ITEA (1995), Vol. 91V N.º 1, 6-20

PRESENCIA DE CEPAS FUNGICAS RESISTENTES A FUNGICIDAS EN POST-COSECHA DE FRUTA DULCE EN LLEIDA

I. Viñas
J. Usall
N. Teixidó
V. Sanchis

UdL-IRTA. Centre R+D de Lleida.
Area de postcollita. Unitat de patologia
Av. Rovira Roure, 177 - 25006 LLEIDA

RESUMEN

En el presente trabajo se determina la presencia y distribución de la micoflora resistente a los fungicidas tiabendazol, benomilo e imazalil en diversas zonas de cinco centrales hortofrutícolas de Lleida. Las zonas estudiadas fueron: zona de recepción, pasillos, zona de selección manual y cámaras. Así mismo, fue investigada la distribución de las cepas de *P. expansum* resistentes a los benzimidazoles y de las cepas de *Penicillium spp.* resistentes al imazalil, aisladas del ambiente, superficie de frutas y embalajes en las diversas zonas estudiadas.

La mayoría de las cepas resistentes pertenecen al género *Penicillium* (96, 7%). Se identifican como *P. expansum* el 4.7% del total de cepas resistentes de *Penicillium* aisladas.

Destaca el hecho de que la totalidad de las cepas de *P. expansum* ensayadas resistentes al tiabendazol y benomilo fueron sensibles al fungicida imazalil y presentaron capacidad de producir podredumbre cuando fueron inoculadas en manzanas. El 60, 7% de estas cepas presentaron capacidad potencial de producir patulina. Ninguna de las cepas de *Penicillium* resistentes al imazalil fue identificada como *P. expansum.* El 89% de las cepas ensayadas presentaron capacidad de producir podredumbre. Ninguna de las cepas de *Penicillium* resistente al imazalil presentaron capacidad de producir patulina.

Palabras clave: *Penicillium expansum,* Post-cosecha, Frutas de pepita, Tiabendazol, Benomilo, Imazalil.

SUMMARY
OCCURRENCE OF FUNGIC STRAINS RESISTANT TO THE MOST COMMON FUNGICIDES IN POSTHARVEST OF POME FRUITS IN LLEIDA

The aim of the present work is determining the distribution of mycoflora present in several areas which is resistant to the fungicides thiabendazole, benomyl and imazalil, in five apple packinghouses in Lleida province (Spain). The following four areas were studied: reception zone, passages, manual selection zone and cold storage rooms.

The most of fungicide resistant strains belonged to *Penicilllium* genus (96.7%). The 4.7% of them were classified as *P. expansum*. Of all *P. expansum* strains tested, the ones that were resistant to thiabendazole and benomyl were controlled by imazalil. The resistant strains showed capacity to decay the pome fruit tissue when inoculated on apples. The potential capacity for patulin production was detected in 60.7% of the strains.

None of the *Penicillium* strains resistant to imazalil was identified as *P. expansum*. Pome fruit tissue was decayed by 89% of the strains assayed. None of the *Penicillium* strains resistant to imazalil showed capacity to produce patulin.

Key words: *Penicillium expansum*, Postharvest, Pomme fruits, Thiabendazole, Benomyl, Imazalil.

Introducción

La contaminación por hongos de la fruta de pepita conservada en cámara puede producirse en el huerto o en la misma central hortofrutícola. En esta última el proceso infeccioso se inicia durante el tratamiento de post-recolección, en el paso de la cadena de selección o durante la conservación en el interior de la cámara frigorífica. En ésta, las posibles vías de contaminación parten del inóculo fúngico conservado en las paredes, del desarrollado sobre los embalajes y del existente en el aire. Los géneros con especies patógenas más frecuentes en las cámaras frigoríficas son *Penicillium, Botrytis, Rhizopus, Alternaria, Cladosporium, Fusarium y Trichothecium* (MOREAU, 1957; PRATELLA, 1960; PALAZÓN y RODRÍGUEZ, 1977).

El género *Penicillium* es de gran importancia en la industria agroalimentaria, por su elevada incidencia, así como por la facilidad para desarrollarse en los más diversos substratos. En el sector frigorista español es el patógeno que mayor porcentaje de podredumbres ocasiona, siendo la podredumbre azul, causada por el *P. expansum* Link, la principal alteración fúngica que presentan las frutas en conservación, ya que puede llegar a producir del 80-90% de los daños (ANDERSON, 1956).

El tratamiento en post-recolección mediante duchas que contienen fungicidas y un antiescaldado, es comúnmente utilizado como medida para prevenir los daños en las frutas almacenadas por periodos de tiempo que oscilan entre los 3 y 9 meses en condiciones de atmósfera controlada. Entre los fungicidas más utilizados durante los últimos 20 años destacan los benzimidazoles y, más concretamente en España, el tiabendazol (TBZ) que ha sido mayoritariamente empleado en post-cosecha de fruta dulce, por su gran efectividad en el control del *P. expansum* (BEATLE y OUTHRED, 1970; BEN-ARIE, GUELFAT-REICH, 1973).

Los benzimidazoles son efectivos en prevenir la infección fúngica que provoca daños en los frutos durante el almacenamiento (ECKERT, 1978). Sus propiedades erradicantes pueden ser atribuidas a su pe-

netración a través de la cutícula y llegada al lugar de infección (BEN-ARIE, 1975). Los benzimidazoles afectan a la función mitótica de las células fúngicas (DAVIDSE, 1973). La selectividad característica de éstos fungicidas sistémicos da lugar, por un lado, a la posibilidad de eliminación del parásito o a la inhibición de su desarrollo sin dañar a la planta huésped; pero, por otro lado, al riesgo de que el número de cepas resistentes sea mayor que para los fungicidas convencionales, cuya acción no se circunscribe a un punto, sino que es consecuencia de una multilocalización.

La gran eficacia del tiabendazol en postcosecha de fruta de pepita produjo una generalización en su uso y al mismo tiempo motivó la aparición de cepas resistentes, con la consecuente disminución en el control de la enfermedad (PRUSKY *et al.*, 1980a). Cepas resistentes han sido detectadas en manzanas y peras en frigoconservación en Estados Unidos (BERTRAND y SAULIE-CARTER, 1978; ROSENBERGER y MEYER, 1979), en Australia (KXOFFMANN *et al.*, 1978; WICKS, 1977), en Israel (PRUSKY *et al.*, 1980b; PRUSKY y BEN-ARIE, 1983) y en España (VIÑAS *et al.*, 1989).

El desarrollo de resistencias fúngicas a los fungicidas de la familia de los benzimidazoles ha estimulado la búsqueda de nuevos fungicidas. Uno de estos nuevos fungicidas es el imazalil, que controla a los *P. expansum* resistentes al tiabendazol en frutas de pepita (BURTON y DEWEY, 1981) y *P. digitatum e P. italicum* en cítricos (TUSET *et al.*, 1981; ECKERT *et al.*, 1981). El imazalil es un fungicida sistémico con un amplio espectro antifúngico. Sus propiedades fungicidas contra las podredumbres causadas por el *Penicillium spp.* fueron referenciadas por LAVILLE en 1973. El fungicida actúa a nivel de la biosíntesis del ergosterol por inhibición de la C-14 dimetilación del lanosterol o del 24-metilen-24, 25-dihidrolanosterol, produciendo la acumulación de los C-14 metil esterol precursores (BUCHENAUER, 1977; SIEGEL y RAGSDALE, 1978; VANDEN BOSSCHE *et al.*, 1984; KERKENAAR *et al.*, 1984 y 1986). La fungitoxicidad de los inhibidores de la dimetilación (DMIs) ha sido atribuida al agotamiento del ergosterol y a la acumulación de los precursores del esterol en las membranas fúngicas. Este anormal contenido del esterol causa hiperfluidez en la membrana, da lugar a cambios en la permeabilidad de la membrana y actividad de los enzimas relacionados con la membrana (KATO, 1986).

Las probabilidades de desarrollo de cepas resistentes al imazalil se esperaba que fuesen muy bajas (KÖLLER y SCHEINPFLUG, 1987). Sin embargo, pocos años después de la aparición de las primeras cepas resistentes en condiciones de laboratorio (DE WAARD *et al.*, 1982), fueron detectadas ya en centrales hortofrutícolas cepas resistentes de *P. digitatum* en cítricos (DAVE *et al.*, 1989; ECKERT, 1987).

El objetivo del presente trabajo fue el estudio, en diferentes zonas de 5 Centrales hortofrutícolas, de la distribución de la micoflora resistente a los benzimidazoles (tiabendazol y benomilo) y al imazalil. Se determina, así mismo, la posible patogenicidad de las cepas resistentes en manzanas y se caracteriza a las mismas mediante la realización de diversas pruebas.

Material y métodos

Toma de muestras

La toma de muestras se realizó en 5 centrales hortofrutícolas de la provincia de Lleida, mediante 3 visitas periódicas por

campaña frutícola, durante las campañas 1985-86, 86-87 y 87-88.

Se recogieron un total de 270 muestras de 4 áreas de la central: zona de recepción, área de selección manual, pasillo e interior de las cámaras (3 cámaras por central). Se estableció la contaminación fúngica ambiental en las 4 zonas indicadas, mientras que la de la superficie de la fruta y embalajes sólo se determinaba en la zona de selección manual e interior de las cámaras (Véase tabla I de distribución de la toma de muestras).

Para la determinación de las cepas resistentes se utilizaron tres fungicidas: tiabendazol, benomilo e imazalil, los dos primeros a la dosis de 40 mg m.a. por ml (PRUSKY *et al.*, 1980b; ROSENBERG *et al.*, 1979) y para el imazalil a 20 mg m.a. por ml (PRUSKY y BEN-ARIE, 1985). Se consideraba que una cepa era resistente a un fungicida determinado cuando la cepa podía crecer en el medio de cultivo patata dextrosa agar (PDA) al que se le había adicionado previamente el fungicida hasta alcanzar las concentraciones antes mencionadas.

La toma de muestras de la contaminación fúngica ambiental resistente se realizó mediante la apertura, durante 30 seg., de placas Petri con medio PDA con el fungicida correspondiente, mientras que la contaminación fúngica de la superficie de frutas y embalajes se determinaba poniendo en contacto placas Rodac, con el medio PDA con fungicidas, con la superficie de frutos y embalajes, realizando al mismo tiempo una ligera presión en el medio de cultivo con el fin de que las esporas fúngicas quedasen adheridas al mismo.

Se utilizó para cada toma de muestras, 5 placas Petri (contaminación fúngica ambiental) y 10 placas Rodac (5 placas para la contaminación superficial de manzanas y 5 placas para los embalajes). El periodo de incubación de las placas fue de 7 días y la temperatura de 25° C.

Aislamiento e identificación de las cepas aisladas

Con el conjunto de cepas crecidas en las placas con medio PDA con fungicidas se procedió al aislamiento en PDA y posterior identificación siguiendo las monografías recomendadas para los diferentes géneros fúngicos. En el género *Penicillium* las descritas por RAPER y THOM (1949), en la *Alternaria* los criterios de ELLIS (1971, 1976) y para el resto de los géneros se ha seguido la monografía de BARNETT y HUNTER, (1973).

Pruebas de resistencia cruzada

La determinación de la resistencia cruzada de las cepas de *Penicillium expansum* resistentes al tiabendazol se realizó sembrando en estría las cepas resistentes, en medio de cultivo PDA con los fungicidas benomilo e imazalil respectivamente. En el caso de las cepas resistentes al benomilo se sembraron en estría en medio de cultivo PDA con los fungicidas tiabendazol e imazalil respectivamente. En todos los casos las dosis de fungicidas fueron las indicadas para la detección de cepas resistentes. El periodo de incubación fue de 7 días a 25° C de temperatura.

Las pruebas se realizaron con 28 cepas de *P. expansum* resistentes al tiabendazol y 28 cepas resistentes al benomilo, representativas del conjunto de cepas aisladas en base a sus características morfológicas y culturales. Se consideraba que una cepa era resistente a un fungicida cuando crecía en

el medio que contiene a ese determinado fungicida.

Pruebas de patogenicidad

Para la determinación de la capacidad patogénica de las cepas resistentes al tiabendazol, benomilo e imazalil se siguió la metodología descrita por PRUSKY y BEN-ARIE (1983). En primer lugar se procedió a la desinfección superficial con etanol 96% de manzanas sanas de la variedad "Golden Delicious" seleccionadas para ésta prueba. Seguidamente se extrajeron mediante un bisturí, en condiciones asépticas, dos cubos de 1 cm^3 por manzana. La prueba se realizó con tres manzanas por cepa.

Paralelamente, se sembraron las cepas fúngicas resistentes en placas Petri con medio PDA y se incubaron durante 7 días a 25° C de temperatura. Después de éste periodo de tiempo, se realizó el corte del medio con el micelio en secciones aproximadas de 1 cm^2, mediante un bisturí en condiciones asépticas. A continuación, se colocaron las secciones de micelio en el interior de los agujeros realizados previamente en las manzanas, procediéndose a la incubación de las manzanas durante 10 días y a 25° C de temperatura. Al cabo de éste tiempo se midió el diámetro de podredumbre y se estudiaron las características morfológicas (color, aspecto, etc) de las podredumbres producidas en todas las manzanas.

La prueba se realizó con 28 cepas de *P. expansum* resistentes al tiabendazol, 28 cepas de *P. expansum* resistentes al benomilo y 36 cepas de *Penicillium* resistentes al imazalil que fueron identificadas previamente.

Capacidad potencial de producción de patulina

Para la determinación de la capacidad potencial de producción de patulina, se utilizaron las mismas cepas fúngicas de las pruebas anteriores, empleándose la metodología descrita por FILTENBORG y FRISVAD (1980).

Previa a la realización del mencionado método, se procedió a la siembra de las cepas resistentes en placas Petri con medio Glucosa-Extracto de levadura-Agar (GYA), incubándose durante 10 días a 25° C de temperatura. Posteriormente, con un sacabocados de 3.5 mm de diámetro interior, en condiciones asépticas, se practicó una incisión en el medio GYA con el moho crecido. Estos discos se depositaban sobre una cromatoplaca de sílica gel 60 G/UV254, realizando una ligera presión y retirando el disco a continuación, después de haberse impregnado la placa con el medio que contendrá posiblemente la patulina que habrá sido excretada en el mismo. En la cromatoplaca se aplicaba también el patrón de patulina.

Por último, se colocaba la cromatoplaca en una cubeta que, como fase móvil contenía cloroformo: acetona (9:1) y para confirmar los resultados se repetía el procedimiento usando el TEF (tolueno, acetato de etilo, ácido fórmico (5:4:1)) como fase móvil. A continuación, las placas se revelaban pulverizándolas con una solución del 0, 5% de MBTH (3-metilbenzotiazol -2-hidrazonhidroclorida). Finalmente se observaban las manchas cromatográficas bajo luz ultravioleta de longitud de onda de 360 nm, determinándose por comparación con el patrón de patulina las cepas que presentaban la capacidad de producir patulina.

Resultados

Estudio de la micoflora resistente al tiabendazol

El total de cepas resistentes al tiabendazol fue de 8192, de las cuales el 97.1% fueron identificadas como *Penicillium,* el 2.3% como *Alternaria* y el 0.6% pertenecientes a otros géneros *(Cladosposium, Rhizopus, Mucor, Trichoderma).*

El conjunto de las 7956 cepas de *Penicillium* resistentes al tiabendazol fueron aisladas en un 66.8% de las muestras procedentes de la contaminación fúngica ambiental, el 28.6% de la contaminación fúngica de la fruta y el 4.3% de la contaminación de la superficie de los embalajes.

En lo que concierne a la distribución de las cepas de *Penicillium* resistentes al tiabendazol aisladas de la contaminación fúngica ambiental y superficie de la fruta se ha observado que proceden en su gran mayoría del interior de las cámaras estudiadas, mientras que las cepas resistentes aisladas de la superficie de los embalajes se distribuyen en similares porcentajes entre las diferentes zonas estudiadas. (Tabla 2).

En el ambiente del 56.5% de las cámaras y en el 52.2% de las zonas de recepción estudiadas se han detectado cepas del género *Penicillium* resistentes al tiabendazol, mientras que las cepas de *Alternaria* resistentes al tiabendazol se presentaron en menor proporción, siendo las zonas de selección manual e interior de las cámaras donde se observaron los más altos porcentajes, 35% y 33% respectivamente (Gráfico 1).

En cuanto a la contaminación fúngica resistente al tiabendazol presente en la superficie de la fruta y embalajes se observa que es el género *Alternaria* el que alcanza una mayor incidencia, con porcentajes del 63.5% en las zonas de selección manual (en fruta) y 66% de las zonas de recepción (en embalajes). Véase gráficos n.º 2 y 3.

Estudio de la micoflora resistente al benomilo

El total de cepas resistentes al benomilo aisladas fue de 5088, de las cuales el 97.1% fueron identificadas como *Penicillium,* el 2% como *Alternaria* y el 0, 9% pertenecían a otros géneros *(Cladosporium, Rhizopus, Mucor, Trichoderma, Aspergillus).*

El conjunto de las 4942 cepas de *Penicillium* resistentes al benomilo fueron aisladas en un 75.8% de las muestras procedentes de la contaminación fúngica ambiental, el 13.2% de la contaminación fúngica de la superficie de la fruta y el 11% de la contaminación de la superficie de los embalajes.

En cuanto a la distribución de las cepas de *Penicillium* resistentes al benomilo de la contaminación fúngica ambiental, superficie de frutas y embalajes se ha observado que procedían en su gran mayoría del interior de las cámaras. Véase tabla 3.

En el ambiente, del 67.5% de las zonas de selección manual y el 65.5% de los pasillos estudiados, se han detectado cepas del género *Penicillium* resistentes al benomilo, mientras que en el interior de las cámaras fue algo inferior (54.5%) (Gráfico 4). Se observa, así mismo, una alta incidencia del género *Penicillium* en la contaminación fúngica de los embalajes de las zonas de recepción y selección manual (75% en ambos casos) (Gráfico 6).

En las cepas del género *Alternaria* resistentes al benomilo, estaban presentes en

CUADRO 1
DISTRIBUCIÓN DE TOMAS DE MUESTRAS POR CENTRAL HORTOFRUTÍCOLA Y CAMPAÑA

Toma de Muestras	Visita 1 (Enero)			Visita 2 (Marzo)			Visita 3 (Mayo)		
	Ambiental	Sup. Fruta	Sup. Embalajes	Ambiental	Sup. Fruta	Sup. Embalajes	Ambiental	Sup. Fruta	Sup. embalajes
Cámara 1	□	•	•	□	•	•	□	•	•
Cámara 2	□	•	•	□	•	•	□	•	•
Cámara 3	□	•	•	□	•	•	□	•	•
S. Manual	□	•	•	□	•	•	□	•	•
Recepcion	□			□			□		
Pasillos	□			□			□		

□ Contaminación determinada con 5 placas Petri
• Contaminación determinada con 5 placas Rodac

CUADRO 2
CONTAMINACIÓN FÚNGICA RESISTENTE AL TIABENDAZOL

	Penicillium		*Alternaria*		Otros géneros	
Zonas estudiadas	n.º cepas	%	n.º cepas	%	n.º cepas	%
AMBIENTAL						
Zona de recepción	61	1,1	17	22,7	8	25,0
Selección manual	90	1,7	16	21,3	8	25,0
Pasillos	1508	28,4	3	4,0	3	9,4
Cámaras	3663	68,8	39	52,0	13	40,6
SUPERFICIE DE FRUTA						
Selección manual	103	4,5	13	15,7	2	20,0
Cámaras	2118	95,5	70	84,3	8	80,0
SUPERFICIE EMBALAJES						
Selección manual	147	43,0	1	3,4	4	57,2
Cámaras	195	57,0	28	96,6	3	42,8
TOTAL CEPAS	7956		187		49	

CUADRO 3
CONTAMINACIÓN FÚNGICA RESISTENTE AL BENOMILO

	Penicillium		*Altemaria*		Otros géneros	
Zonas estudiadas	n.º cepas	%	n.º cepas	%	n.º cepas	%
AMBIENTAL						
Zona de recepción	41	1,1	8	16,0	5	25,0
Selección manual	179	4,8	7	14,0	6	30,0
Pasillos	1059	28,3	13	26,0	5	25,0
Cámaras	2467	65,8	22	44,0	4	20,0
SUPERFICIE DE FRUTA						
Selección manual	141	21,6	7	20,0	4	44,5
Cámaras	511	78,4	28	80,0	5	55,5
SUPERFICIE EMBALAJES						
Selección manual	128	23,5	2	10,5	7	53,8
Cámaras	416	76,5	17	89,5	6	46,2
TOTAL CEPAS	4942		104		42	

mayor porcentaje en la contaminación fúngica de la superficie de frutas en el interior de las cámaras estudiadas en un 57% (Véase gráfico nº 5) mientras que las aisladas de la contaminación fúngica de la superficie de la fruta procedían prácticamente en su totalidad del interior de las cámaras (96.2%) (Véase gráfico 7).

Estudio de micoflora resistente al imazalil

El total de cepas aisladas resistentes al imazalil fue de 180, de las cuales el 70% pertenecían al género *Penicillium.* Otros géneros identificados fueron: *Cladosporium* (15.2%), *Alternaria* (7.7%), *Trichoderma* (6%) y *Rhizopus* (1.1%).

Del conjunto de las 126 cepas de *Penicillium* resistentes al imazalil fueron aisladas en un 55% de la contaminación fúngica ambiental y el 42% de la contaminación fúngica de la superficie de la fruta y el 3% de la superficie de embalajes.

En lo que respecta a la distribución de las cepas de *Penicillium* resistentes al imazalil aisladas de la contaminación fúngica ambiental se ha observado que son los pasillos donde se han aislado el más alto porcentaje (60.1%), mientras que las aisladas de la contaminación fúngica de la superficie de la fruta proceden prácticamente en su totalidad del interior de las cámaras (96, 2%) (Gráfico n.º 7).

Identificación de las cepas aisladas de Penicillium

Del conjunto de las 7956 cepas aisladas del género *Penicillium* resistentes al tiabendazol, se identificaron 440 cepas como *P. expansum* por sus características morfológicas, culturales y microscópicas. Esta cantidad representa el 5.5% del total de cepas de *Penicillium* resistentes al tiabendazol aisladas. De éste porcentaje, el 88.5% de las cepas proceden de la contaminación fúngica ambiental, el 6.1% de la contaminación de la superficie del embalaje, y el 5.4% de la superficie de los embalajes.

Del conjunto de las 4942 cepas del género *Penicillium* resistentes al benomilo se identificaron 178 cepas de la especie *P. expansum,* que representa el 3.6% del total de cepas de *Penicillium* resistentes al benomilo. De éste porcentaje, el 54% de las cepas proceden de la contaminación fúngica ambiental, el 3.9% de la contaminación de la superficie de la fruta y el 42% de la superficie de los embalajes. Ninguna de las cepas de *Penicillium* resistentes al imazalil utilizadas en las pruebas de caracterización fueron identificadas como *P. expansum,* Las 36 cepas de *Penicillium* resistentes al imazalil utilizadas en las pruebas de caracterización de cepas, fueron identificadas como *P. cyaneo-fulvum, P. variabile, P. rugulosum, P. minioluteum, P. tardum, P. pinophilum, y Penicillium spp.,* siendo *P. variabile* el que se presenta en mayor porcentaje (33.3%) y el resto de las especies con porcentajes que oscilaban del 8.4 al 2.8%.

Caracterización de las cepas resistentes

En los resultados de las pruebas de resistencia cruzada, se observó que todas las cepas de *P. expansum* ensayadas resistentes al tiabendazol lo eran también al benomilo y viceversa. Así mismo, se observó que el total de cepas de *P. expansum* ensayadas resistentes al tiabendazol y benomilo fueron sensibles al imazalil.

En las pruebas realizadas para determinar la capacidad de producción de podredumbre de las cepas resistentes, éstas manifestaron capacidad para ello. La consistencia, el aspecto y el color de las podredumbres fueron similares a los que originan las cepas de *P. expansum* no resistentes en manzanas. Con respecto a las cepas de *Penicillium spp.* resistentes al imazalil se observó que el 89% de las cepas presentaron capacidad de producir podredumbre, pero siempre de tamaño menor y color más oscuro que las originadas por *P. expansum* en manzanas.

Con respecto a las pruebas realizadas para determinar la capacidad potencial de producir patulina se observó que el 60, 7% de las cepas de *P. expansum* resistentes ensayadas presentaban ésta capacidad. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por SCOTT y BULLERMANN (1975) en sus trabajos, en los que detectaron que el 66.9% de las cepas de *P. expansum* aisladas de la superficie de manzanas presentaban capacidad de producir patulina, mientras que ninguna de las cepas de *Penicillium spp.* resistentes al imazalil presentaron ésta capacidad.

Discusion

La mayoría de las cepas de *Penicillium* resistentes a los fungicidas tiabendazol y benomilo provienen de la contaminación fúngica ambiental, fundamentalmente del interior de las cámaras. Debido a que el benomilo pertenece a la misma familia de fungicidas que el tiabendazol, no resulta extraño la aparición de éste gran número de cepas de *Penicillium* resistentes, aunque en menor número, debido a que el benomilo no está autorizado en post-recolección de peras y manzanas en España.

La totalidad de cepas de *P. expansum* ensayadas resistentes al tiabendazol y benomilo son sensibles al imazalil y presentan también capacidad de producir podredumbre, por lo que el desarrollo de la resistencia a los fungicidas empleados, no ha afectado a esta capacidad, confirmándose la gravedad que supone la existencia de estos tipos de cepas en el proceso de conservación de la fruta.

Las cepas de *Penicillium* resistentes al imazalil no pertenecen a la especie *P. expansum,* pero la mayoría de ellas pueden producir podredumbre, aunque de menor tamaño, en igualdad de condiciones de incubación a las de esta última especie.

El 60.7% de las cepas de *P. expansum* resistentes al tiabendazol tienen capacidad de producir patulina, por lo que las cepas resistentes que permanezcan en el fruto cuando éste sea triturado para la obtención de zumo, podrán producir patulina si las condiciones de cultivo son idóneas.

Conclusiones

Se demuestra que en las centrales hay una elevada tasa de contaminación por parte de cepas de *Penicillium* resistentes al tiabendazol y al benomilo y que algunas de estas cepas pertenecen a la especie *P. expansum,* principal hongo causal de podredumbres. Así mismo se observa que estas cepas han sido aisladas, en su mayoría, de la contaminación fúngica ambiental del interior de las cámaras frigoríficas.

Otro hecho preocupante es que se han aislado cepas de *Penicillium* resistentes al imazalil, con capacidad de producir podredumbre en manzanas. Esta materia activa es hasta el momento la más efectiva en el control de *P. expansum,* ya que ninguna de las cepas resistentes aisladas pertenece a

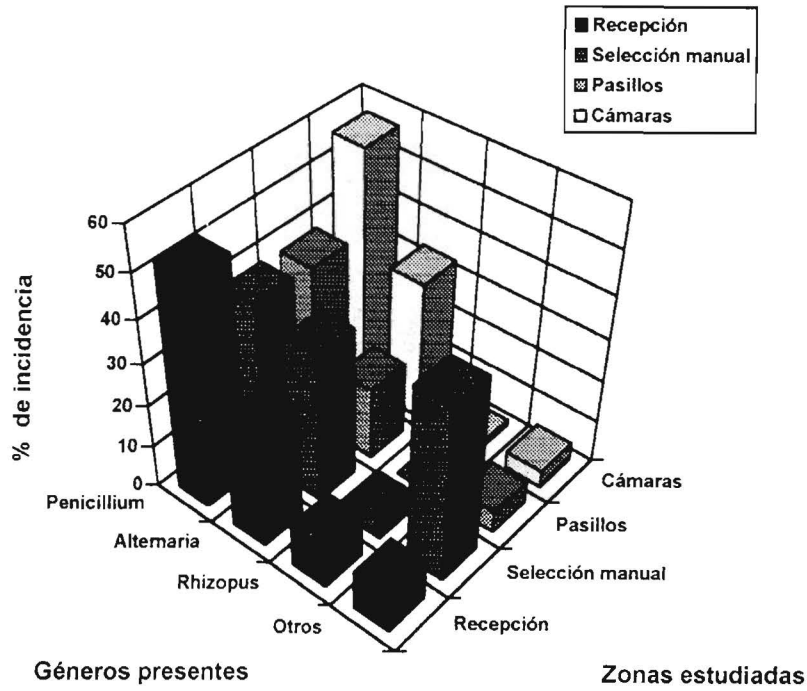


Fig. 1. Incidencia de la contaminación fúngica ambiental resistente al Tiabendazol.

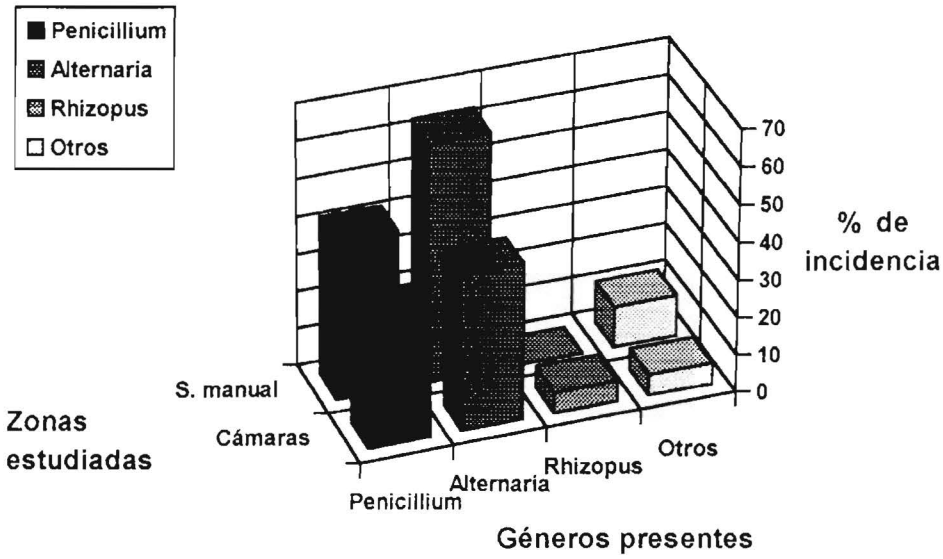


Fig. 2. Incidencia de la contaminación fúngica de la superficie de la fruta resistente al Tiabendazol.

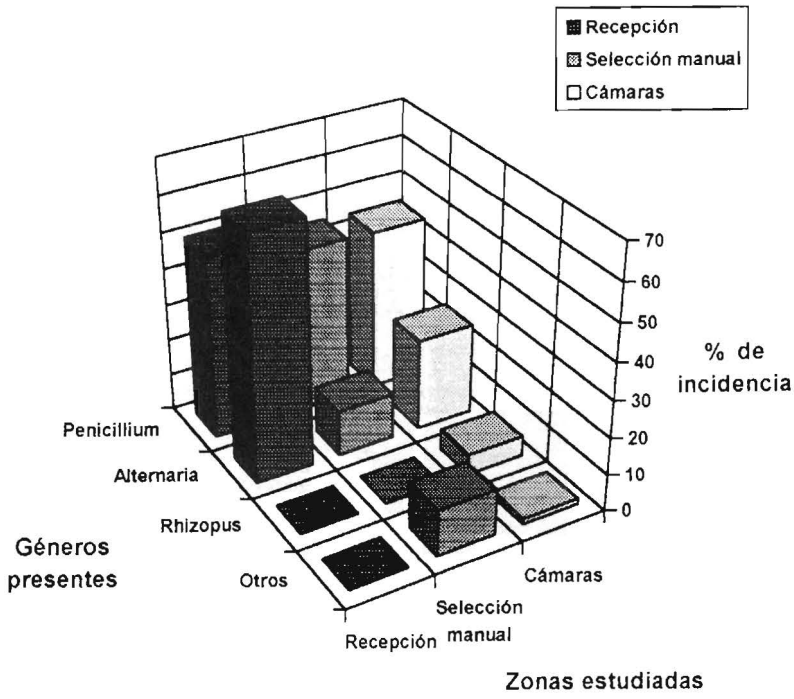


Fig. 3. Incidencia de la contaminación fúngica de la superficie de los embalajes resistentes al Tiabendazol.

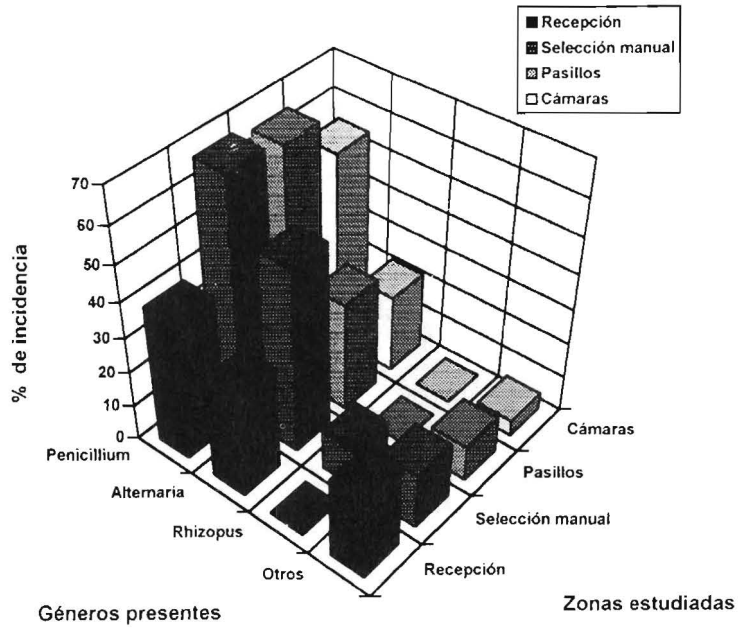


Fig. 4. Incidencia de la contaminación fúngica ambiental resistente al Benomilo.

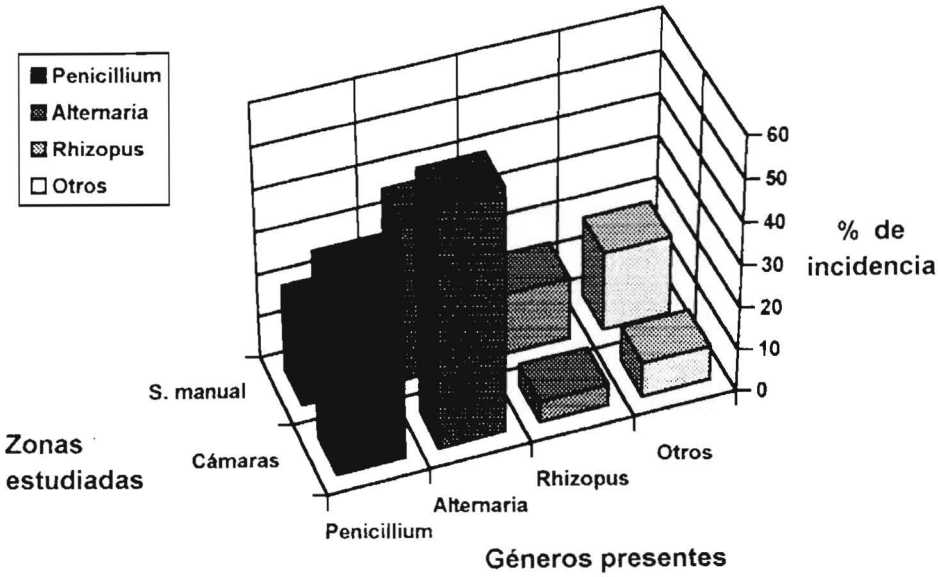


Fig. 5. Incidencia de la contaminación fúngica de la superficie de la fruta resistente al Benomilo.

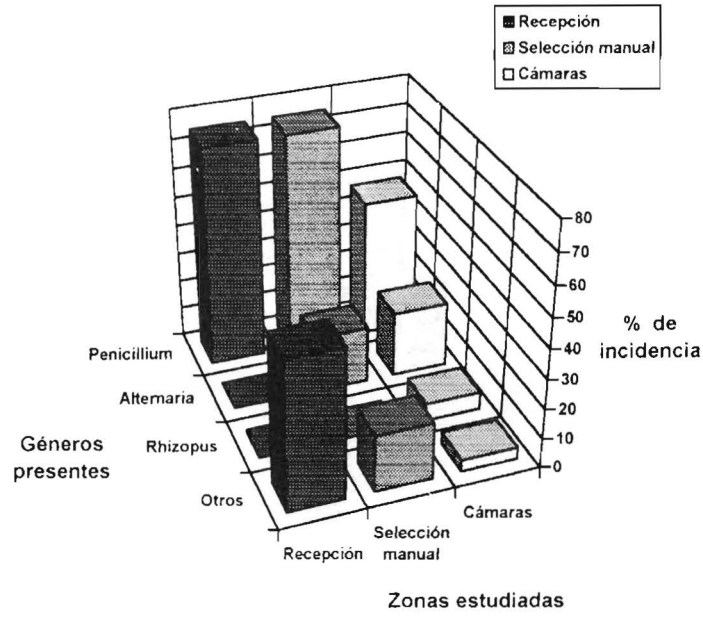


Fig. 6. Incidencia de la contaminación fúngica de la superficie de los embalajes resistente al Benomilo.

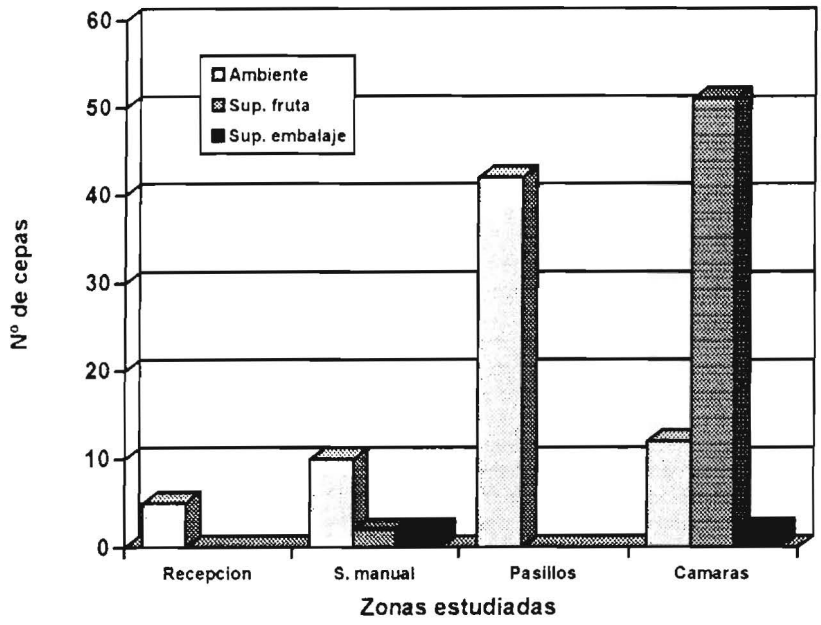


Fig. 7. Distribución de la contaminación fúngica resistente al imazalil.

esta especie. No se ha apreciado la aparición de resistencias múltiples en las cepas de *P. expansum* resistentes al tiabendazol y benomilo frente al imazalil, de diferente modo de acción.

Una última conclusión que se puede obtener de este estudio es que se debe controlar el proceso de producción de zumo de manzana y especialmente la calidad de la fruta utilizada, para evitar problemas de presencia de toxinas, especialmente de la patulina.

Bibliografía

ANDERSON H.W., 1956. Diseases of fruit crops. Mc-Graw Hill Book Co. Inc. (New York).

BARNETT H.L., HUNTER B.B., 1973. Illustrated genera of imperfecti fungy. Burgess Publishing Company.

BEATTLE B.B., OUTHERD N.L., 1970. Benzimidazole derivates as postharvest fungicides to control rotting of pears, cherries and apricots. Austral. J. Exp. Agr. Anim. Husb., 10, 654-656.

BEN-ARIE R., 1975. Benzimidazole penetration, distribution and persistence in postharvest treated pears. Phytopathology, 1187-1189.

BEN-ARIE R., GUELFAT- REICH S., 1973. Preharvest and postharvest applications of benzimidazoles for control of storage decay in pears. Hort. Science, 8, 181 -183.

BERTRAND P.F., SAULIE J.L., 1978. The occurrence of Benomyl-tolerant strains of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in the mild- Columbia region of Oregon and Washington. Plant. Dis. Rep., 62, 302-305.

BUCHENAUER H., 1977. Mechanism of action of the fungicide imazalil in Ustilage avenae. Zeitsch fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 84, 440-450.

BURTON C.L., DEWEY D.H., 1981. New fungicides to control benomyl-resistant *Penicillium expansum* in apples. Plant Disease, 65, 881-883.

DAVE B., SALES M., WALIA M., 1989. Resistance of diferent strains of *Penicillium digitatum* to imazalil

treatment in California citrus packinghouses. Proc. Fla. State Hortic. Soc. , 102, 178-179.

DAVIDSE L.C., 1973. Antimitotic activity of methyl benzimidazol-2-carbonate (MBC) in *Aspergillus nidulans*. Pest. Biochem. Physiol., 3, 317-325.

DE WAARD M.A., GROENEWEG H., VAN NISTELROOY J.G.M., 1982. Laboratory resistance to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in *Penicillium italicum*. Neth. J. Plant Pathol., 88, 99-112.

ECKERT J.W., 1978. Control of postharvest diseases. In: Antifugal compounds Vol 1. Siegel M.R., Sisler H.D. eds. Marcel Dekker Inc. (New York), 269-352.

ECKERT J.W., 1987. *Penicillium digitatum* biotypes with reduced sensivity to imazalil (Abstr.) Phytopathology, 77, 1728.

ECKERT J.W., BRETSCHNEIDER B.F., RATNAYAKE M., 1981. Investigations on new postharvest fungicides for citrus fruits in California. Proc. Int. Soc. Citric., 2, 804-810.

ELLIS M.B., 1971. Dematiaceus Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew. Surrey, 608 pp.

ELLIS M.B., 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth mycological Institute. Kew. Surrey, 507 pp.

FILTEMBORG O., FRISVAD J.C., 1980. A simple screening method for toxicogenic moulds in pure cultures. Lebensm. Wiss. Technol., 13, 128-130.

KATO T., 1986. Sterol biosynthesis in fungi, a target for broad spectrum fungicides. In: Hang, G. and Hoffman H. eds., Chemistry of Plant Protection. Vol 1 Springer-Verlag, Berlín, 1-24.

KERKENAAR A., BARUG D., 1984. Fluorescence microscope studies of *Ustilage maydis and Penicillium italicum* after treatment with imazalil of fenpropimorph. Pesticide Science, 15, 199-205.

KERKENAAR A., JANSSEN G.G., COSTET M.F., 1986. Special effects of imazalil on sterol biosynthesis of *Penicillium italicum*. In: Sixth International Congress of Pesticide Chemistry., IUPAC, Ottawa, Canada., Abstract 3C-02.

KOFFMANN W.L., PENROSE A.R., MENZIES K.C., KALDOR J., 1978. Control of benzimidazole tolerant *Penicillium expansum* in pome fruit. Scientia Hortic., 9, 31-39.

KOLLER W., SCHEINPFLUG H., 1987. Fungal resistance to sterol byosinthesis inhibitors. A new challenge. Plant Disease, 71, 1066-1074.

LAVILLE, E., 1973. Études des activités du R23979 et de ses sels sur les pourritures a *Penicillium (P. digitatum, P. italicum)* des oranges. Fruits, 28, 545-547.

MOREAU C..1957. Pourritures des fruits et conditions d'entreposage. Fruits, 12 (4-5), 177.

PALAZÓN I., RODRÍGUEZ C., 1977. Las podredumbres de la fruta conservada en cámara frigorífica. Cuaderno INIA n.º 5, 1-92.

PRATELLA G.C., 1960. La micoflora delle cellee frigorofrigorière. Frutticultura, 22(2), 12.

PRUSKY D., BAZAK M., BEN-ARIE R., 1980a. Tolerance of *Penicillium expansum* in Israel to postharvest fungicide treatments. Proc. 5th Congr. Union Phytopathol. Mediter., 1, 158-159.

PRUSKY D., BAZAK M., BEN-ARIE R., 1980b. Development, persistence, survival and strategies for control of thiabendazole-resistant strains of *Penicillium expansum* of pome fruits. Phytopathology, 75, 877-882.

PRUSKY D., BEN-ARIE R., 1983. Tolerance of *Penicillium expansum* to postharvest benzimidazole treatments (Abstr.) 4th Proc. Int. Congr. of Plant Pathology. Melbourne. Australia, 427.

PRUSKY D., BEN-ARIE R., 1985. Effect of imazalil on the pathogenicity of *Penicillium crustosum* causing storage rots of pome fruits. Plant Disease, 69, 416-418.

RAPER K.B., THOM C., 1949. A manual of the Penicillia. The Williams and Wilkins (Baltimore).

ROSENBERG D.A., MEYER F.W., 1979. Benomyl-tolerant *Penicillium expansum* in apple packinghouses in eastern New York. Plant. Dis. Rep., 63, 37-40.

SCOTT W.T., BULLERMANN L.B., 1975. Microbiological assay of patulin, using *Bacillus meqaterium*. J.A.O.A.C., 58, 497- 499.

SIEGEL M.R., RAGSDALE N., 1978. Antifungal mode of action of imazalil. Pest. Biochem. Physiol., 9, 48-56.

TUSET J.J., PIQUER J., GARCÍA J., MARTÍNEZ J.M., ROCA M., 1981. Activity of imidazole fungicides to control postharvest citrus decay. Proc. Int. Soc. Citric., 2, 784-787.

VANDEN BOSSCHE H., LAUWERS W., WILLEMSENS G., MARICHAL P., CORNELISSEN F., COOLS W., 1984. Molecular for the antimycotic and antibacterial activity on N-substitued imizadoles and triazoles: the inhibition of isoprenoid biosynthesis. Pesticide Science, 15, 188-198.

VIÑAS I., VENDRELL M., SANCHIS V., 1989. Antifungal treatment resistant *Penicillium expansum* in pome fruits: Mycological and toxicological study. Microbiologie-Aliments-Nutrition, 7, 93-100.

WICKS T., 1977. Tolerance to benzimidazole fungicides in blue molf *(Penicillium expansum)* on pears. Plant. Dis. Reptr., 61, 447-449.

(Aceptado para publicación el 12 de julio de 1994).