

INFECCIONES TEMPRANAS DE *Botrytis cinerea* Y *Alternaria* spp. Y SU RELACIÓN CON PUDRICIONES DE POSTCOSECHA EN PERA D'ANJOU

EARLY INFECTIONS BY *Botrytis cinerea* AND *Alternaria* spp. AND THEIR RELATIONSHIP WITH POSTHARVEST ROT IN D'ANJOU PEAR

Carla Nahir Basso^{1a,2}, María Cristina Sosa^{1b*,2} y María Cecilia Lutz^{1c,2}

^{1a} Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Ruta 151 Km 12,5 Cinco Saltos, Río Negro, Argentina

^{1b} Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Ruta 151 Km 12,5 Cinco Saltos, Río Negro, Argentina
<https://orcid.org/0000-0002-5569-6696>

^{1c} Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Ruta 151 Km 12,5 Cinco Saltos, Río Negro, Argentina
<https://orcid.org/0000-0002-6515-7768>

² Instituto de Biotecnología Agropecuaria, Centro de Investigaciones de Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue (CITAAC) Conicet-UNCo. Ruta 151 Km 12,5 Cinco Saltos, Río Negro, Argentina

* Autor para correspondencia: mcristasosa10@gmail.com

RESUMEN

Las podredumbres en postcosecha por heridas en frutos han sido ampliamente estudiadas, pero existe escasa información sobre aquellas producidas por infecciones latentes. *Botrytis cinerea* y *Alternaria* spp. producen infecciones en etapas tempranas del desarrollo de pera cv. "d'Anjou", ocasionando importantes pérdidas en el Alto Valle de Río Negro, Argentina. Los objetivos de la investigación incluyeron la evaluación de la susceptibilidad de los órganos florales/frutos a infecciones producidas por la inoculación artificial (ILA) de *B. cinerea* y *A. alternata*, la evaluación de la ocurrencia natural de infecciones fúngicas latentes (ILN) durante el desarrollo y crecimiento del fruto, y el estudio de la relación entre infecciones latentes tempranas (por *B. cinerea* y *A. alternata*) y la incidencia de pudriciones y mohos en el cáliz y pedúnculo del fruto, y las características fisiológicas del fruto durante la conservación frigorífica. El estudio se realizó en un monte comercial de pera cv. "d'Anjou" en las temporadas 2018/19 y 2019/20. Se evaluó la ocurrencia de ILN por ambos patógenos en plena flor (PF), caída de pétalos (CP), 30 días de plena flor (DPF), 60 DPF y 120 DPF (pre-cosecha), y la susceptibilidad de los diferentes órganos desde PF a 60 DPF. La frecuencia de ILN y ILA se determinó por disección y aislamiento *in vitro*. Las condiciones de la fruta, incidencia de mohos y podredumbres, e ILN se estudiaron hasta 120 días de conservación y 7 días en anaquel. A pesar de la variabilidad entre temporadas, se presentaron infecciones por los hongos estudiados en PF y CP, siendo severas en cáliz y pedúnculo 60 y 120 DPF. En postcosecha, las ILN fueron altas. Sin embargo, las podredumbres calicinales por *B. cinerea* no superaron el 2,5% en la temporada con precipitaciones y alta HR durante la primavera. Además, hubo 0,5% de podredumbres por *Alternaria*

en fruta y un incremento significativo del moho en pedúnculo desde los 90 días de conservación. En este momento, se observó una reducción significativa del contenido relativo de agua y la firmeza de los frutos.

Palabras clave: infecciones latentes, patógenos de postcosecha, *Pyrus communis*, podredumbres calicinales y pedunculares, moho gris, podredumbres por *Alternaria*.

ABSTRACT

Postharvest rot of fruit due to injury has been extensively studied, but there is scarce information about rot caused by latent infections. *Botrytis cinerea* and *Alternaria* spp. produce infections at early stages of fruit development of pear cv. 'd'Anjou', causing significant losses in the Alto Valle de Río Negro, Argentina. Research objectives have included evaluation of the susceptibility of floral organs/fruits to infections produced by the artificial inoculation (ALI) of *B. cinerea* and *A. alternata*, evaluation of the occurrence of natural latent fungal infections (NLI) during fruit development and growth, and study of the relationship between early latent infections by *B. cinerea* and *Alternaria* spp. on the incidence of rot and mold in the fruit calyx and stem, and the physiological characteristics of the fruit during cold storage. The study was conducted in a commercial 'd'Anjou' pear orchard during the 2018/19 and 2019/20 seasons. The occurrence of NLI was determined at full blossom (FB), petal fall (PF), 30 days after full blossom (DFB), 60 DFB and 120 DFB (pre-harvest), while susceptibility of the different organs was evaluated from FB to 60 DFB. Frequency of NLI and ALI was determined by dissection and in vitro isolation. The postharvest physiological conditions of the fruit, incidence of NLI, and incidence of mold and rot were studied up to 120 days of cold storage and after 7 days of shelf life. Despite the variability between seasons, fungal infections occurred at FB and PF, being severe in the calyx and stem at 60 and 120 DFB. NLI had a high incidence at postharvest. However, calix-end rot by *B. cinerea* did not exceed 2.5% in the season with precipitations and high RH during spring. In addition, *Alternaria* rot reached 0.5%, while stem mold increased significantly after 90 days of cold storage. At this moment, fruit significantly reduced its relative water content and firmness.

Keywords: postharvest pathogens, *Pyrus communis*, calix-end and stem-end rots, grey mold, *Alternaria* rot, latent infections.

INTRODUCCIÓN

Argentina ocupa el tercer lugar en el mundo en la producción de pera (*Pyrus communis* L.) con un volumen de producción de 595.427 toneladas de fruta que se concentra en aproximadamente 26.000 hectáreas en los valles de Río Negro y Neuquén, Patagonia Norte (FAOstat 2021). La variedad de pera "d'Anjou", tercera en importancia regional, se destina principalmente a la exportación en contra-estación a mercados altamente competitivos y exigentes en calidad e inocuidad de los alimentos.

Las peras son productos altamente perecederos, especialmente en la fase de postcosecha y durante la maduración, etapa en que se producen pérdidas por podredumbres causadas por patógenos fúngicos. El moho gris causado por *Botrytis cinerea* presenta un alto impacto económico en la producción mundial con pérdidas anuales que fluctúan entre 10 y 100 billones de dólares (Boddy, 2016; Abbey et al., 2018), afectando entre 20 y 60% de los productos almacenados, según los países de los cuales se trate (Sardella et al., 2016; Sutton et al., 2014; Spadaro et al., 2020). En la última década, en la

Patagonia Norte, *B. cinerea* seguido por *Alternaria alternata* constituyen un componente importante de las pérdidas de fruta de exportación durante la postcosecha y la comercialización. Estas pérdidas se deben al desarrollo de podredumbres y a la reducción en la calidad estética y comercial de la fruta, por presencia de mohos de cáliz y pedúnculo (Sosa et al., 2016 a y b; Lutz et al., 2017). Las podredumbres postcosecha por *B. cinerea* se vinculan a infecciones en heridas, y a la activación de infecciones latentes del cáliz y pedúnculo de la fruta (Lennox et al., 2004; Tian, 2007; Sutton et al., 2014). En Chile, en peras "Packhams" se han reportado pérdidas de postcosecha de alrededor del 10% por la ocurrencia de infecciones latentes calicinales en fruto (Bustamante Álvarez, 2015). En California, en peras "Bartlett" se han reportado pérdidas en frutos maduros por *B. cinerea* asociadas a cáliz, cuando las piezas florales afectadas quedaron retenidas en el fruto (Sommer et al., 1985). En peras "d'Anjou", las podredumbres de la base de cáliz originadas desde infecciones en la floración han sido reportadas en California (Elmer y Michailides, 2007), Washington (Xiao y Boal, 2004) y en Sudáfrica (Lennox et al., 2004).

Mientras que las infecciones previas a la cosecha se correlacionan con los niveles de moho gris en el extremo del pedúnculo de pera "d'Anjou" almacenada (Lennox y Spotts, 2004). En fruta almacenada en cámaras frigoríficas de la región Patagonia Norte, se ha incrementado la incidencia de podredumbres calicinales por *B. cinerea* que provienen de infecciones latentes a cosecha (Sosa et al., 2016 a).

Las podredumbres en pera por *Alternaria* frecuentemente se desarrollan en almacenamiento, desde infecciones latentes que ocurren en el huerto (Li et al., 2007). La podredumbre peduncular por *Alternaria* spp., *Penicillium* spp. y eventualmente por *B. cinerea* en peras, ha sido motivo de rechazo de fruta sudafricana exportada (Witbooi et al., 2011). En nuestra región, *Alternaria* sp. presenta una creciente importancia como responsable de podredumbres postcosecha en pera "Bosc" (Lutz et al., 2017) y como moho en extremo de pedúnculo y cáliz de pera "William's", "Packham's" y "d'Anjou", que afectan la calidad y la comercialización en mercados exigentes (Sosa et al., 2016 b).

Mundialmente, existe amplia bibliografía sobre la epidemiología de los patógenos de herida que afectan peras y manzanas, tales como *Penicillium expansum* y *B. cinerea*. Mientras, resulta limitado el conocimiento sobre la ocurrencia y epidemiología de las enfermedades postcosecha causadas por patógenos que ocasionan podredumbres durante la conservación, a partir de infecciones latentes (Wenneker y Thomma, 2020). En el mismo sentido, en nuestra región, la pera cosechada a madurez óptima recibe tratamientos con fungicidas en la línea de procesamiento de las plantas de empaque para controlar *P. expansum* y *B. cinerea*, causales de podredumbres asociadas a heridas. Este manejo tradicional no considera la ocurrencia de infecciones fúngicas latentes, a pesar de que las podredumbres desde el extremo del pedúnculo y la base del cáliz del fruto son un componente importante de las pérdidas económicas. Más aún, las infecciones secundarias por *B. cinerea* en almacenamiento, se originan principalmente desde infecciones primarias de cáliz y pedúnculo que resultan en nidos de fruta afectada incrementando las podredumbres. Resulta fundamental poder establecer pautas de manejo conociendo el momento oportuno de intervención para disminuir las pérdidas por podredumbres postcosecha del sector productor-empacador. En este estudio en pera "d'Anjou", se propuso (i) evaluar la susceptibilidad de los órganos florales/frutos a infecciones producidas por la inoculación artificial de *B. cinerea* y *A. alternata*, (ii) estudiar la ocurrencia natural de infecciones latentes por hongos durante la

formación y crecimiento del fruto, y, (iii) estudiar la relación entre las infecciones latentes tempranas por *B. cinerea* y *Alternaria* spp., sobre la incidencia de podredumbres y mohos en cáliz y pedúnculo de fruta, y las características fisiológicas de la fruta durante la conservación frigorífica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Huerto utilizado en el estudio

Durante las temporadas 2018 a 2020, los estudios se realizaron en una plantación comercial de pera variedad "d'Anjou", situado en proximidad a la localidad de Cipolletti (38° 57' 36.2" S - 67° 57' 42.7" W), Río Negro, Patagonia Norte, Argentina. El huerto injertado sobre pie franco, de 14 años de edad presentaba un marco de plantación de 2 x 4 m y 40 árboles por fila. Las prácticas de manejo convencional del cultivo estuvieron a cargo del productor. Los estudios del momento de ocurrencia de infecciones latentes y de susceptibilidad mediante inoculaciones con los principales hongos patógenos, se realizaron en plantas distribuidas en tres filas.

Hongos patógenos

Aislados virulentos de *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea* de la Colección del Laboratorio de Fitopatología, Instituto de Biotecnología Agropecuaria del Comahue; CITAAC - UNCo obtenidos de peras con podredumbre calicinal se usaron en los ensayos de inoculación artificial en condiciones de campo. La virulencia de los aislados fúngicos se mantuvo por inoculaciones periódicas en fruta de pera, seguidas por re-aislamiento y re-almacenamiento en la colección de cultivos. Brevemente, para la producción de inóculo desde los cultivos conservados en glicerol 20% -20 °C, se tomaron alícuotas de 10 µL que fueron transferidas a placas de Petri con agar papa dextrosa (APD), las que se incubaron a 22 ± 2 °C. Los conidios fueron obtenidos desde colonias de 7 días de edad crecidas bajo fotoperíodo de 12:12 h (luz:oscuridad). Las suspensiones conidiales de *B. cinerea* y *A. alternata* se obtuvieron por raspado de la superficie de la colonia con bisturí estéril, re-suspendido en agua destilada estéril (ADE) y posterior filtrado con gasa estéril para la remoción del micelio fúngico. La concentración de conidios se estableció por conteo en cámara de Neubauer y cada suspensión se ajustó a 10³ conidios mL⁻¹ ADE.

Susceptibilidad a infecciones artificiales a campo en estadios tempranos del desarrollo del fruto

La ocurrencia de IL tempranas en flores y frutos se estudió a campo por inoculaciones artificiales

de los dos hongos de importancia: *B. cinerea* y *A. alternata*. Los momentos estudiados fueron: plena flor (PF) (75% de flores abiertas); caída de pétalos (CP); 30 días después de plena flor (DPF) (período de división celular del fruto) y 60 DPF (período de elongación celular) (Fig. 1). Para ello, una suspensión de 10^3 conidios mL^{-1} de *B. cinerea* y *A. alternata* se asperjó sobre 5 ramilletes de flores/frutos por planta, de 5 plantas por fila y de 4 filas. ADE se utilizó como testigo. En cada momento, la inoculación se realizó por aspersión (3 pulsos, 200 μL vol/ pulso) tanto en la zona peduncular como calicinal. Inmediatamente, cada uno de los ramilletes de flores/frutos se cubrió con un algodón húmedo estéril y se colocó una bolsa de polietileno precintada para proteger de otras infecciones fúngicas y generar las condiciones ambientales óptimas para la infección. Luego de 30 días de incubación, se retiraron las bolsas y se recolectaron todas las muestras que se llevaron refrigeradas al laboratorio. La detección de las infecciones se llevó a cabo a través de la técnica de disección de flores/frutos ($n=50$) y aislamiento en placas de Petri, siguiendo la metodología adaptada de Kock y Holz (1992). En PF y CP, cada flor ($n=50$) se diseccionó en receptáculo (gineceo), estambres / sépalos y pedicelo. En los estadios fenológicos siguientes, el fruto ($n=50$) se diseccionó en restos florales (sépalos y estambres), base de cáliz y pedúnculo. Las piezas se desinfectaron superficialmente por inmersión secuencial durante 1 min en alcohol etílico (70% V/V), 1min en hipoclorito de sodio (5%, V/V) y 1 min en ADE, y posterior secado en papel estéril. Las piezas vegetales se sembraron en placas de Petri con agar papa dextrosa acidificado (APD-A, ácido láctico, 20 μL , 25% V/V), e incubaron en con fotoperíodo de 12:12 h (luz:oscuridad) a 22 ± 2 °C. A las 96 h se realizó el reconocimiento y el conteo de las colonias fúngicas correspondientes a *B. cinerea* y *Alternaria* spp. por pieza vegetal. A

cada una de las colonias obtenidas, se les realizó la caracterización macro-morfológica (color de las colonias, aspecto, presencia de estructuras reproductivas) y micro-morfológica (tamaño y forma de conidióforos y conidios), con la finalidad de validar su identidad (Barnett y Hunter, 1998; Fillingner y Elad, 2016).

Ocurrencia natural de infecciones latentes durante la floración y el desarrollo del fruto

Durante las temporadas productivas 2018/19 y 2019/20, se estudió desde floración a cosecha la susceptibilidad a infecciones latentes naturales (ILN). Los momentos estudiados correspondieron a los estadios fenológicos: plena flor (PF) (75% de flores abiertas); caída de pétalos (CP); 30 días después de plena flor (DPF) (período de división celular del fruto); 60 DPF (período de elongación celular); y 120 DPF (7 d antes de cosecha - DAC) (Calvo et al., 2020) (Fig. 1).

La incidencia de infecciones latentes naturales (ILN) se determinó utilizando la técnica de disección y aislamiento adaptada de Kock y Holz (1992), descrita en el experimento anterior. Para ello, se muestrearon 5 ramilletes florales o frutos en cada momento (Fig. 1) desde 10 plantas, los que se transportaron en bolsas de polietileno refrigeradas al laboratorio. En PF y CP, la flor central de cada ramillete ($n=50$) se diseccionó en pétalos, estambres y sépalos; mientras en los momentos restantes, el fruto ($n=50$): en restos florales (sépalos y estambres), base de cáliz y pedúnculo. Las piezas vegetales se desinfectaron superficialmente, se sembraron en placas con APD-A, e incubaron a 22 ± 2 °C con fotoperíodo de 12:12 h (luz:oscuridad). A las 96 h se realizó el reconocimiento de las colonias fúngicas correspondientes a *Botrytis cinerea* y *Alternaria* spp. y el conteo por pieza vegetal. A cada una de las colonias obtenidas, se les realizó la caracterización macro-morfológica y micro-



Fig. 1. Estadios fenológicos en pera en los que se tomaron las muestras para los estudios. PF: plena floración, CP: caída de pétalos, 30, 60 y 120 DPD: días después de plena flor.

Fig. 1. Phenological stages of pears in which samples were obtained. PF: full bloom; CP: petal fall; 30, 60 and 120 DPF: days after full bloom.

morfológica descrita en el apartado anterior, con la finalidad de validar su identidad (Barnett y Hunter, 1998; Fillinger y Elad, 2016).

Registros climáticos

Las condiciones ambientales de humedad, temperatura y precipitaciones fueron tomadas para los años de evaluación de los ensayos desde la Estación Agrometeorológica de INTA (<http://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/met/clima.htm>).

Evaluación postcosecha de la fruta

Al momento de madurez comercial de la variedad, se colectaron manualmente 250 frutos por árbol, de calibre homogéneo y sin daños, de 5 árboles al azar ($n=250$, $r=5$). La fruta fue colocada en bandejas dentro de bolsas de polietileno perforadas en cajas de cartón y estas almacenadas en cámara de frío convencional a $-0,5 \pm 0,5$ °C, 99% HR durante 120 días desde la cosecha.

Durante la conservación frigorífica, se evaluaron: (i) las condiciones fisiológicas de la fruta, (ii) la incidencia de infecciones latentes naturales y (iii) la incidencia de podredumbres causadas por *B. cinerea* y *Alternaria* sp. y de mohos por *Alternaria/Cladosporium*. Los momentos de evaluación durante la conservación fueron: 60 días después de cosecha (DC), 90 días DC, 120 días DC y madurez de comercialización (MAD, 7 días a 20°C, condiciones de anaquel).

Las condiciones fisiológicas se determinaron en muestras de frutos sin síntomas ($n=20$) en cada momento de evaluación. En laboratorio, se midieron el contenido de azúcares (sólidos solubles SS, ° Brix) por refractometría (Numak modelo ZGRB-32 ATC) y la firmeza (lb cm^{-2}) con penetrómetro digital (Wagner instruments, serie Fruit Tester FT327). En la temporada 2018/19, a muestras compuestas de discos de tejido se les midió el contenido relativo de agua (CRA) en piel y en pulpa, según la metodología de Savage y Cavender-Bares (2011).

La detección de infecciones latentes naturales (ILN) se realizó en frutos asintomáticos ($n=50$, 5 por caja). En la postcosecha de la temporada 2018/2019 se utilizó la técnica de disección de pedúnculos (extremo y base) y cáliz (sépalos y base) de fruto, desinfección superficial y siembra en placas con APD-A. Luego de 96 h de incubación a 22 ± 2 °C, se registraron las colonias fúngicas por patógeno y fruta. En la postcosecha de la temporada 2019/2020, se utilizó la técnica ONFIT (overnight freezing incubation technique), modificada de Michailides et al. (2010). Luego de 72 h de incubación a 22 ± 2 °C, se registraron las colonias fúngicas por patógeno y fruta.

La incidencia de podredumbres por *B. cinerea*

y *Alternaria* spp. y de mohos por *Alternaria-Cladosporium* asociados a cáliz y pedúnculo de la fruta, se determinó visualmente en la fruta almacenada ($n=100$, 10 cajas). Muestras de fruta representativas fueron llevadas a laboratorio para el aislamiento de hongos patógenos.

A cada una de las colonias fúngicas obtenidas de los diferentes experimentos, se les realizó la caracterización macro-morfológica y micro-morfológica descrita previamente, con la finalidad de validar su identidad (Barnett y Hunter, 1998; Fillinger y Elad, 2016).

Análisis estadístico

En los ensayos de detección de ocurrencia natural de infecciones latentes (ILN) y de infecciones artificiales (IA), para cada momento de estudio, se realizó el conteo por género de hongo patógeno y pieza diseccionada, y se calculó la frecuencia de aparición (%). En cada caso, se compararon las frecuencias medias con desviación estándar de forma gráfica, por momento, patógeno y pieza vegetal. En la evaluación de postcosecha, se calculó el porcentaje de incidencia de mohos y podredumbres como $I (\%) = 100 * (n^\circ \text{ frutos enfermos} / n^\circ \text{ frutos totales})$. Los datos de las variables fisiológicas de la fruta se sometieron al análisis de varianza, previa comprobación de la normalidad y homogeneidad de los datos. La separación de medias se realizó a través del test Tukey, con 0,05 de significancia. Con los resultados de la combinación de ensayos se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con un agrupamiento por jerarquía (clusters) en el mapa de factores de componentes principales CP. Se utilizó el programa de estadística R commander, plug-in Factor Miner y NMBU (R Core Team, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Susceptibilidad a infecciones artificiales a campo en estadios tempranos del desarrollo del fruto

La susceptibilidad del cv. d' Anjou a infecciones artificiales de los patógenos más importantes se pudo estudiar por inoculaciones artificiales a campo, con posterior recuperación de los hongos. *Alternaria* spp. fue el hongo con la mayor frecuencia de recuperación, tanto en los órganos inoculados con el patógeno *Alternaria alternata*, como en el testigo (agua). En PF y CP, *Alternaria* spp. se recuperó en más del 60% de las piezas (Fig. 2 A). *Alternaria* no se identificó a nivel de especie y cepa en la recuperación de la infección, lo que explica que no se detecten diferencias en las frecuencias del hongo entre el testigo sin inocular y las flores inoculadas. Asimismo, la

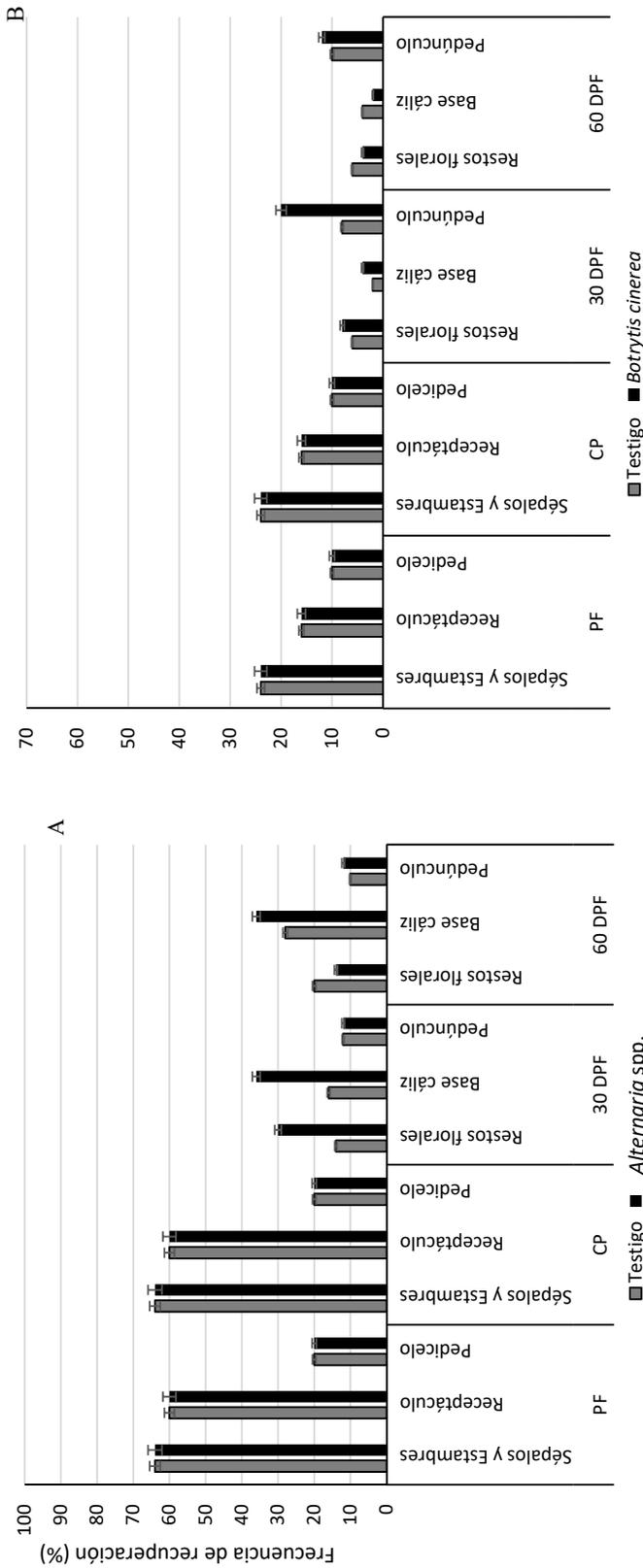


Fig. 2. Frecuencia de recuperación de *Alternaria* spp. y *B. cinerea* desde órganos florales y de frutos inoculados artificialmente con *Alternaria alternata* (A) y *Botrytis cinerea* (B) en pera 'd'Anjou'. La inoculación se realizó con suspensión conidial (10^3 conidios mL⁻¹) y agua (testigo) por pulverización manual en diferentes momentos fenológicos. PF: plena floración, CP: caída de pétalos, 30 y 60 DPF: días después de plena floración. Frecuencia de recuperación de cada hongo desde los órganos evaluados (n=50) por momento mediante disección y aislamiento en APD-A.

Fig. 2. Frequency of recovery from floral and fruit organs after artificial inoculation by *Alternaria alternata* (A) and *Botrytis cinerea* (B) in pear cv. 'd'Anjou'. Inoculation was carried out with conidial suspension (10^3 conidia mL⁻¹) and water (control) by manual spraying at different phenological stages: PF: full blossom; CP: petal fall; 30 and 60 DPF: days after full bloom. Recovery frequency of each fungus from the evaluated organs (n=50) per stage by dissection and isolation in APD-A.

alta tasa de recuperación del hongo demuestra que *Alternaria* spp. es un hongo que está presente en la microbiota fúngica de las flores. A los 30 DPF y 60 DPF, la infección por *Alternaria* spp. de restos florales se redujo a la mitad, mientras se observó un porcentaje mayor de recuperación en la base de cáliz, que fue hasta un 44% más alto que el testigo (Fig. 2 A). En relación a *B. cinerea*, alcanzó una recuperación ligeramente superior al 20% en sépalos y estambres y al 15% en receptáculo floral a PF y CP. En general, no hubo diferencias entre las flores/frutos inoculados y sin inocular en la recuperación de *B. cinerea*, lo cual indica la existencia de infecciones previas al momento en que se realizó la inoculación y una baja tasa de infección de los conidios inoculados. A 30 DPF se obtuvo el valor máximo de frecuencia de recuperación desde infecciones en pedúnculos inoculados (Fig. 2 B). La frecuencia de recuperación de *B. cinerea* en piezas florales y base de cáliz del fruto fue menor a lo esperado. Lennox y Spotts, (2004) demostraron que los cálices fueron susceptibles a la infección inmediatamente después de plena floración, sin embargo, estos investigadores con la inoculación de los cálices, no obtuvieron niveles más altos de moho gris en la base del cáliz del fruto de pera "d'Anjou" en almacenamiento. Probablemente, la coexistencia de *B. cinerea* con otros microorganismos, tales como la misma *Alternaria* spp., y también con hongos de otros géneros como *Cladosporium* spp., levaduras y bacterias, podría ser la responsable de la baja frecuencia de recuperación de *B. cinerea*, ya que éste es altamente susceptible a la competencia. En este sentido, Elad y Stewart (2007), indican que, sobre la superficie de la planta, los conidios y los tubos germinativos de *B. cinerea* son sensibles al efecto de antibióticos y enzimas líticas producidas por otros microorganismos.

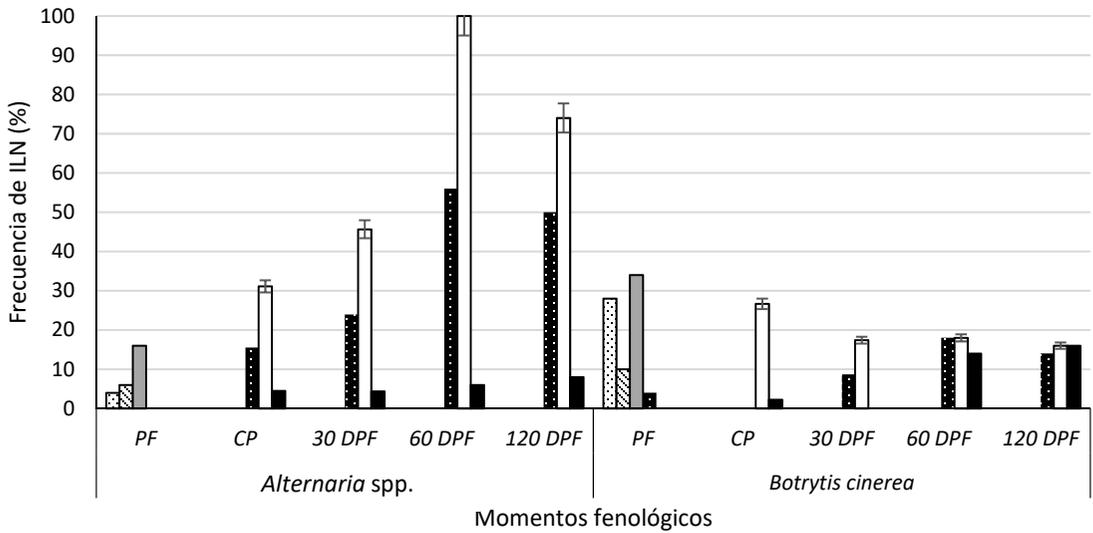
Ocurrencia natural de infecciones latentes durante la floración y el desarrollo del fruto

En este estudio realizado en una plantación comercial de pera "d'Anjou", se pudieron establecer desde la floración y hasta la cosecha, los momentos críticos para la ocurrencia de infecciones naturales por *B. cinerea* y *Alternaria* spp. Se observó la ocurrencia de ILN de manera temprana desde plena floración. En 2018/19, la sumatoria de las frecuencias de ILN por *B. cinerea* en las piezas diseccionadas fue mayor en PF (pétalos 28% y sépalos 34%) (Fig. 3 A). A CP se observó que la frecuencia de este patógeno en los restos florales fue similar a la de pétalos en PF y que la misma disminuyó durante los siguientes estadios fenológicos. A partir de 30 DPF, desde la base del cáliz, contiguo a los restos florales, se

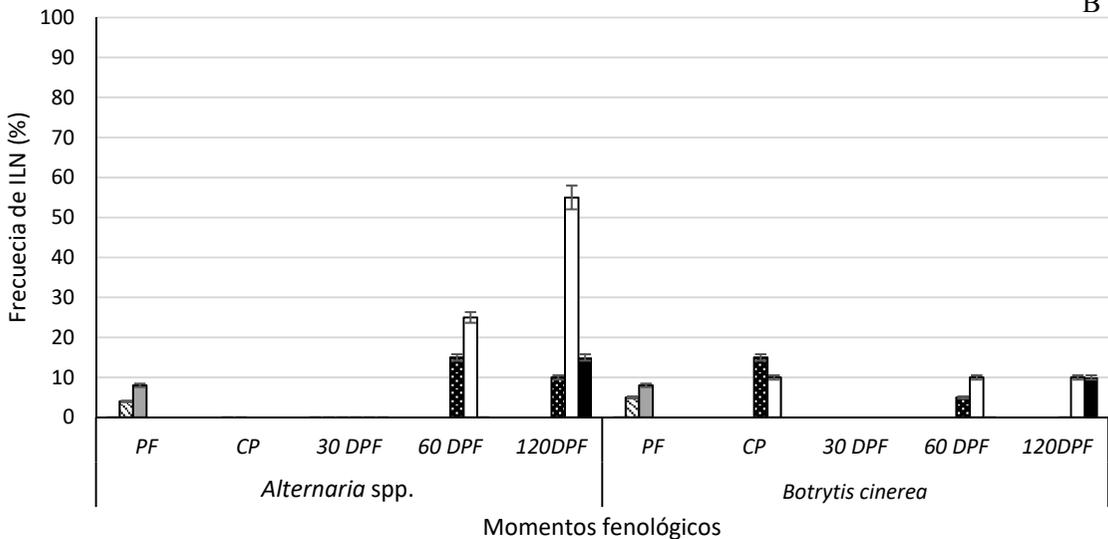
comenzó a detectar la presencia del patógeno, con un máximo de frecuencia de aislamiento a los 60 DPF, momento que corresponde al inicio de crecimiento de fruto, y en que se detectó además, en pedúnculo (Fig. 3 A). Estas frecuencias se mantuvieron a 120 DPF (7 d antes de cosecha). En 2019/20, *B. cinerea* presentó desde PF una frecuencia de alrededor del 10% en sépalos y estambres, que se mantiene en los estadios fenológicos siguientes en los restos florales de la fruta. En la base del cáliz, la mayor frecuencia de *B. cinerea* se detecta a CP, y en pedúnculo se detecta a 120 DPF (7 d antes de cosecha) (Fig. 3 B). *B. cinerea* es un hongo necrótrofo, capaz de sobrevivir como saprófito en restos de tejidos vegetales muertos a los cuales coloniza. Esto podría sugerir el avance de las infecciones causadas por conidios en los restos florales adheridos al cáliz, hacia el interior del receptáculo del fruto. Uno de los momentos críticos de detección de IL por *B. cinerea* en cáliz coincide con los resultados de un estudio en pera "Packham's" realizado en Chile, en el que se reporta que el mayor %IL fue a 60 DPF, inicio de crecimiento de frutos (Bustamante Álvarez, 2015). Nuestros resultados en pera "d'Anjou" confirman lo expresado por Elmer y Michailides (2007), quienes sostienen que las infecciones calicinales se producirían a través de las estructuras florales senescentes en el desarrollo del fruto en el campo. Las diferencias en las frecuencias obtenidas cada año, particularmente en el cáliz, podrían atribuirse a diferencias en las condiciones ambientales, con escasas precipitaciones en la temporada 2019/20 (Fig. 4). En estudios regionales en Chile, Pinilla y Álvarez (2001) indican que en años con primaveras y veranos húmedos y lluviosos existe una mayor presión del patógeno, especialmente en floración, con una mayor incidencia de podredumbres calicinales por *B. cinerea*. Por su parte, Spotts et al. (2009) han reportado que la susceptibilidad de la fruta a *B. cinerea* varía entre los años, en función de las fluctuaciones de humedad y temperatura estacional. Otros investigadores han reportado para cultivos de carozo y vid que las condiciones ambientales durante la floración afectaron la incidencia de podredumbres postcosecha, por los niveles elevados de infecciones latentes que se producen (Michailides et al., 2010; Fillinger y Elad, 2016). En cuanto a las infecciones pedunculares, por la morfología característica del cv d'Anjou, el patógeno ingresa por el extremo distal del pedúnculo corto, grueso y carnoso, lo que explica la mayor susceptibilidad antes de cosecha a las infecciones (Xiao, 2006).

Las condiciones ambientales durante la estación de crecimiento 2018/19 fueron conducentes para las infecciones en el huerto

A



B



□ PÉTALOS ▨ ESTAMBRES ■ SÉPALOS ▩ BASE DE CÁLIZ □ RESTOS FLORALES ■ PEDÚNCULO

Fig. 3. Frecuencia porcentual de infecciones latentes naturales por patógenos en las diferentes piezas diseccionadas durante diferentes estadios fenológicos en pera "d'Anjou". A. Temporada productiva 2018-2019 B. B. Temporada productiva 2019-2020. PF: plena floración; CP: caída de pétalos; DPF: días desde plena flor; ILN: infecciones latentes naturales. Barras indican el desvío estándar porcentual.

Fig. 3. Frequency of natural latent infections (%) by pathogens in pieces dissected during different phenological stages of pear cv. 'd'Anjou'. A. Season 2018-2019 B. B. Season 2019-2020. PF: full blossom; CP: petal fall; DPF: days from full blossom; ILN: natural latent infections. Bars indicate the standard deviation.

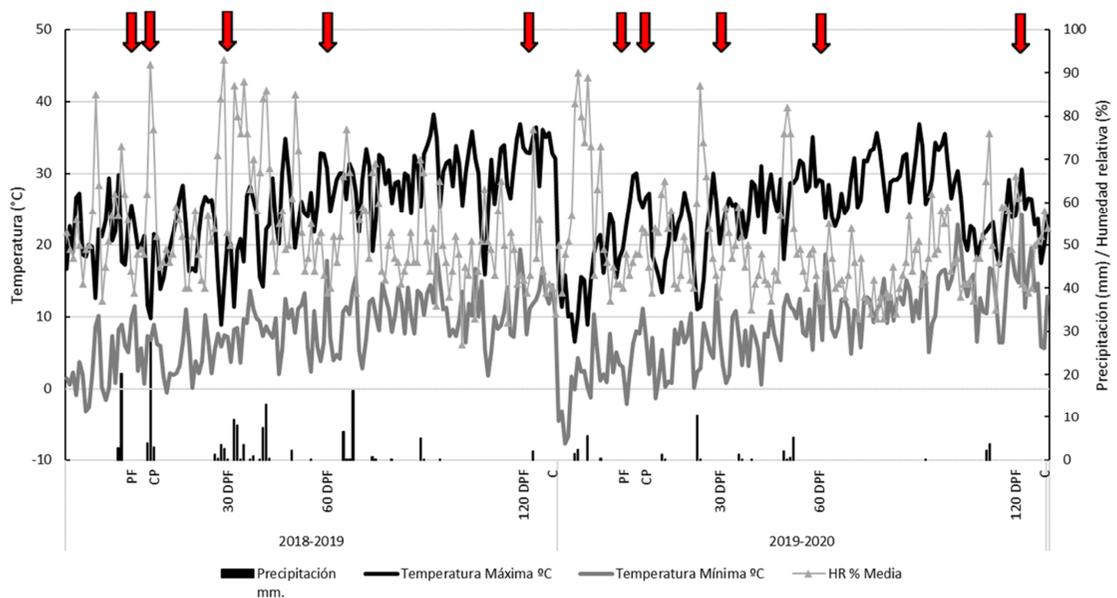


Fig. 4. Principales variables meteorológicas durante las temporadas 2018/19 y 2019/20. Datos tomados desde la Estación meteorológica de Guerrico, Alto Valle de Río Negro (<http://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/met/clima.htm>). Las flechas rojas indican los momentos de muestreo.

Fig. 4. Main meteorological variables during the 2018/19 and 2019/20 seasons. Data were taken from the Guerrico Meteorological Station, Alto Valle, Río Negro (<http://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/met/clima.htm>). Red arrows indicate the sampling stage.

frutal, y pudieron favorecer la germinación de los conidios de *B. cinerea* y *Alternaria* spp. (Fig. 4). Además de la temperatura y precipitaciones ocurridas, la duración de la humedad relativa (HR) elevada son factores que afectan la infección de la fruta. La HR promedio fue superior al 50%, alcanzando entre 81-86% HR máxima promedio, con temperaturas medias entre 13 y 20 ° C (Fig. 4). Las precipitaciones que ocurrieron durante 5 días continuos en septiembre coincidieron con la floración y cuaje del fruto, y durante 12 días en octubre, con el estadio de crecimiento de fruta (30 DPF).

Respecto a las ILN por *Alternaria* spp., alcanzaron en la temporada 2018/19 un 100% de frecuencia de aislamiento a los 60 DPF en restos florales y se presentaron en estas piezas durante todos los estadios evaluados (Figs. 3 A y B). Al igual que lo observado con *B. cinerea*, a la presencia de *Alternaria* spp. en los restos florales, le siguió una incidencia creciente en la base de cáliz del fruto. Si bien en ambas temporadas, el máximo valor de frecuencia de este hongo fue a los 60 días DPF, durante 2018/19 hubo alrededor de 73% más de ILN por *Alternaria* spp., que en 2019/20. Por otro lado, *A. alternata* en pedúnculo tuvo el mismo comportamiento que *B. cinerea*,

con mayor infección a 120 DPF (7 d antes de cosecha) con frecuencias que variaron entre 10% (2018/19) y 15% (2019/20). Durante la temporada 2019/20, si bien las precipitaciones fueron escasas, hubo máximos de HR superiores al 80%, previo a los momentos de muestreo (Fig. 4), condiciones que habrían favorecido las infecciones por *Alternaria* spp.. Las especies de *Alternaria* pueden sobrevivir en condiciones extremas; sin embargo, la HR y la temperatura son condicionantes para la germinación y la infección de los conidios (Harteveld et al., 2014; Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernández, 2014). Prusky et al. (2002) reportaron que las infecciones quiescentes por *Alternaria* en mango fueron altamente dependientes de la cantidad de horas con humedad relativa superior al 80%.

Los resultados obtenidos en este estudio son coincidentes con los reportados para pera "Packham's" en que *Alternaria* alcanzó una incidencia a los 60 DPF de 75% en sépalos y 65% en base de cáliz (Sosa et al., 2016). En el mismo sentido, Lee et al. (2006) reportaron que, en los primeros estadios de desarrollo de pera asiática, los discos de piel del cáliz tuvieron un 34 % de infección por *A. alternata*, mientras que a cosecha fue mayor la infección de pedúnculo.

Esto podría deberse a la posición del fruto con el cáliz hacia arriba, la que favorece el depósito y la germinación de los conidios en coincidencia con condiciones ambientales predisponentes, y hacia cosecha, con la lignificación del pedúnculo que lo hace más susceptible a infecciones de hongos oportunistas necrótrofos.

Con el objetivo de integrar los resultados de la ocurrencia natural de infecciones latentes y la frecuencia de recuperación a inoculaciones artificiales de *B. cinerea* y *Alternaria* spp., desde floración hasta precosecha, se realizó un análisis

de agrupamiento jerárquico en el mapa de componentes principales (Fig. 5), donde la suma de componentes explica el 92,5% de la variabilidad. El análisis de las variables obtenidas para *B. cinerea* y *Alternaria* spp. permitió reconocer 3 grupos con los momentos: plena flor (PF) y caída de pétalos (CP) (Grupo I); 60 y 120 DPF (Grupo II) y 30 DPF (Grupo III). El grupo I se caracterizó por los mayores valores de recuperación de ambos patógenos (mayor susceptibilidad), y mayor IL de *B. cinerea* en restos florales. El grupo II mostró los valores más altos de IL de *Alternaria* spp. en

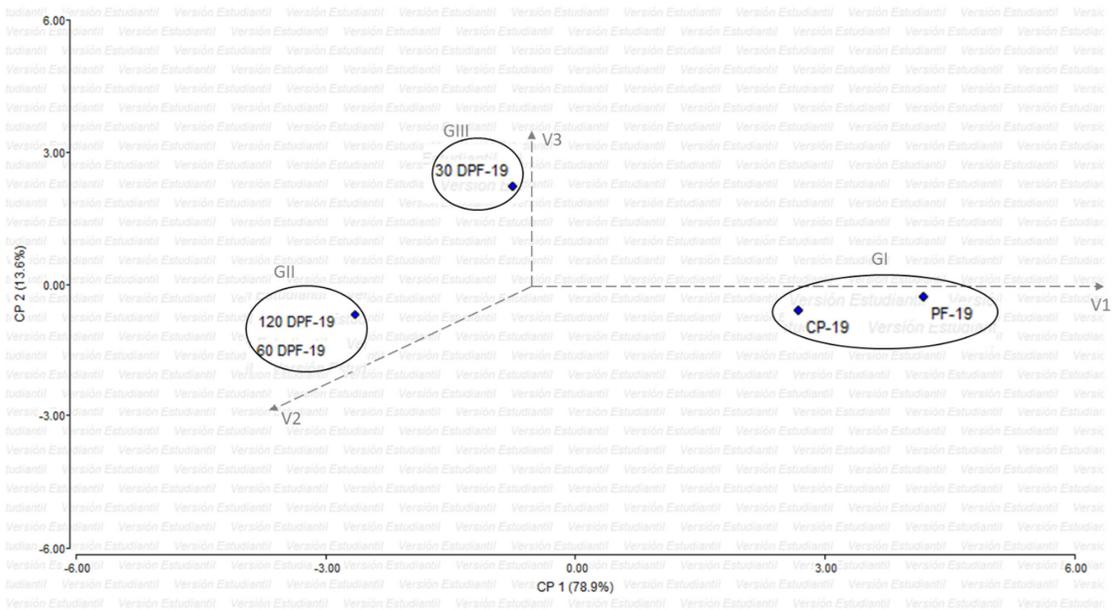


Fig. 5. Análisis de componentes principales para los estadios fenológicos estudiados durante la temporada 2018/2019. El eje X representa el componente 1 (CP1), el eje Y representa el componente 2 (CP2). Círculos indican los 3 grupos de momentos obtenidos en análisis de conglomerados, con corte a una distancia euclídea 3,04. Los vectores graficados indican el gradiente positivo para variables agrupadas: V1, Frecuencia de recuperación (FR) de *B. cinerea* en restos florales, FR *B. cinerea* en base de cáliz/receptáculo, FR *Alternaria* spp. en restos florales, FR *Alternaria* spp. en base de cáliz/receptáculo, FR *Alternaria* spp. en pedúnculo, infecciones latentes (IL) *B. cinerea* en restos florales; V2, IL *Alternaria* spp. en restos florales, IL *Alternaria* spp. en base de cáliz, IL *Alternaria* spp. en pedúnculo, IL *B. cinerea* en base de cáliz, IL *B. cinerea* en pedúnculo; V3, FR *B. cinerea* en pedúnculo. PF: plena flor, CP: caída de pétalos, DPF: días después de floración.

Fig. 5. Analysis of principal components for the studied phenological stages during the 2018/2019 season. Circles indicate the 3 groups of stages obtained in cluster analysis, cut at a Euclidean distance 3.04. Vectors indicate the positive gradient for the variables: V1, recovery frequency (RF) *B. cinerea* from floral remains, RF *B. cinerea* from base of calyx/receptacle, RF *Alternaria* spp. from floral remains, RF *Alternaria* spp. from calyx/receptacle, RF *Alternaria* spp. from stem, IL *B. cinerea* from floral remains; V2, IL *Alternaria* spp. from floral remains, IL *Alternaria* spp. from calyx base, IL *Alternaria* spp. from stem, IL *B. cinerea* from calyx base, IL *B. cinerea* from stem; V3, RF *B. cinerea* from stem. PF: full blossom, CP: petal fall, DPF: days after full blossom. FR *B. cinerea* from stem. PF: full blossom, CP: petal fall, DPF: days after full blossom.

todas las piezas y de *B. cinerea* en base de cáliz y pedúnculo. Finalmente, el grupo III, presentó la mayor FR de *B. cinerea* desde pedúnculo, y presencia de ambos patógenos en las demás piezas diseccionadas. Bustamante Álvarez (2015), en una región de Chile, detectó los mismos momentos críticos que el grupo II (inicio de crecimiento de fruto -60 DPF- y cerca de cosecha -120 DPF-) para las infecciones por *B. cinerea* de cáliz en pera "Packham's". Asimismo, Lennox y Spotts (2004) con inoculaciones en crecimiento de fruto de pera "d'Anjou" y cerca de cosecha, tuvieron mayores %I en fruta, que en relación con la floración.

Caracterización postcosecha de fruta

Las IL que ocurren durante la floración o mientras el fruto está en crecimiento, se reactivan a medida que avanza la maduración de la fruta. En pera, al igual que en manzana, frutilla, vid, frambuesa y palta, entre otros cultivos, como resultado de estas infecciones se producen importantes pérdidas económicas de postcosecha (Elmer y Michailides, 2007; Michailides et al., 2010; Sanzani et al., 2012; Fillingier y Elad, 2016).

Las características fisiológicas de la fruta a lo largo del período de conservación se presentan en la Tabla 1. En general se observa que a medida que pasa el tiempo, disminuye el contenido relativo de agua (tanto de la piel como de la pulpa de los frutos) y la firmeza.

En la mayoría de la fruta inmadura y en los pedúnculos, los mecanismos que limitan la agresión del patógeno se asocian a sustancias antimicrobianas, fitoalexinas, enzimas o estructuras físicamente resistentes. Si bien existe una amplia variedad de explicaciones de cómo se producen las infecciones latentes, la mayoría coincide que el ataque del patógeno comienza cuando se producen cambios físicos y fisiológicos en la pared celular del hospedante, en el equilibrio

dinámico del metabolismo climatérico y en el patógeno (Alkan y Fortes, 2015; Galsurker et al., 2018). En el proceso de maduración de los frutos, se produce una alteración del turgor celular y de la estructura de la pared celular, por los procesos metabólicos que esta implica, ocasionando un ablandamiento de los mismos. Es así que la firmeza de los frutos, es una de las principales variables relacionadas con la susceptibilidad al ataque de patógenos oportunistas que están asociados a la pérdida de integridad de la pared celular (Giovannoni, 2004; Seymour et al., 2013; Dos Santos et al., 2015).

La detección de las infecciones latentes en la fruta almacenada durante la postcosecha fue realizada por dos técnicas diferentes: disección y aislamiento en APD-A en la primera temporada (2019) y ONFIT, en la segunda (2020). Las técnicas usadas fueron evaluadas previamente para la detección de ILN en pera durante la postcosecha con resultados similares (datos no mostrados). Los valores de ILN de nuestros experimentos están referidos a una muestra pequeña (n=50) de fruta aún asintomática durante la postcosecha, y se encuentran por encima de los porcentajes de incidencia de podredumbres observada (n= 1000 frutos) durante y al final de la conservación. Sin embargo, el uso de estas técnicas para la detección de ILN por parte de los empacadores, podría ser una herramienta útil para establecer el riesgo potencial de pérdidas por podredumbres de fruta (calicinales/pedunculares) durante la mediana y larga conservación y la comercialización.

Las ILN obtenidas de fruta almacenada durante dos temporadas se muestran como frecuencia de cada patógeno en la Tabla 2, junto a los %I de podredumbres; mientras que, en la Tabla 3 se presenta %I de moho en cáliz y pedúnculo de los frutos. Las podredumbres por *B. cinerea* fueron más frecuentes que por *Alternaria* spp., sin embargo, se observó variabilidad entre

Tabla 1. Características fisiológicas de pera "d'Anjou" a lo largo de la conservación frigorífica y en condiciones de anaquel.

Table 1. Physiological characteristics of pear cv. 'd'Anjou' during cold storage and shelf life.

Momento de evaluación	CRA ³ / piel	CRA ⁴ /pulpa	Sólidos Solubles ⁵	Firmeza (libras cm ⁻²)
60 DC ¹	83,07 c	85,24 b	13,16 a	14,53 c
90 DC	79,51 b	83,18 b	14,06 a	9,00 b
120 DC	78,07 b	82,61 b	13,84 a	8,65 b
MAD ²	75,13 a	79,46 a	13,92 a	6,13 a

¹. DC: después de cosecha. ². MAD: condiciones de anaquel, 7 días a 20 °C. ³. CRA: contenido relativo de agua. ⁴. Promedio de 5 discos por fruto de muestra compuesta de 5 frutos.

⁵. Promedio de 5 repeticiones. Promedios seguidos de letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas según la prueba HSD de Tukey (p <0,05).

Tabla 2. Porcentajes (%) de podredumbres e infecciones latentes en pera "d'Anjou" durante la conservación frigorífica y luego de 7 días de anaquel.

Table 2. Percentages of latent infections and fungal decay in pear cv. 'd'Anjou' during cold storage and after 7 days of shelf life.

Patógeno	Momento (DC) ¹	2018/19						2019/20					
		Infecciones Latentes (%) ²			Podredumbres (%) ³			Infecciones Latentes (%) ⁴			Podredumbres (%) ³		
		Cáliz	Extremo	Pedúnculo	Cáliz	Cáliz	Pedúnculo	Cáliz	Pedúnculo	Lenticelas	Cáliz	Pedúnculo	
<i>Alternaria</i> spp.	Cosecha	-	-	-	-	-	-	30,0	9,0	-	-	-	-
	60	53,3	0,0	40,0	13,3	0,0	0,0	44,0	40,0	0,0	0,0	0,3	0,0
	90	40,0	20,0	10,0	0,0	0,0	0,0	36,0	36,0	4,0	0,3	0,3	0,0
	120	70,0	20,0	30,0	20,0	0,0	0,0	64,0	16,0	4,0	0,3	0,3	0,0
	+7DA ¹	50,0	12,0	4,0	0,0	0,0	0,0	44,0	12,0	4,0	0,5	0,0	0,0
<i>B. cinerea</i>	Cosecha	-	-	-	-	-	-	7,0	25,0	-	-	-	-
	60	0,0	0,0	6,7	6,7	0,1	0,0	16,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
	90	20,0	20,0	30,0	30,0	1,4	0,1	28,0	36,0	4,0	0,3	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	10,0	20,0	1,6	0,1	28,0	32,0	32,0	0,3	0,2	0,2
	+7DA	0,0	40,0	8,0	0,0	2,4	0,1	28,0	64,0	32,0	0,3	1,2	1,2

¹. DC: días después de cosecha. DA: días a temperatura ambiente, condiciones de anaquel. ² Diseción y aislamiento en APD. ³. % I: Porcentaje de incidencia= 100* (número de fruta afectada / número total de fruta). ⁴ ONFIT (overnight freezing-incubation technique).

Tabla 3. Incidencia de mohos en cáliz y pedúnculo de pera “d’Anjou” por *Alternaria* – *Cladosporium* durante la conservación frigorífica.**Table 3. Mold incidence in calix and stem of pear cv. ‘d’Anjou’ by *Alternaria* - *Cladosporium* during cold storage and shelf life.**

Momento (DC) ¹	2018/19		2019/20	
	Cáliz ²	Pedúnculo	Cáliz ²	Pedúnculo
60	0,40	3,70	1,70	9,00
90	1,11	14,22	2,53	14,32
120	2,75	44,63	2,67	25,22
+ 7DA	3,43	49,14	11,29	44,16

¹ DC: días después de cosecha. ² Porcentaje de incidencia de moho (% I = 100* (número de fruta afectada / número total de fruta).

las temporadas. Durante 2018/19 hubo mayor incidencia de podredumbres calicinales por *B. cinerea*, alcanzando el 2,4% I en condiciones de anaquel. Estas podredumbres podrían explicarse por la alta ocurrencia de infecciones latentes detectadas tempranamente en restos florales en PF y CP y en cáliz desde los 30 DPF (Fig. 3 A), producidas por los períodos de lluvia y HR elevada prolongada, que podrían haber favorecido la condensación de agua en dicha zona del fruto y la germinación de conidios e infección de *B. cinerea* (Fig. 4). Mientras en la temporada 2019/20, las podredumbres pedunculares (1,2% I) fueron superiores a las de cáliz, lo que se corresponde con la frecuencia de un 25% de IL detectada en pedúnculos a cosecha (Tabla 2). Este resultado coincidiría con los de Lennox et al. (2004) quienes en pera “d’Anjou” reportan entre 10 a 30% I menos de podredumbre calicinal por *B. cinerea*, que en extremo del pedúnculo. Las podredumbres por *Alternaria* spp. sólo se observaron durante la temporada 2019/20 en cáliz desde 60 DC (0,3% I), con un ligero incremento en las condiciones de anaquel (Tabla 2). Estos valores no se relacionan con la frecuencia de *Alternaria* spp. en incremento desde los 60 DPF y hasta cosecha (Figs. 3 A y B) en restos florales y en cáliz, y de IL en PC que alcanzaron hasta el 64% en cáliz (Tabla 2). Algunos autores han reportado que no existe una relación directa entre el nivel de infección precosecha y la incidencia de moho gris en peras almacenadas en frío (Holz et al., 2007a; Lennox y Spotts, 2004). Resulta interesante el análisis de la incidencia de moho en cáliz y pedúnculo por la presencia del *Alternaria-Cladosporium*, sin desarrollo de podredumbres. La presencia de estos mohos se incrementa a medida que transcurre la conservación, con valores luego de 120 DC en frío y 7 en condiciones de anaquel, de entre el 3 y 11% para cáliz, y entre 44 y 49% para pedúnculo en 2018/19 y 2019/20,

respectivamente (Tabla 3). La alta incidencia de mohos que no comprometen la pulpa del fruto es coincidente con estudios previos en que el complejo *Alternaria-Cladosporium* fue responsable de afecciones “cosméticas” con una incidencia superior al 35% en cáliz y pedúnculo de pera “Packham’s” almacenada (Sosa et al., 2016a). En tal sentido, los altos % I de mohos observados en nuestro estudio y particularmente en pedúnculo coinciden con lo reportado por Sitton y Pierson (1983), quienes demuestran que *Alternaria* en pedúnculo rara vez causa podredumbres en el fruto, y sí representa principalmente un daño cosmético. Galsurker et al. (2018), sostienen que los hongos que causan podredumbre en el extremo del pedúnculo en la fruta penetran por heridas o aberturas naturales durante la floración. Así, *A. alternata* vive endofíticamente, principalmente en floema y xilema, de manera asintomática en el pedúnculo hasta que la fruta madura (Prusky et al., 2013).

Con el objetivo de relacionar los resultados de los diferentes ensayos postcosecha de las dos temporadas (2018/19 y 2019/20), se realizó un análisis de componentes principales (ACP) y conglomerados para todas las variables evaluadas (Fig. 6). La suma de los componentes explica el 62,1% de la variabilidad. Del análisis fue posible identificar 5 grupos (corte a una distancia euclídeana 3.85) con los momentos de muestreo por tener valores similares para las variables. Las variables fisiológicas SS y firmeza/CRA se representan en vectores opuestos. En el grupo I (90 DC-19 y DC-20 y 120DC-20) la fruta presentó valores de IL e IN elevados de *Alternaria* spp. en cáliz, medios IL de *Alternaria* spp. en pedúnculo, altos IL de *B. cinerea* y medios IN en cáliz, medios IN en pedúnculo y IN de moho cáliz y pedúnculo; medios para CRA en piel y pulpa y de firmeza y altos de sólidos solubles. El grupo II (GON-20) presentó valores de IL de *Alternaria*

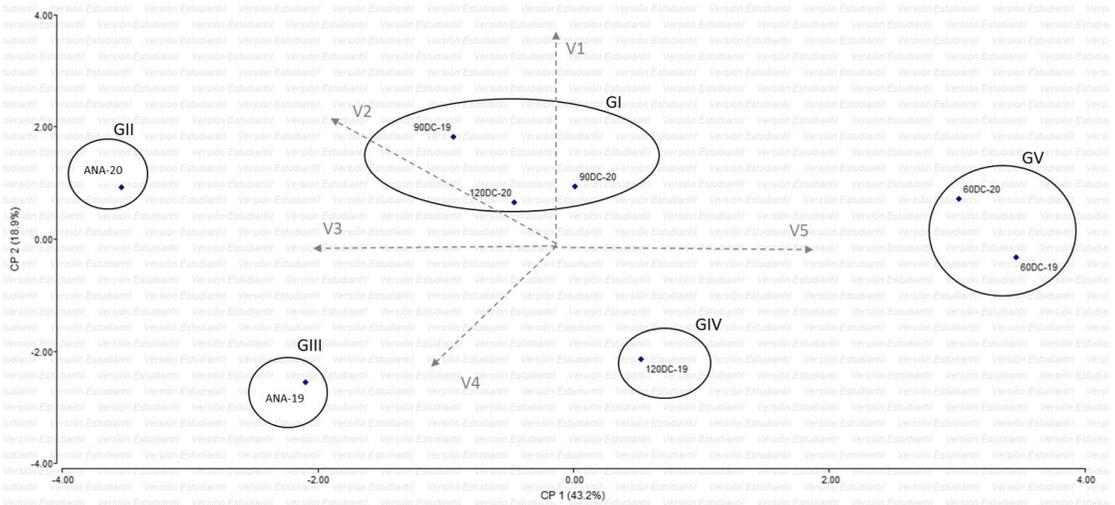


Fig. 6. Análisis de componentes principales para las variables de calidad fisiológica de fruta, incidencia postcosecha de podredumbres e infecciones latentes por *Alternaria* spp. y *Botrytis cinerea* durante la temporada 2019 y 2020. IL: Infecciones latentes; IN: Incidencia de podredumbres y mohos; CRA: contenido relativo de agua; DC: días desde cosecha; ANA: 7 días a temperatura ambiente, anaquel; -19: temporada 2018/2019; -20: temporada 2019/2020. Círculos indican los 5 grupos formados por los momentos agrupados por el análisis de conglomerados, con corte a una distancia euclídeana de 3,85. Flechas indican el gradiente positivo para las variables: V1, IN *Alternaria* spp. en cáliz, IL *B. cinerea* en cáliz; V2, IL *B. cinerea* en pedúnculo, IN *B. cinerea* en pedúnculo, IN *B. cinerea* en cáliz; V3, IN moho en cáliz, Sólidos solubles; V4, IN moho en pedúnculo; V5, IL *Alternaria* spp. en cáliz, IL *Alternaria* spp. en pedúnculo, CRA piel y pulpa, y Firmeza.

Fig. 6. Analysis of principal components for the variables of physiological fruit quality, postharvest incidence of rot and latent infections by *Alternaria* spp and *Botrytis cinerea* during the 2018/2019 and 2019/2020 seasons. IL: latent infections; IN: Incidence of rot and mold; CRA: relative water content; DC: days from harvest; ANA: after 7 days at room temperature, shelf life; -19: 2018/2019 season; -20: 2019/2020 season. Circles indicate the 5 groups formed by the stages grouped by the cluster analysis, with cutoff at a Euclidean distance 3.85. Arrows indicate the positive gradient for the variables: V1, IN *Alternaria* spp. in the calyx, IL *B. cinerea* in the calyx; V2, IL *B. cinerea* on stem, IN *B. cinerea* on stem, IN *B. cinerea* in calyx; V3, IN calyx mold, Soluble solids; V4, IN mold on stem; V5, IL *Alternaria* spp. in calyx, IL *Alternaria* in stem, CRA skin and pulp, and Firmness.

spp. altos en cáliz y medios en pedúnculo, de IL de *B. cinerea* altos en cáliz y de IL e IN en pedúnculo; finalmente, IN altos de moho en cáliz, y medios en pedúnculo. El grupo III (GON-19, condiciones de góndola 2019), presentó fruta con valores altos de IN de *B. cinerea* en cáliz y de moho en pedúnculo, IL bajos de *Alternaria* spp. en cáliz y pedúnculo e IL bajos de *B. cinerea* en cáliz. El grupo II y III presentaron fruta con valores de SS altos y firmeza y CRA bajos en piel y pulpa. El grupo IV (120 DC-19) presentó valores altos de IL de *Alternaria* spp. en cáliz y pedúnculo y medios de *B. cinerea* en pedúnculo, IN altos de moho de pedúnculo e IN bajos de *B. cinerea* en

cáliz; con valores medios de SS y firmeza/CRA. El grupo V (60 DC-19 y DC-20) se caracteriza por fruta con valores altos de IL de *Alternaria* spp. en cáliz y pedúnculo, medios IL de *B. cinerea* en pedúnculo y bajos de IN de *B. cinerea* y de moho en pedúnculo, con elevado CRA (pulpa y piel) y firmeza.

A medida que se incrementa el tiempo de conservación, entre las variables fisiológicas estudiadas, se destaca la disminución en la firmeza de la pulpa, con un incremento en las podredumbres desde los 90 DC y en condiciones de anaquel. Las infecciones fúngicas por algunos patógenos de postcosecha permanecen latentes

durante el crecimiento de la fruta, hasta una fase particular durante la maduración y senescencia de la fruta, en que los patógenos cambian de estilo de vida a necrótrofos y causan podredumbre. Galsurker et al. (2018), encontraron correlación positiva entre la longitud del tiempo de maduración y la severidad de las enfermedades de postcosecha, que incluye la podredumbre de pedúnculo en fruta. Li et al. (2006), encontraron que el proceso infectivo de las hifas latentes de *A. alternata* durante el almacenamiento de pera asiática "Pinguoli" era afectado por las condiciones de almacenamiento, los cambios en la fisiología, la estructura del tejido y los compuestos antifúngicos de defensa de la fruta. Tanto para *A. alternata* como para *B. cinerea*, se ha reportado la capacidad de infección asintomática en floración y fruto inmaduro (de Kock y Combrink, 1994; Lennox y Spotts, 2004; Spotts et al., 2009) y el cambio de estilo de vida a necrótrofo en la fruta madura de diferentes especies vegetales. Elmer y Michailides (2007), en estudios epidemiológicos correlacionan significativamente la colonización por *B. cinerea* de los tejidos florales senescentes en la primavera, con la incidencia y severidad de moho gris a cosecha y durante el almacenamiento. Mientras, *A. alternata* probablemente percibe los cambios durante la maduración de la fruta y responden a ellos por cambios de estilo de vida asintomática quiescente a un estado necrotrófico que causa podredumbre de pedúnculo (Galsulker et al., 2018).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en pera "d'Anjou" indican que existe un porcentaje importante de infecciones latentes de cáliz y pedúnculo de la fruta por *Botrytis cinerea* y *Alternaria* sp. que se originan temprano en el campo. A pesar de la variabilidad observada en las temporadas 2018/19 y 2019/20, en los estadios fenológicos de plena flor y caída de pétalos se presentan infecciones por los hongos estudiados. Sin embargo, en los momentos de inicio de crecimiento de fruto (60 DPF) y antes de cosecha (120 DPF), son mayores las infecciones del cáliz y pedúnculo de la fruta por ambos patógenos. En la fruta en postcosecha, si bien las IL fueron altas en los distintos momentos de evaluación, la incidencia de podredumbres por *Alternaria* spp. y *B. cinerea* fue baja. La podredumbre por *B. cinerea* alcanzó 2,4% en cáliz cuando el año fue lluvioso y húmedo y tuvo infecciones tempranas en flores. Tanto las podredumbres como los mohos tuvieron comercialización (condiciones de anaquel) en correspondencia con una caída en

la firmeza de la pulpa y contenido relativo de agua en piel y pulpa. De acuerdo a los resultados regionales obtenidos, para disminuir las pérdidas comerciales postcosecha por podredumbres / mohos de *B. cinerea* y *Alternaria* sp. en pera "Beurré d'Anjou", se requiere de una estrategia de control eficaz que incluya los momentos de susceptibilidad estudiados y las condiciones ambientales durante la floración y el crecimiento de la fruta.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Comahue (Argentina) que financió la investigación a través del PIA 136. Al Ing. Agr. Hector Arraztoa, de la Empresa Tres Ases por facilitarnos el monte frutal de estudio y al Sr. Pablo Soto por facilitarnos el acceso a la cámara frigorífica.

LITERATURA CITADA

- Abbey, J., D. Percival, L. Abbey, S. Asiedu, B. Prithiviraj, and A. Schilder. 2018. Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*) -prospects and challenges. *Biocontrol Science and Technology* 29 (3): Ss207-228. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1548574>
- Alkan, N., and Fortes A.M. 2015. Insights into molecular and metabolic events associated with fruit response to post-harvest fungal pathogens. *Front. Plant Sci.* 6:889. <https://doi:10.3389/fpls.2015.00889>
- Barnett, H., and B. Hunter. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3° ed. 218 p. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Boddy, L. 2016. *Pathogens of autotrophs*. The Fungi. Academic Press, 245-292.
- Bustamante Álvarez, M. I. 2015. Determinación de la ocurrencia de infecciones por *Botrytis cinerea* Pers. en peras cv. Packham's Triumph post floración. Tesis de Grado Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 33 p. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/148779>
- Calvo, G., A. Colodner, and A. Rodríguez. 2020. Cosecha de peras y manzanas. Temporada 2019-2020 Características y pautas de manejo poscosecha. Octubre 2020, EEA ALTO VALLE INTA, General Roca, RN. https://inta.gob.ar/sites/default/files/cosecha_de_peras_y_manzanas-temporada_2019-2020.pdf

- de Kock, S.L., and G. Holz. 1992. Blossom–end rot of pears: Systemic infection of flowers and immature fruit by *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* 135(4): 317-327. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1992.tb04317.x>
- de Kock, L., and J.C. Combrink. 1994. Blossom-end rot of pears caused by *Botrytis cinerea*. *Acta Hort.* 368, 667-672 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1994.368.79>
- Dos Santos, R.S., Arge, L. W.P., Costa, S.I., Machado, N.D., de Mello-Farias, P.C., Rombaldi, C.V., and A.C. de Oliveira. 2015. Genetic regulation and the impact of omics in fruit ripening. *Plant Omics*, 8(2).
- Elad, Y., and A. Stewart. 2007. Microbial control of *Botrytis* spp. (ch.13, p. 223–236). In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Denle (Eds.). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Elmer, P.A.G., and T. Michailides. 2007. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. (p. 243- 272). In Y. Elad, Williamson B., Tudzynski P and N. Delen (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Netherlands. Springer.
- FAO STAT. 2021. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT Database: FAO. Retrieved December 1st, 2021 from <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Fillinger, S., and Y. Elad (Eds.). 2016. *Botrytis*-the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
- Galsurker, O., S. Diskin, D. Maurer, O. Feygenberg, and N. Alkan. 2018. Fruit stem-end rot. *Horticulturae* 4(4): 50. <https://doi.org/10.3390/horticulturae4040050>
- Giovannoni, J.J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*, 16(suppl_1), S170-S180 <https://doi.org/10.1105/tpc.019158>
- Harteveld, D.O.C., O.A. Akinsanmi, S. Dullahide, and A. Drenth. 2014. Sources and seasonal dynamics of *Alternaria* inoculum associated with leaf blotch and fruit spot of apples, *Crop Protection*, 59, 35-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.01.011>
- Holz, G., S. Coertze, and B. Williamson. 2007. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In *Botrytis: Biology, pathology and control* (pp. 9-27). Springer, Dordrecht.
- Lennox, C. L., and R.A. Spotts. 2004. Timing of preharvest infection of pear fruit by *Botrytis cinerea* and the relationship to postharvest decay. *Plant Disease* 88(5): 468-473. <https://10.1094/pdis.2004.88.5.468>
- Li, Y.C., Y. Bi, and L.Z. An. 2007. Occurrence and latent infection of *Alternaria* rot of pingguoli pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. pingguoli) fruits in Gansu, China. *Journal of Phytopathology* 155: 56-60. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01202.x>
- Lutz, M.C., M.C. Sosa, and A. Colodner. 2017. Effect of pre and postharvest application of fungicides on postharvest decay of Bosc pear caused by *Alternaria/Cladosporium* complex in North Patagonia, Argentina. *Scientia Horticulturae* 225: 810-817. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.05.007>
- Michailides, T.J., D.P. Morgan, and Y. Luo. 2010. Epidemiological assessments & postharvest disease Incidence. in: D. Prusky & M.L. Gullino (eds.), *Postharvest Pathology, Plant Pathology in the 21st Century Vol. 2 Chapter 6*, Springer Science + Business Media B.V.
- Pinilla, B., y M. Álvarez. 2001. Estudios epidemiológicos de la “pudrición calicinal” de las pomáceas causada por *Botrytis cinerea*. Resúmenes XI Congreso Nacional de Fitopatología. Chile. On line: <https://www.sochifit.cl/resumen/xi-congreso-de-fitopatologia-diciembre-2001/> Consultada 19.12.2021
- Prusky, D., N. Alkan, T. Mengiste, and R. Fluhr. 2013. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. *Annual Review of Phytopathology* 51(1): 155-176.
- Prusky, D., Y. Shalom, I. Kobiler, M. Akerman, and Y. Fuchs. 2002. The level of quiescent infection of *Alternaria alternata* in mango fruits at harvest determines the postharvest treatment applied for the control of rots during storage. *Postharvest Biology and Technology* 25: 339–347. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00169-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00169-7)
- Sanzani, S.M., L. Schena, V. De Cicco, and A. Ippolito. 2012. Early detection of *Botrytis cinerea* latent infections as a tool to improve postharvest quality of table grapes. *Postharvest Biology and Technology* 68: 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.02.003>
- Savage, J. A., and J.M. Cavender-Bares. 2011. Contrasting drought survival strategies of sympatric willows (genus: *Salix*): consequences for coexistence and habitat specialization. *Tree Physiology* 31(6): 604-614. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpr056>
- Sardella, D., A. Muscat, J.P. Brincat, S. Decelis, and V. Valdramidi. 2016 A comprehensive review of the pear fungal diseases. *International Journal of Fruit Science* 16 (4): 351-377, <https://doi.org/10.1080/15538362.2016.1178621>

- Seymour, G. B., L. Østergaard, N.H. Chapman, S. Knapp, and C. Martin. 2013. Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology* 64: 219-241. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120057>
- Sitton, J.W., and C.F. Pierson. 1983. Interaction and control of *Alternaria* stem decay and blue mold in d'Anjou pears. *Plant Disease* 67: 904-907
- Sommer, N. F., J.R. Buchanan, R.J. Fortlage, and B.E. Bearden. 1985. Relation of floral infection to *Botrytis* blossom-end rot of pears in storage. *Plant Disease* 69(4): 340-343.
- Sosa, M.C., M.C. Lutz, N. Condoplo Lefort, and L. Vera. 2016a. Calyx and stem mold, affecting pear fruit cosmetic quality: Etiology and management strategies. *ISHS Acta Horticulturae* 1144:36. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1144.36>
- Sosa, M.C., M.C. Lutz, A. Sanchez, and N. Condoplo Lefort. 2016b. Postharvest losses by complex of *Phytophthora* sp. and *Botrytis cinerea* in long storage pear fruit in the Northpatagonia, Argentina, *ISHS Acta Horticulturae* 1144:35. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1144.35>
- Spadaro, D., R. Torres, D. Errampalli, K. Evertt, L. Ramos, and M. Mari. 2020. Pome fruits. Pages 55-112. In: *Postharvest Pathology of Fresh Horticultural Produce* 111 (3) 435. L. Palou and J. L. Smilanick, eds. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Spotts, R.A., M. Serdani, K.M. Wallis, M. Walter, T. Harris-Virgin, K. Spotts, and A. Qu. 2009. At-harvest prediction of grey mould risk in pear fruit in long-term cold storage. *Crop Protection* 28 (5): 414-420. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.01.001>
- Sutton, T.B., H.S. Aldwinckle, A.M. Agnello, and J.F. Walgenbach (Eds.). 2014. *Compendium of apple and pear diseases and pests* (p. 20-21). St. Paul, MN: American Phytopathological Society.
- Tian, S.P. 2007. Management of postharvest diseases in stone and pome fruit crops. In *General concepts in integrated pest and disease management* (pp. 131-147). Springer, Dordrecht.
- Troncoso-Rojas, R., and M.E. Tiznado-Hernández. 2014. *Alternaria alternata* (Black Rot, Black Spot). p 147-187. In: S. Bautista Baños (Ed). *Postharvest Decay. Control Strategies*. Elsevier.
- Wenneker, M., and B.P. Thomma. 2020. Latent postharvest pathogens of pome fruit and their management: From single measures to a systems intervention approach. *European Journal of Plant Pathology* 1-1. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01935-9>
- Witbooi, W. R., J.F. Fourie, and M.A. Taylor 2011. Stem decay on cold stored pears. *SA Fruit Journal* 10(1): 36-39.
- Xiao, C.L., and B.J. Boal 2004. Prevalence and incidence of *Phacidiopycnis* rot in d'Anjou pears in Washington State. *Plant disease* 88(4):413-418. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.4.413>
- Xiao, C. 2006. Postharvest fruit rots in "d'Anjou" pears caused by *Botrytis cinerea*, *Potrebniomyces pyri*, and *Sphaeropsis pyriputrescens*. *Plant Health Progress*. 13 August 2015. <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/diagnosticguide/2006/pears/>
- Zambounis, A., I. Ganopoulos, A. Tsafaris, D. Valasiadis, and P. Madesis. 2020. Metagenomics analysis of fungal communities associated with postharvest diseases in pear fruits under the effect of management practices. *Arch. Microbiol.* 202(9):2391-2400. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01960-6>