spp.....	35
3.5. Ensayos en postcosecha con controladores de origen natural.....	36
3.5.1. Obtención del material.....	36
3.5.2. Ensayo <i>in vivo</i>	37
3.6. Análisis estadístico.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1. Aislamiento de <i>Alternaria</i> spp.....	42
4.2. Identificación morfológica y molecular de los aislados de <i>Alternaria</i> spp.	43
4.2.1. Identificación morfológica.....	43
4.2.2. Identificación molecular.....	45
4.2.2.1. Reacciones de PCR para identificación de Género.....	45
4.2.2.2. Reacciones de PCR para identificación de Grupos Especies.....	46
4.3. Ensayos en postcosecha con biocontroladores.....	49
5. DISCUSIÓN.....	65
5.1. Aislamiento de <i>Alternaria</i> spp.....	65
5.2. Identificación morfológica y molecular de los aislados de <i>Alternaria</i> spp.	65
5.3. Ensayos en postcosecha con biocontroladores.....	68
6. CONCLUSIONES.....	74
ANEXO.....	75
7. BIBLIOGRAFÍA.....	77

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La vid (*Vitis vinífera* L.)

Vitis vinífera L. es una planta arbustiva del género *Vitis* L., de la familia de las Vitáceas, perteneciente al orden *Ramnales* (Gascón, 2008). El género *Vitis* L. es originario de zonas templadas del hemisferio norte; de América, Europa y Asia.

La vid tiene requerimientos climáticos bien determinados; es una planta exigente en calor y sensible a las heladas de invierno y de primavera, no solamente para su desarrollo vegetativo, sino para la maduración de sus frutos, que precisan iluminación y temperaturas adecuadamente altas (Hidalgo, 1993).

Por estas circunstancias, el área mundial del cultivo de la vid está comprendida, aproximadamente, entre los 20° y 50° Latitud Norte y los 20° y 40° Latitud Sur.

Las precipitaciones estivales son la mayor desventaja de los climas oceánicos, por la afección de plagas y enfermedades criptogámicas tales como la podredumbre gris y negra y peronóspera de la vid (Cátedra de Viticultura. Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo, 2014).

1.1.1. Fases del crecimiento

La fenología es el estudio de las distintas etapas de crecimiento de cada planta durante una temporada, y comprende el desarrollo, diferenciación e iniciación de órganos o estructuras y se refiere al estudio de fenómenos vinculados a ciertos ritmos periódicos tales como la brotación, floración, entre otros y están relacionadas con factores medioambientales (Mullins y col., 1992).

V. vinífera L. por ser una especie de zona templada requiere de variaciones estacionales bien marcadas para un adecuado desarrollo fenológico.

Se clasifica el crecimiento de la vid en dos ciclos; el vegetativo y el reproductivo.

1.1.1.1. Ciclo vegetativo

Está representado por el crecimiento y desarrollo de los órganos vegetativos (raíces, pámpanos, hojas, zarcillos, nietos, chupones), se incluye dentro de este ciclo el almacenamiento de sustancias de reserva y el inicio al reposo o dormición de yemas (Chauvet y Reynier, 1978).

1.1.1.2. Ciclo reproductivo

El ciclo reproductivo ocurre simultáneamente con el vegetativo y hace referencia a la formación y al desarrollo de los órganos reproductores de la vid (inflorescencia, flores, bayas y semillas) y a su maduración (Salazar y Melgarejo, 2005).

Al término de la primavera o comienzo del verano, se produce la **Floración**. Los óvulos fecundados crecen y estimulan el desarrollo de las partes del ovario que llega a constituir la baya, se dice entonces, que el fruto está cuajado (Hidalgo, 1993).

El desarrollo se traduce en un incremento en parámetros físicos (volumen, tamaño, color, dureza) y una evolución de compuestos químicos (azúcares, pH, acidez, compuestos fenólicos).

Fases de crecimiento y desarrollo del fruto:

- Etapa verde o herbáceo: va desde la formación del grano hasta el envero. El aumento de tamaño es rápido, especialmente el de la semilla. La acidez es alta y las bayas son duras. En esta etapa la uva se comporta como un órgano fotosintetizante (Salazar y Melgarejo, 2005). Dentro de esta fase diferenciamos principalmente dos estadios sucesivos: **Grano Pimienta** y **Grano Arveja**; diferenciándose por el tamaño del grano.
- **Envero**: se caracteriza por una leve detención del crecimiento y por el cambio de color, que pasa del verde al color característico de la variedad; el cual ocurre en la última fase de crecimiento herbáceo de la baya.

La disminución del color verde está ligada a la rápida desaparición de los pigmentos clorofílicos que comienza con el cuajado (Pugliese, 2009). Al final del envero la pepita está perfectamente formada y capaz de reproducir la planta; se ha alcanzado la madurez fisiológica, que es bastante anterior a la madurez del fruto (Hidalgo, 1993).

Después del envero, la uva aumenta de tamaño; su color se afirma; la pulpa se enriquece en azúcares a la vez que disminuye la proporción de ácidos. La fruta ha terminado su crecimiento y ha adquirido todas sus características fisicoquímicas y organolépticas, para ser consumida (Hidalgo, 1993).

- **Madurez:** se alcanza cuando permanece estacionaria la cantidad de azúcar en el fruto. Pero, puede producirse ulteriormente una evaporación de parte del agua de la pulpa, y si la cantidad de azúcar permanece estacionaria, su proporción aumenta y se produce la sobremaduración (Hidalgo, 1993). La madurez ideal debe definirse para cada zona vitícola, inclusive para cada viñedo, en función de los objetivos técnico-comerciales y del mercado, y con ella determinar la fecha de **Cosecha** (Figura 1).



Figura 1: Etapas del ciclo fenológico de la vid y postcosecha (Rodríguez Romera y col., 2014).

1.1.1.3. Postcosecha

La **Postcosecha** es parte integral de la cadena alimentaria, abarca desde que el producto es cosechado hasta que llega al consumidor para su consumo fresco o hasta que el producto es utilizado como materia prima para su posterior procesamiento. Su objetivo principal es la preservación de calidad e integridad física del fruto (Rivero y Quiroga, 2007).

1.1.2. Principales destinos comerciales

La especie *Vitis vinífera* es el frutal más cultivado en el mundo desde tiempo inmemorial, como consecuencia de la calidad de sus frutos.

Se han clasificado las variedades por sus orígenes, sus caracteres ampelográficos y por su distribución geográfica. También resulta de gran interés e importancia, generar una clasificación según el destino de sus productos:

- Para vino o mosto: es el más importante y distribuido a nivel mundial. En general, las uvas son de racimo medio a pequeño, apretado, con bayas de dimensiones reducidas o pequeñas, piel fina y pepitas escasas en número y tamaño.
- Para mesa: incluye variedades que se aprecian más por las condiciones físicas y estructurales de sus frutos, que por las características de sus mostos. Se buscan racimos más bien grandes, bien conformados, de buen aspecto, con bayas sueltas, pulpa crujiente, piel resistente, de difícil desgrane, sabor fresco y con aromas agradables.
- Para pasificación: se utilizan uvas procedentes de viñas de bajo rendimiento y con altos niveles de azúcar. La tendencia marca una clara preferencia de los consumidores por las variedades sin semillas, también llamadas apirenas.

1.2. Uva de mesa

La continua caída del precio de la uva, especialmente de las provenientes de cultivares comunes para vinificar, hace necesario profundizar el proceso de diversificación

productiva en esta cadena agroalimentaria. La producción de uva de mesa se presenta como una alternativa conveniente (Miranda y Novello, 2012).

Los principales países productores, al igual que los mayores consumidores e importadores de uva de mesa, se localizan en el hemisferio norte. En el hemisferio sur, los países productores más importantes son Chile, Sudáfrica, Argentina y Australia; siendo también los principales exportadores (Miranda y Novello, 2012).

1.2.1. Regiones productoras de Argentina

El cultivo de la vid en Argentina se puede dividir en tres regiones diferenciadas por sus características agroecológicas: noroeste, centro-oeste (concentra el 93% del área con uva de mesa del país) y sur. Una de las ventajas argentinas en la producción de uva de mesa es que puede ofrecer una misma variedad en distintas épocas, ya que el cultivo se realiza en regiones con distintas características climáticas, lo que da una amplitud de oferta en el tiempo que no pueden lograr la mayoría de los países competidores.

La producción de uva de mesa se localiza principalmente en San Juan, que con 9.283 hectáreas en el año 2009 constituyó el 81% de la superficie del país. Mendoza constituye el 12%; destacándose el área Este, la cual es la mayor productora de la provincia. Es significativo el cultivo de la uva de mesa cv. Red Globe en esa zona (Miranda y Novello, 2012).

1.2.2. Estructura productiva nacional

La superficie cultivada con uvas de mesa en Argentina ha mostrado un crecimiento constante. Al cierre de la cosecha 2010 contaba con 11.496 hectáreas; dicha superficie ha aumentado el 243% con relación al Censo Vitícola Nacional del año 1990 y el 31% comparado con el año 2000, en que se realizó la Actualización Registro de Viñedos (Figura 2) (Instituto Nacional de Viticultura, 2011).

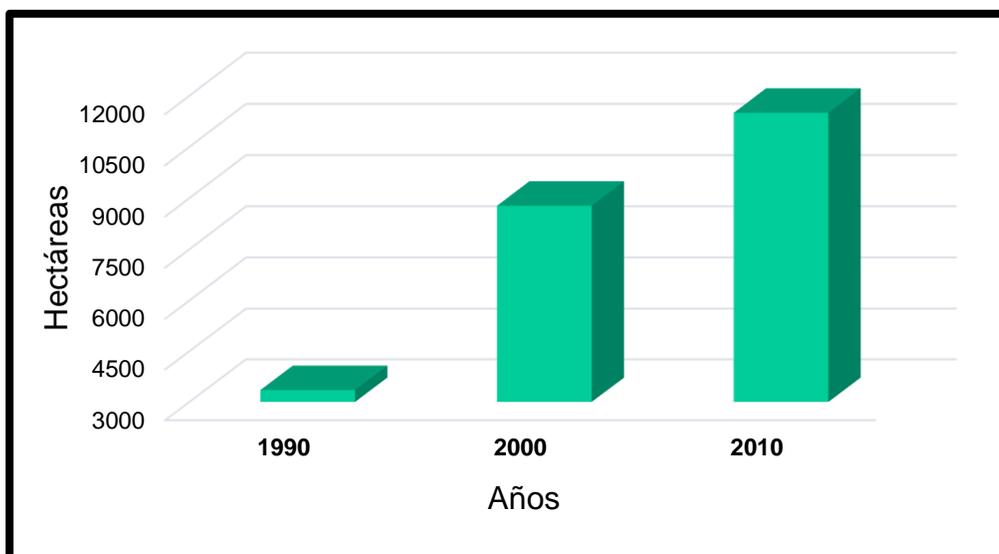


Figura 2: Crecimiento de la superficie cultivada con uvas de mesa en Argentina (Instituto Nacional de Viticultura, 2011).

Nuestro país está creciendo en los volúmenes exportados. De acuerdo a datos del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, en 11 meses del año 2010 las uvas representaron el 7% del total de dólares obtenidos por la exportación total de frutas frescas, después de los cítricos, las peras, las manzanas y berries (arándanos, frutillas y otras). En cuanto a las toneladas, el 4,35%. Sin embargo, la producción nacional de uva de mesa tiene como principal destinatario el mercado interno (Instituto Nacional de Viticultura, 2011).

Existe una importante reducción de la plantación de uvas tintas y una suba considerable en las blancas y rosadas. El 50% de la superficie con uvas de mesa del país correspondió en el año 2009 a uvas rosadas, el 39% a blancas. El 11,28% fue de uvas tintas. El 28% de la superficie perteneció a la variedad blanca sin semilla Superior Seedless, le siguió en orden de importancia la variedad Red Globe, rosada, con el 21,43% y el 18,84% correspondió a Flame Seedless, variedad tinta sin semilla (Instituto Nacional de Viticultura, 2011).

1.2.2.1. Estructura productiva de la provincia de Mendoza

Mendoza posee casi 15 millones de hectáreas de superficie donde la superficie cultivada bajo riego no supera el 2% (300.000 ha). La viticultura es una actividad económica agrícola muy importante en la provincia, comprende 158.833 hectáreas. Su producción se destina principalmente a la elaboración de vinos, los cuales son requeridos mundialmente por su alta calidad (Martínez, 2011). Mendoza posee su producción vitícola concentrada en variedades para vinificar, las que representan más del 98%.

En cuanto a la producción de uva de mesa, en nuestra provincia existen alrededor de 200 explotaciones con cultivares de vid de este tipo, lo que le permite a Mendoza posicionarse como la segunda provincia productora de uvas para consumo en fresco.

La estructura productiva de uvas de mesa provincial se compone por un 61% de la superficie cultivada con uvas rosadas, 29% blancas y 9% negras. En cuanto a las variedades, predominan la Red Globe con 585,6 ha (42% del área provincial con uva de mesa), el 15% corresponde a la variedad Aconcagua y el 8,73% a la variedad Patricia, entre otras (Figura 3) (Instituto Nacional de Viticultura, 2011).

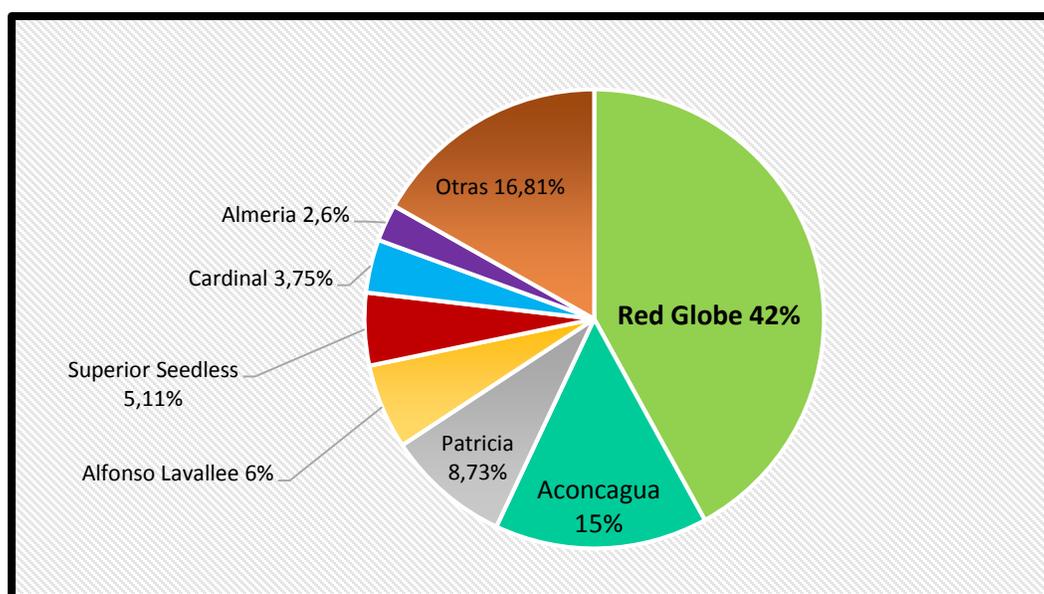


Figura 3: Variedades de uva de mesa cultivadas en Mendoza. Año 2009 (Instituto Nacional de Viticultura, 2011).

1.2.3. Conservación de uvas de mesa

Prolongar la vida útil de la uva de mesa tras la recolección adquiere suma importancia para alargar el período de comercialización y obtener mejores precios en el mercado. Es importante destacar que la respuesta positiva de los mercados consumidores se limita a productos que cumplan con ciertos requisitos de calidad. En uva de mesa se requiere un gran atractivo visual, alta apetecibilidad, adecuadas cualidades físicas y resistencia a la conservación frigorífica y al transporte (Llorente, 1991). Para lograr esto es necesario cosechar un producto en su estado óptimo de madurez, que esté sano y realizar un procedimiento de empaque adecuado que permita conservar las uvas de acuerdo a su potencial. El éxito de la comercialización, además de los requisitos mencionados anteriormente, es elegir el cultivar adecuado, que tenga un alto potencial de conservación y embalar la fruta de acuerdo a los requerimientos del comprador (Calvo y Sangiacomo, 1995).

En la cadena agroalimentaria uva de mesa de la Región centro-oeste, se han estimado pérdidas que superan un 20% por problemas en el arribo a los mercados de destino (Batistella y col., 2001). Una de las causas de éstas pérdidas es el desconocimiento del comportamiento postcosecha de algunas cultivares.

El potencial de conservación de cada cultivar está determinado por su susceptibilidad a defectos de calidad. Estos defectos pueden ser desórdenes fisiológicos o patológicos (Burger y col., 2005). Dentro de ellos, el decaimiento causado por patógenos es una de las principales limitantes de la vida útil. La uva de mesa es altamente susceptible a podredumbres de postcosecha causadas por hongos. El desgrane del racimo, la pérdida de firmeza y el manchado de las bayas, también son problemas importantes en el momento de la comercialización.

El pardeamiento del raquis reduce marcadamente la calidad y en consecuencia, la vida postcosecha de la fruta. Crisosto y col. (2001), indicaron que el pardeamiento ocurre como consecuencia de la pérdida de agua y que la sensibilidad a la deshidratación de la fruta varía para diferentes variedades.

En la actualidad la mayor parte de la producción de uva de mesa exportable de la región, es aportada por un número reducido de cultivares (Superior Seedless y Red Globe). En la Región de Cuyo, la información del comportamiento en postcosecha de nuevas cultivares según la zona de producción, es escasa o inexistente (Rivero y Quiroga, 2007).

1.3. Enfermedades en vid

La uva de mesa, a campo, es susceptible al ataque provocado por distintos patógenos; levaduras, hongos, virus e insectos (Tabla 1). La uva de mesa es sensible al decaimiento por varios hongos fitopatógenos, que causa podredumbres tanto en precosecha como en postcosecha (Rodríguez Romera y col., 2012). Estos hongos se encuentran distribuidos ampliamente en el medio ambiente y la mayoría de ellos necesitan una puerta de entrada para iniciar su acción, tales como daños de polilla, picaduras, hendiduras fisiológicas, heridas de granizada, entre otras (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1988).

En las condiciones ecológicas de Cuyo, la podredumbre de los racimos es causada por un complejo etiológico, donde intervienen principalmente hongos filamentosos, además de bacterias, levaduras e insectos; como consecuencia, cualitativamente los racimos pierden estética, lo que obliga a la eliminación manual de granos cuando el ataque es leve. Cuando la enfermedad se ha generalizado, se deben separar los racimos completos atacados, produciendo importantes pérdidas cuantitativas (Oriolani y col., 2012).

Tabla 1: Enfermedades en vid presentes a campo.

ENFERMEDADES DE LA VID EN CAMPO		
Nombre	Agente causal	Daño
Agalla de corona	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Biovar 3</i>	Tumor que obstaculiza la normal circulación de la savia.
Antracnosis de la vid	<i>Sphaceloma ampelinum</i>	Debilitamiento general, disminución de la producción, pérdida cualitativa del racimo, imposibilidad de obtener estaca.
Hoja de malvón	<i>Hongos xilófagos asociados pertenecientes a las Divisiones: Ascomycota, Basidiomycota y Deuteromycota.</i>	Afecta la longevidad y productividad de los viñedos.
Oidio de la vid	<i>Erysiphe necator Schw.</i>	Disminución importante del cuaje, caída de bayas y falta de crecimiento de las mismas. Debilitamiento general. Predisposición al ataque de otros hongos.
Peronóspora de la vid	<i>Plasmopara viticola</i>	Filoptosis. Pérdidas de racimos. Disminución de la calidad de bayas.
Podredumbre gris	<i>Botrytis cinerea Pers</i>	Disminución cuali-cuantitativa de la producción.
Podredumbre de los racimos	Complejo etiológico. Hongos: <i>Botrytis cinerea Pers</i> , <i>Penicillium spp</i> , etc. También bacterias, levaduras e insectos.	Afecta flores y semillas. Alteraciones cualitativas en el aspecto enológico. Producción de micotoxinas cancerígenas.
Podredumbre ácida	Levaduras: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , etc. y bacterias acéticas: géneros <i>Gluconobacter</i> y <i>Acetobacter</i> .	Pérdidas de producción. Mostos con elevada acidez volátil; vinos inestables.
Podredumbre del cuello	<i>Phytophthora spp.</i>	Disminución de la producción. Síntomas se agravan progresivamente y las plantas mueren.
Podredumbre negra	<i>Phoma uvicola</i>	Desecación de granos.
Degeneración infecciosa	<i>Grapevine Fanleaf Virus</i> , <i>Arabis Mosaic Virus</i> y <i>Raspberry Ringspot Virus</i>	Amarillamiento en forma de parches de los tejidos verdes. Pérdida del seno peciolar. Entrenudos cortos. Fasciación de pámpanos.
Enrollamiento	<i>Grapevine Leafroll Associated Virus</i>	Enrollamiento de la lámina foliar hacia la cara abaxial.

Fuente: (Oriolani y col., 2012).

Después de la cosecha los frutos frescos son susceptibles de ser atacados por patógenos saprófitos o parásitos, debido a su alto contenido en agua y nutrientes y porque

han perdido la mayor parte de la resistencia intrínseca que los protege durante su desarrollo en la planta. Su contenido en ácidos orgánicos es suficiente para producir pH inferiores a 4,6 favoreciendo que las formas microbianas predominantes en el fruto sean de origen fúngico (Viñas, 1990).

Las pérdidas económicas ocasionadas por las enfermedades de postcosecha representan actualmente uno de los principales problemas de la frutihorticultura mundial; la reducción de las unidades consumibles es la pérdida más evidente. En frutas, estas enfermedades son ocasionadas por hongos de diversos géneros (*Penicillium*, *Botrytis*, *Alternaria*, entre otros) (Torres Leal, 2012)(Rodríguez Romera y col., 2011) (Tabla 2).

Tabla 2: Enfermedades de la vid presentes en postcosecha.

ENFERMEDADES DE LA VID EN POSTCOSECHA		
Nombre	Agente causal	Daño
Podredumbre de los racimos	Complejo etiológico. Hongos: <i>Botrytis cinerea Pers</i> , <i>Penicillium spp</i> , <i>Alternaria spp</i> , etc.	Podredumbre blanda de sus bayas.
Podredumbre gris	<i>Botrytis cinerea Pers</i>	Disminución cuali-cuantitativa de la producción.
Podredumbre ácida	Levaduras: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , etc. y bacterias acéticas: géneros <i>Gluconobacter</i> y <i>Acetobacter</i> .	Pérdidas de producción. Mostos con elevada acidez volátil; vinos inestables.

Fuente: Rodríguez Romera y col., 2011.

Un patógeno que no estaba citado para la Argentina en postcosecha de uva de mesa es *Alternaria* spp. Sin embargo, en estudios realizados en la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza (EEA Mendoza) en la temporada 2010-2012 se ha visto que está presente en un alto porcentaje. La podredumbre causada por *Alternaria* spp. se desarrolla en frutos almacenados en frío y su ocurrencia esporádica es un serio reto al almacenamiento prolongado de uva de mesa a baja temperatura. Estudios previos muestran que *Alternaria* spp. coloniza bayas, pedicelos y raquis durante todo el período de

desarrollo del racimo, pero que factores de estrés durante el almacenamiento en frío podrían predisponer los racimos al decaimiento por este patógeno. La prodredumbre de los racimos causada por este hongo se caracteriza por provocar lesiones firmes, superficiales, marrones oscuras a negras en bayas, cerca del pedicelo y por micelio gris en raquis y pedicelo (Rodríguez Romera y col., 2012).

1.3.1. Género *Alternaria*

Especies incluidas en el género *Alternaria* están ampliamente distribuidas en la naturaleza, aislándose de diferentes cultivos agrícolas, del suelo, del polvo ambiental, como así también de la materia orgánica en descomposición. Su distribución es universal y se considera que es un hongo de espacios abiertos (Oviedo, 2012).

El género incluye especies saprófitas y patógenas de plantas, responsables del deterioro de frutas y vegetales en el campo, durante el transporte y el almacenamiento; provocando considerables pérdidas económicas (Pavón Moreno y col., 2012).

En general, las especies de *Alternaria* son patógenos foliares que provocan una destrucción relativamente lenta de los tejidos del huésped a través de la reducción del potencial fotosintético. Normalmente, no afectan el transporte de nutrientes o del agua a lo largo de la planta, porque no se dirigen específicamente a las raíces o vasos (Rotem, 1994).

Asimismo, los miembros del género *Alternaria* son causa frecuente de infecciones en reposo en el que el hongo penetra en el tejido donde permanece latente hasta que las condiciones para la infección son favorables (Pavón Moreno y col., 2012).

Por otra parte, la mayoría de las especies de *Alternaria* tienen la habilidad de producir una gran variedad de metabolitos secundarios, los cuales pueden jugar roles importantes, ya sea en la patología de plantas, en la calidad y/o en la seguridad alimentaria de los productos agrícolas (Pavón Moreno y col., 2012).

El hongo puede sobrevivir como micelio o esporas en restos vegetales en descomposición durante un tiempo considerable, o como una infección latente en las semillas (Rotem, 1994). Si se transmite por semilla, *Alternaria* spp. puede atacar a la plántula una vez que la semilla ha germinado. En otros casos, las esporas se propagan principalmente por el viento a superficies de las plantas donde la infección puede ocurrir. Normalmente, los tejidos debilitados, ya sea por la acción de los insectos, el estrés por frío, la sobre maduración de los frutos, las lesiones, la senescencia, entre otros, son más susceptibles a la infección por *Alternaria* spp. que los tejidos sanos (Thomma, 2003).

Después de la cosecha, las especies de *Alternaria* pueden permanecer sobre las frutas produciendo lesiones que alteran su aspecto. Además, pueden crecer a temperaturas bajas y se las identifica frecuentemente cómo agentes de deterioro de los frutos refrigerados (Visconti y Sibila, 1994).

A pesar de las diferencias taxonómicas y patogénicas entre las especies de *Alternaria*, la mayoría de ellas causan un patrón de infección similar. Las esporas inactivas presentan paredes muy melanizadas que, en condiciones favorables, son capaces de producir uno o más tubos germinativos que penetran la cutícula, a través de estomas o heridas, e invaden la planta (Thomma, 2003).

El género *Alternaria* compite espacialmente con otras especies fúngicas sobre la superficie vegetal siendo antagonista de *Cladosporium*, *Epicoccum* y *Fusarium* (Lacey, 1989). *Alternaria* es, después de *Cladosporium*, el género cuyas esporas se encuentran suspendidas en el aire con mayor frecuencia (Oviedo, 2012).

1.3.1.1. Taxonomía del género *Alternaria*

El género *Alternaria* fue establecido por Nees en 1816 con la especie tipo *A. alternata* (originalmente *Alternaria tenuis*), y clasificado taxonómicamente de la siguiente manera:

- **Reino:** Fungi.
- **Filo:** Deuteromycetes.
- **Clase:** Hyphomycetes.
- **Orden:** Hyphomycetales.
- **Familia:** Dematiaceae.
- **Género:** *Alternaria*.

Es un hongo filamentoso con conidióforos simples y tabicados. Los conidios de *Alternaria* spp. poseen septos transversales y longitudinales conocidos como dictiosporas; son de color pardo y poseen un extremo apical en pico (faeodictiosporas). Se originan por brotación apical a partir de una célula conidiógena o de la espora anterior, dando lugar, en este último caso, a una cadena que suele ramificarse si una espora produce más de un brote. Los conidios de este género presentan un desarrollo acrópeto (Simmons, 2007).

Andersen y col., 2001 consideraron el aspecto de los conidióforos y agruparon a las especies en tres secciones que abarcaban seis grupos especies en base a la morfología sobre agar papa zanahoria (APZ) a 25 °C bajo alternancia de un fotoperíodo día-noche. Por otro lado, Chou y Wu (2002) dividieron a las especies en tres secciones según formaran o no cadenas de dictiosporas, y consideraron, además, el largo de las cadenas de las esporas.

Posteriormente, Simmons (2007) describió un sistema taxonómico basado en una clave dicotómica que considera la observación de las características morfológicas en el cultivo. Se tienen en cuenta las siguientes características de las especies descritas: desarrollo de la colonia y apariencia; tipo de esporulación visible a 50X; patrones de esporulación; conidióforos; conidios e hifas accesorias observables a mayor magnificación; y comparación de taxos similares. Una primera separación de las especies del género en categorías mayores fue realizada en base a la morfología del conidio y a los patrones de esporulación. Se requiere para una correcta identificación condiciones de cultivo

controladas (ciclos de luz, medios de cultivo, temperatura, etc.) y estandarizadas (Oviedo, 2012).

Dentro del género *Alternaria*, las especies se definen principalmente por las características de los conidios. Se han descrito más de 270 especies en todo el mundo (Simmons, 2007). Sin embargo, la considerable variabilidad de los conidios en cuanto tamaño, forma y tabicación, dentro de cada especie, así como dentro de una misma colonia, la superposición de las características conidiales entre especies estrechamente relacionadas, sumado a la influencia de los factores intrínsecos y a diferentes condiciones ambientales, hace que la morfología sea un criterio poco fiable para el establecimiento de los límites de identificación entre las especies (Rotem, 1994).

Simmons (2007) ha organizado al género en una serie de grupos especies, cada uno de ellos caracterizados por una especie tipo que los representa. Un número importante de estudios filogenéticos respaldan el agrupamiento de las especies de *Alternaria* en numerosos grupos especies (Chou y Wu, 2002; Hong y col., 2005), algunos de ellos son: 1) grupo especie *A. alternata* que incluye especies tales como *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. tenuissima*, *A. gaisen*, *A. citri* y *A. longipes*. (Figura 4); 2) grupo especie *A. infectoria* que incluye especies tales como *A. arbusti*, *A. ethzedia*, *A. infectoria*, *A. intercepta*, *A. metachromatica*, *A. oregonensis*, *A. photistica*, *A. triticina*, *A. viburni* y *A. triticimaculan* (Figura 5); 3) grupo especie *A. porri* que incluye especies tales como *A. porri*, *A. dauci* y *A. tomatophila*. (Figura 6) y 4) grupo especie *A. radicina* (Figura 7).



Figura 4: Grupo especie *A. Alternata*: conidios y conidióforos. N: *A. daucifolii*; L–M: *A. arborescens*; H–J: *A. alternata*; O: *A. gaisen*; E: *A. limoniasperae*; K: *A. tenuissima*; P: *A. longipes* (Woudenberg y col., 2013).



Figura 5: Grupo especie *A. infectoria*: conidios y conidióforos. A–B: *A. ethzedia*; C–D: *A. infectoria*; E–F: *A. conjuncta*; G–H: *A. oregonensis* (Woudenberg y col., 2013).



Figura 6: Grupo especie *A. porri*: conidios y conidióforos. A–C: *A. daucii*; D–F: *A. pseudorostrata*; G–H: *A. solani* (Woudenberg y col., 2013).



Figura 7: Grupo especie *A. radicina*: conidios y conidióforos. A–C: *A. carotiincultae*; D–E: *A. petroselini*; F–G: *A. radicina*; H–I: *A. selini*; J–L: *A. smyrnii* (Woudenberg y col., 2013).

El uso conjunto de técnicas moleculares con metodologías convencionales resulta de gran valor para contrarrestar las limitaciones que se presentan al utilizar criterios morfológicos y bioquímicos en la caracterización de los organismos. Todas estas técnicas proveen una herramienta valiosa en el estudio de diferentes organismos en especial el estudio sistemático de los hongos, proporcionando una información más objetiva (Oviedo, 2012).

Con el advenimiento de las técnicas moleculares se han identificado regiones del ADN con diferentes grados de variabilidad que han permitido la detección o identificación

de especies o grupos taxonómicos mayores. Un requerimiento crucial para una exitosa detección de un microorganismo a nivel de especie por medio de un análisis de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) es la elección de un marcador genético adecuado durante el proceso de diseño de los cebadores, que permitan un alto grado de especificidad (Scheu y col., 1998).

Para una correcta identificación a nivel de especie dentro del género *Alternaria*, es necesaria una aproximación polifásica utilizando características morfológicas, fisiológicas y moleculares.

1.3.1.2. Micotoxinas

Algunas especies de *Alternaria* son bien conocidas por su habilidad de producir un amplio espectro de metabolitos secundarios. Estos son compuestos que poseen bajo peso molecular producidos durante la fase estacionaria de crecimiento y no son necesarios para el crecimiento o el desarrollo del hongo que las produce. Actualmente todavía se debate sobre la naturaleza del metabolismo secundario y el rol que dichos metabolitos tienen en la biología de los organismos que los producen. Muchos de estos metabolitos tienen actividad biológica y pueden ser tóxicos para otros microorganismos (antibióticos), las plantas (fitoxinas) o los animales (micotoxinas) (Fox y Howlett, 2008).

Las micotoxinas son compuestos orgánicos biológicamente activos que pueden causar problemas de intoxicaciones agudas, subagudas o crónicas con efectos carcinogénicos, teratogénicos, mutagénicos, neurotóxicos e inmunosupresores (Richard, 2007). Cuando las toxinas fúngicas son ingeridas o inhaladas en determinadas concentraciones por los animales o por el hombre producen efectos perjudiciales para la salud, debido a que disminuyen la disponibilidad de alimentos proteicos, afectan la inmunidad humoral y celular causando una mayor predisposición a las infecciones microbianas y por la morbi-mortalidad de animales de producción (Bräse y col., 2009).

La mayoría de las especies productoras de micotoxinas son saprófitas. Las principales micotoxinas han sido reconocidas como productos metabólicos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Sidhu, 2002).

1.4. Control de enfermedades en postcosecha

Para satisfacer la demanda creciente de alimentos de la población mundial, es fundamental el control de plagas y enfermedades que afectan a las plantas cultivadas que se utilizan para tal fin (Montealegre y Pérez, 2013).

Uno de los métodos más utilizados para contrarrestar las pérdidas en cultivos agrícolas por organismos o plagas causantes de enfermedades es el uso de pesticidas. Estas son sustancias químicas que producen innumerables efectos indeseados sobre el ecosistema, induciendo a la generación de organismos resistentes, persistencia ambiental de residuos tóxicos, contaminación de suelos y recursos hídricos, lo cual altera el equilibrio ecológico (Izzeddin y Medina, 2011).

Conociendo así los efectos adversos que causan los agroquímicos, actualmente la tendencia en el área agroindustrial, se inclina cada vez más a la disminución tanto de costos en la producción como de la presencia de residuos de pesticidas en los productos agrícolas y el medio ambiente, situando así al control biológico como una alternativa dentro del manejo de plagas y enfermedades (Izzeddin y Medina, 2011).

1.4.1. Tratamiento tradicional con dióxido de azufre (SO₂)

Como se mencionó anteriormente, los racimos de uva de mesa son muy susceptibles a pardeamiento del raquis y a podredumbre de postcosecha causada por hongos filamentosos y levaduras. El tratamiento comercial más usado en diversos países del mundo para reducir o evitar ambos daños, es la aplicación de dióxido de azufre (SO₂).

La uva tolera la aplicación de SO₂ gracias a la característica de impermeabilidad de su piel, que impide la penetración del gas a su interior (Berger, 1982). La fumigación con

SO₂ puede matar las esporas o micelio superficial de *Alternaria* spp., pero no mata el micelio que ha invadido las bayas. Las esporas emergerán y desarrollarán en la superficie del tejido infectado bajo condiciones de humedad y temperatura (Swart y col., 1995).

El SO₂ puede dañar la fruta cuando existen vías de acceso tales como heridas en la piel, desprendimiento del pecíolo y lenticelas no suberizadas (encontradas en fruta inmadura). Así también, se observan alteraciones cuando la concentración del SO₂ excede lo normal por un tiempo prolongado (Berger, 1982). El SO₂ puede provocar sabor picante y olor irritante; deteriorar las bayas por blanqueamiento y aumentar la tasa de pérdida de agua; y por lo tanto causar pardeamiento prematuro de los tallos (Swart y Holz, 1994).

Además, estudios previos indican que el almacenamiento a baja temperatura y el tratamiento con SO₂ pueden predisponer a la uva de mesa a la enfermedad (Swart y col., 1995).

La demanda mundial para reducir el uso de pesticidas, proteger el medio ambiente y la salud del consumidor, limita cada vez más la aplicación de químicos en productos frutihortícolas. Muchos países importadores de uva de mesa han fijado límites cada vez más estrictos a la concentración de anhídrido sulfuroso (Rivero y Quiroga, 2010). Además, hay un marcado cambio de tendencia en la comercialización de productos hortofrutícolas hacia los mercados de productos ecológicos u orgánicos y, al mismo tiempo, los mercados 'tradicionales' están exigiendo el cumplimiento de criterios propios más restrictivos que los límites máximos de residuos (LMR) establecidos por la legislación (Pássaro Carvalho y col., 2012).

Debido a lo expuesto, el uso del SO₂ en la conservación de uva de mesa está siendo cada vez más cuestionado. Es por ello, que las investigaciones están enfocadas a desarrollar métodos alternativos de control, tales como el control biológico como potenciales sustitutos al su uso de SO₂ (Rivero y Quiroga, 2010).

1.4.2. Tratamientos con controladores de origen natural

Los productos alternativos a los fungicidas de síntesis convencionales deben ser sustancias, naturales o de síntesis, con efectos toxicológicos residuales sobre el medioambiente, personas y animales, conocidos y muy bajos. Por este motivo se evalúan principalmente sustancias presentes de forma natural en plantas, animales o microorganismos o, en el caso de productos sintetizados artificialmente, aditivos alimentarios permitidos sin restricciones por la legislación (Pássaro Carvalho y col., 2012).

Una de las herramientas de manejo disponible para lograr el control de plagas y enfermedades, es la utilización de **biocontroladores**, la cual ha contribuido a una producción más ecocompatible y menos contaminante (Montealegre y Pérez, 2013).

La conservación durante postcosecha presenta un desafío para el control biológico, mediante el uso de microorganismos antagonistas, en el combate de hongos fitopatógenos. El ambiente parcialmente controlado, de temperatura y humedad, puede ayudar a alterar el equilibrio en las interacciones entre el huésped, el patógeno y el antagonista a favor de este último (Pássaro Carvalho y col., 2012).

En un sentido amplio y según la definición de Cook y Baker (1983), el control biológico involucraría todas aquellas prácticas tendientes a disminuir la incidencia de enfermedades excluyendo el control químico (Mateluna Estay, 2006).

El **control biológico** busca mantener un equilibrio en el agro-ecosistema, de forma tal de proteger a la planta, para que no sufra daños significativos en presencia del patógeno (Mateluna Estay, 2006). En relación con los productos químicos, los agentes de control biológico presentan ventajas claras pues son más seguros, ya que no se acumulan en los alimentos y producen un efecto insignificante en el equilibrio ecológico, pues no destruyen a los enemigos naturales, y son compatibles con otros sistemas de lucha (Pássaro Carvalho y col., 2012).

Para que un antagonista sea considerado como tal, debe ser capaz de impedir que un patógeno pueda colonizar un determinado ambiente, impidiendo así también, el inicio de la infección. En su defecto este debería poder destruir el patógeno ya instalado impidiendo que se desarrolle la infección (Martín Russo, 2011).

Para ser más eficaces, los antagonistas o controladores biológicos deben ser: genéticamente estables, efectivos a bajas concentraciones, fáciles de reproducir en medios de cultivo económicos, efectivos para controlar un amplio rango de patógenos, preparados para ser distribuidos en una forma fácil, no tóxicos para los seres humanos, resistentes a los pesticidas, compatibles con otros tratamientos (químicos y físicos), no patogénicos para las plantas y activos contra el patógeno de múltiples formas (Mateluna Estay, 2006).

Durante los últimos años numerosos agentes de biocontrol han sido investigados frente a diversas enfermedades de postcosecha de frutos. Aunque en el plano experimental se han encontrado y patentado en laboratorios de todo el mundo numerosas levaduras, bacterias y también hongos filamentosos con capacidad antagónica contra podredumbres de postcosecha, los registros son complicados y el uso comercial es escaso. Normalmente los mejores resultados se obtienen en usos preventivos, ya que en general la actividad fungicida o curativa es limitada. Tienen un gran potencial como tratamientos complementarios a otros sistemas alternativos respetuosos con el medioambiente (Pássaro Carvalho y col., 2012).

La falta de antagonistas comercializados se debe a que son pocos los países que, como Estados Unidos, disponen de normativas específicas y simplificadas para el registro de este tipo de productos biológicos. En otros países, como los de la Unión Europea, el registro se ve obstaculizado por la exigencia de estudios toxicológicos largos y costosos equiparables a los exigidos para cualquier pesticida de síntesis química (Pássaro Carvalho y col., 2012).

Aunque el control biológico no pretende reemplazar, en el corto plazo, completamente los sistemas de control químico, puede ser utilizado junto con otras técnicas como parte de un sistema integrado de control y ha de ser puesto en práctica integrándolo con los métodos y con las estrategias de producción existentes actualmente (Robles Carrión, 2010).

1.4.2.1. Tratamiento con recubrimientos de quitosano

Las películas o cubiertas comestibles consisten en capas delgadas que se forman o forman directamente sobre la superficie de los productos vegetales como envolturas protectoras. Se elaboran a partir de una gran variedad de proteínas, polisacáridos y lípidos, ya sea como componentes únicos o combinados (Ramos-García y col., 2010). Pueden ser usados como barrera para reducir los índices de respiración y transpiración a través de la superficie de las frutas, retardando el crecimiento microbiológico y los cambios de color, y mejorando la textura y calidad de la fruta (Cruañes y Locaso, 2011).

El carácter comestible, la degradación y el aumento de la seguridad alimentaria son los tres principales beneficios de las películas comestibles altamente funcionales. Representan una alternativa sin costos ambientales y sin efectos adversos sobre la salud (Cruañes y Locaso, 2011).

El mecanismo por el cual los recubrimientos conservan la calidad de frutas y vegetales es debido a que crean una barrera física a los gases, produciendo una atmósfera modificada ya que reducen la disponibilidad de O₂ e incrementan la concentración de CO₂ (Ramos-García y col., 2010).

Los recubrimientos hechos a base de polisacáridos han sido los más utilizados para recubrir frutos, y esto es debido a sus propiedades mecánicas de adherencia y flexibilidad en la superficie de los productos hortofrutícolas (Ramos-García y col., 2010).

Un carbohidrato que se utiliza para la formulación de los recubrimientos comestibles es el quitosano; el mismo es un polisacárido que se obtiene del exoesqueleto de crustáceos mediante la desacetilación parcial de la quitina (Ramos-García y col., 2010).

El quitosano posee actividad biológica como antimicrobiano contra un amplio espectro de hongos filamentosos, levaduras y bacterias. Es biocompatible, biodegradable y no tóxico (Cruañes y Locaso, 2011).

Los recubrimientos con quitosano forman una cubierta en la superficie de los frutos, que actúa como una barrera mecánica para proteger al fruto de infecciones causadas por hongos filamentosos, ayudando así a disminuir las enfermedades causadas durante el almacenamiento por *Rizophus stolonifer*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*, entre otras (Ramos-García y col., 2010).

Su actividad fungicida ha sido reportada en varios estudios, inhibiendo el crecimiento de los hongos causantes de enfermedades postcosecha, manifestándose esta inhibición en el crecimiento micelial y esporulación o en ambos estados de desarrollo (El Gahaout, 1992a).

El quitosano se adhiere a la membrana plasmática de los hongos gracias a las interacciones electrostáticas entre las cargas positivas del quitosano y a las cargas negativas de los fosfolípidos formadores de membrana, una vez adherido a la membrana, causa una filtración a través de ella hasta llegar al citosol; el quitosano utiliza energía para atravesar la membrana, sin embargo, este proceso no involucra al proceso de endocitosis. Los hongos normalmente mantienen en su citosol niveles muy bajos de Ca^{2+} , esto es gracias a la barrera que forma la membrana plasmática, la cual posee reguladores herméticos que impiden el paso libre de gradientes de Ca^{2+} . Este proceso de regulación, en el que también se involucra al mecanismo homeostático, permite que se regule la concentración de Ca^{2+} dentro del citosol; enviando fuera de la célula al exceso de Ca^{2+} o los almacenándolo en organelas de la propia célula. Por lo tanto, al introducirse el quitosano

al interior del citosol modifica drásticamente el mecanismo homeostático, ya que al formar canales en la membrana permite el paso libre de gradientes de calcio, ocasionando una inestabilidad en la célula hasta su muerte (Ramos-García y col., 2010).

El efecto contra diversos hongos fitopatógenos dependerá del grado de polimerización, de acetilación, naturaleza del hospedante, composición de los nutrientes, condiciones del medio ambiente y período de incubación (Robles Carrión, 2010).

Actualmente, se llevan a cabo investigaciones en distintos países que tienen como objetivo reducir la presencia de las especies fitopatógenas en los productos agrícolas durante la postcosecha. En cuanto al control biológico para *Alternaria* spp. en postcosecha de uva de mesa, no se encontraron antecedentes previos.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

- ❖ *Alternaria* spp. coloniza la uva de mesa cv. Red Globe desde estadíos tempranos de su ciclo fenológico.
- ❖ El uso de productos de origen natural es una alternativa viable para preservar la calidad de los racimos de uva de mesa cv. Red Globe, en reemplazo de los generadores de dióxido de azufre.

2.2. Objetivo General

- ❖ Estudiar la etiología de *Alternaria* spp. en uva de mesa durante el ciclo fenológico de la vid y en conservación; y proponer en postcosecha un manejo alternativo al uso de generadores de dióxido de azufre (método tradicional) y de menor impacto ambiental, utilizando agentes de control biológico o recubrimientos de quitosano.

2.3. Objetivos Específicos

- ❖ Identificar mediante técnicas morfológicas y moleculares los aislamientos de *Alternaria* spp. en uva de mesa en distintas etapas del ciclo fenológico de la vid y en postcosecha, en la región de Mendoza.
- ❖ Evaluar la eficiencia de la cepa de la levadura *Metschnikowia pulcherrima* RCM2 y del quitosano para reducir la incidencia de la podredumbre causada por *Alternaria* spp. en uva de mesa en postcosecha.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestreo

El muestreo se efectuó a partir de sucesivas etapas del desarrollo fenológico de la uva: floración, grano pimienta, grano arveja, envero y cosecha; también se extrajeron muestras de postcosecha (30, 60 y 90 días) conservadas en cámaras frigoríficas a una temperatura de 0-0,5 °C, con una humedad relativa del 90-95% y atmósfera no controlada.

A campo, la toma de muestras se realizó en un viñedo de uva de mesa localizado en Junín, Mendoza; esta finca cuenta con 20 hectáreas de uva de mesa, las cuales fueron implantadas en el año 2010 (Figura 8).



Figura 8: Viñedo de uva de mesa cv. Red Globe (Rodríguez Romera y col., 2011).

Se utilizó un muestreo aleatorio simple con parcelas ubicadas completamente al azar. Se muestreó material de la variedad de uva de mesa Red Globe; la misma posee muy

buena conservación frigorífica y es resistente al transporte. Se cosecharon los racimos de cada parcela en forma aislada (Figura 9).

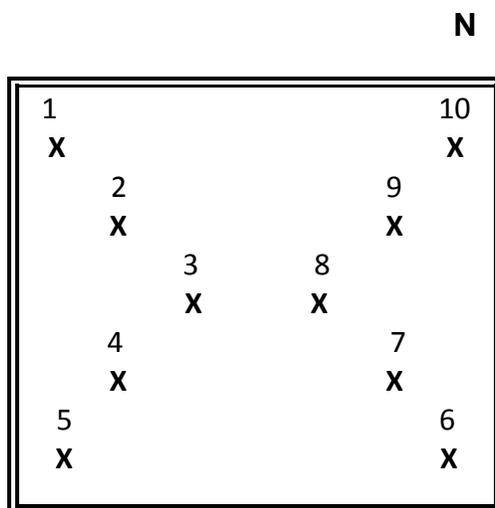


Figura 9: Esquema de recolección de muestras a campo.

Las bayas asintomáticas se trasladaron al laboratorio y se procedió a la desinfección superficial de las mismas con alcohol al 70% por 30 segundos y con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto, luego se escurrieron y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. De la etapa de postcosecha, además de bayas, se tomaron también semillas y se desinfectaron superficialmente; a fin de detectar si el inóculo de *Alternaria* spp. se encontraba dentro de la baya.

Una parte de los racimos muestreados fue almacenada en cámara frigorífica a 0-0,5 °C, con una humedad relativa del 90-95% y atmósfera no controlada para simular las condiciones de postcosecha. Posteriormente, se tomaron muestras a los 30, 60 y 90 días de conservación para realizar aislamientos de *Alternaria* spp., tanto de bayas como de semillas sintomáticas y asintomáticas.

3.2. Aislamiento de *Alternaria* spp.

El aislamiento de *Alternaria* spp. se realizó por el método de siembra directa. Las flores, bayas y semillas (enteras y partidas) fueron colocadas sobre la superficie de placas de Petri conteniendo dos medios de cultivo sólidos, Agar Diclorán Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) y Agar Diclorán Glicerol al 18% (DG18); a fin de comparar el desarrollo de las colonias en los mismos y determinar cuál se ajustaba mejor a los requerimientos del ensayo.

Se sembraron, para la etapa de floración, 10 flores por placa; para las etapas de grano pimienta, grano arveja, envero, cosecha y postcosecha (a los 30, 60 y 90 días de conservación) se sembraron 10 trozos de bayas infectadas (cortados con bisturí) por placa de Petri. En total se sembraron 200 flores, 200 bayas por etapa, y 200 bayas y 200 semillas por cada fecha de conservación en postcosecha. Además, de postcosecha se extrajeron semillas para ser sembradas, enteras y partidas. Las placas se incubaron a 25 °C por 7 días en oscuridad.

Cumplido el tiempo de incubación, se determinó el porcentaje de infección en cada una de las etapas muestreadas. Posteriormente, los aislados de *Alternaria* spp. se subcultivaron en agar nutritivo sintético (ANS) y se llevaron a estufa a 25 °C por 7 días. Luego se conservaron a 4°C para su posterior identificación.

3.3. Conservación de aislados de *Alternaria* spp.

A fin de conservar la colección de aislados obtenida se preparó una solución de glicerol al 15% empleándolo como crioprotector y se fraccionó en tubos Eppendorf. Se extrajeron 4 discos de agar con micelio fresco de cada aislado. Se conservaron por duplicado a -80 °C.

3.4. Identificación morfológica y molecular de los aislados de *Alternaria* spp.

3.4.1. Identificación morfológica

Se seleccionaron un total de 107 aislados con características morfológicas del género *Alternaria* a partir de los cultivos en ANS de las bayas de racimos de uva de mesa y de flores, provenientes de viñedos ubicados en Junín, Mendoza, campañas 2014/15.

Se realizó un cultivo monospórico por cada aislado. A tal fin se tomó una pequeña cantidad superficial de micelio y se preparó una suspensión en 10 ml de agua destilada estéril al 0.1% de Tween 80. Posteriormente, se dispersó el contenido de cada tubo sobre una placa de Petri con medio agar agua. Se diseminó la suspensión por rotación para que las esporas se fijaran al agar; a continuación se descartó el excedente. Las placas de Petri se incubaron inclinadas apoyadas sobre una pared (aprox. 45°) durante 16 horas a temperatura ambiente. A partir de dichas placas y mediante la utilización de una lupa estereoscópica, se aisló una espora de cada aislado, y se realizaron posteriormente siembras monospóricas en medio agar papa zanahoria (APZ). Los cultivos se incubaron a 25 °C por 7 días. Una vez finalizado el periodo de incubación, se transfirieron a los medios de cultivo recomendados según Simmons (2007) para la identificación morfológica de los grupos especies de *Alternaria* spp.: APZ y medio de cultivo V8 (V8). Los cultivos se incubaron bajo ciclos alternativos de luz blanca/luz negra (8/16 horas) a 22°C para inducir la formación de los patrones de esporulación característicos. La identificación se realizó según la metodología propuesta por Simmons (2007) en base a características macroscópicas y microscópicas (Figura 10 y 11). En el primer caso se observó el color de la colonia, el diámetro, la textura y el número de anillos; en el segundo caso las características observadas, al microscopio óptico y a la lupa, fueron los patrones de esporulación, la morfología de conidióforos, el tamaño y la forma de conidios, la presencia o ausencia de cadenas, el número de conidios por cadena y la ramificación de las mismas.

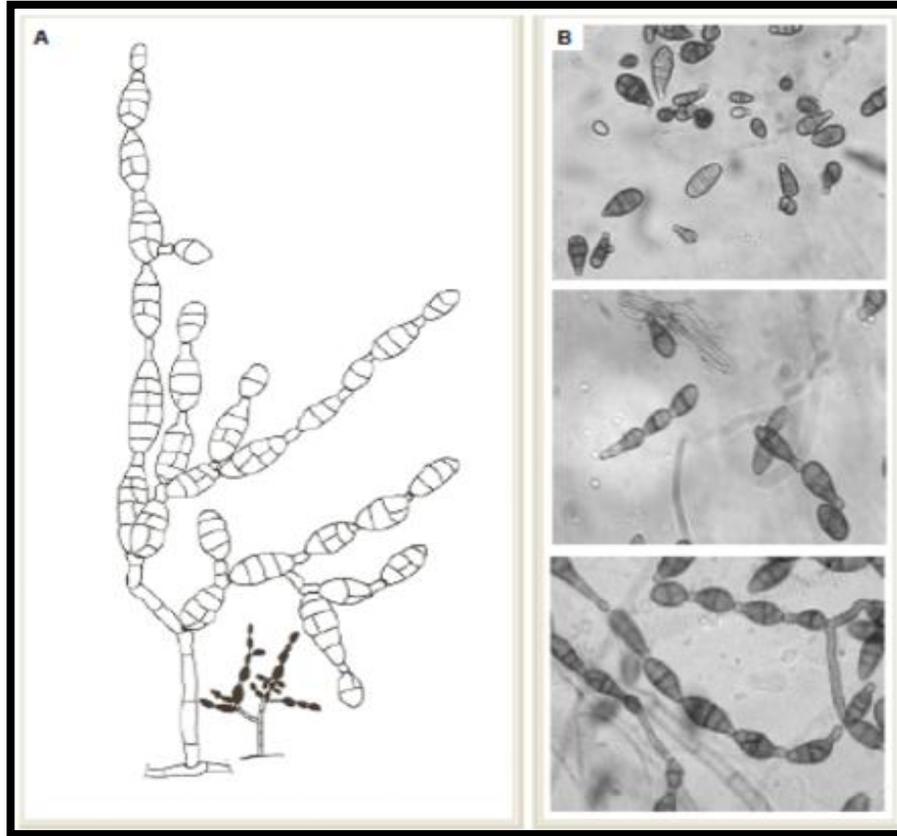


Figura 10: Conidios, conidióforos y patrones de esporulación de *Alternaria alternata*, en los medios de cultivo APZ (A) y microscopía 50X (B) (Oviedo, 2012).

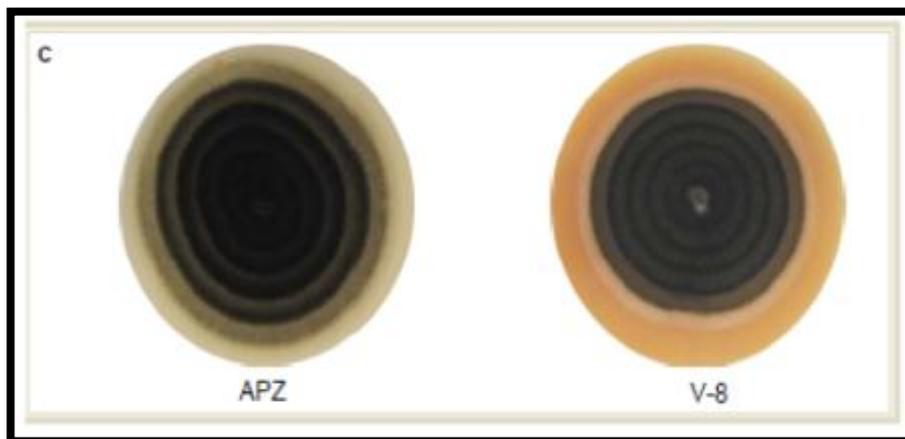


Figura 11: Colonia de *Alternaria alternata* en los medios de cultivo APZ y V8 incubada durante 7 días a 22°C (C) (Oviedo, 2012).

3.4.2. Identificación molecular

3.4.2.1. Extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico

A fin de continuar con la identificación utilizando técnicas de biología molecular, se seleccionó un número de cepas representativas de cada estadio muestreado para efectuarles una extracción de ADN. Se tomó micelio fresco de los cultivos monospóricos seleccionadas. El mismo fue añadido a tubos Eppendorf de 1,5 ml que contenían 500 µl de buffer de lisis (400mM Tris-Hcl (pH 8); 60mM EDTA (pH 8); 150mM ClNa y 1% SDS). Los tubos fueron incubados en agitación por el lapso de 30 minutos. Posteriormente, se centrifugaron durante 2 minutos a 10000 rpm. Se transfirió el sobrenadante de cada tubo a uno nuevo y se descartaron los originales. Se centrifugaron, nuevamente, a 10000 rpm por 2 minutos y se transfirió el sobrenadante de cada tubo a otro, descartando los anteriores. Se añadió 500 µl de isopropanol en los tubos, los mismos se mezclaron por inversión y se vortearon durante un minuto. A continuación, los tubos se centrifugaron a 10000 rpm por 2 minutos y se eliminó el sobrenadante mediante un golpe seco, volteándolos. El paso siguiente consistió en lavar los pellets remanentes, añadiendo 300 µl de etanol 70 % frío; la operación se realizó dos veces, centrifugando a 10000 rpm durante 3 minutos entre una y la otra y también al concluir la segunda. Finalmente se secó el pellet a temperatura ambiente durante una hora, dejando los tubos destapados sobre papel absorbente; posteriormente el ADN fue resuspendido en 50 µl de agua mili Q estéril. El ADN genómico se cuantificó por comparación visual usando ADN del bacteriófago λ digerido con *HindIII* (New England, BioLabs, Inc.) como ADN testigo. Las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa al 1% para corroborar su integridad. Se realizaron las diluciones correspondientes en agua bidestilada hasta obtener una concentración de 100 ng en un volumen final de 10 µl para realizar las reacciones.

3.4.2.2. Reacciones de PCR

3.4.2.2.1. Identificación de género

Para confirmar la identificación morfológica de los aislados de *Alternaria* spp. se usó la metodología propuesta por Pavón y col. (2010). Esta metodología basada en un método de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) que utiliza como cebadores oligonucleótidos generados a partir del gen *Alt a1*, permite una rápida detección del género *Alternaria* y la posterior identificación a nivel de grupo especie.

En un primer paso se usaron los cebadores derivados del *gen Alt a1* específicos de género, Dir5cAlta1 y Inv4Alta1 (Tabla 3). Las reacciones de PCR para identificación de género se realizaron en una mezcla de 10 µl que contenía 1X buffer PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-ClH a pH 8,3); 0,01875 mM de cada dNTP (1mM); 0,4 µM de cada uno de los cebadores seleccionados (5 µM); 2,5 mM de MgCl₂ (25 mM); 0,5 Unidades de Taq ADN polimerasa (Go Taq polymerase, Promega) (5 U/µl), 10-25 ng de ADN genómico.

Se usó un control negativo en cada reacción conteniendo todos los reactivos, excepto el ADN.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Gradient usando el siguiente programa: 1 ciclo a 94 °C durante un minuto, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 30 segundos a la temperatura de *annealing* y 72 °C por 45 segundos. Se realizó una extensión final a 5 minutos a 72 °C después de los 35 ciclos.

Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,7% teñido con bromuro de etidio y fueron visualizados con un transiluminador bajo luz UV. El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación visual con ADN testigo (100 bp ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 100-1500bp.

Tabla 3: Secuencia de los cebadores específicos utilizados en la determinación del género *Alternaria*.

	Secuencia del cebador (5´ - 3´)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)	Tamaño del producto (bp)
Dir5cAlta1	GAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTT	55	195
Inv4Alta1	CGCGGCAGTAGTTGGGAA		

Fuente: Pavón y col. (2010).

A partir de la temperatura de *melting* otorgada por el fabricante de los cebadores (Invitrogen), se ajustó la temperatura de *annealing* máxima y en consecuencia se estableció un gradiente de temperatura de prueba para hacer correr el ciclo programado, a fin de determinar a cuál de ellas la amplificación era más eficiente.

3.4.2.2.2. Identificación de los grupos especies de *Alternaria* spp.

Para la identificación de los grupos especies de *Alternaria* spp. se utilizó la metodología propuesta por Pavón y col. (2010). Se usaron los cebadores derivados del *gen Alt a1*, AaltDA1ta1 y AinflAlta1 correspondiente al grupo especie *A. alternata* (Tabla 4). Las reacciones de PCR se realizaron en una mezcla de 10 µl que contenía: Las reacciones de PCR para identificación de grupos especie se realizaron en una mezcla de 10 µl que contenía 1X buffer PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-ClH a pH 8,3); 0,01875 mM de cada dNTP (1mM); 0,4 µM de cada uno de los cebadores seleccionados (5 µM); 2,5 mM MgCl₂ (25 mM); 0,5 U de Taq ADN polimerasa (Go Taq polymerase, Promega) (5 U/µl), 10-25 ng de ADN genómico.

El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación visual con ADN testigo (50 bp ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 50-1500bp.

Tabla 4: Secuencia de cebadores específicos utilizados en la determinación de los diferentes grupos especies de *Alternaria* spp.

Secuencia del cebador (5´- 3´)		Temperatura de annealing (°C)	Tamaño del producto (bp)	Grupo especie
AaltDAIta1	CGCATCCTGCCCTGTCA	65	118	<i>A. alternata</i>
AinflAlta1	GTTGGTAGCCTTGATGTTGAAGC			
AinfDAIta1	CGCATCCTGCCCAGTTG	63	118	<i>A. infectoria</i>
AinflAlta1	GTTGGTAGCCTTGATGTTGAAGC			
AsolDAIta1	CGCATCCTGCCCCGTCT	65	118	<i>A. porri</i>
AsollAlta1	GTTGGTGGCCTTGATGTTGAAG			
AraDAIta1	CCCGCCAGGACAACGCT	63	131	<i>A. radicina</i>
AsollAlta1	GTTGGTGGCCTTGATGTTGAAG			

Fuente: Pavón y col. (2010).

Nuevamente, a partir de la temperatura de *melting* otorgada por el fabricante de los cebadores, se ajustó la temperatura de *annealing* máxima y en consecuencia se estableció un gradiente de temperatura de prueba para hacer correr el ciclo programado, a fin de determinar a cuál de ellas se obtenía mejor amplificación.

3.5. Ensayos en postcosecha con controladores de origen natural

Se realizó un ensayo *in vivo* (racimos de uvas en conservación en frío), evaluando la efectividad de una cepa de la levadura *Metschnikowia pulcherrima* (RCM2) previamente seleccionada (Ponsone y col., 2012) y de diferentes concentraciones de quitosano como tratamientos postcosecha alternativos al SO₂ en uva de mesa cv. Red Globe. Las evaluaciones se realizaron a los 15, 30, 60 y 90 días con racimos conservados en cámaras frigoríficas a una temperatura de 0-0,5 °C, con una humedad relativa del 90-95% y atmósfera no controlada.

3.5.1. Obtención del material

- Obtención del patógeno: Se utilizó una cepa de *Alternaria alternata* aislada de postcosecha, campaña 2014-2015, e identificada como tal en el punto 3.4.2.2.2.
- Obtención de la uva de mesa: Se trabajó con racimos de uva aparentemente sanos de la cultivar Red Globe, provenientes de INTA de Junín, Mendoza. Los racimos se cosecharon el día anterior al comienzo del ensayo e inmediatamente fueron trasladados a cámara frigorífica a 0-0,5°C y 95% HR.
- Obtención de la solución de quitosano: Se trabajó con quitosano obtenido experimentalmente en el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) de Mar del Plata, según procedimientos internos a partir de exoesqueletos de langostinos (cáscaras o peladuras). Se utilizó disuelto en agua destilada estéril (solución de trabajo al 8%) pH ajustado a 4.5 con ácido acético.
- Obtención de levaduras nativas: Se utilizó la cepa de levadura indígena potencialmente biocontroladora previamente aislada; identificada como *Metschnikowia pulcherrima* (RCM2). Dicha cepa fue obtenida de uvas tintas, provenientes de la zona este de la provincia de Mendoza (Ponsone y col., 2012).
- SO₂ comercial: Adquirido a la empresa Matesa Grape Guard. Ingrediente activo: metabisulfito de sodio (E-223) 98%, Inert 2%.

3.5.2. Ensayo *in vivo*

Se llevó a cabo el ensayo *in vivo* sobre racimos de uvas cosechas en la temporada 2016. El mismo se realizó en el Laboratorio de Postcosecha de la Estación Experimental INTA Mendoza.

El diseño experimental contó con 30 tratamientos, que incluyeron variables como: dosis de quitosano y niveles de inóculo de levadura, bayas con o sin heridas y momentos

de inoculación de *Alternaria alternata*, junto con sus respectivos controles con SO₂ y agua (tabla 5). Se realizaron triplicados de cada tratamiento.

Tabla 5: Tratamientos aplicados usando bayas con y sin heridas de uva de mesa cv. Red Globe.

ENSAYO POSTCOSECHA		
TRATAMIENTO	HERIDAS	INOCULACIÓN
Testigo absoluto	Con heridas	-
Testigo absoluto	Sin heridas	-
QUITOSANO 0,5%	Con heridas	(Antes <i>Alternaria</i>)
QUITOSANO 0,5%	Sin heridas	(Antes <i>Alternaria</i>)
QUITOSANO 0,5%	Con heridas	(Después <i>Alternaria</i>)
QUITOSANO 0,5%	Sin heridas	(Después <i>Alternaria</i>)
Testigo quitosano 0,5%	Con heridas	-
Testigo quitosano 0,5%	Sin heridas	-
QUITOSANO 1%	Con heridas	(Antes <i>Alternaria</i>)
QUITOSANO 1%	Sin heridas	(Antes <i>Alternaria</i>)
QUITOSANO 1%	Con heridas	(Después <i>Alternaria</i>)
QUITOSANO 1%	Sin heridas	(Después <i>Alternaria</i>)
Testigo quitosano 1%	Con heridas	-
Testigo quitosano 1%	Sin heridas	-
M. <i>pulcherrima</i> (RCM2) 10 ⁴	Con heridas	(Antes <i>Alternaria</i>)
M. <i>pulcherrima</i> (RCM2) 10 ⁴	Sin heridas	(Antes <i>Alternaria</i>)
M. <i>pulcherrima</i> (RCM2) 10 ⁴	Con heridas	(Después <i>Alternaria</i>)
M. <i>pulcherrima</i> (RCM2) 10 ⁴	Sin heridas	(Después <i>Alternaria</i>)
Testigo M. <i>pulcherrima</i> (RCM2) 10 ⁴	Con heridas	-
Testigo M. <i>pulcherrima</i> (RCM2) 10 ⁴	Sin heridas	-
M. <i>pulcherrima</i> (RCM2) 10 ⁶	Con heridas	(Antes <i>Alternaria</i>)
M. <i>pulcherrima</i> (RCM2) 10 ⁶	Sin heridas	(Antes <i>Alternaria</i>)
M. <i>pulcherrima</i> (RCM2) 10 ⁶	Con heridas	(Después <i>Alternaria</i>)
M. <i>pulcherrima</i> (RCM2) 10 ⁶	Sin heridas	(Después <i>Alternaria</i>)
Testigo M. <i>pulcherrima</i> (RCM2) 10 ⁶	Con heridas	-
Testigo M. <i>pulcherrima</i> (RCM2) 10 ⁶	Sin heridas	-
SO ₂ 1g/Kg	Con heridas	(Antes <i>Alternaria</i>)
SO ₂ 1g/Kg	Sin heridas	(Antes <i>Alternaria</i>)
Testigo SO ₂ 1g/Kg	Con heridas	-
Testigo SO ₂ 1g/Kg	Sin heridas	-

Para la realización del ensayo, tanto para los tratamientos con bayas con herida como para aquellos con bayas sin herida, se procedió de la siguiente manera: se utilizaron recipientes plásticos previamente desinfectados con alcohol 70%; se colocaron en el interior de cada uno de ellos 10 grupos de 3 bayas de aspecto aparentemente sano del cultivar cv. Red Globe y se les aplicó el tratamiento correspondiente. Se rotularon adecuadamente y se llevaron a las cámaras frigoríficas del Laboratorio de Postcosecha, a 0-0,5° C.

La diferencia entre los tratamientos con bayas con y sin heridas, es que en los primeros se efectuaron, utilizando una aguja hipodérmica, 3 heridas en cada baya.

En los tratamientos **Antes Alternaria**, en primer lugar, se asperjó un inóculo de 1×10^4 conidios mL⁻¹ de *A. alternata* sobre las bayas y se dejaron secar a temperatura ambiente por un lapso de 3 horas; posteriormente, se les aplicó el controlador de origen natural correspondiente. Por otra parte, en los tratamientos **Después Alternaria** se aplicó primero el controlador correspondiente; al cabo de tres horas de secado se asperjó un inóculo de 1×10^4 conidios mL⁻¹ de *A. alternata* y se dejó, nuevamente, secar por tres horas antes de ingresarlas a la cámara frigorífica.

Al aplicar *A. alternata* antes que el controlador, se evalúa la actividad de éste como curativo; mientras que cuando se aplica primero el controlador y posteriormente *A. alternata*, se evalúa al controlador como preventivo.

El SO₂ sólo se evaluó como curativo ya que así se usa tradicionalmente. En este caso, no fue necesario dejar un tiempo de secado luego de la aplicación del mismo ya que el generador de dióxido de azufre se coloca al momento de conservar en cámara y tiene la característica de que el azufre se libera en su forma gaseosa (Figura 12).

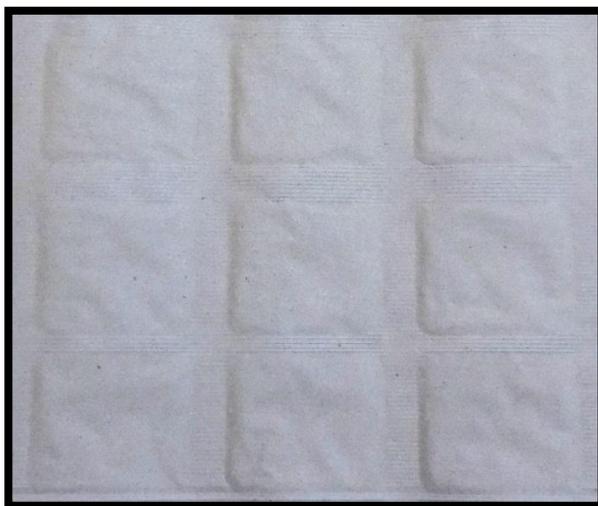


Figura 12: Generadores de SO₂.

Se realizaron evaluaciones visuales a los 15, 30, 60 y 90 días que consistieron en contar el número de bayas con sintomatología de podredumbre causada por *Alternaria* spp. (Figuras 13 y 14).



Figura 13: Podredumbre causada por *Alternaria* spp.

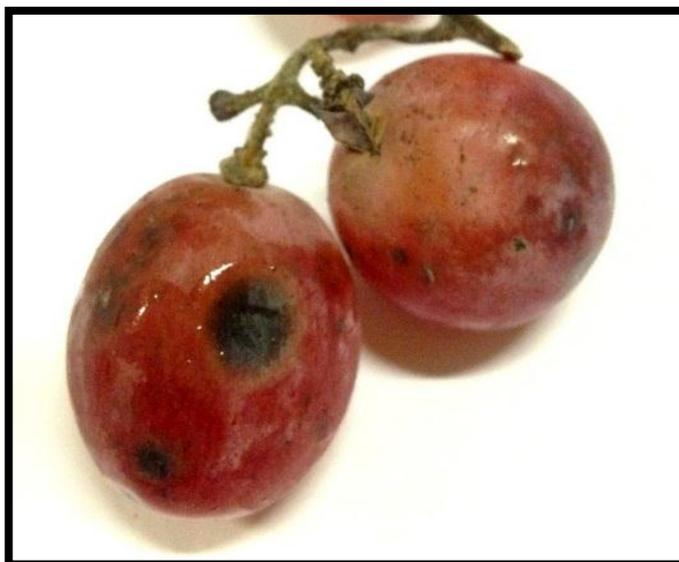


Figura 14: Podredumbre causada por *Alternaria* spp.

Además, en la misma evaluación visual se observó si había presencia de otros patógenos; en el caso de detectar *Botrytis*, se descartaban las bayas afectadas, a fin de que la contaminación no se propagase e impidiese realizar correctas observaciones de *Alternaria* en las sucesivas evaluaciones. Los resultados se registraron en una planilla y se realizó la fotodocumentación.

3.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos del aislamiento de *Alternaria* spp. y del ensayo *in vivo* en postcosecha fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó el programa Infostat para Windows Version 2013 con un nivel de significancia fue de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento de *Alternaria* spp.

Los resultados obtenidos en este trabajo revelan la presencia del patógeno *Alternaria* spp. en todos los estadios estudiados; desde floración hasta postcosecha.

La mayor incidencia se detectó en la etapa de floración; con un 98%. Luego de esa etapa se registró una reducción muy acentuada de dicho porcentaje (Figura 15). Posteriormente, se observó un aumento pronunciado de la incidencia en postcosecha a los 30, 60 y 90 días en bayas; dichos valores fueron significativamente mayores a los obtenidos en las otras etapas ($P < 0,05$), (excepto en floración).

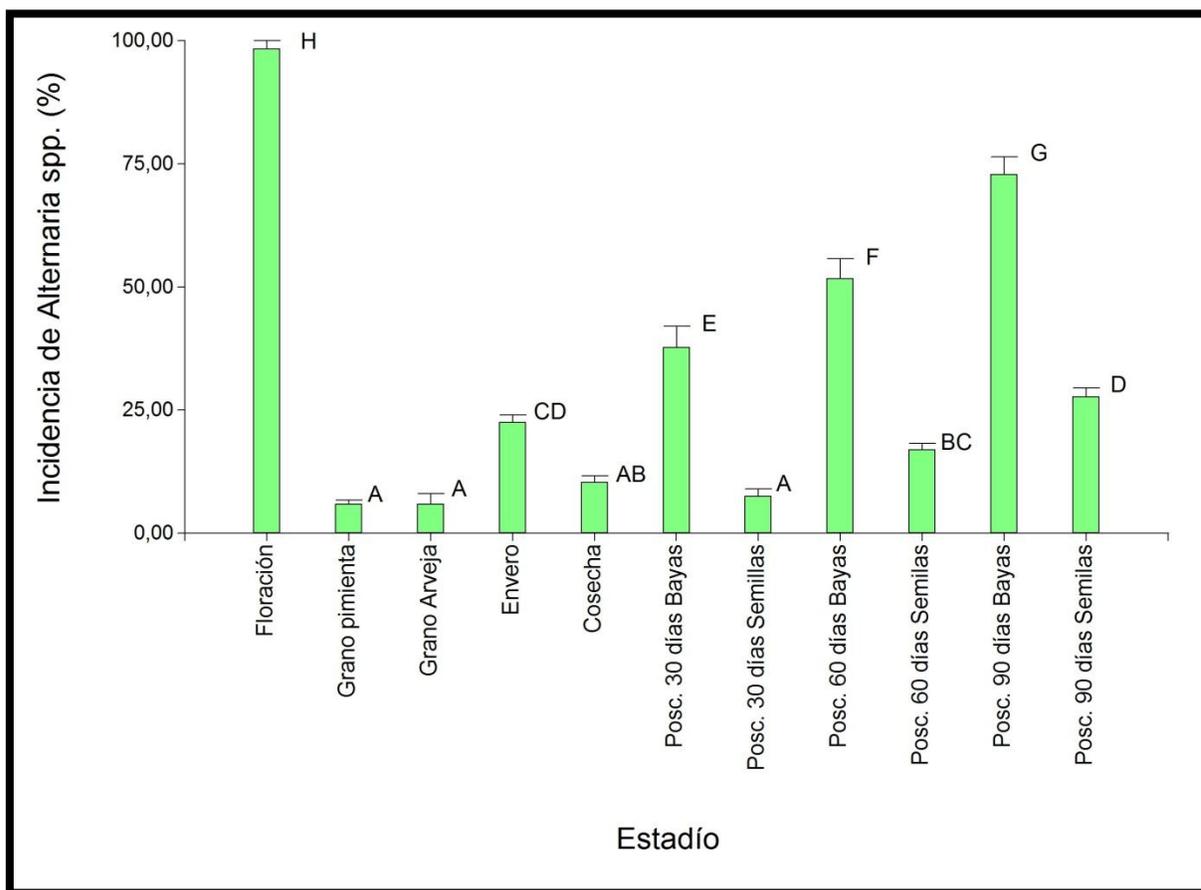


Figura 15: Incidencia de *Alternaria* spp. en las distintas fases del ciclo fenológico y de postcosecha de uva de mesa cv. Red Globe provenientes de aislamientos de la campaña 2014/15.

Este comportamiento podría explicarse por el uso de fungicidas a campo; la práctica común consiste en aplicar dichos productos en la fase de floración y luego efectuar de 2 a 3 repeticiones en envero. La hipótesis es que el muestreo en floración, se realizó antes de que se hiciera la primera aplicación; y el muestreo de las etapas siguientes fue posterior a la aplicación de los fungicidas, por lo tanto la presencia del patógeno en la fruta, naturalmente, fue menor. Además, el aumento de la incidencia observado en envero podría estar relacionado con el incremento de azúcares disponibles en bayas.

El aumento posterior de incidencia en postcosecha se asocia a las condiciones allí existentes que predisponen a la fruta a la podredumbre provocada por *Alternaria* spp. A su vez, es interesante destacar que en dicha etapa se detectó presencia del patógeno tanto en bayas como en semillas; en ambos casos, la incidencia fue en aumento en las sucesivas evaluaciones. El porcentaje de incidencia, en todos los casos, fue mayor en bayas. Dicha discrepancia entre los porcentajes en bayas y semillas también podría estar relacionada con la aplicación de fungicidas en floración.

4.2. Identificación morfológica y molecular de los aislados de *Alternaria* spp.

4.2.1. Identificación morfológica

Se identificaron un total de 107 aislados con características morfológicas del género *Alternaria*, a partir de los cultivos en ANS, almacenados a 4 °C, de las cepas fúngicas aisladas de flores y bayas de uva de mesa cv. Red Globe provenientes de viñedos ubicados en Junín, Mendoza, campañas 2014/15. Los aislados fueron identificados por examen microscópico (50X) a partir de los caracteres morfológicos cuando estas desarrollaron en los medios de cultivo APZ y V8. La totalidad de los aislados fueron identificados como *A. alternata*, de acuerdo al patrón de esporulación propuesto por Simmons (2007).

Las cepas de *A. alternata* desarrolladas en el medio de cultivo APZ y V8, incubadas durante 7 días, mostraron, en general, una colonia algodonosa, con abundante micelio aéreo, de color verde oliva a grisáceo; de aproximadamente 7 cm de diámetro con 3-4 pares de anillos concéntricos de esporulación (Figuras 16 y 17). En la observación a la lupa, destacamos que los conidios se observaron, mayormente, en los anillos externos.

La esporulación, en el medio APZ, fue abundante pero no densa, presentando cadenas simples y ramificadas de 4-6 conidios en conidióforos cortos, mientras que en el medio V-8 la esporulación fue densa.

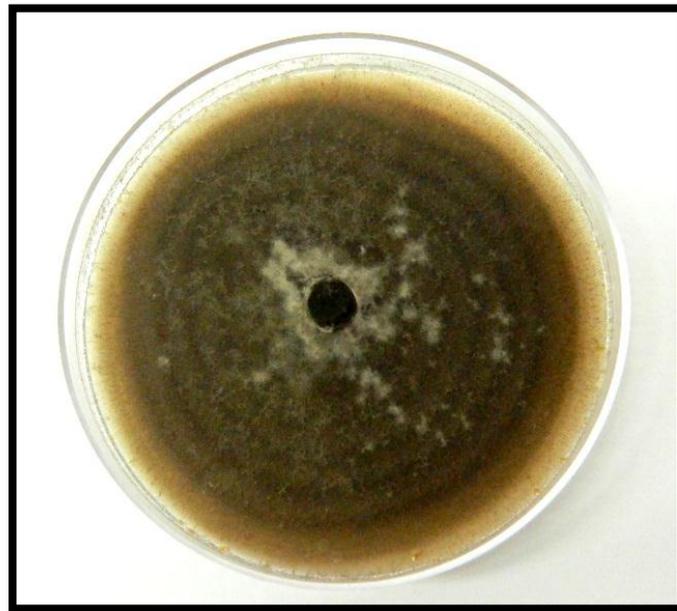


Figura 16: Crecimiento de una colonia identificada morfológicamente como *Alternata alternata* en medio de cultivo APZ.

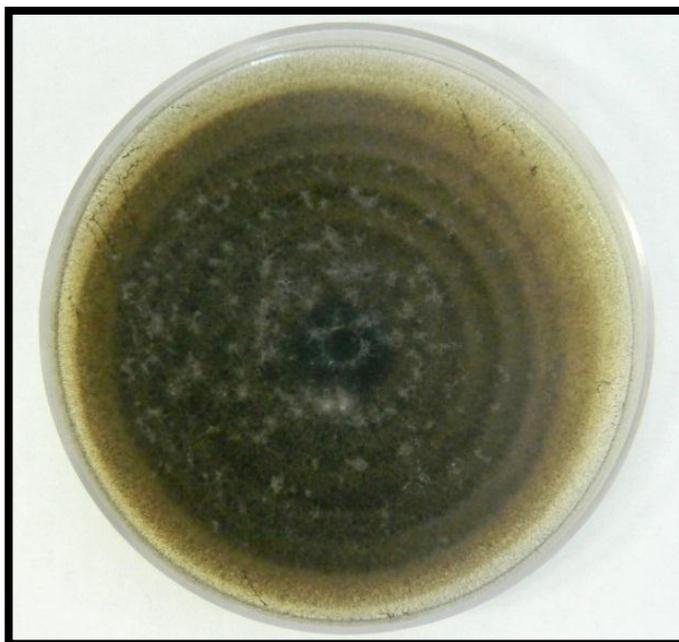


Figura 17: Crecimiento de una colonia identificada morfológicamente como *Alternata alternata* en medio de cultivo V8.

4.2.2. Identificación molecular

4.2.2.1. Reacciones de PCR para identificación de Género

De las 107 cepas identificadas morfológicamente como *Alternaria alternata* se tomó un número representativo de cada estadio estudiado (n= 45) y se analizaron mediante la técnica de PCR.

En un primer paso usando los cebadores derivados del gen Alt A1 específicos de género, Dir5cAlta1 y Inv4Alta1, se observó que todas los aislados seleccionados (n= 45), e identificados morfológicamente como pertenecientes al género *Alternaria*, mostraron un producto de amplificación específico de 195 pb (Figura 18); correspondiente al género *Alternaria*.

La temperatura de *annealing* que se eligió entre aquellas que se probaron para realizar la PCR, y que posteriormente se empleó para la identificación de las cepas seleccionadas, fue de 58° C. Esta decisión se determinó a partir de la observación de la

amplificación de las bandas. Dicha temperatura es diferente a la indicada por la bibliografía citada (55° C) (Pavón y col., 2010).

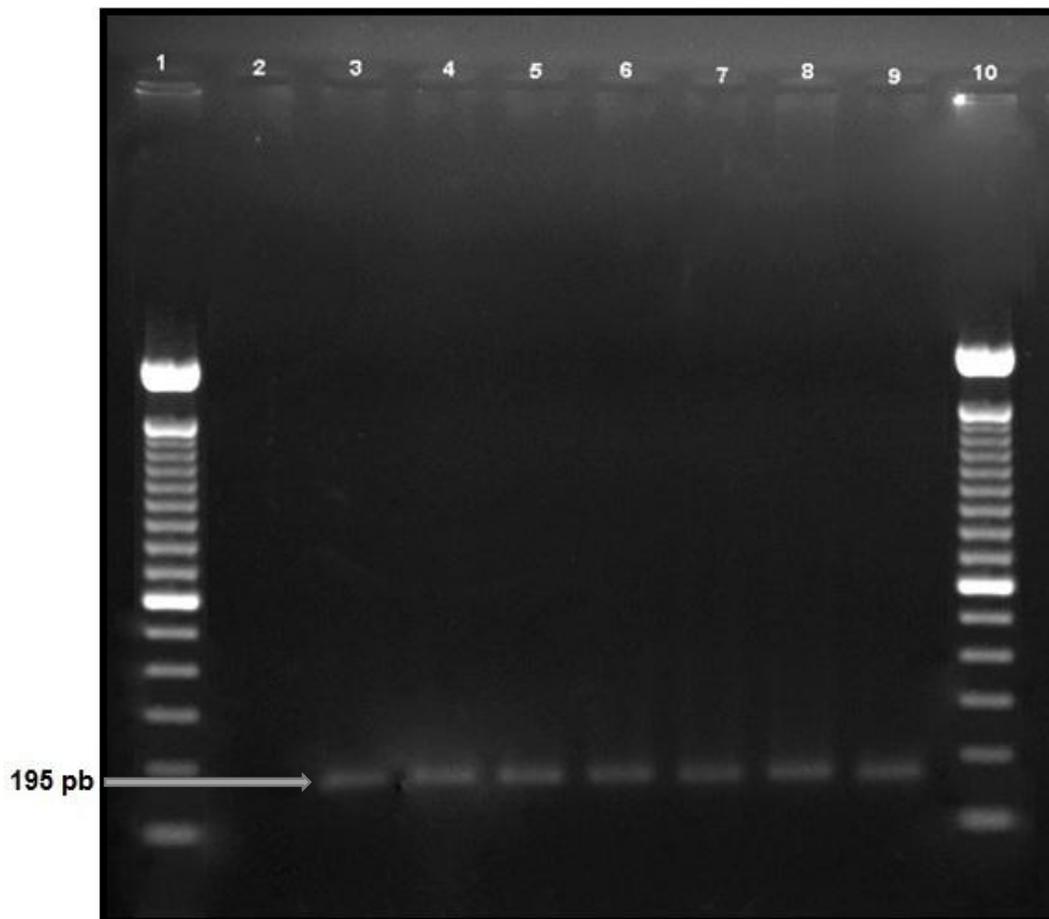


Figura 18: Electroforesis en gel de agarosa 1,7 % mostrando los productos de PCR del gen *Alt a1*, obtenidos usando los cebadores específicos del género *Alternaria*, Dir5cAlta1 y Inv4Alta1.

Línea 1: marcador de peso molecular 100bp con bandas de referencia que oscilan entre 100-1500 pb (Invitrogen); línea 2: control negativo; líneas 3-9: cepas identificadas morfológicamente como *Alternaria alternata*, aisladas durante distintos estadios del ciclo fenológico y la conservación en frío de uva de mesa; línea 10: marcador de peso molecular 100bp con bandas de referencia que oscilan entre 100-1500 pb (Invitrogen).

4.2.2.2. Reacciones de PCR para identificación de Grupos Especies

Posteriormente, se realizó la técnica de PCR para confirmar los grupos especies a los cuales pertenecían las cepas aisladas. Se pudo confirmar que todas las cepas

seleccionadas (n= 45) identificadas morfológicamente como *A. alternata*, mostraron un producto de amplificación específico de 118 pb con el par de cebadores correspondientes a *Alternaria alternata*, AaltDAIta1 y AinflAlta1 (Figura 19); sin producir reacción de amplificación con los primers específicos para *A. infectoria*, *A. porri* y *A. radicina* (Figura 20) a ninguna de las temperaturas probadas de los respectivos gradientes establecidos.

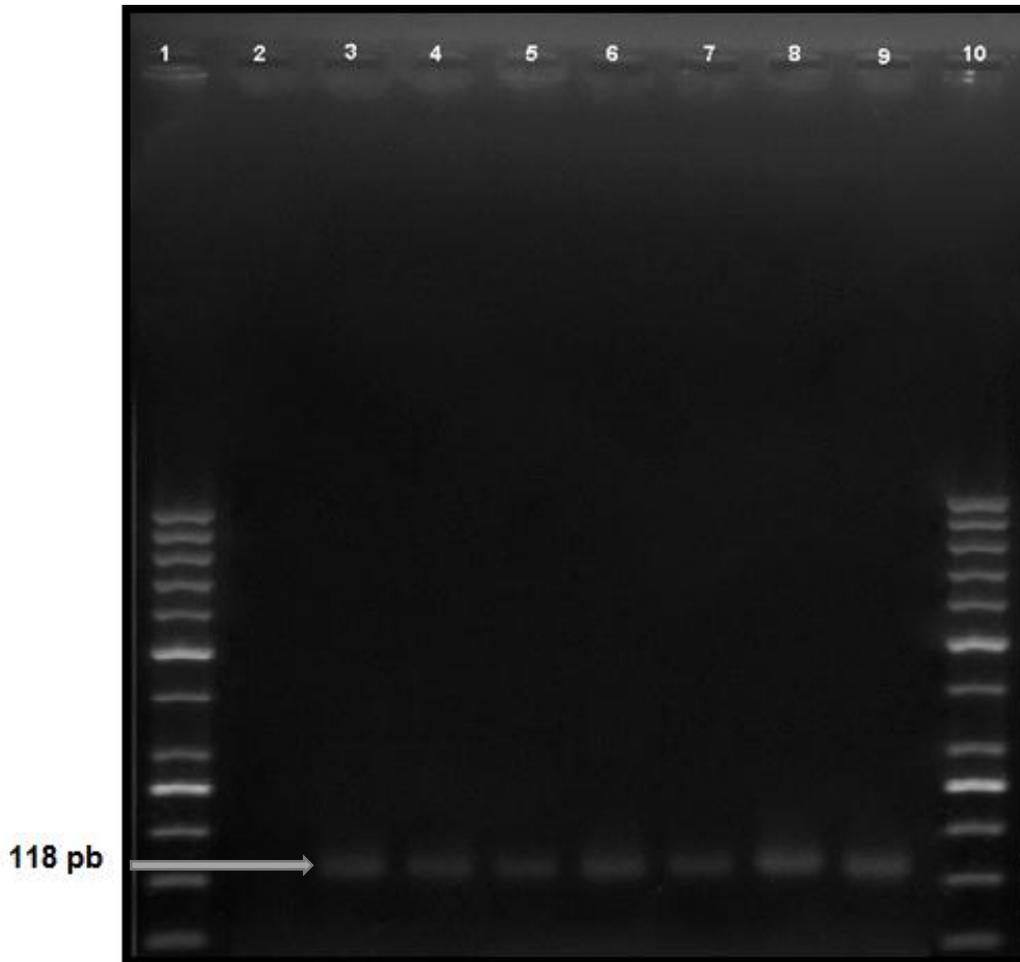


Figura 19: Electroforesis en gel de agarosa 1,7 % mostrando los productos de PCR del gen *Alt a 1*, obtenidos usando los cebadores específicos del grupo especie *Alternaria alternata*, AaltDAIta1 y AinflAlta1.

Línea 1: marcador de peso molecular 50bp con bandas de referencia que oscilan entre 50-1500 pb (Invitrogen); línea 2: control negativo; líneas 3-9: cepas identificadas morfológicamente como *Alternaria alternata*, aisladas durante distintos estadios del ciclo fenológico y la conservación en frío de uva de mesa; línea 10: marcador de peso molecular 50bp con bandas de referencia que oscilan entre 50-1500 pb (Invitrogen).

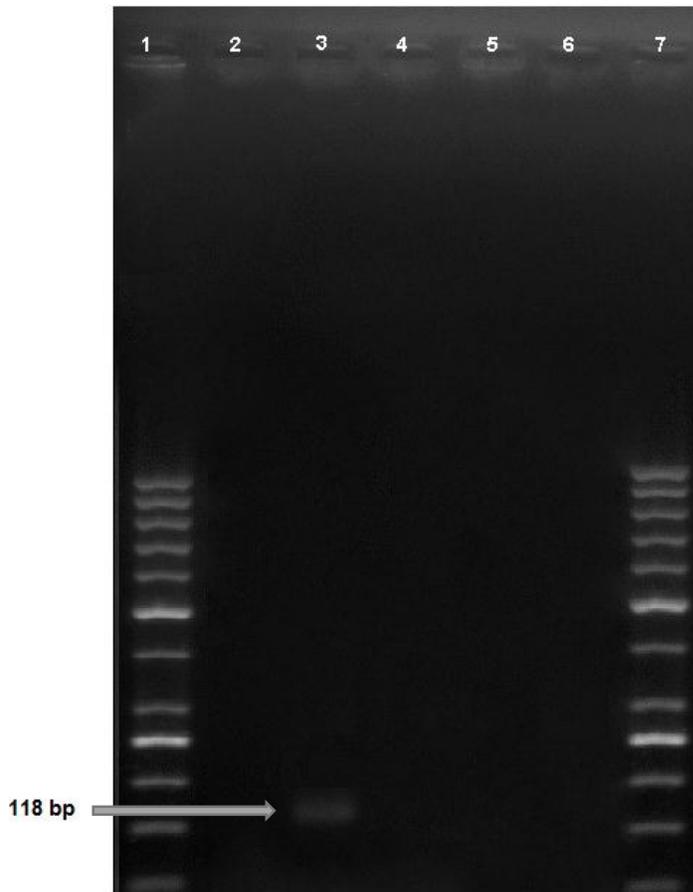


Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa 1,7 % mostrando los productos de PCR del gen *Alt a1*, obtenidos usando los cebadores específicos de los grupos especies *Alternaria alternata*, AaltDA1 y AinflAlta1; *A. infectoria*, AinfDA1 y AinflAlta1; *A. porri*, AsolDA1 y AsollAlta; y *A. radicina*, AraDA1 y AsollAlta1.

Línea 1: marcador de peso molecular 50bp con bandas de referencia que oscilan entre 50-1500 pb (Invitrogen); línea 2: control negativo; líneas 3-4: cepa identificada morfológicamente y molecularmente como *Alternaria alternata*; línea 3: cebadores específicos de *A. alternata*; línea 4: cebadores específicos de *A. infectoria*; línea 5: cebadores específicos de *A. porri*; línea 6: cebadores específicos de *A. radicina*; línea 7: marcador de peso molecular 50bp con bandas de referencia que oscilan entre 50-1500 pb (Invitrogen).

La temperatura de *annealing* que se eligió entre aquellas que se probaron para realizar la PCR de grupo especie *A. alternata*, y que posteriormente se empleó para la identificación de las cepas seleccionadas, fue de 55° C. Esta decisión se determinó a partir

de la observación de la amplificación de las bandas. Dicha temperatura es diferente a la indicada por la bibliografía citada (65° C) (Pavón y col., 2010).

4.3. Ensayos en postcosecha con biocontroladores

Durante el ensayo en postcosecha con biocontroladores donde las bayas fueron inoculadas con cepas de *Alternaria alternata*, se observó que además de la especie fúngica inoculada, las condiciones permitieron el desarrollo de otros hongos filamentosos y levaduras; tales como *Botrytis*, *Rhizopus*, *Penicilium*, *Trichoderma*, etc.

Como una primera aproximación general, se observó a los 15 días de transcurrido el ensayo, que si bien hubo baja incidencia de podredumbre causada por *A. alternata* (<5%) en todo los casos; los tratamientos que muestran mayor incidencia son los de SO₂ con y sin heridas y el de RCM2 con un nivel de inóculo de 10⁶, con heridas y aplicado después del patógeno (P<0,05) (Figura 21).

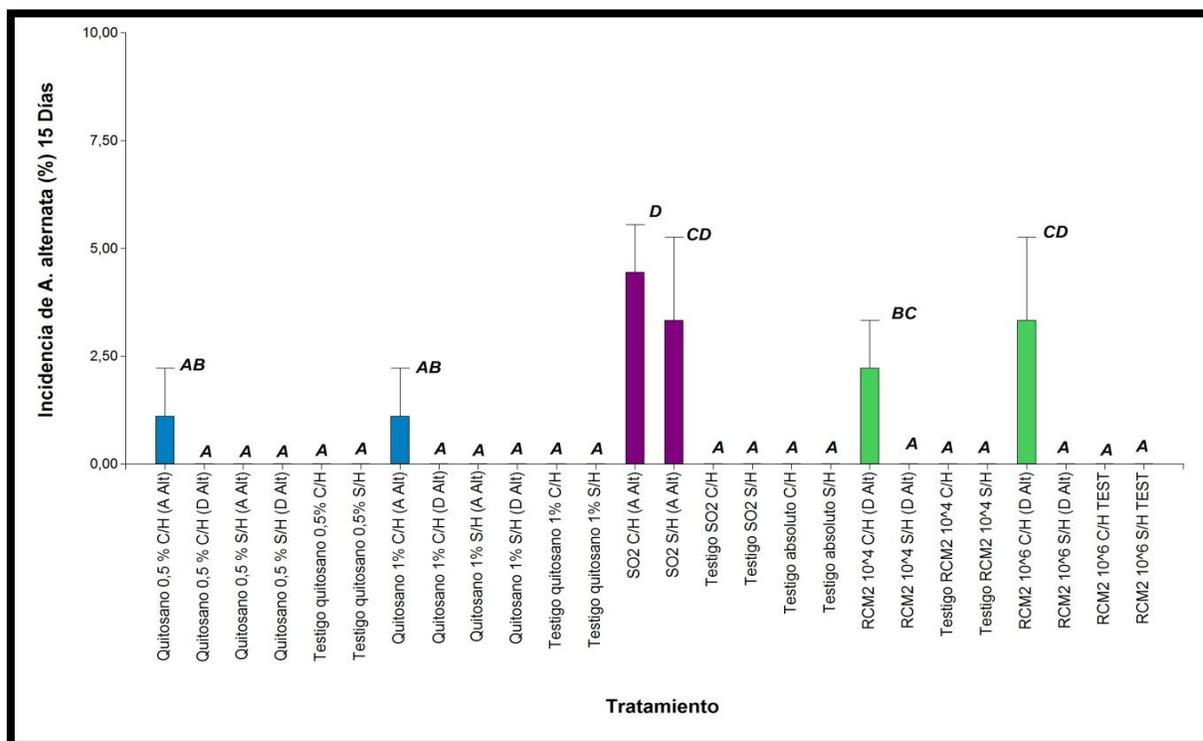


Figura 21: Incidencia de *A. alternata* (%), a los 15 días de transcurrido el ensayo, para todos los tratamientos planteados con uvas inoculadas con 10⁴ conidios mL⁻¹ de *A. alternata*.

A los 30 días de transcurrido el ensayo se observó, al igual que en la evaluación anterior, que el porcentaje de infección causado por *A. alternata* fue bajo (<7%) para todos los tratamientos. Al comparar todos los tratamientos entre sí, se destacan los del potencial biocontrolador RCM2 con un nivel de inóculo de 10⁶, sin herida y aplicado después del patógeno, RCM2 con un nivel de inóculo de 10⁴, con herida y aplicado después de *Alternaria* y SO₂ con herida; como aquellos que presentaron incidencias más altas (P<0,05) (Figura 22).

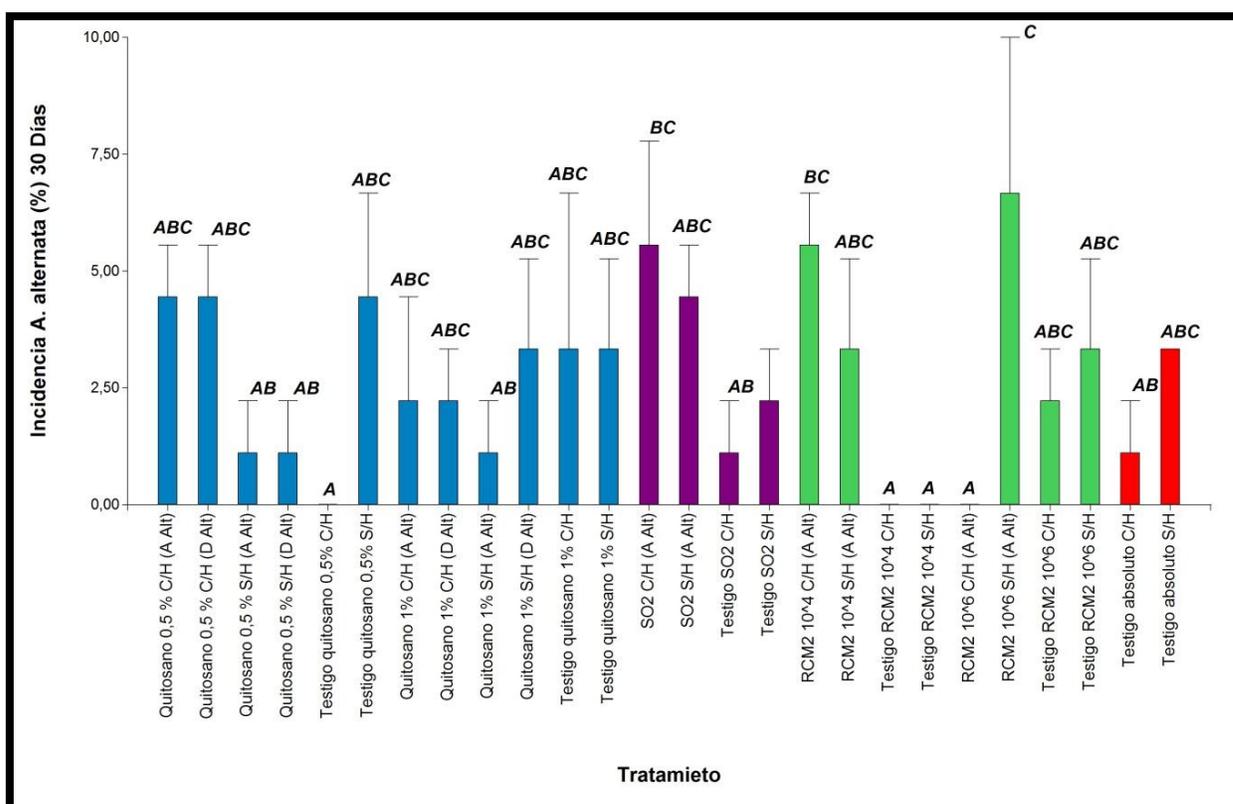


Figura 22: Incidencia de *A. alternata* (%), a los 30 días de transcurrido el ensayo, para todos los tratamientos planteados con uvas inoculadas con 10⁴ conidios mL⁻¹ de *A. alternata*.

Al analizar variables por separado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para la incidencia de *A. alternata* entre los distintos tratamientos (P<0,05). Como así tampoco, entre los respectivos testigos de los controladores, incluyendo bayas con y sin heridas, y el testigo absoluto (Figura 23).

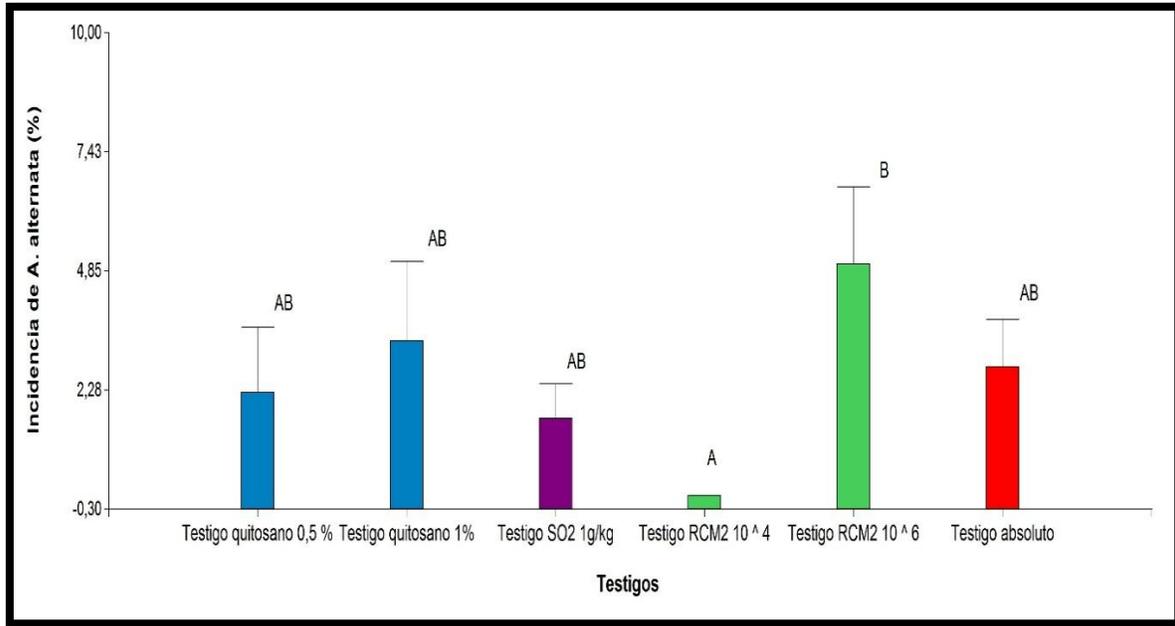


Figura 23: Incidencia de *A. alternata* (%), a los 30 días de transcurrido el ensayo, para los testigos de los controladores.

A los 60 días de iniciado el ensayo, se encontró que los tratamientos más efectivos para controlar la incidencia de *A. alternata*, incluyendo bayas con y sin heridas y distintos momentos de inoculación de *Alternaria*, fueron SO₂, quitosano 0,5% y quitosano 1% (P<0.05); a su vez, no hubo diferencia estadística entre ellos tres. Por otro lado, si bien la incidencia de *A. alternata* para los tratamientos con RCM2 a ambos niveles de inóculo fueron superiores a los obtenidos con el control tradicional, se puede observar cierto nivel de control respecto del testigo absoluto (P<0,05). A su vez, entre ambos niveles de inóculo se registró diferencia significativa; resultando menor la incidencia de *A. alternata* cuando se aplicó el mayor nivel de inóculo la cepa RCM2 (Figura 24).

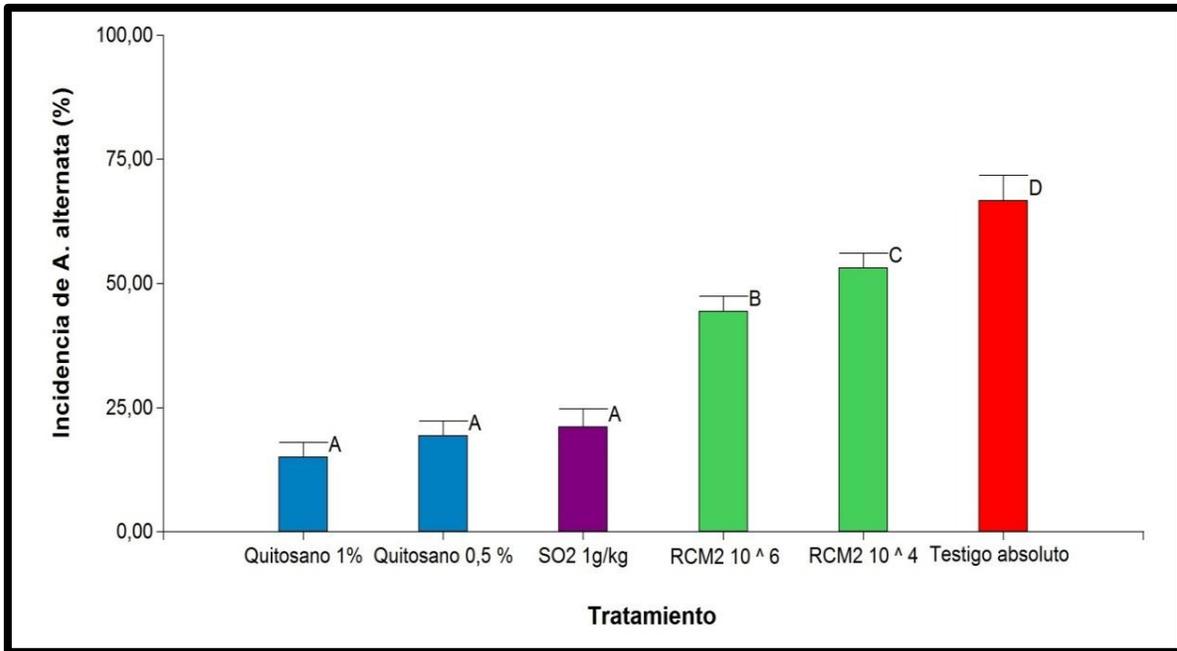


Figura 24: Incidencia de *A. alternata* (%), a los 60 días de transcurrido el ensayo, para los distintos tratamientos con uvas inoculadas con 10^4 conidios mL^{-1} de *A. alternata*.

Al analizar los testigos de los respectivos controladores, incluyendo bayas con y sin heridas; con respecto al testigo absoluto, se destaca que hay diferencia significativa y que la incidencia en todos ellos es menor que la que se observa en el testigo absoluto ($P < 0,05$) (Figura 25). Lo dicho indicaría que a los 60 días todos los controladores son efectivos en la reducción de incidencia de *A. alternata* en conservación.

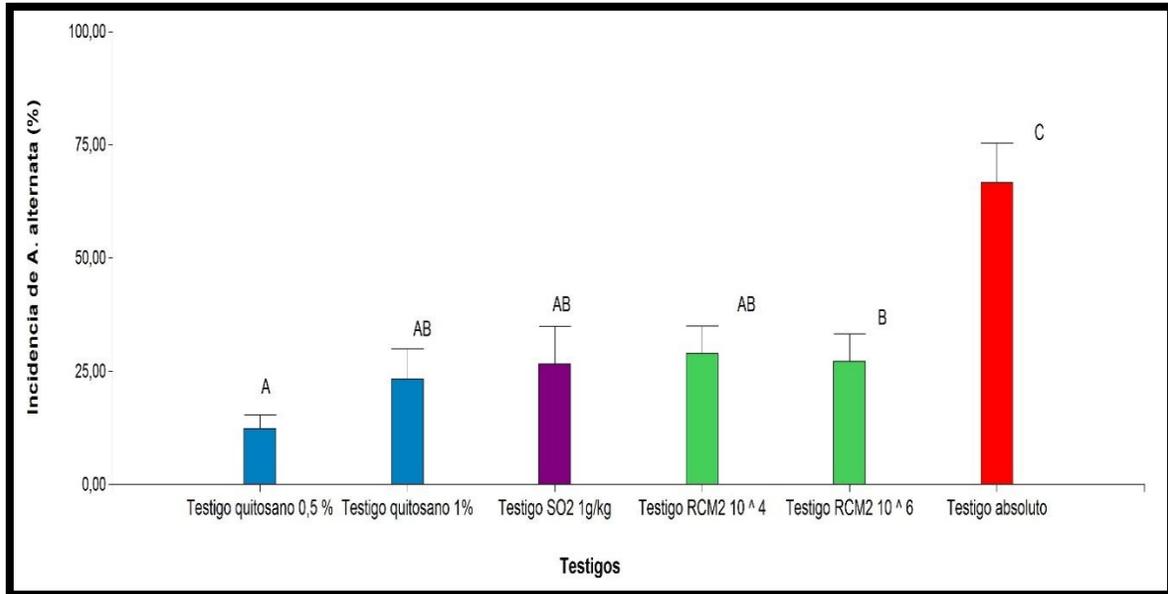
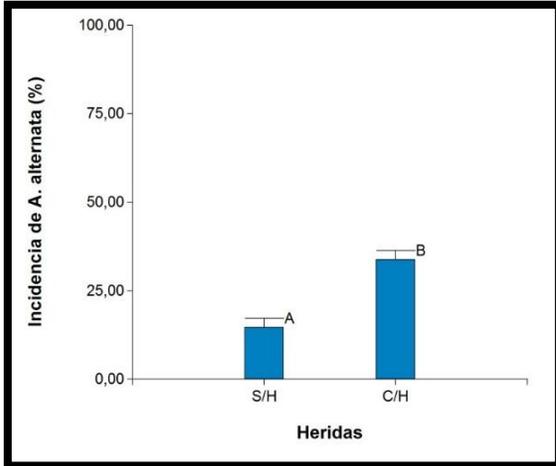
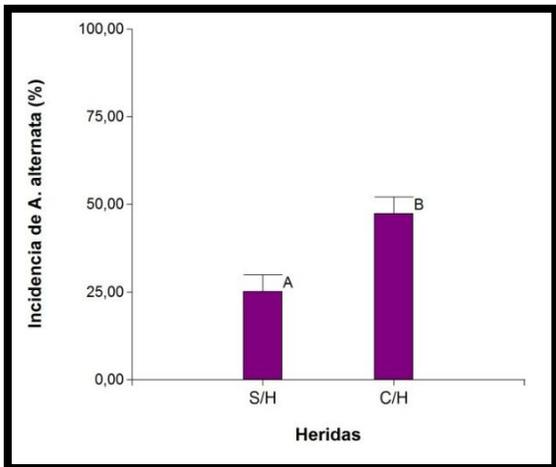


Figura 25: Incidencia de *A. alternata* (%), a los 60 días de transcurrido el ensayo, para los testigos de los controladores.

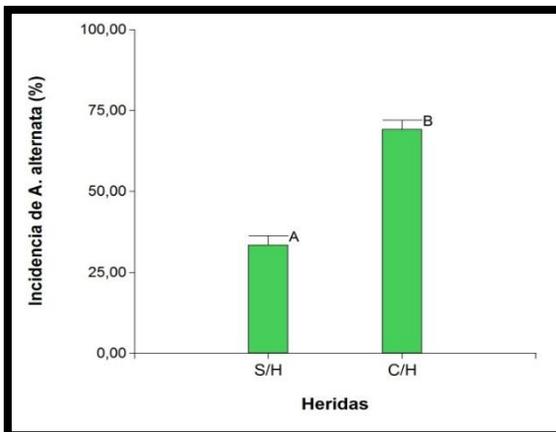
Se observó diferencia significativa para la incidencia del patógeno *Alternaria* entre las bayas sin heridas y aquellas a las cuales se les efectuaron heridas en el laboratorio; para todos los tratamientos, incluyendo los distintos momentos de inoculación del patógeno, distintas dosis y niveles de inóculo; siendo mayor el porcentaje de incidencia para bayas con heridas ($P < 0.05$) (Figura 26); por lo que la incidencia del patógeno se vió favorecida por la presencia de las mismas.



A



B



C

Figura 26: Incidencia de *A. alternata* (%), a los 60 días de transcurrido el ensayo, para tratamientos con bayas con heridas (C/H) y sin heridas (S/H) con uvas inoculadas con 10^4 conidios mL^{-1} de *A. alternata*. Tratamientos con SO_2 (A), quitosano (B) y RCM2 (C).

Es interesante remarcar que a los 60 días de iniciado el ensayo, no se registró diferencia estadística entre las distintas dosis aplicadas de quitosano, incluyendo bayas con y sin herida y con inoculación de *A. alternata* antes y después de aplicar dicho controlador ($P < 0.05$) (Figura 27).

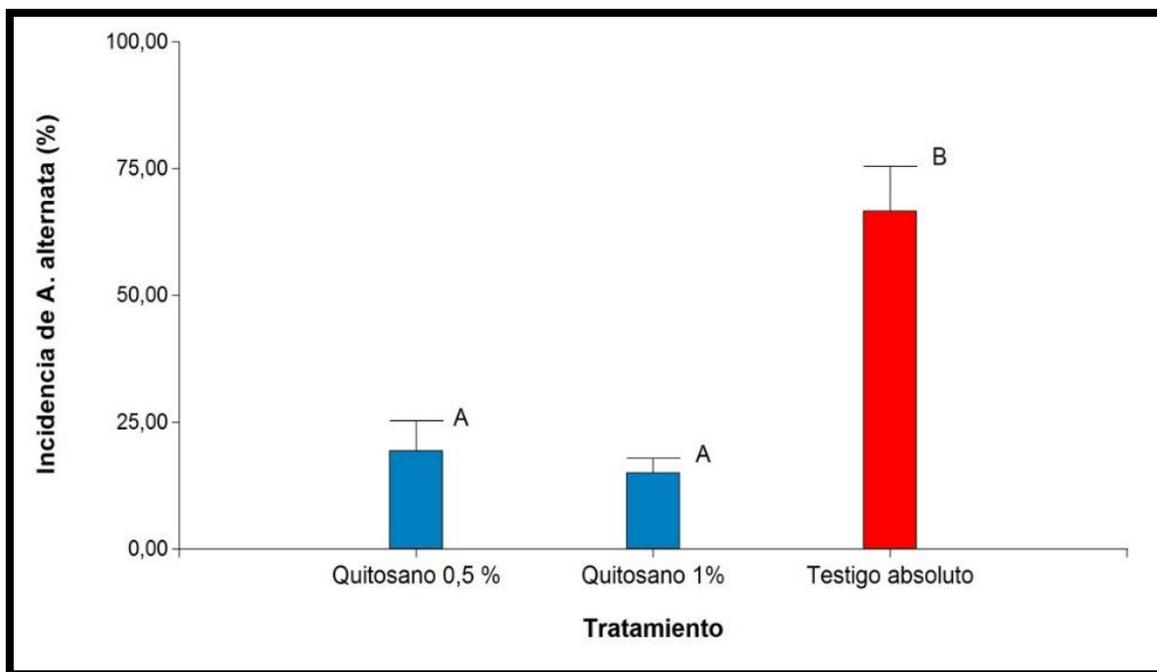


Figura 27: Incidencia de *A. alternata* (%), a los 60 días de transcurrido el ensayo, para las distintas dosis del controlador quitosano con uvas inoculadas con 10^4 conidios mL^{-1} de *A. alternata*.

Además, para los tratamientos de quitosano, combinando en esta oportunidad ambas dosis y bayas con y sin heridas; se observó que hubo diferencia estadística entre los momentos de inoculación de *A. alternata* en bayas. Cuando la inoculación del patógeno se efectuó antes de aplicar el controlador, el porcentaje de incidencia de *Alternaria* fue menor que cuando el patógeno se inoculó después que el controlador ($P < 0.05$) (Figura 28).

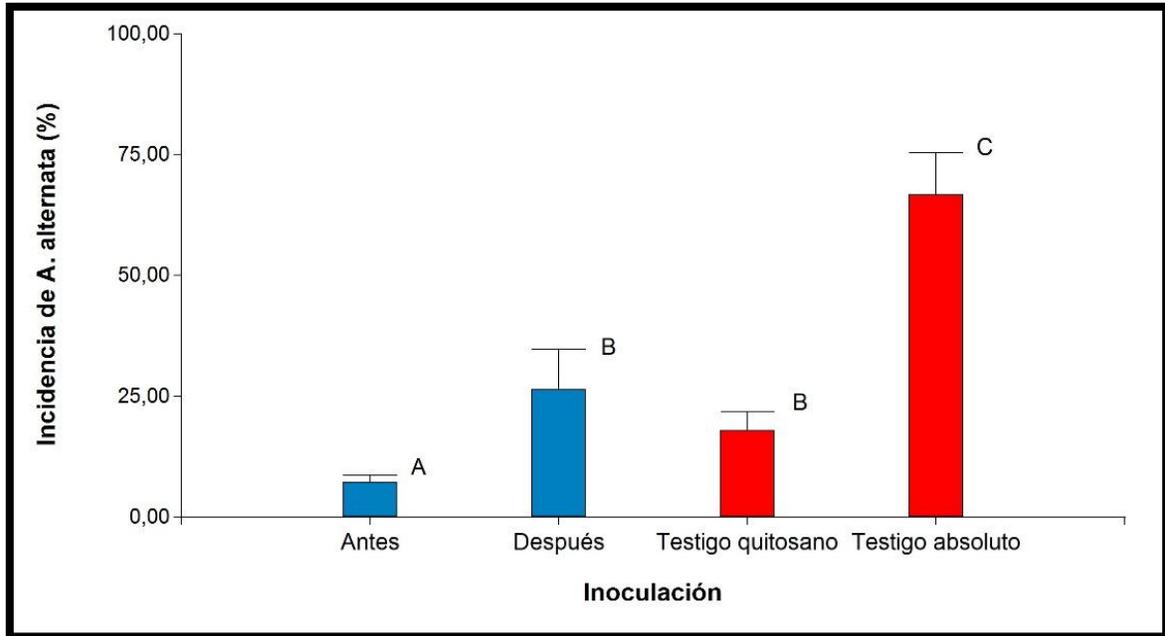


Figura 28: Incidencia de *A. alternata*, a los 60 días de transcurrido el ensayo, para los distintos momentos de inoculación con 10^4 conidios mL^{-1} de *A. alternata*, cuando se aplicó quitosano.

En cuanto a los momentos de inoculación de *Alternaria* respecto de *Metschnikowia pulcherrima* (RCM2), no se registraron diferencias significativas entre la inoculación del patógeno antes y después de aplicar la cepa RCM2, incluyendo ambos niveles de inóculo y bayas con y sin heridas. Asimismo, no se observó diferencia significativa entre los momentos de inoculación y el testigo absoluto ($P < 0.05$) (Figura 29).

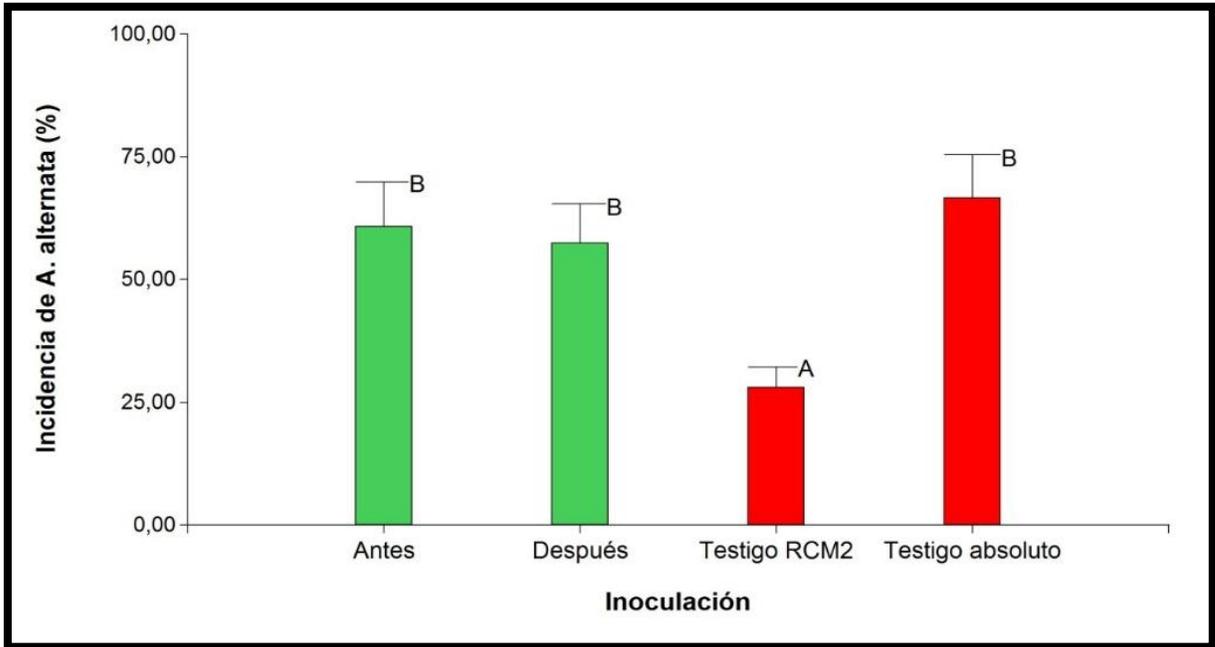


Figura 29: Incidencia de *A. alternata*, a los 60 días de transcurrido el ensayo, para los distintos momentos de inoculación con 10^4 conidios mL^{-1} de *A. alternata*, cuando se aplicó RCM2.

A los 90 días de transcurrido el ensayo, los tratamientos de SO_2 y de quitosano a distintas dosis, incluyendo bayas con y sin heridas y distintos momentos de inoculación del patógeno; continuaron siendo los más efectivos controlando la incidencia de *Alternaria* ($P < 0.05$) (Figura 30).

En esta evaluación, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los dos niveles de inóculo de RCM2, ni de ellos con el testigo absoluto; incluyendo bayas con y sin heridas y los distintos momentos de inoculación del patógeno.

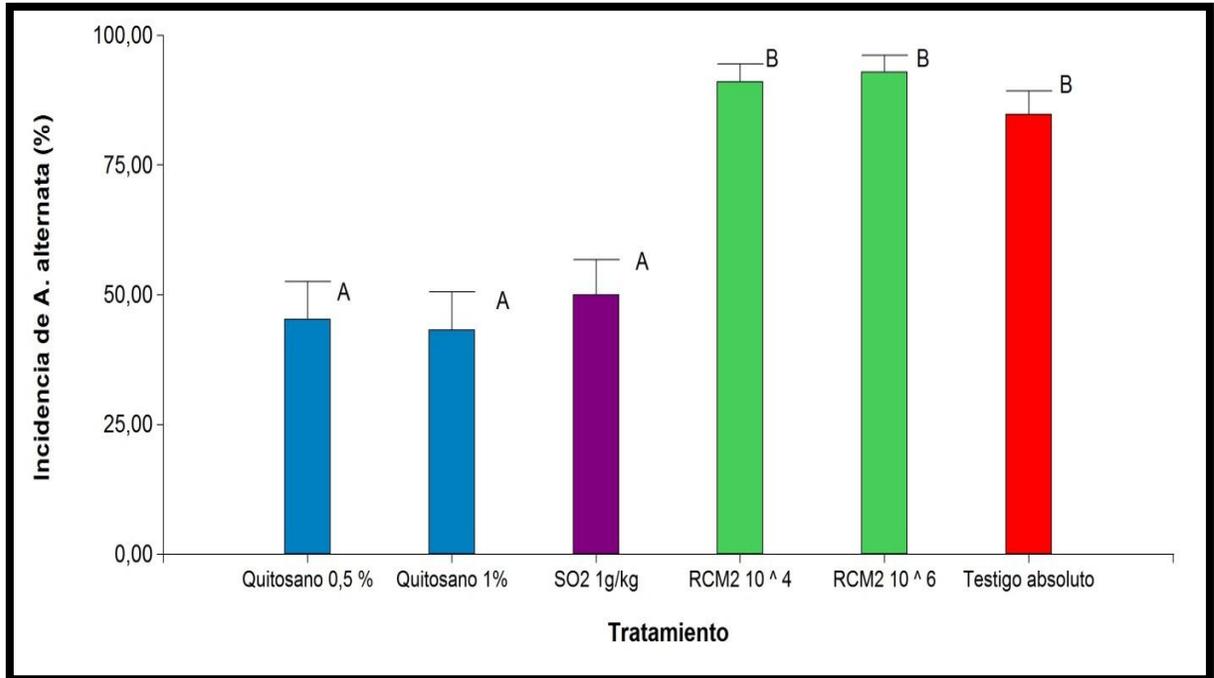


Figura 30: Incidencia de *A. alternata* (%), a los 90 días de transcurrido el ensayo, para los distintos tratamientos con uvas inoculadas con 10^4 conidios mL^{-1} de *A. alternata*.

Es interesante destacar que al igual que en la evaluación de los 60 días, se registró mayor incidencia de *A. alternata* en bayas con heridas que en aquellas sin heridas, para todos los tratamientos, incluyendo inoculación de *Alternaria* antes y después de los controladores, distintas dosis y niveles de inóculo.

En dicha evaluación de los 90 días, en lo que respecta a los momentos de inoculación del patógeno, se registró diferencia significativa entre ellos para el tratamiento de quitosano, incluyendo las distintas dosis del controlador y bayas con y sin heridas; observándose menor incidencia de *A. alternata* cuando el patógeno se inoculó antes que el controlador (Figura 31). El mismo comportamiento se registró también en la evaluación de los 60 días.

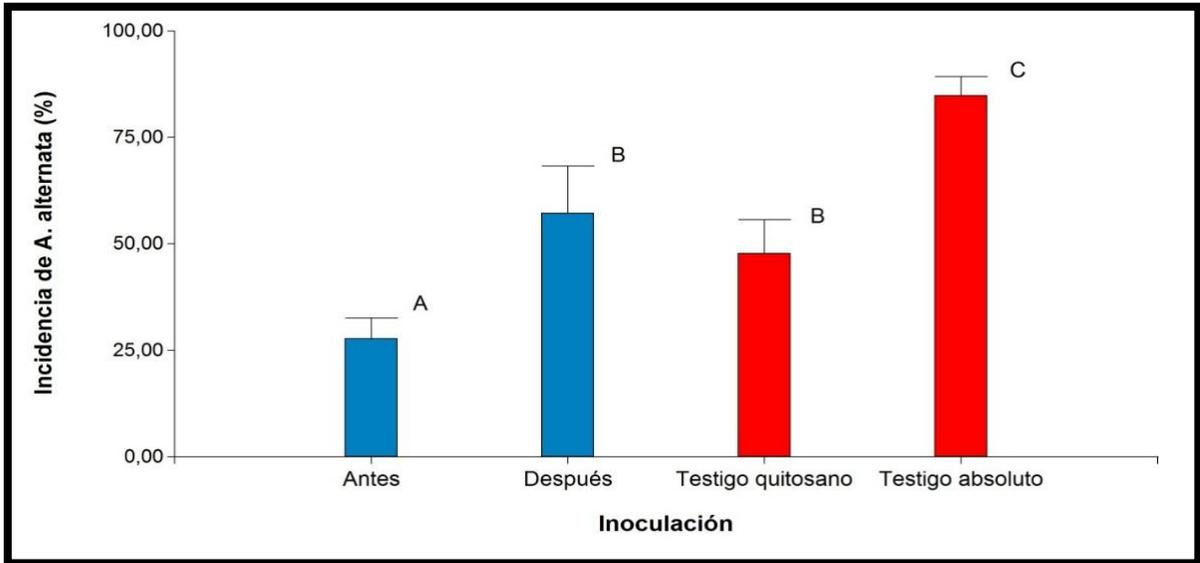


Figura 31: Incidencia de *A. alternata* (%), a los 90 días de transcurrido el ensayo, para los distintos momentos de inoculación con 10^4 conidios mL^{-1} de *A. alternata*, cuando se aplicó quitosano.

En cambio, en los tratamientos realizados con RCM2, incluyendo los distintos niveles de inóculo y bayas con y sin heridas, se observó que no hubo diferencia significativa entre los momentos de inoculación del patógeno; al igual que en la evaluación de los 60 días (Figura 32).

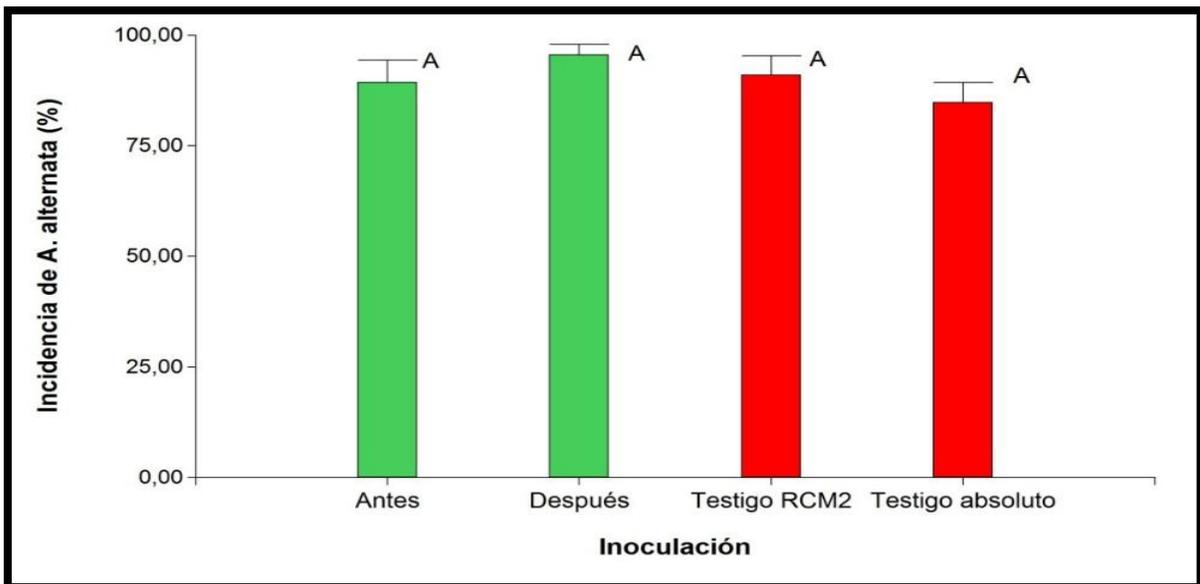


Figura 32: Incidencia de *A. alternata*, a los 90 días de transcurrido el ensayo, para los distintos momentos de inoculación con 10^4 conidios mL^{-1} de *A. alternata*, cuando se aplicó RCM2.

En las siguientes imágenes se pueden apreciar visualmente los resultados obtenidos en la evaluación de los 90 días; en ellas se muestran los tratamientos de SO₂ (Figura 33), quitosano (Figura 34) y RCM2 (Figura 35). En todos los casos se presentan bayas sin heridas y con inoculación de *A. alternata* antes de los controladores. Ya que no hubo diferencias significativas, en dicha evaluación, entre las distintas dosis de quitosano, ni entre los diferentes niveles de inóculo de RCM2; se exhibe sólo uno de ellos, indistintamente, en cada caso.



Figura 33: Tratamiento de SO₂, a los 90 días de transcurrido el ensayo, con bayas sin heridas e inoculación con 10⁴ conidios mL⁻¹ de *A. alternata* antes de aplicar el controlador.



Figura 34: Tratamiento de quitosano al 1%, a los 90 días de transcurrido el ensayo, con bayas sin heridas e inoculación con 10^4 conidios mL^{-1} de *A. alternata* antes de aplicar el controlador.



Figura 35: Tratamiento de RCM2 al nivel de inóculo 10^4 , a los 90 días de transcurrido el ensayo, con bayas sin heridas e inoculación con 10^4 conidios mL^{-1} de *A. alternata* antes de aplicar el controlador.

Los resultados indican, que en ninguna de las 4 evaluaciones realizadas donde se aplicó quitosano hubo diferencia significativa en cuanto al control de la incidencia de *A. alternata*, entre las dos dosis aplicadas ($P < 0.05$); incluyendo bayas con y sin heridas y distintos momentos de inoculación del patógeno (Figura 36).

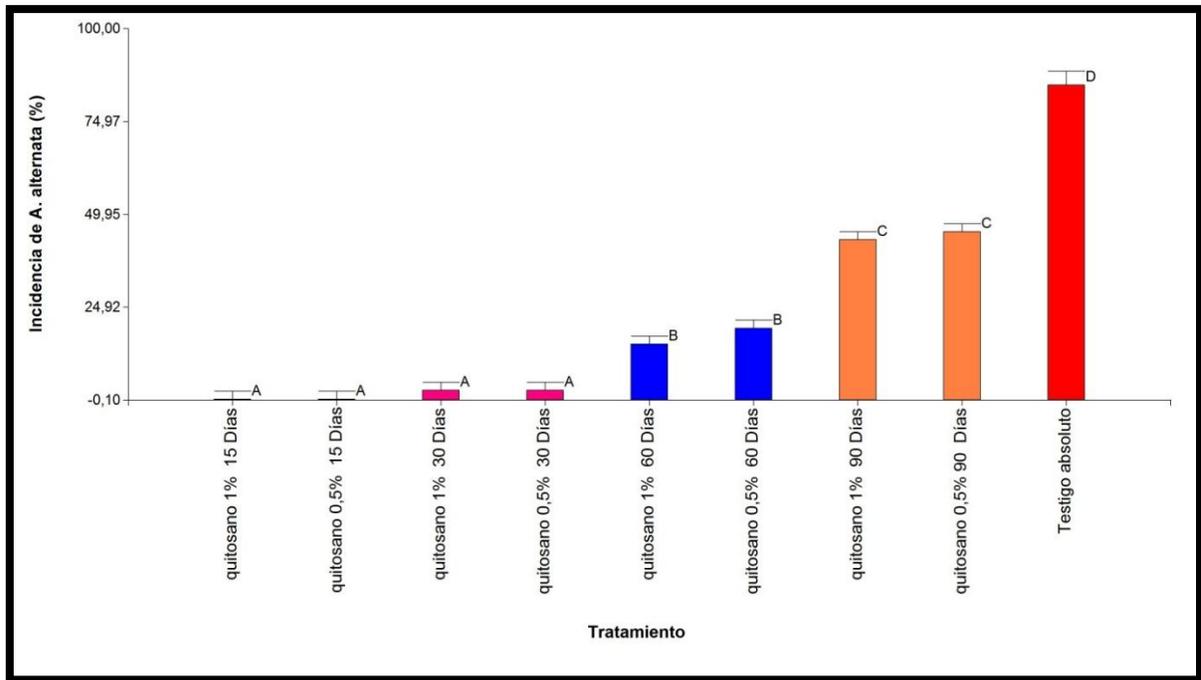


Figura 36: Incidencia de *A. alternata* (%) a lo largo del ensayo cuando se aplicó el tratamiento quitosano a ambas dosis, con inoculación de 10^4 conidios mL^{-1} de *A. alternata* en bayas.

5. DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento de *Alternaria* spp.

Los resultados obtenidos en la presente tesis, revelaron que el patógeno *Alternaria* spp. estuvo presente en todos los estadíos estudiados; desde floración hasta postcosecha. En relación con lo observado, otros autores sostienen que grupos especies de pequeñas esporas de *Alternaria* spp. (tamaño de conidio inferior a 60 μm ; como *A. alternata*, *A. tenuissima* y *A. infectoria*, principalmente) han sido reportados como contaminantes de varios alimentos, tales como cereales, frutas y vegetales; causantes del decaimiento de los mismos antes y después de su cosecha (Andersen y col., 2015, Armitage y col., 2015 y Logrieco y col., 2009).

Rotem (1994) expuso que muchos de los hospedantes del género *Alternaria* son susceptibles a sus respectivas enfermedades en dos estadíos de su desarrollo. El primer pico de susceptibilidad ocurre en el estadío juvenil y el segundo se da en el estadío senescente. La susceptibilidad de las hojas o plantas envejecidas ha sido reportada en casi todos los sistemas de *Alternaria*-hospedante.

Observamos un aumento marcado de la incidencia en la etapa de postcosecha en las evaluaciones de los 30,60 y 90 días. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Swart y Holz (1991), quienes señalan que infecciones latentes a campo, no detectables en la etapa de cosecha, pueden desempeñar un papel destacado en la podredumbre causada por *Alternaria* spp. en postcosecha.

5.2. Identificación morfológica y molecular de los aislados de *Alternaria* spp.

En el trabajo realizado en esta tesis, se logró identificar la población de *Alternaria* aislada de uvas de mesa cv. Red Globe. *Alternaria alternata* fue la única especie presente; identificada mediante métodos morfológico y molecular.

De manera similar a lo obtenido en el presente trabajo, pero en uvas para vinificar, *A. alternata* también fue la única especie de *Alternaria* identificada en uvas sanas de las variedades Malbec, Chardonnay, Merlot, Cabernet y Bonarda durante la cosecha 2001 en Mendoza, Argentina (Magnoli y col., 2003). Ostry y col., (2007), también encontraron que *A. alternata* fue la única especie de *Alternaria* presente en 13 variedades de uva cultivadas en la región sur de la República Checa durante la cosecha 2004. Prendes (2015), por su parte, determinó en base a los caracteres morfológicos desarrollados en los medios de cultivo APZ y V8 de aislados de uva Malbec a tiempo de cosecha de la DOC San Rafael durante las vendimias 2011 y 2012, que todos dichos aislados pertenecían al grupo especie *A. alternata*.

Los autores, Andersen y col., (2015), Greco y col., (2012) y Patriarca y col., (2007); quienes han hecho estudios sobre otros sustratos, clasificaron aislados de *Alternaria* spp. de pimientos en cuatro grupos especies. Se basaron en sus características morfológicas y en sus patrones de esporulación; todos ellos pertenecieron a grupos especies de esporas pequeñas de *Alternaria* spp.

Por otra parte, los autores Andersen y col., (2001) y Simmons (2007) exponen que la mayoría de las especies de *Alternaria* spp., incluyendo *A. alternata*, exhiben una considerable plasticidad morfológica que depende de las condiciones de cultivo, sustrato, temperatura, luz y humedad. Además, dentro de la misma colonia hay un rango considerable de variación morfológica en los conidios respecto al tamaño, forma, septación y color. Asimismo, hay varias especies de pequeñas esporas con características morfológicas que se superponen con aquellas de *A. alternata*, las más comúnmente conocidos son *A. tenuissima* y *A. infectoria*.

Así, la diferenciación de estos hongos puede ser difícil para quienes no están familiarizados con las características morfológicas específicas que separan estos grupos especies, y se ha indicado que estos hongos, en especial *A. alternata*, son frecuentemente identificados erróneamente (Roberts y col., 2000; Simmons, 2007). Por lo que la técnica de

PCR se convierte en una herramienta indispensable al momento de hacer una correcta identificación de grupos especies.

La práctica de identificar los aislados a nivel de grupo especie, permite aumentar y enriquecer la información disponible en relación a la presencia de este patógeno en importantes cultivos de nuestro país y al grado de afección que pueden provocar; como así también el nivel de control que pueden ejercer distintos tratamientos sobre los mismos.

La necesidad de establecer una definición correcta sobre la identificación de las especies de *Alternaria* se relaciona con la capacidad conocida de muchas especies para producir numerosos metabolitos secundarios, sobre todo fitotoxinas, que pueden jugar un papel importante en la patogénesis de las plantas. El grupo especie *A. alternata* engloba las principales especies del género productoras de micotoxinas, como alternariol (AOH), éter metil alternariol (AME), ácido tenuazónico (TeA) y altertoxina-I (ATX-I) (Andersen y col., 2001, 2002). Debido al peligro toxicológico que implican, numerosos estudios se han enfocado en la identificación de hongos potencialmente productores y de los factores que determinan su ocurrencia en distintos alimentos de consumo humano (Logrieco y col., 2009). Prendes (2015) en su trabajo expone que de las 34 cepas de *A. alternata* aisladas de uvas Malbec de la DOC San Rafael, vendimias 2011 y 2012 y que se evaluaron; el 97 % fueron capaces de producir al menos 1 de las 3 micotoxinas evaluadas (AOH, AME y ATe). El ATe fue producido por la mayoría de las cepas (97 %) y a los mayores niveles (máximo de 1941 ppm y mínimo de 11,2 ppm), seguido por AOH producido por el 71 % de las cepas, con un máximo de 437 ppm y un mínimo de 1,8 ppm y AME producido por el 56 % de las cepas, con un máximo de 663,4 ppm y un mínimo de 0,6 ppm.

Por lo tanto, una correcta identificación de las especies de *Alternaria* en combinación con el conocimiento acerca de los cultivos potencialmente contaminables, son una clave importante para determinar el riesgo toxicológico relacionado a la toxicidad de estas

micotoxinas y la posible presencia natural de estas en los productos agrícolas (Logrieco y col., 2009).

En consecuencia, disponer de técnicas genéticas rápidas capaces de diferenciar los grupos especies de *Alternaria* spp. es importante para la detección precoz de especies fitopatógenas en cultivos sensibles y el establecimiento de medidas preventivas y correctoras con el fin de reducir las pérdidas económicas en el sector primario y minimizar los riesgos para la salud del consumidor (Pavón y col., 2010).

5.3. Ensayos en postcosecha con biocontroladores

Dado que los tratamientos con fungicidas químicos en postcosecha no son amigables con el ambiente ni con la salud de los consumidores y que no se permiten en todos los países del mundo; la búsqueda por alternativas naturales dirigida a contrarrestar las podredumbres de frutas es necesaria (Yan y col., 2014). Además, la preocupación por la salud pública y las políticas restrictivas que limitan el uso de químicos en la agricultura, actúan como un mayor incentivo.

Los resultados obtenidos en la presente tesis, muestran en las evaluaciones en postcosecha de los 15 y 30 días, que las medias de la incidencia de *A. alternata* calculadas a partir de la observación de síntomas provocados por dicho patógeno en las bayas de uva de mesa cv. Red Globe, no superaron en ninguno de los tratamientos efectuados, ni en los testigos, el 6,7%; los mismos son porcentajes relativamente bajos de incidencia. Estos resultados están en concordancia con el trabajo realizado por los autores Swart y Holz (1991); quienes allí exponen que los síntomas de podredumbre causada por *A. alternata* en uvas de mesa sólo son evidentes al final de un almacenamiento en frío prolongado.

En los ensayos realizados en nuestro trabajo, se observó, tanto en la evaluación ejecutada a los 60 días de transcurrido el ensayo como en la los 90 días, para todos los tratamientos donde se aplicaron los controladores, incluyendo distintas dosis y niveles de inóculo de los mismos y diferentes momentos de inoculación del patógeno; mayor incidencia

de *A. alternata* en bayas con heridas que en aquellas en las que no se realizaron las mismas y presentaban originalmente aspecto sano. Por lo que la incidencia del patógeno se vió favorecida por la presencia de heridas. Estudios previos realizados en otros sustratos, como pimiento, indicaron que *Alternaria* spp. causa podredumbre en sus frutos; y que además de las especies patógenas, que colonizan plantas a través de las flores, las especies saprófitas también pueden infectar las frutas si su piel es lesionada por insectos, enfriamiento, quemaduras solares o deficiencia de calcio (Hochmuth y Hochmuth, 2009; Wall y Biles, 1993). Es importante destacar entonces, que cuidar el estado sanitario de la uva de mesa es también una forma de prevenir la incidencia de podredumbres.

En la presente tesis también se pudo analizar el comportamiento del potencial controlador quitosano en relación a los momentos de inoculación de *A. alternata*. En la evaluación de los 60 y 90 días se observó que en los tratamientos de quitosano, que incluían ambas dosis del controlador y bayas con y sin herida; la incidencia de *A. alternata* fue menor cuando se inoculó primero el patógeno y después el quitosano, que cuando el procedimiento se realizó al revés. Este hecho sugiere que el quitosano a los 60 y 90 días de almacenamiento podría funcionar como curativo en uvas que vengan con un cierto nivel de inóculo establecido desde el viñedo.

La actividad fungicida del quitosano ha sido bien documentada tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. La literatura generalmente muestra que el nivel de inhibición de los hongos está altamente correlacionada con la concentración de quitosano, lo que indica que su rendimiento se relaciona con la aplicación de una tasa apropiada (Bautista-Baños y col., 2006).

Resultados obtenidos en la presente tesis mostraron que en las 4 evaluaciones realizadas en postcosecha donde se aplicó quitosano como controlador, incluyendo bayas con y sin heridas y distintos momentos de inoculación del patógeno; no hubo diferencia significativa en cuanto al control de la incidencia de *A. alternata* entre las dos dosis aplicadas, 0,5 % y 1 %. Esta observación nos conduce a pensar que se obtendrían resultados igualmente beneficiosos

aplicando menor cantidad del controlador. En discrepancia con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, otros autores mostraron en ensayos *in vitro* que con el aumento de la concentración de quitosano (0,75-6,0 mg/ml), el crecimiento radial de *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*, disminuyó (El Ghaout y col.,1992b). El mismo efecto se informó sobre *Sclerotinia sclerotiorum* cuando las concentraciones de quitosano aumentaron de 1 % a 4 %. Por su parte, Cheah y col., (1997), informó que en estudios *in vitro* donde se aplicó quitosano para controlar el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* en zanahoria, se encontró que todos los tratamientos con el biocontrolador redujeron significativamente ($P < 0,01$) el crecimiento del hongo, en comparación con el crecimiento de los cultivos tratados con agua. Quitosano al 4% fue el inhibidor más eficaz ($P < 0,0001$).

Rodriguez Navas y col. (2015a), en su trabajo realizado *in vitro* sobre uvas de mesa cv. Red Globe con inoculación de *Botrytis cinerea* B24, expusieron que el crecimiento del micelio disminuyó un 70% en las placas que tuvieron tratamiento con quitosano al 0,5%, un 77% en las placas tratamiento de quitosano al 1% y un 85% en las placas con tratamiento de quitosano al 2%. Si bien el menor crecimiento de *B. cinerea* B24 se registró en las placas con la mayor concentración de quitosano, no hubo diferencia significativa ($P = 0.01$) con el crecimiento registrado en las placas con la concentración del 1%. Es importante destacar, al momento de optar por la concentración a utilizar del biocontrolador, que los valores de las concentraciones media inhibitorias (CMI) del quitosano en varios organismos fúngicos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium verticillioides*, *Ramularia cercosporioides*) se encuentran en el rango de concentración desde 0.0018% hasta 1.0%, siendo afectado por factores como pH del medio y grado de polimerización del quitosano (Oliveira y col., 2013).

El trabajo realizado en la presente tesis mostró que para los tratamientos con aplicación de quitosano, incluyendo ambas dosis del controlador, bayas con y sin heridas y diferentes momentos de aplicación del inóculo; no hubo diferencia significativa en el control de *A. alternata*

de uvas de mesa cv. Red Globe con respecto al tratamiento tradicional con SO₂ en ninguna de las 4 evaluaciones de postcosecha realizadas.

Son muchos los resultados exitosos de la utilización del quitosano, así podemos mencionar los experimentos de Sánchez Domínguez y col. (2007) quienes estudiaron el efecto *in vitro* del quitosano en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata* en tomate, y obtuvieron reducción del grado de inhibición y crecimiento de este hongo en un 50,6 %.

Trabajos previos realizados *in vivo* con inoculación artificial de hongos obtuvieron como resultado que las coberturas de quitosano fueron efectivas en reducir la podredumbre en frutillas causada por *Botrytis cinerea* o *Rizhopus stolonifer*. Luego de 14 días de almacenamiento de la fruta, las coberturas de quitosano a 15 mg/ml redujeron la podredumbre causada por ambos hongos en un 60 % (El Ghaouth y col., 1992a).

Estos resultados coinciden con un amplio número de trabajos que demuestran la eficacia de los tratamientos con quitosano aplicados en la conservación de uvas de mesa, tales como los de Romanazzi y col., (2002 y 2012) y Freitas y col., (2015), y en otras frutas como fresas, frutillas, cerezas (Romanazzi 2010, Romanazzi y col., 2013) y en tomates (Liu y col., 2007, Badawy 2009), donde los porcentajes de podredumbre gris (*B. cinerea*) y otras podredumbres, como la podredumbre verde y azul causadas por *Penicillium digitatum* y *P. Italicum*, respectivamente, en cítricos (Chien y col., 2007) disminuyeron significativamente con respecto a los tratamiento control.

Es interesante destacar que no todos los hongos presentan la misma sensibilidad al quitosano y esto puede ser debido a la composición de fosfolípidos de membrana y particularmente a la naturaleza de sus cargas (Ramos García y col., 2010).

Por otra parte, numerosos trabajos señalan que la actividad antifúngica y antibacteriana del quitosano mejora mediante la adición de agentes antimicrobianos (Yu y col., 2013), aceites esenciales (Perdones y col., 2012), ácidos orgánicos y sus sales (Sivakumar y col., 2005), o en combinación con otros biopolímeros (Moreira y col., 2011). Por lo que la aplicación combinada

de quitosano con estos productos podría ser probada en futuras investigaciones en uva de mesa.

Si bien se obtuvieron, en nuestro trabajo, resultados alentadores en cuanto al uso de quitosano; sólo se evaluó su capacidad para reducir la incidencia de *A. alternata* en postcosecha, pero no se estudió la calidad de la uva de mesa al finalizar el período de conservación. Cabe recordar que las propiedades organolépticas son muy importantes en este producto que se comercializa para su consumo en fresco.

El quitosano permite prolongar la vida media de frutos y vegetales al formar una capa semipermeable que regula el intercambio de gases y reduce las pérdidas por transpiración. Este efecto se ha reportado en numerosos productos hortofrutícolas, tales como fresas, manzanas, tomates y pimiento morrón, entre otros (Du y col., 1997; El Ghaouth y col., 1991a; El Ghaouth y col., 1992b). En el proceso de maduración se ha encontrado que el quitosano interviene en la reducción de los niveles de etileno y CO₂ en manzanas, pepinos (*Cucumis sativus* L.), pimientos, etc. (Du y col., 1997; El Ghaouth y col., 1991a). En otros parámetros relacionados con la calidad de los frutos, también se ha evidenciado un efecto positivo al aplicar quitosano, observándose que la pérdida de peso disminuye, aumenta la firmeza y la acidez titulable de los frutos, y el contenido de sólidos solubles totales tiende a mantenerse o incrementarse (Bautista-Baños y col., 2003; Kittur y col., 2001).

En nuestro ensayo realizado en postcosecha, además del efecto del quitosano como controlador, se evaluó el de *Metschnikowia pulcherrima* (RCM2). Si bien, en todas las fechas de evaluación la incidencia de *A. alternata* fue mayor en los tratamientos con RCM2 que en aquellos donde se aplicó SO₂; en la evaluación de los 60 días se observó una reducción de la incidencia por parte de dicha cepa con respecto al control absoluto. Por su parte, la autora Prendes (2015) informa por primera vez acerca del uso de *Metschnikowia* spp. como antagonista de *A. alternata* en uva para vinificar; todas las cepas de levadura, aisladas durante las vendimias 2011, 2012 y 2013 en uvas Malbec a tiempo de cosecha de la DOC San Rafael

e identificadas como *M. pulcherrima* fueron evaluadas y mostraron capacidad de disminuir la infección en uva provocada por las cepas de *A. alternata* empleadas.

6. CONCLUSIONES

- ❖ El patógeno *Alternaria* estuvo presente en todas las etapas del ciclo fenológico de la uva de mesa cv. Red Globe analizadas y en postcosecha.
- ❖ El valor más alto de incidencia de *Alternaria* se dio en la etapa de floración; seguido por los de postcosecha a los 90, 60 y 30 días en bayas.
- ❖ El grupo especie identificado para todas las cepas analizadas fue *Alternaria alternata*.
- ❖ La presencia de heridas en las bayas favorece el desarrollo de la podredumbre causada por *Alternaria alternata* en postcosecha.
- ❖ No hay diferencias significativas entre las dos dosis de quitosano aplicadas (0,5% y 1%) en ninguna etapa de la evaluación en postcosecha; por lo que se sugiere optar por la menor de ellas, reduciendo así el residuo de quitosano en la uva que se comercializará.
- ❖ Los tratamientos de quitosano fueron más efectivos en la reducción de la incidencia de *A. alternata* cuando se aplicaron después del inóculo de *Alternaria*, que cuando se aplicaron antes del mismo.
- ❖ La levadura *M. pulcherrima* (RCM2) fue menos efectiva para la reducción de la incidencia de *A. alternata* en postcosecha, en las evaluaciones de los 60 y 90 días, que los tratamientos con quitosano y SO₂.
- ❖ Los tratamientos con quitosano y SO₂ produjeron resultados similares en la reducción de la incidencia de *A. alternata* en postcosecha, en las evaluaciones de los 60 y 90 días; por lo que el uso de quitosano podría sugerirse como reemplazante del control químico tradicional.

ANEXO

Medios de cultivo y soluciones

- Agar nutritivo sintético (ANS): sacarosa 0,2 g; KH_2PO_4 1 g; MgSO_4 (7 H_2O) 0,5 g, KNO_3 1 g; KCl 0,5 g; agar 20 g; agua destilada 1000 ml. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 6 cm.
- Agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC): glucosa 10 g; peptona 5 g; KH_2PO_4 1 g; MgSO_4 (7 H_2O) 0,5 g; cloranfenicol 0,001 g; dicloran 0,002 g; rosa de bengala 0,0025 g; agar 15 g; agua destilada 1000 ml; agar-agar 15g. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm.
- DG18: glucosa 10g; peptona 5 g; MgSO_4 (7 H_2O) 0,5g; KH_2PO_4 1g; diclorán 0,002g; cloranfenicol 0,001 g; glicerol 220g; agua destilada 1000ml; agar-agar 15g.
- Agar agua (AA): agar 10 g; agua destilada 1000 ml. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm.
- Agar papa zanahoria (APZ): papa 20 g; zanahoria 20 g; agar 20 g; agua destilada 1000 ml. Las papas y las zanahorias con cáscara se lavaron, se cortaron en trozos, y se hidrataron con 500 ml de agua, se hirvieron en autoclave a vapor fluente durante 45 minutos. Se filtró el caldo y se le añadió el agar. Con las papas y las zanahorias se realizó un puré, utilizando una mini procesadora; posteriormente se adicionó al caldo y el agar, para luego, finalmente, llevarlo a volumen con agua destilada (1000 ml). Se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm o 4 cm, dependiendo el uso de las mismas.

- Medio de cultivo V8: jugo V8 (comercial) 175 ml; CaCO₃ 3 g; agar 2g; agua destilada 1000 ml. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri.
- Tubos de ensayo con detergente Tween 80: 10 ml de agua destilada por tubo con unas gotas de Tween 80. Los tubos se esterilizaron durante 15 minutos a 121 °C.
- Buffer de lisis: 400mM Tris-Hcl (pH 8); 60mM EDTA (pH 8); 150mM ClNa y 1% SDS.
- Acetato potásico: 60 ml acetato potásico 5M; 11,5 ml ácido acético glacial y 28,5 ml agua destilada.

- Crisosto, C. H.; J. L. Smilanick; y N. K. Dokoozlian. (2001). Table grapes suffer water loss, stem browning during cooling delays. *California Agriculture*, 55 (1), 39-42.
- Cruaños, M. D., y Locaso, D. E. (2011). Quitosano: antimicrobiano biodegradable en postcosecha de arándanos (*Vaccinium myrtillus* L.). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 12 (1), 57-63.
- Du, J., Gemma, H., Iwahori, S. (1997). Effects of chitosan coating on the storage of peach, japanese pear and kiwifruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 66 (1), 15-22.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R. (1991a). Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumbers and bell pepper fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*, 15, 359-368.
- El Ghaouth, A., Arul, J., y Asselin, A. (1992a). Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology*, 82, 398-402.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Asselin, A., y Benhamou, N. (1992b). Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *HortScience*, 27, 1016-1018.
- Fox E.M., Howlett B.J. (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 481-487.
- Freitas, L. S., Jacques, R. A., Richter, M. F., Silva, A. L., y Caramão, E. B. (2008). Pressurized liquid extraction of vitamin E from Brazilian grape seed oil. *Journal of Chromatography A*, 1200 (1), 80-83.
- Gascón, J. C. (2008). *Caracterización de variedades de vid (Vitis vinifera L.) de la provincia de Huesca*. Huesca. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza. Departamento de Agricultura y Economía Agraria.
- Greco, M., Patriarca, A., Terminiello, L., Fernández Pinto, V., y Pose, G. (2012). Toxigenic *Alternaria* species from argentinean blueberries. *International Journal of Food Microbiology*, 154 (3), 187–191.
- Hidalgo, L. (1993). *Tratado de viticultura general*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Hochmuth, G.J. y Hochmuth, R.C. (2009). Blossom-End Rot in Bell Pepper: Causes and Prevention. Recuperado de: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/files/ss/ss49700.pdf>.
- Hong, G.S., Cramer, R.A., Lawrence, C.B. y Pryor, B.M. (2005). Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genetics and Biology*, 42, 119-129.
- Instituto Nacional de Viticultura. (2011). *Informe estadístico sobre la uva de mesa en Argentina*. Mendoza. Recuperado de: http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/estadisticas/Cosecha/2014/1._INFORME_COSECHA.2014.pdf.
- Izzeddin A., N., y Medina T., L. (2011). Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus*, 15 (3), 8-12.
- Kittur, F.S., Kumar, K.R., Tharanathan, R.N. (2001). Functional packaging of chitosan films. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und forschung A.*, 206, 44-47.
- Lacey J. (1989). Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 67, 11S-25S.
- Liu, J., Tian, S. P., Meng, X. H., & Xu, Y. (2007). Control effects of chitosan on postharvest diseases and physiological response of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 300–306.
- Llorente, A. (1991). Uva de mesa natural. Una alternativa para la diversificación productiva. Proyecto de desarrollo rural. Estación Experimental INTA Alto Valle. Noviembre 1991.

- Logrieco, A., Moretti, A., Solfrizzo, M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*, 2, 129–140.
- Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., Dalcerro, A. (2003). Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus section Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 179-184.
- Martín Russo, V. (2011). Selección de levaduras nativas de uva con capacidad antagónica frente a *Botrytis cinerea*. Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.
- Martínez, L. E. (2011). Efecto de la aplicación de abonos orgánicos sobre las características físico-químicas y microbiológicas de suelos bajo cultivo de vid de la provincia de Mendoza. Mendoza. Tesis de maestría. Universidad de Buenos Aires, área Ciencias del Suelo. Otorgado por Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía.
- Mateluna Estay, R. A. (2006). Estudio de actividad antibacteriana de potenciales biocontroles sobre bacterias acéticas involucradas en la pudrición ácida de la uva. Santiago de Chile. Tesis de grado. Universidad de Chile.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (1988). Podredumbres del racimo (Acida y fúngicas). Madrid. Recuperado de: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_PEV%2FPEV_1988_2_1_8.pdf.
- Miranda, O. y Novello, R. (2012). Documento de la Cadena Uva de Mesa. San Juan: INTA. Recuperado de: http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_programa_nacional_frutales_cadena_de_la_uva_de_.pdf.
- Montealegre A., J. R., y Pérez R., M. L. (2013). *Control biológico de enfermedades de las plantas en Chile*. Santiago de Chile. Recuperado de: http://www.rapaluruaguay.org/agrotoxicos/Control%20Biol%F3gico%20de%20Enfermedades_de_Plantas_en_Am%E9rica_Latina_y_el_Caribe.pdf.
- Moreira, M.R., Ponce, A., Ansorena, R. y Roura, S.I. (2011). Effectiveness of edible coatings combined with mild heat shocks on microbial spoilage and sensory quality of fresh cut broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Journal of Food Science*, 76, 367-373.
- Mullins, M. G., A. Bouquet y L. E. Williams. (1992). *Biology of the Grapevine*. Cambridge Univ. Press. New York. ISBN-13: 978-0521038676.
- Oliveira Pedro, R., Takaki, M., Castilho Gorayed, T.C., Luiz Del Bianchi, V., Cláudio Thomeo, J., José Tiera, M., y Oliveira Tiera, V. (2013). Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. *Microbiological Research*, 168 (1), 50 – 55.
- Oriolani, E., Rodríguez Romera, M., y Combina, M. (2012). Determinación de la agresividad de las levaduras que producen la podredumbre ácida en los racimos de la vid en Mendoza y San Juan, Argentina. In *Manual de Poscosecha de de Frutas. Manejo integrado de patógenos*, pp. 18. Ediciones INTA.
- Ostry, V., Skarkova, J., Prochazkova, I., Kubatova, A., Malir, F., Ruprich, J. (2007). Mycobiota of Czech wine grapes and occurrence of ochratoxin A and *Alternaria* mycotoxins in fresh grape juice, must and wine. *Czech Mycology*, 59, 241-254.
- Oviedo, M. S. (2012). Ecofisiología de *Alternaria* spp. en soja. Micotoxinas. Río Cuarto. Córdoba. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales.
- Pássaro Carvalho, C., Nunes, C., y Palou, L. (2012). Control de enfermedades de poscosecha. In *Cítricos: Cultivo, Poscosecha e Industrialización*, pp. 285-306. Itagúí: Editorial Artes y Letras S.A.S.

- Patriarca, A., Azcarate, M. P., Terminiello, L., Fernandez Pinto, V. (2007). Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 219-222.
- Pavón, M. Á., González, I., Pegels, N., Martín, R. y García, T. (2010). PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a1. *Food Control*, 21 (12), 1745-1756.
- Pavón Moreno, M. Á. (2012). *Importancia del género Alternaria como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas*. Madrid. España. *Nutrición Hospitalaria*, 27 (6), 1772-1781.
- Perdonés, A., Sánchez, L., Chirlat, A. y Vargas, M. (2012). Effect of chitosan- lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70, 32-41
- Ponsone M. L., Kuhn Y., Schmidt-Heydt M., Chulze S. (2012). Effect of *Kluyveromyces thermotolerans* strains, potential biocontrol agents, on polyketide synthase gene expression, ochratoxin accumulation by *Penicillium* and *Aspergillus* species. *World Mycotoxin Jour.*
- Prendes L. (2015). Hongos filamentosos de uvas Malbec de la DOC San Rafael: potencial biocontrol de los productores de micotoxinas con levaduras del mismo ecosistema. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Cuyo.
- Pugliese M. B. (2009). Influencia del deshoje y despunte en el desarrollo del color y otras variables de calidad en la cultivar Red Globe bajo malla antigranizo. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo.
- Ramos-García, M. D., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L. L., Bosquez-Molina, E., Alia-Tejacal, I., y Estrada-Carrillo, M. (2010). Compuestos Antimicrobianos Adicionados en Recubrimientos Comestibles para Uso en Productos Hortofrutícolas. *Revista mexicana de Fitopatología*, 28 (1), 44-57.
- Richard J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 3-10.
- Rivero, M. L. y Quiroga, M. I. (2007). *Calidad durante la conservación frigorífica de uva de mesa para exportación*. Mendoza. Recuperado de: <http://www.horticom.com/pd/imagenes/71/998/71998.pdf>.
- Rivero, M.L., y Quiroga, M.I. (2010). ¿Es el 1-MCP (1-Metilciclopropeno) una alternativa al uso del dióxido de azufre en conservación de uva de mesa? *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 11 (1), 8-17.
- Roberts R.G., Raymond, S.T., Andersen, B. (2000). RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research*, 104, 151-160.
- Robles Carrión, Á. R. (2010). Uso de microorganismos antagonistas y sustancias naturales como una alternativa ecológica en el control de enfermedades en cultivos. Loja, Ecuador. Recuperado de: http://unl.edu.ec/sites/default/files/investigacion/revistas/2014-9-6/5_articulo_de_revision_34-43_b1.pdf.
- Rodríguez Navas, A., Ponsone, M.L., Rogic, G., Quiroga, M.I., Rodríguez Romera, M., Moraga, L., Rivero, M.L. (2015). Quitosano, una alternativa biocompatible para reemplazar el uso de SO₂ en uva de mesa. Argentina. Balcarce. Congreso. VIII Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Postcosecha. Facultad de Ciencias Agrarias.
- Rodríguez Romera, M., Combina, M., y Oriolani, E. (2012). Complejo parasitario de la podredumbre ácida de los racimos de la vid, en Mendoza y San Juan, Argentina. En *Manual de Poscosecha de Frutas. Manejo integrado de Patógenos*. pp. 17-19. Mendoza: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

- Rodríguez Romera, M., D'Innocenzo, S., y Oriolani, E. (2011). Diagnóstico y cuantificación de patógenos en uva de mesa durante la poscosecha. En *Libro de Resúmenes VI Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología de Poscosecha*, p. 30. Mendoza , Argentina.
- Rodríguez Romera, M., Ponsone, M. L., y Díaz, M. (2014). Conservación en frío de uva de mesa con diferentes dosis de SO₂. XXXVII Congreso Argentino de Horticultura, Mendoza.
- Romanazzi, G., Nigro F., Ippolito A., Di Venere D., and Salerno, M. (2002). Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science*, 67, 1862–1867
- Romanazzi, G., (2010). Chitosan treatment for the control of postharvest decay of table grapes, strawberries and sweet cherries. In: Sivakumar, D. (Ed.), *Fresh Produce – Special Issues: New Trends in Postharvest Management of Fresh Produce*, 4 (1). Global Science Books, Ltd, UK, pp. 111–115
- Romanazzi, G., Nigro F., Ippolito A., Di Venere D., and Salerno, M. (2012) Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 63 (1), 141-147.
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Santini, M., Landi, L. (2013) Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 75, 24-27.
- Rotem, J. (1994). *The Genus Alternaria: Biology, Epidemiology, and Pathogenicity*. (Vol. 201). St. Paul: APS Press.
- Sánchez Domínguez, D., Bautista Baños, S., y Castillo Ocampo, P. (2007). Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. *Anales de Biología*, 29, 23-32.
- Salazar, D.M. y Melgarejo, P. (2005). *Viticultura. Técnicas de Cultivo de la Vid, Calidad de la Uva y Atributos de los Vinos*. AMV Ed. Mundi-Prensa S.A., Madrid, España.
- Scheu, P., Berghof, K. y Stahl, U. (1998). "Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction". *Food Microbiology*, 15, 13-31.
- Sidhu G.S. (2002). Mycotoxin genetics and genes clusters. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 705-711.
- Simmons, E. (2007). *Alternaria: an Identification Manual*. Netherlands: Samson R.
- Sivakumar, D., Sultanbawa, Y., Ranasingh, N., Kumara, P., Wijesundara, R. L. C. (2005). Effect of the combined application of chitosan and carbonic salts on the incidence of anthracnose and the quality of papaya during storage. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80, 447–452
- Swart, A. y Holz, G. (1991). *Alternaria alternata* rot of cold-stored table grapes in the Cape Province of South Africa. *Phytophylactica*, 23, 217- 222.
- Swart, A. y Holz, G. (1994). Colonization of Table Grape Bunches by *Alternaria alternata* and Rot of Cold-Stored Grapes. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 15, 19-25.
- Swart, A., Lennox, C., y Holz, G. (1995). Infection of Table Grape Bunches by *Alternaria alternata*. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 16 (1), 3-6.
- Thomma, B.P.H.J (2003): *Alternaria* spp.: From general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4 (4), 225-236.
- Torres Leal, G. (2012). Tecnología de poscosecha. In *Manual de Poscosecha de Frutas. Manejo integrado de patógenos*, p. 13. Ediciones INTA.
- Viñas, I. (1990). Principios básicos de la patología de poscosecha. En *Manual de Poscosecha de Frutas*. 2012. Ediciones INTA.
- Visconti, A. and Sibilia, A. (1994). *Alternaria* toxins. In: Miller, J.D. and Trenholm, H.L. (Eds.) *Mycotoxins in grain*. Eagan Press, St. Paul, MN, USA, pp. 315-336.

- Yan, F., Xu, S., Chen, Y., Zheng, X. (2014). Effect of rhamnolipids on *Rhodotorula glutinis* biocontrol of *Alternaria alternata* infection in cherry tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 97, 32-35.
- Wall, M.M., Biles, C.L. (1993). *Alternaria* fruit rot of ripening chile peppers. *Phytopathology*, 83, 324–328.
- Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M., Crous, P.W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75, 171-212.
- Yu L., Gong J., Zeng C., Zhang L. (2013). Preparation of zeolite-A/chitosan hybrid composites and their bioactivities and antimicrobial activities. *Materials Science and Engineering C*, 33, 3652-3660.