

EFFECTO DE TEMPERATURA, HUMEDAD RELATIVA Y FISIOLÓGIA DE BULBOS DE CULTIVARES DE CEBOLLA (*Allium cepa*) EN LA INCIDENCIA DE *Aspergillus Níger* EN EL VALLE INFERIOR DEL RIO NEGRO, ARGENTINA

Por María Cristina Pozzo Ardizzi, Gabriela Aschkar, Graciela Pellejero, María Inés Gil y Raúl Roa
CURZA - Universidad Nacional del Comahue

RESUMEN

La cebolla cultivada en el Valle Inferior del Río Negro, Argentina, es sometida a prolongados períodos de conservación en los que frecuentemente desarrollan enfermedades de postcosecha. Nuestro objetivo fue evaluar los efectos de la temperatura (T) y la humedad relativa (HR) dentro de la estructura de almacenamiento (pilas), y del porcentaje de agua (PA) y sólidos solubles (SS) de los bulbos, sobre la incidencia (I) de *Aspergillus niger*, en diferentes cultivares de cebolla. Los cultivares que intervinieron fueron Cobriza INTA, Antártica INTA, Valcatorce INTA, Valuno INTA y Grano de Oro. Se colocaron sensores que registraron la T y la HR sobre y dentro de las pilas y se realizaron muestreos periódicos de bulbos en los que se determinaron I, PA y SS. Se analizó el efecto de los parámetros mencionados sobre el comportamiento del patógeno en los distintos cultivares. La incidencia aumentó en la primera etapa de la conservación en la que las T decrecientes indujeron la esporulación del patógeno. Cuando estas continuaron descendiendo, este fenómeno se frenó y el desprendimiento de las catáfilas afectadas se tradujo en una disminución de la enfermedad. El análisis de los PA y de los SS explicó la diferencia entre la I de *A. niger* en el cultivar blanco y los coloreados, pero no pudo diferenciar las I entre estos últimos. Se puede desatacar que Valuno INTA y Grano de Oro mostraron mejor comportamiento frente a la enfermedad, la duración óptima del período de conservación osciló entre 2 y 3,5 meses, y la necesidad de disminuir el inóculo en el ambiente productivo.

Palabras clave: Postcosecha; Temperatura; Humedad relativa; Porcentaje de agua en los tejidos; Sólidos solubles; Cultivares.

EFFECT OF THE STORAGE CONDITIONS AND SOME INTRINSICAL PROPERTIES OF THE BULBS ON THE *Aspergillus niger* INCIDENCE IN ONION (*Allium cepa* L.), IN THE LOW VALLEY OF THE BLACK RIVER, ARGENTINA

ABSTRACT

Cultivated onion in the Low Valley of Río Negro is subjected to prolonged periods of conservation during which is very common that post-harvest diseases develop. Our object was to assess the effects of temperature (T) and relative humidity (HR) within the storage structures (batteries), and the water percentage (PA) and soluble solids (SS) of bulbs, on the incidence (I) of *Aspergillus niger* in different onion cultivars. Cobriza INTA, Antarctica INTA, Valcatorce INTA, Valuno INTA and Grano de Oro were the cultivars employed. Sensors to record T and HR were placed over and into batteries and periodic bulb samplings were taken out to assess I, PA and SS. The effects of the mentioned parameter over the pathogen behaviour were analyzed in each cultivar. The incidence increased in the first phase of conservation while the decreasing T promoted the pathogen sporulation. This phenomenon didn't progress when these continued decreasing, and the detachment of the affected scales resulted in a disease decrease. The PA and SS analyze explained difference in the *A. niger* incidence between the white and the colored cultivars, but could not, differentiate the incidences among the last. It could be emphasize that Valuno INTA and Grano de Oro cultivars showed the best behavior in front to the disease, the optimal duration of the conservation period oscillated between the two and three and half months, and the need to reduce the inoculum in the productive environment.

Key words: Post-harvest; Temperature; Relative humidity; Percentage of water in the tissues; Soluble solids; Cultivars.

INTRODUCCION

La cebolla cultivada en el Valle Inferior del río Negro (VIRN) Argentina se almacena en pilas, a la intemperie, hasta su comercialización. Valcatorce INTA es el cultivar más difundido debido a su aspecto y características organolépticas pero es muy susceptible a *Aspergillus niger* en postcosecha. Esta enfermedad es conocida en Argentina como “Carbonilla” por las masas conídicas pulverulentas de color negro que se desarrollan sobre los bulbos (Foto 1). En general, los bulbos ingresan a las pilas aparentemente sanos pero, cuando estas estructuras se desarman para la clasificación previa a la comercialización, es frecuente encontrar lotes de cebolla con valores de incidencia que superan ampliamente las tolerancias comerciales.



Foto 1.

Bulbos de cebolla del cultivar Valcatorce INTA mostrando síntomas de *Aspergillus niger* con un nivel de incidencia superior al 70%.

Las pilas son estructuras que están compuestas íntegramente por bulbos y restos de hojas y no poseen ningún mecanismo para remover el aire interno. El lento pero activo metabolismo de los bulbos puede modificar la atmósfera interna y desarrollar un ambiente favorable para que el patógeno se desarrolle. Estudios realizados sobre la actividad de *A. niger in vitro* e *in vivo* sobre bulbos de cebolla, bajo condiciones controladas (Broderick y Greenshields, 1981; Tanaka, 1991; Ko *et al.*, 2002; Parra y Magan, 2004; Astoreca *et al.*, 2007), han determinado que la temperatura óptima para el crecimiento miceliar oscila entre los 28 y los 30 °C. Sin embargo, El-Nagerabi y Ahmed (2003), en estudios realizados en Sudan, determinaron que el óptimo crecimiento del hongo se producía entre los 30 a 35 °C. Esto estaría sugiriendo la adaptación de razas a los diversos ámbitos productivos. Si bien en el VIRN, la etapa de conservación transcurre en otoño-invierno, con temperaturas en descenso, en el corazón de las pilas, ese gradiente es más atenuado. Con respecto a la humedad relativa ambiente (HR), la atmósfera interna también puede tener valores diferentes a los de la intemperie como producto de la liberación de agua en el proceso de respiración. Sin embargo, si el cuello de los bulbos ha cerrado bien, ese aporte debería ser mínimo porque se ha comprobado que es el cuello el principal punto de intercambio gaseoso ya que las catáfilas externas son prácticamente impermeables la difusión de gases (Hoftum, 1993; Yoo *et al.*, 1997). La germinación de las esporas y el crecimiento micelial de *A. niger* requieren HR superiores a 75% (Abdel-Rahim y Arbab, 1985; El-Negerabi y Ahmed, 2003) sin embargo este hongo ha sido considerado por algunos autores como un hongo xerófilo por su capacidad para sobrevivir y crecer sobre sustratos con baja actividad del agua (Parra *et al.*, 2004; Mata-Gómez *et al.*, 2009). Cuando la

actividad de agua decrece con el tiempo, los sustratos se vuelven crujientes y se rompen con facilidad (Astoreca *et al.*, 2007). Este proceso ocurre en las túnicas externas de la cebolla, que inicialmente son funcionales pero que a medida que avanza el desarrollo del bulbo, se van deshidratando y convirtiéndose en estructuras de protección, de consistencia papirácea.

La incidencia y la severidad de la “Carbonilla”, se estiman a través de los síntomas visuales pero en realidad se está considerando el signo de *A. niger* que esporula a partir de un micelio no percibido previamente. La conidiación es la fase de resistencia de este patógeno y por lo tanto, cuando se desencadena, significa que se lo ha sometido a uno o a varios factores estresante que pueden provenir del ambiente o del sustrato (Agnihotri, 1969; Galbraith y Smith, 1969; Broderick y Greenshields, 1981). El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la temperatura y la humedad relativa dentro de la estructura de almacenamiento (pilas), y del porcentaje de agua y sólidos solubles de los bulbos, sobre la incidencia de *A. niger*, en diferentes cultivares de cebolla. Estos últimos parámetros son factores estrechamente relacionados con la actividad del agua en los tejidos, la que por ser dependiente de la temperatura y de la HR del aire, y ser propia de cada sustrato, resulta muy compleja de calcular en sistemas abiertos, donde las condiciones ambientales no están controladas y donde están presentes sustratos de características diferentes (cultivares)

MATERIALES Y MÉTODOS

En la temporada de producción 2005-2006 se realizó un cultivo en el que se incluyeron cinco cultivares: Cobriza INTA, Antártica INTA, Valcatorce INTA, Valuno INTA y Grano de Oro. El cultivar Antártica INTA pertenece al grupo de cebollas blancas, apto para el deshidratado, pero fue incluido a modo de referencia por su buen comportamiento frente a la enfermedad (Pozzo Ardizzi *et al.*, 2004) y por su alto contenido en sólidos solubles. El cultivo fue conducido según la modalidad productiva de la zona con el objeto de tener el material necesario para construir las pilas de conservación y poder realizar el experimento en postcosecha. La cosecha se llevó a cabo el 1 de marzo del 2006 y los bulbos fueron colocados sobre el surco durante unos diez días para que se secan las catáfilas externas antes de armar las pilas (curado). Para registrar los cambios que se produjeran durante la conservación, se establecieron cuatro fechas de evaluación: la primera, antes de iniciar la conservación (10 de marzo), y tres muestreos posteriores, a aproximadamente 40, 80 y 120 días de conservación. Se construyó una pila por cada fecha de muestreo y dentro de cada una se distribuyeron los tratamientos (cultivares) según un diseño de Bloques Completamente Aleatorizados con cuatro repeticiones. Cada unidad experimental estuvo compuesta por 100 bulbos colocados en bolsas de red identificadas y distribuidas al azar en la parte central de la pila. De este modo, en el interior de cada pila se ubicaron 20 bolsas correspondientes a los cinco tratamientos con sus cuatro réplicas. Como una pila es una estructura de maciza de grandes dimensiones se utilizaron bulbos de Valcatorce INTA de un cultivo aledaño, para completar su construcción.

Los parámetros analizados y las metodologías utilizadas en cada fecha de muestreo fueron las siguientes:

a) Incidencia visual de *A. niger* (I): Se calculó el porcentaje de bulbos afectados. Para ello, se buscó la presencia de síntomas en todas las catáfilas coloreadas, removiendo una por una, hasta llegar a las reservantes. Para los análisis estadísticos se realizaron la transformación de las proporciones (p) en un valor $W = \arcseno \sqrt{p}$ y luego se retransformaron en $(p) = (\text{seno } W)^2$

b) Porcentaje de agua en los bulbos (PA): Se seleccionaron cinco bulbos del tamaño representativo del cultivar, se les extrajo una rodaja de 1 cm de altura, a nivel ecuatorial, y se registró el peso fresco de ese material (PF). Se lo llevó a estufa, a 70° C hasta peso constante (aproximadamente 48 hs.) y se registró el peso seco (PS). El PA se calculó aplicando la siguiente expresión:

$$PA = \frac{PF - PS}{PF} \times 100$$

En el análisis estadístico de este parámetro no se transformaron los datos pues el rango de porcentajes registrados no superó el 40 % (Little y Hills, 1983)

c) Sólidos Solubles (SS): Se calculó por refractometría, utilizando un refractómetro de mano. Se basa en los cambios del índice de refracción que sufre una sustancia cuando otra es disuelta en ella. Esa desviación es leída en la escala como porcentaje de azúcar, conocida también como grados Brix. Para ello, se colocaron unas gotas del jugo proveniente de la tercera catáfila reservante más externa a nivel ecuatorial del bulbo, en el refractómetro de mano (Handheld Refractometers MODEL REF103, Copenhague, Dinamarca) y se registró el valor en una escala de 0 a 20.

d) Temperatura (T) y Humedad Relativa (HR) en el interior y en el exterior de la pila: Se construyó una pila *ex profeso* para obtener estos registros de modo que las condiciones ambientales internas y externas no se perturbaran con los muestreos. Se colocó un sensor (Gemini Tinytalk II, dataloggers LTD, Reino Unido) en el centro de la pila y otro sobre una cara externa. Si bien el experimento finalizó el 10 de julio, los registros de la T y la HR continuaron hasta fines de julio para registrar los datos tardíos, dado que algunos productores, conservan algunas pilas hasta esa fecha.

Se analizaron los cambios de las variables ambientales y las variables metabólicas registradas (PA y SS) a través del tiempo en cada uno de los cultivares. Se realizaron análisis de regresión lineal para la incidencia de *A. niger* frente a cada una de ellas determinándose el coeficiente de regresión y de correlación en cada caso. Para ello se utilizó el paquete estadístico INFOSTAT (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de la Incidencia visual de *A. niger*

La evaluación sanitaria inicial determinó que los cultivares ingresaron a las estructuras de almacenamiento con diferentes niveles de Incidencia (I) de *A. niger* (Fig. 1). Las lesiones visibles causadas por el patógeno se localizaban próximas al cuello, entre las catáfilas coloreadas de los bulbos. El Análisis de la Varianza (ANOVA) y el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan (TCMD) a $P < 0,05$, agruparon a los cultivares en tres niveles de susceptibilidad al patógeno: por un lado, Cobriza INTA con un nivel de I del 30%, significativamente superior al resto de los cultivares, al por otro lado Valcatorce INTA, Valuno INTA y Grano de Oro presentaron un nivel intermedio con diferencias no significativas entre sí, que osciló entre 15 y 22 %, y por último, Antártica INTA en el que no se observó presencia de la enfermedad.

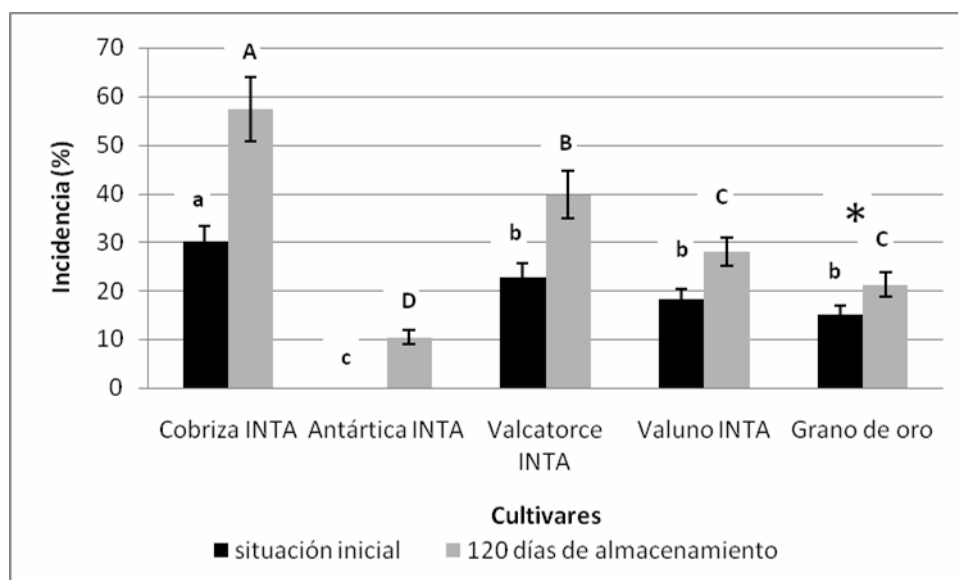


Fig. 1. Incidencias de *Aspergillus niger* en los diferentes cultivares de cebolla. Las barras negras (situación inicial) con igual letra minúscula y las barras grises (120 días de almacenamiento) con igual letra mayúscula, no se diferencian estadísticamente según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P < 0,005$). El (*) señala al único cultivar en el que ambas incidencias no difieren según el Test de Student ($P < 0,005$).

En la Figura 2 se muestra la evolución de la I de *A. niger* durante el período de conservación, que se ajustó adecuadamente a un modelo polinómico de segundo orden en todos los cultivares (Tabla I). En todos los casos la I se incrementó en los primeros días de conservación, para luego, mostrar una tendencia gradualmente decreciente hasta el final del experimento. Este tipo de comportamiento había sido registrado en experimentos anteriores (van Konijnenburg y Pozzo Ardizzi, 1997; Pozzo Ardizzi *et al.*, 2004). La comparación de los parámetros de los modelos de regresión que describieron las evoluciones de las I, indicó que en los cultivares Cobriza INTA y Valcatorce INTA, los coeficientes simples no difirieron significativamente, al igual que en Valuno INTA y Grano de Oro. Antártica INTA, tuvo un término independiente significativamente menor que el resto de los cultivares que reflejó la baja o nula I al iniciar el experimento. Con respecto al coeficiente cuadrático negativo que interpretó el decrecimiento generalizado hacia el final de la conservación, en Antártica INTA, fue significativamente más negativo que en Valuno INTA y Grano de Oro. No obstante, en Cobriza INTA y Valcatorce INTA se registraron los menores valores de este coeficiente, interpretando el pronunciado descenso de sus I, estos decrecimientos, no lograron compensar los altos niveles de I en las primeras fases de desarrollo de la enfermedad.

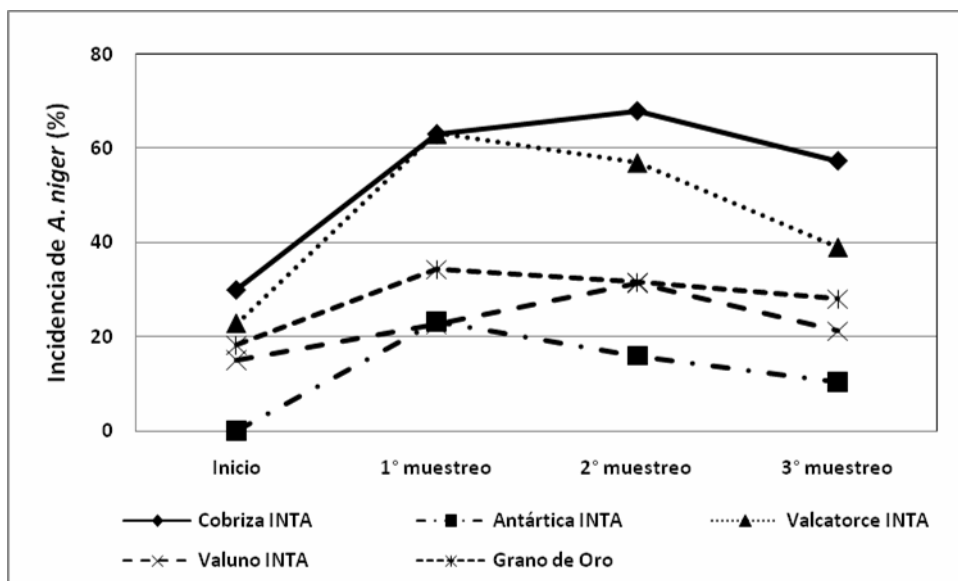


Fig. 2. Evolución temporal de la Incidencia de *Aspergillus niger* sobre diferentes cultivares de cebolla durante el período de conservación del año 2006 en el VIRN.

El incremento de la I en los comienzos de la conservación se produjo por la manifestación de nuevas lesiones sobre bulbos que estaban inoculados con el hongo pero que, en la evaluación visual inicial permanecían latentes y fueron considerados “bulbos sin síntomas”. La posterior disminución de la I no se debió a un proceso de “curación” como puede suceder en las patologías animales sino a que, como el patógeno se alojaba fundamentalmente sobre y entre las catáfilas coloreadas más externas que se fueron rasgando y desprendiendo con el transcurso del tiempo, en muchos casos, bulbos anteriormente afectados, retomaron su estatus de “bulbo sin síntoma”. Estos autores han demostrado que esos bulbos asintomáticos estaban inoculados con propágulos de patógeno porque, al colocarlos en cámara húmeda 20 °C, se cubrieron rápidamente de las masas pulverulentas características. Delhey *et al.* (2007) determinó que el 100 % de bulbos de Valcatorce INTA, colocados bajo condiciones de humedad y temperatura adecuadas desarrollaban síntomas de la enfermedad.

Efecto de la temperatura sobre la Incidencia de *A. Níger*

En la Figura 3 se representan los registros de la T media semanal en el interior y en el exterior de la pila. La T interna fue entre 1 y 6,8 °C superior a la externa durante el período de conservación, salvo entre el 7 y el 13 de abril, que la exterior fue 1,49 °C superior a la interior. Estas diferencias indicaron la existencia de un gradiente térmico que se incrementó hacia el interior de la pila, de modo que los bulbos ubicados en distintas profundidades estuvieron sometidos a diferentes T. Para que el patógeno se expanda y esporule es necesario que se den las condiciones ambientales favorables a ambos procesos. Tanaka (1991), en un experimento realizado sobre bulbos enteros, determinó que la temperatura (T) promedio mínima para el crecimiento micelial eran los 28 °C y para la producción de esporas sobre las catáfilas era de 17 °C. Por debajo de este registro, algunas esporas lograban germinar, pero el tubo germinativo no progresaba y ya, por debajo de los 14 °C no había germinación. Ko *et al.* (2002) encontraron que la mayor severidad de la enfermedad, se producía a los 25 °C y por debajo de este valor, la actividad fúngica disminuía críticamente hasta ser nula a los 20 °C.

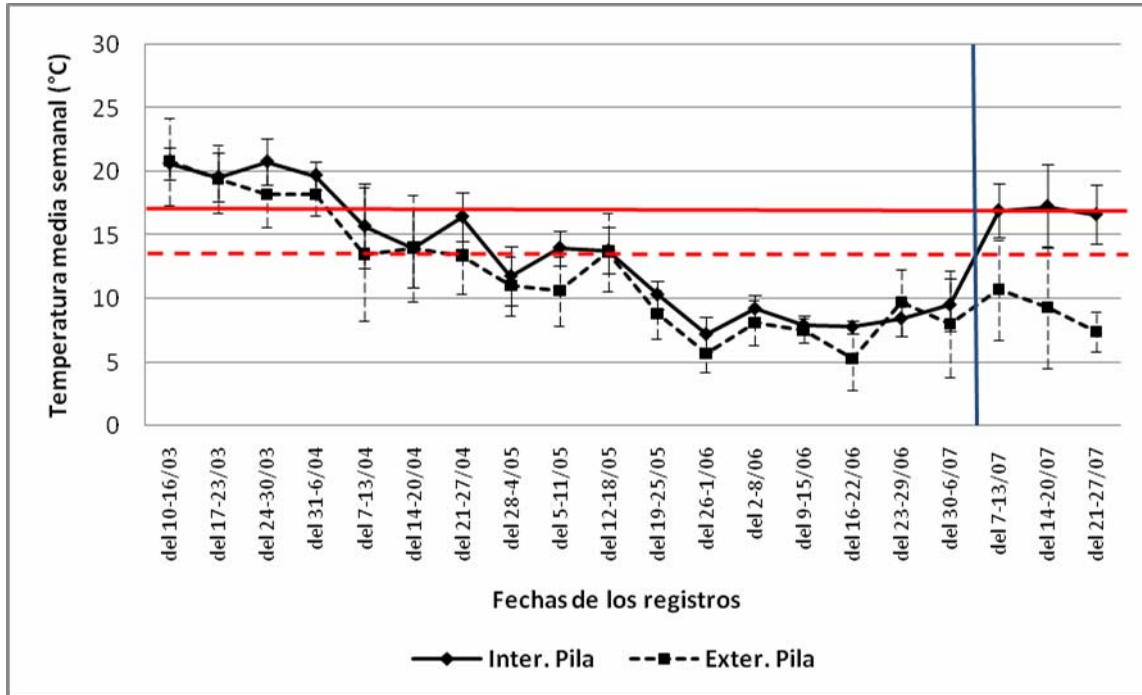


Fig. 3. Valores de temperaturas medias en el centro y en el exterior de las pilas durante el período de conservación en el 2006. La línea sólida roja indica los 17 °C por debajo de los cuales cesa el crecimiento micelial y la producción de esporas de *Aspergillus niger* sobre las catáfilas. La línea roja cortada señala los 14 °C, considerada la temperatura mínima para la germinación de esporas. La línea vertical azul indica la fecha de finalización del ensayo.

Según esos datos la I inicial, en este experimento, debería haber permanecido estable pues las T promedio, externas e internas, no superaron significativamente los 20 °C, establecidos por ellos como la T mínima necesaria para que se registre alguna tipo de actividad en el patógeno. Sin embargo, si se considera la T cardinal mínima para el crecimiento micelial y la producción de esporas registrada por Tanaka (1991), o sea, 17 °C, el material almacenado estuvo sometido a T subóptimas durante más de un mes. En la Figura 3, se puede observar que las T externas e internas, descendieron a ese nivel entre el 7 y el 13 de abril, una semana previa al primer muestreo en pila (apertura de la primera pila). Fue precisamente en esa evaluación cuando se notaron los mayores incrementos de las I. Luego, las T continuaron descendiendo, pero la externa, rápidamente pasó el nivel de los 14 °C por debajo de la cual, lo mismos investigadores observaron que se inhibía completamente la germinación de esporas. La T interna se mantuvo entre los 17 °C y los 14 °C hasta mediados de mayo, pero esto no se tradujo en un incremento de la I. En los siguientes muestreos, el nivel general de enfermedad alcanzó una meseta para luego disminuir pero se registraron diferencias entre los cultivares. Esto permitiría inferir que las T no favorecieron la colonización de las catáfilas coloreadas más profundas a partir de las que se estaban desprendiendo. Sin embargo, esa disminución de la I hacia el final del experimento, no fue suficiente para reducir esta hasta los valores de I iniciales. Sólo en Grano de Oro, ambos valores resultaron estadísticamente semejantes (Test de Student, $P < 0,005$) (Fig. 1). En algunos cultivares, los valores de I alcanzados al final del experimento estuvieron dentro de los valores esperados después de 4 meses de conservación como es el caso de Antártica INTA, Valuno INTA y Grano de Oro cuyas diferencias entre la I inicial y la final fueron 0-10,8 %, 18,2-28 % y 15-21,2 % respectivamente. Sin embargo, las diferencias registradas en Valcatorce INTA y Cobriza INTA fueron muy pronunciadas: 22,8-39,7 % para la primera y 30-57,4 % para la segunda. Estos valores representan altos niveles de descarte durante la comercialización. El ANOVA y TCMD realizados sobre las I finales en los distintos cultivares, determinaron que todos se mantuvieron en la misma posición relativa que al iniciar el experimento, pese a los incrementos sufridos. Sólo Valcatorce INTA, que ingresó como un cultivar con una I intermedia, al finalizar la conservación, se diferenció de ese grupo por el pronunciado incremento, pero no alcanzó el nivel de Cobriza INTA (Fig. 1). Finalmente, los valores

de T en el interior de la pila registraron un pronunciado incremento de la T hacia fines de julio (Fig. 3). Esto, pudo deberse a la ruptura de la dormancia dado que, aunque no se registró sistemáticamente el inicio de la brotación, los bulbos se mostraban más blandos y con cierta actividad meristemática en el brote central donde comenzaban a colorearse algunas catáfilas.

Efecto de la Humedad Relativa sobre la Incidencia de *A. Níger*

En la Figura 4 se representan las variaciones de la HR en el interior y en el exterior de la pila desde el inicio de la conservación hasta fines de mes de julio del 2006. Si bien en la mayoría fechas no se observaron diferencias significativas entre ambos registros, la HR interna fue ligeramente inferior a la externa. Esto podría deberse a que el otoño y el invierno son las estaciones con mayor frecuencia de lluvias en el VIRN y por lo tanto, se registran altas HR ambiente. Con respecto al efecto de este parámetro sobre el desarrollo de la enfermedad, el incremento de la I se produjo con HR del orden del 50 al 60 % (Figs. 2 y 4). Hay que tener en cuenta, que los síntomas corresponden a la fase esporulativa del patógeno, que es un estado de resistencia que se desencadena frente a condiciones adversas, por lo tanto, sería lógico esperar que la I aumentara con HR tan bajas. Los antecedentes afirman que se requieren altos niveles de HR para que se produzca la germinación de las esporas y por lo tanto, la colonización de nuevos sustratos. Abdel-Rahim y Arbab (1985) detectaron fallas en la germinación con valores inferiores al 76 % de HR. Determinaron que entre 76 y 81 % de HR las esporas demoraban 15 h en germinar, y a medida que la HR aumentaba, el tiempo necesario para emitir el tubo germinativo disminuía y la longitud del mismo aumentaba incrementando la producción de micelio.

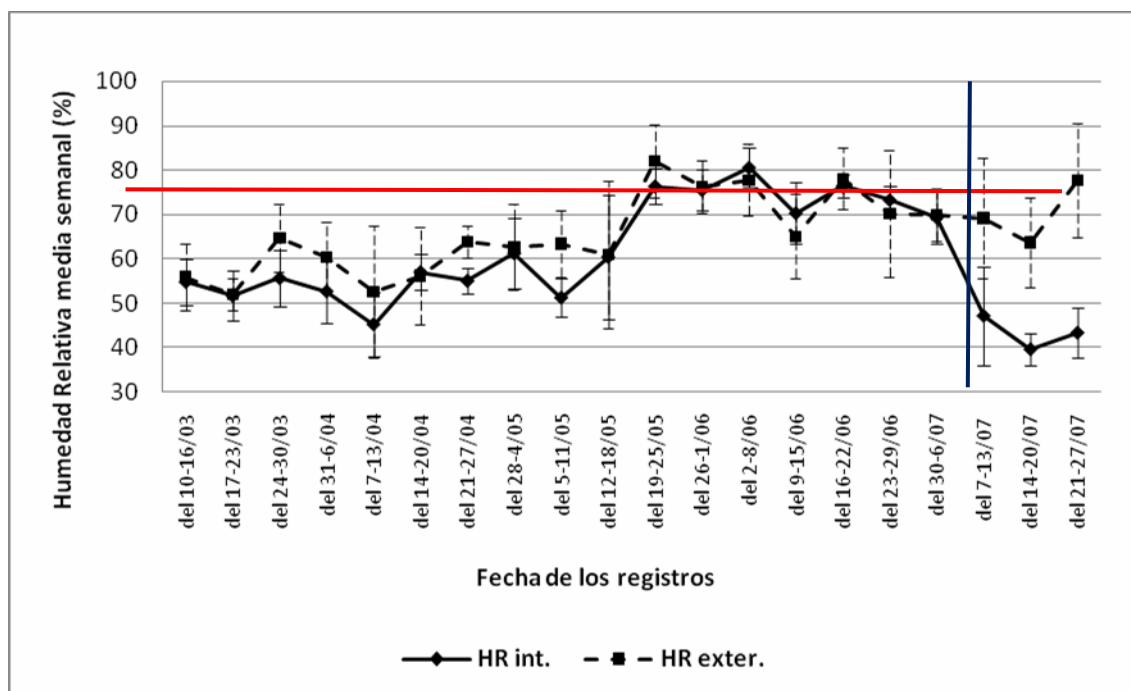


Fig. 4. Valores de las HR en el centro y en el exterior de las pilas durante el período de conservación en el 2006. La línea sólida roja indica una HR del 75 % por debajo de la cual disminuye la actividad de *Aspergillus niger*. La línea vertical azul indica la fecha de finalización del ensayo.

Efecto del Porcentaje de Agua (PA) y de los Sólidos Solubles (SS) sobre la Incidencia de *A. niger*

El contenido de agua en los alimentos es responsable en gran medida de las reacciones químicas, enzimáticas y microbiológicas que se puedan producir durante la conservación de los mismos. Para analizar su comportamiento del agua, se la divide en libre y ligada. La primera sería la única disponible para el crecimiento de los microorganismos o para intervenir en las transformaciones hidrolíticas que estos producen. La mejor forma de medir su disponibilidad es mediante la actividad de agua (a_w) pero, ante la imposibilidad de cuantificarla en un sistema abierto y tan precario como una pila, se evaluaron otros parámetros que están estrechamente relacionados con ella como son el PA y los SS. Al medir el PA en los tejidos de los bulbos, se sabe que parte de esa agua está en relación con los SS. El método utilizado para medir el contenido de agua en los tejidos, o sea, por secado en estufa, es cuestionado cuando se lo utiliza en algunos productos porque puede haber pérdida de otros sustancias volátiles además del agua, pero en el caso de la cebolla, está comprobado que el principal y casi único solvente en sus tejidos es el agua (Brewster, 2001)

En la Figura 5 se muestra el PA en los distintos cultivares y su evolución durante la conservación. Grano de Oro, que registró un nivel intermedio de I, tuvo el mayor PA y Antártica INTA, que presentó los menores niveles de incidencia entre los cultivares evaluados, mostró el menor. El PA inicial, sufrió un leve decrecimiento en el primer muestreo que ocurrió en todos los cultivares pero que apenas osciló entre el 3,4 % en Antártica INTA y el 0,5 % en Valcatorce INTA. Posteriormente, se mantuvo estable, hasta la finalización del experimento. Esta pérdida y el posterior equilibrio podrían estar relacionados con el cierre de los cuellos que se completa en las primeras etapas de la postcosecha (datos no publicados, Pozzo Ardizzi *et al.*, 2006). Los SS se mantuvieron estables durante todo el almacenamiento, lo que se atribuye al estado de dormancia de los bulbos. No obstante, se observaron diferencias entre los cultivares ($P < 0,005$) ya que Antártica INTA, mostró valores significativamente mayores durante toda la conservación.

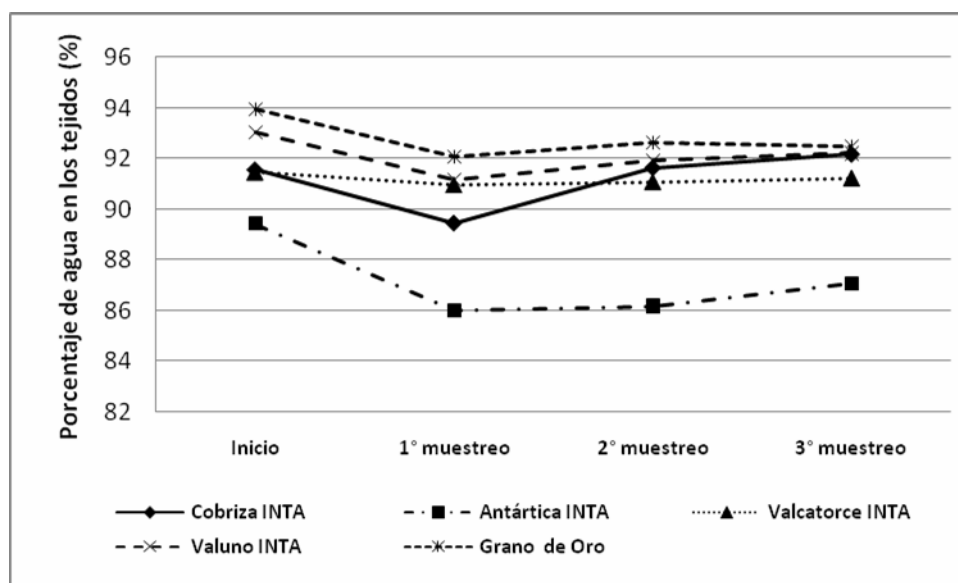


Fig. 5. Evolución del porcentaje de agua en los bulbos de los diferentes cultivares durante el período de conservación que va de principios de marzo a principios de julio del 2005, en el VIRN.

Las diferencias que se registraron entre los demás cultivares no superaron los dos puntos (Fig. 6). Antártica INTA fue el cultivar más resistente a la infección por *A. niger* (Figs. 1 y 2) y en él se conjugaron los dos últimos factores analizados: tuvo proporcionalmente menor cantidad de agua

que a su vez, estaba ligada a una mayor cantidad de azúcares solubles. El contenido de SS es un buen estimador del contenido azúcares ya que estas representan más del 90% de la materia soluble en los bulbos de cebolla (Benkeblia *et al.*, 2004)

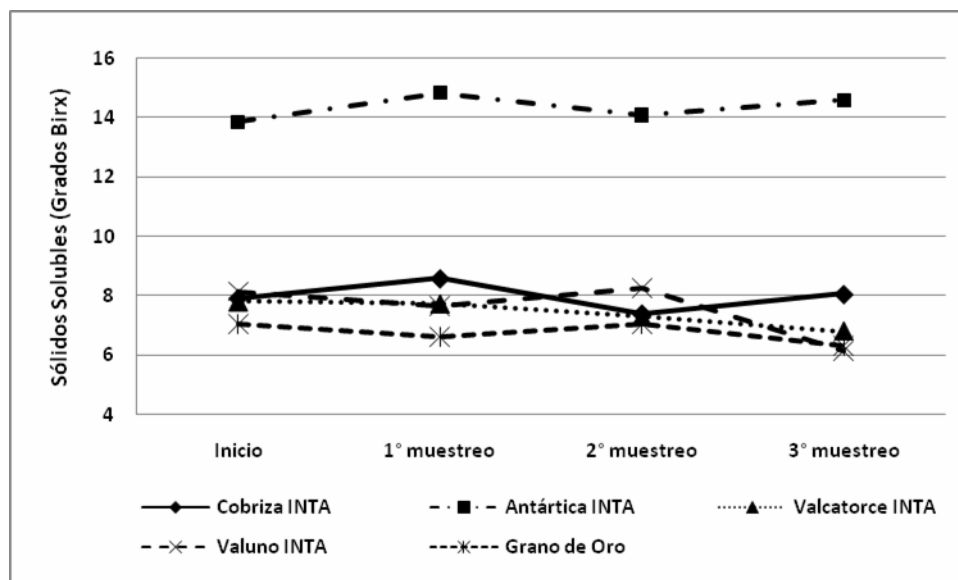


Fig. 6. Evolución de los sólidos solubles en los bulbos de los diferentes cultivares durante el período de conservación que va de principios de marzo a principios de julio del 2005, en el VIRN.

En los análisis de regresión simple estos parámetros no estuvieron correlacionados con la I, pero sí lo hicieron entre ellos ($-0,892$, $P < 0,001$) (Tabla II), a mayor cantidad de azúcares solubles, menor PA (estimador de a_w). Esta relación se incrementó cuando se incluyeron ambos parámetros en el modelo de regresión, es decir, la I en función de los SS y del PA (ecuación 1). Este modelo pudo explicar aproximadamente el 40 % del comportamiento de la variable dependiente.

$$I = 966,544 - 9,396 \text{ PA} - 9,009 \text{ SS con un error estándar } 15,82 \text{ (} P < 0,013 \text{)} \text{ (1)}$$

Esto significa que es necesario identificar otras variables que están determinando las variaciones de la I de *A. niger* en cebolla.

Como ya se dijo, la evaluación de la I y la severidad de la esta enfermedad dependen del desarrollo de la conidiación a partir del micelio colonizador. En términos generales, cuando un microorganismo coloniza con éxito un sustrato es porque sus requerimientos nutricionales y ambientales están satisfechos pero si en el transcurso de su desarrollo, esta situación cambia, detiene su crecimiento y en la mayoría de los casos, no muere sino que pasa a su fase de resistencia (Griffin, 1996; Parra *et al.*, 2004). Broderick y Greenshields (1981), sostienen que el crecimiento vegetativo y la esporulación de *A. niger* son procesos que compiten por niveles limitantes de nutrientes. En este trabajo la asociación entre los SS y la I (Tabla II), o sea la producción de esporas, fue moderadamente negativa ($r = -0,406$ (Tabla II) y coincidió con los resultados de Ko *et al.* (2002) que analizando las mismas variables obtuvieron una correlación negativa entre ambas. Esto permite inferir que a mayor cantidad de SS, menor I visible ya que habiendo una buena disponibilidad de azúcares, la esporulación fue escasa.

Los bulbos ingresaron a las pilas inoculados o infectados por el hongo (Figs. 2 y 3), o sea que, la relación entre el hospedante y el patógeno se estableció durante el cultivo cuando las catáfilas externas aun eran funcionales, tal como lo han comunicado otros autores (Hayden y Maude, 1992; Hayden *et al.* 1994a, 1994b; Agrios, 1996; Lorbeer, 2000; El-Nagerabi y Ahmed, 2003; Tyson y Fullerton, 2004). En la evaluación inicial los bulbos afectados mostraban pequeñas lesiones

(clusters de esporas) entre la zona del cuello y el hombro del bulbo, sólo sobre las catáfilas coloreadas y en ningún caso se observaron daños sobre las catáfilas reservantes. Ko *et al.* (2002) realizaron inoculaciones artificiales sobre distintos sectores de los bulbos para determinar puntos de vulnerabilidad y obtuvieron la mejor correlación de la I con la inoculación sobre las tunicas coloreadas. Al momento de ingresar a las pilas, dichas catáfilas coloreadas, si bien están senescentes, aun tienen humedad en sus tejidos. La finalidad del “curado”, previo al almacenamiento, es acelerar el secado de las tunicas externas. Según Walker (1925), los residuos de las sustancias solubles en las células de las catáfilas que van muriendo, son exudados y aprovechados por el patógeno. Cuando la situación se va tornando nutricionalmente limitante, *A. niger* esporula y se autoabastece, en parte, de carbono y nitrógeno aportados por la autólisis de su micelio como sucede en los cultivos artificiales (Lahoz *et al.*, 1974). Broderick y Greenshields (1981) establecieron que si el estrés es producido como un shock, el hongo no esporula pero detiene su crecimiento, pudiendo formar esclerocios (Agnihotri, 1969). Sólo si el proceso es gradual, forma conidióforos y conidios permitiendo la percepción de los síntomas, tal como sucede con la metodología local de conservación. Por eso, en países más tecnificados como Japón, las cebollas recién cosechadas ingresan a cámaras de conservación donde son expuestas inmediatamente a 4°C (Tanaka, 1991)

CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que es muy difícil evitar la enfermedad porque *A. niger* es un contaminante ambiental pero los cultivares Valuno INTA y Grano de Oro, mostraron los menores valores de I durante la conservación constituyéndose en cultivares alternativos a Valcatorce INTA. Hasta que no aparezcan cultivares resistentes al patógeno será necesario recurrir a los menos susceptibles y acentuar los esfuerzos por implementar prácticas que morigeren los efectos de la enfermedad. El análisis de la T y la HR dentro y fuera de la pila, en el VIRN, ha permitido inferir que los cambios graduales que se producen en estos factores influyen sobre el comportamiento del patógeno, induciendo a la esporulación del mismo. Por la metodología y por la época del año en que transcurre la conservación, las variaciones de la I fueron explicadas, en parte, por el descenso de la T y por los cambios en la HR. Resulta difícil separar los efectos que producen esos parámetros ambientales, de los producidos por las variaciones que se van generando en los sustratos porque las condiciones de almacenamiento también afectan el metabolismo de las cebollas. Sin embargo, los diferentes cultivares sometidos a las mismas condiciones, han expresado diferentes niveles de I. Las variables analizadas como el PA y los SS, explicaron en parte los resultados de I global (40 %) y si bien sirvieron para justificar el mejor comportamiento de Antártica INTA no fueron suficientes para explicar las diferencias entre los otros cultivares. Hay que tener en cuenta que Antártica INTA, además de ser un cultivar apto para el deshidratado, con altos SS y menor PA, se caracteriza porque sus catáfilas de protección son blancas y según algunas investigaciones, las cebollas blancas son menos susceptibles a *A. niger* (Walker, 1925; Sinclair y Letham, 1996; Pozzo Ardizzi *et al.*, 2004)

Como las infestaciones y/o infecciones por *A. niger* se producen durante el cultivo, sería muy importante mantener bajo el inóculo del patógeno en los ambientes productivos ya que la I y la severidad dependen del volumen del inóculo aportado por las distintas fuentes (semilla, suelo y aire) (Ko *et al.*, 2002). En la postcosecha sería importante evitar las condiciones ambientales que promuevan la esporulación pero las estructuras utilizadas en el VIRN no lo permiten. La conservación bajo condiciones controladas requiere de equipamiento y estructuras edilicias antieconómicas para la producción regional.

Considerando esta situación y analizando los resultados de varias temporadas sería recomendable iniciar la comercialización de las cebollas, o sea, abrir las pilas, cuando haya transcurrido un período de conservación mayor a 1 mes. Durante ese tiempo acontecen simultáneamente dos fenómenos, por un lado, las T decrecientes que inducen a la esporulación y por otro lado, las catáfilas externas, sobre las que se está expresando el patógeno, continúan deshidratándose hasta desprenderse. Si las catáfilas coloreadas más profundas están invadidas por el patógeno, también se va a expresar sobre ellas, pero si no es así, las T subóptimas en disminución, llegan a inhibir la germinación de las esporas y por lo tanto, se frena la dispersión dentro del bulbo.

En la mayoría de los casos la enfermedad se expresa entre y sobre las catáfilas de protección por lo que, en futuros trabajos, se prestará especial atención a la composición de las mismas y a los acontecimientos que se producen en ese ámbito.

La urgencia por encontrar soluciones para este problema sanitario no sólo se debe a la necesidad de corregir un defecto estético sino también a que se ha comprobado en numerosas investigaciones médicas que las personas inmunodeprimidas pueden ser afectadas por Aspergillosis (Richard *et al.*, 1984; Topping *et al.*, 1985; Kierownik, 1990; Abarca, 2000). Además, un tema que será necesario dilucidar es si *A. niger*, creciendo sobre los bulbos sometido condiciones ambientales que le generen algún tipo de estrés, exuda micotoxinas como lo han detectado otras investigaciones, sobre otros sustratos (Frisvad *et al.*, 2007)

BIBLIOGRAFIA

- Abarca M. L. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en aspergilosis nosocomial. Rev. Iberoam. Micol. 17: 79 - 84.
- Abdel-Rahim A. M. and Arbab H. A. 1985. Factors affecting spore germination in *Aspergillus niger*. Mycopathologia Vol. 89 N° 5: 75 -79.
- Agnihotri V. P. 1969. Some nutritional and environmental factors affecting growth and production of sclerotia by a strain of *Aspergillus niger*. Can. J. Microbiol.15: 835 - 840.
- Agrios G. N. 1996. Fitopatología. UTEHA. Ed. Limusa. Méjico.
- Astoreca A., Magnoli C., Ramirez M. L., Combina M. and Dalcerro A. 2007. Water activity and temperatura effects on growth of *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *A. carbonarius* isolated from different substrates in Argentina. International Journal of Food Microbiology 119 (3): 314 - 318.
- Benkeblia N., Onodera S., Yoshihira T., Kosaka S. and Shoimi N. 2004. Effect of temperature on soluble invertase activity and glucose, fructose and sucrose status on onion bulbs (*Allium cepa*) in store. International Journal of Food Sciences and Nutrition. Vol 55 (4): 325 - 331.
- Brewster J. L. 2001. Las Cebollas y otros *Alliums*. Ed. Acribia. España. pp. 253.
- Broderick A. J. and Greenshields R. N. 1981. Sporulation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus ochraceus* in continuous submerged liquid culture. Journal of General Microbiology 126: 193 - 202.
- Delhey, R.; Kiehr, M.; Frayssinet, S.; García Lorenzana, U.; Ramila, G.; Zappacosta, D.; Negrín, D.; Valdez, N.; Haag, V. y Kroneberger. 2007. Desarrollo de un test para pronosticar la intensidad de carbonilla (*Aspergillus niger*) en bulbos de cebolla. Horticultura Argentina 56: 56.
- El-Nagerabi S. A. F. and Ahmed A. H. M. 2003. Storability of Onion Bulbs Contaminated by *Aspergillus niger* Mold. Phytoparasitica 31 (5): 515 - 523.
- Frisvad J. C., Smedsgaard J., Samson R. A., Larsen T. O., and Thrane U. 2007. Fumonisin B2 Production by *Aspergillus niger*. J. Agric. Food Chem. 55: 9727 - 9732.
- Galbraith. J. C . and Smith J. E. 1969. Filamentous growth of *Aspergillus niger* in submerged shake culture. Transactions of the British Mycological Society 52: 237-246.
- Griffin D. H. 1992. Fungal Physiology. Ed. Wiley Science Paper Back Series. Pp. 472.
- Hayden N. J. and Maude R. B. 1992. The role of seed-borne *Aspergillus niger* in transmission of black mould of onion. Plant Pathology 41: 573 - 581.
- Hayden N. J., Maude R. B. and Proctor F. J. 1994a. Studies on de biology of black mould (*Aspergillus niger*) on temperate and tropical onions. 1. A comparison of sources of the disease in temperate and tropical field crops. Plant Pathology Vol. 43: 562 - 569.
- Hayden N. J., Maude R. B. and Proctor F. J. 1994b. Strategies for the Control of Black Mould (*Aspergillus niger*) on Stored Tropical Onions. Acta Hort. (ISHS) 358: 271 - 274.
- Hoftun, H. 1993. Internal atmosphere and watery scales in onion bulbs (*Allium cepa* L.). Acta Hort. (ISHS) 343:135-140. http://www.actahort.org/books/343/343_30.htm.
- Kierownik J. 1990. Pulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus niger*. Pneumonol. Pol. 58: 328333.
- Ko S. S., Huang J. W., Wang J. F., Chang W. N. and Shanmugasundaram S. 2002. Evaluation of Onion Cultivars for Resistance to *Aspergillus niger*, the Causal Agent of Black Mold. American Society for Horticultural Science Journal Vol. 127 (4): 697 - 702.
- Lahoz R., Ballesteros A. M. and Jimeno L. 1974. Influence of Temperature on the Autolytic Phase of Growth of *Aspergillus niger*. Annals of Botany 38: 661 - 666.
- Little T. M. and Hills F. J. 1983. Métodos Estadísticos para la Investigación en la Agricultura. Ed. Trillas. México.
- Lorbeer J. W. 2000. Nature and Source of Inoculum of *Aspergillus niger* Causing the *Aspergillus* Black Mold Disease of Onions in New York. Results of the 2000 Agricultural Extension and Research Projects Funded by the New York State IPM Program.

- Mata-Gómez M., Rodríguez L. V., Ramos E., Renovato J., Cruz-Hernández M., Rodríguez R., Contreras J. and Aguilar C. 2009. A Novel Tannase from the Xerophilic Fungus *Aspergillus niger* GH1. J. Microbiol. Biotechnol. doi: 10.4014/jmb.0811.615.
- Parra R., Aldred D., Arched D. B. and Magan N. 2004. Water activity, solute and Temperature modify growth and spore production of wild type and genetically engineered *Aspergillus niger* strains. Enzyme and Microbial Technology 35: 232 - 237.
- Parra R. and Magan N. 2004. Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds. Journal of Applied Microbiology 2004, 97, 429-438.
- Pozzo Ardizzi, M. C., Aschkar G., Pellejero G., Gil M. I., Abrameto M., van Konijnemburg A. y Sidotti B. 2004. Incidencia de enfermedades en bulbos de cebolla durante la post-cosecha. VI Reunión Científica de la Cebolla del MERCOSUR. Villa de Merlo, San Luis.
- Richard J. L., Thurston J. R., Peden W. M. and Pinello C. 1984. Recent studies on aspergillosis in Turkey poults. Mycopathologia 87: 311.
- Sinclair P. J. and Letham D. B. 1996. Incidence and sites of visible infection of *Aspergillus niger* on bulbs of two onion (*Allium cepa*) cultivars. Australasian Plant Pathology 25 (1) 8 - 11.
- Tanaka K. 1991. Studies on the Black Mold Disease of Onion Bulbs Caused by *Aspergillus niger* van Tieghem. Bull. Fac. Agr. Saga Univ. 70: 1 - 54.
- Topping M. D., Scarisbrick D., Miuczyznska C., Clarke E. and Deaton E. 1985. Clinical and immunological reactions to *Aspergillus niger* among workers at a biotechnology plant. Brit. Jour. Ind. Med. 42: 312318.
- Tyson J. L. and R. A. Fullerton. 2004. Effect of Soil-Borne Inoculum on Incidence of Onion Black Mould (*Aspergillus niger*). New Zeland Plant Protection 57: 138 - 141.
- van Konijnembur A. and Pozzo Ardizzi M. C. 1997. Variables Which Influence the Incidence of Black Mould (*Aspergillus niger*) on Onions bulb in the Lower Valley of the Rio Negro River. Acta Horticulturae Nro. 433: 635 - 638.
- Walker J. C. 1925. Studies on Disease Resistance in the Onion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 11: 183 - 189.
- Yoo K. S., Andersen C. R. and Pike L. M. 1997. Internal CO₂ concentrations in onion bulbs at different storage temperatures and response to sealing of the neck and base. Postharvest Biology and Technology 12: 157 - 163.