

Tesis de Maestría

Determinación de hongos alterantes en nueces de pecan de producción nacional

Larre, María Alejandra

2010

Tesis presentada para obtener el grado de Magister de la
Universidad de Buenos Aires en Bromatología y Tecnología
de la Industrialización de los Alimentos de la Universidad de
Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Larre, María Alejandra. (2010). Determinación de hongos alterantes en nueces de pecan de producción nacional. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4801_Larre

Cita tipo Chicago:

Larre, María Alejandra. "Determinación de hongos alterantes en nueces de pecan de producción nacional". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4801_Larre

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

BIBLIOTECA CENTRAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Y NATURALES / UBA

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Orgánica

DETERMINACION DE HONGOS ALTERANTES EN NUECES DE PECAN
DE PRODUCCION NACIONAL

Tesis presentada para optar al título de
Magister en Bromatología y Tecnología de la
Industrialización de los Alimentos

Ing. Agr. María Alejandra Larre

Director de Tesis: Dr. Ricardo Comerio

Co Directora de Tesis: Dra. Graciela Vaamonde

6/09/2010

Exple 474.311/2002

Buenos Aires, 2010

80607_

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), que a través del aporte económico del Proyecto Nacional de Frutales 3192, sustentó este trabajo.

Al Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola del INTA en cuyas instalaciones realicé la presente Tesis. En especial a su Director, Dr. Roberto Lecuona.

A los Ingenieros Ernesto Madero y Enrique Frusso de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Delta del Paraná, por la información brindada y por facilitarme las muestras de nueces de pecán analizadas en este estudio.

A mis directores, el Dr. Ricardo Comerio y la Dra. Graciela Vaamonde, por el apoyo y los conocimientos que me brindaron.

A la Lic. Estela Favret del IMyZA por su colaboración en la búsqueda bibliográfica.

A Juan Carlos Torres del IMyZA por su asistencia técnica.

A mis compañeros de Maestría y en particular a Stella Romero.

A la Dra. María Amanda Villaverde.

A Osvaldo Gross y Lionel Bondulich que despertaron en mí la curiosidad por la tecnología de los alimentos que me llevó a cursar esta Maestría.

Y a mi familia, en especial a Patricia, que tanto me ayudó y me alentó en mi carrera profesional.

INDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCION	3
I.1. ORIGEN DEL CULTIVO DE PECAN	3
I.2. DESCRIPCION BOTANICA	5
I.3. VALOR NUTRICIONAL	6
I.4. CULTIVO Y COMERCIALIZACION	7
I.5. SITUACION ACTUAL DE LA PRODUCCION DE PECANES EN EL MUNDO	10
I.6. DESARROLLO DEL CULTIVO DE PECAN EN LA ARGENTINA.....	12
I.7. PERSPECTIVAS DE COMERCIALIZACION	16
I.8. ANTECEDENTES SOBRE EL ANALISIS MICROBIOLOGICO DE NUECES DE PECAN.....	17
I.9. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO	20
II. MATERIALES Y METODOS	21
II.1. ANALISIS DE NUECES DE PECAN VISIBLEMENTE ALTERADAS	21
II.1.1. Muestras	21
II.1.2. Obtención aséptica de las semillas	21
II.1.3. Análisis cualitativo	23
II.1.4. Análisis cuantitativo.....	25
II.2. ANALISIS DE PECANES EN BUEN ESTADO DE CONSERVACION	26
II.2.1. Muestras	27
II.2.2. Obtención aséptica de las semillas.....	27
II.2.3. Análisis cualitativo	28
II.2.4. Análisis cuantitativo	28
II.3. ANALISIS DE NUECES ADQUIRIDAS EN EL MERCADO	29
II.3.1. Muestras	29
II.3.2. Obtención aséptica de las semillas.....	29
II.3.3. Análisis cualitativo	29
II.3.4. Análisis cuantitativo	29
II.4. ANALISIS DE FLORES FEMENINAS	30
II.4.1. Muestras.....	30
II.4.2. Tratamiento de las flores	30
II.4.3. Siembra e incubación	30
II.4.4. Identificación genérica y obtención de cultivos puros	30
II.4.5. Identificación de especies.....	30
III. RESULTADOS Y DISCUSION.....	31
III.1. ANALISIS DE PECANES VISIBLEMENTE ALTERADOS.....	32
III.1.1. Análisis cualitativo.....	32
III.1.2. Análisis cuantitativo.....	36
III.2. ANALISIS DE PECANES EN BUEN ESTADO DE CONSERVACIÓN	37
III.2.1. Análisis cualitativo	37
III.2.2. Análisis cuantitativo	42
III.3. ANALISIS DE NUECES ADQUIRIDAS EN EL MERCADO	44
III.3.1. Análisis cualitativo	44
III.3.2. Análisis cuantitativo	46
III.4. ANALISIS DE FLORES DE PECAN.....	47
IV. CONCLUSIONES	50
V. APENDICES	51
APENDICE 1: ESQUEMAS DE SIEMBRA UTILIZADOS PARA LA DETERMINACION DE LAS ESPECIES FUNGICAS PRESENTADAS.....	51
APENDICE 2: COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO, LIQUIDOS DE MONTAJE, SOLUCIONES Y REACTIVOS.....	59
APENDICE 3: CLAVE PARA LA IDENTIFICACION DE GENEROS FUNGICOS PRESENTES EN NUECES Y FLORES DE PECAN	67
VI. BIBLIOGRAFIA	73

RESUMEN

El pecán, *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch, originario del centro y este de EE.UU y de los valles de los principales ríos de México, fue introducido en la Argentina en el siglo XIX por Domingo Faustino Sarmiento. En la actualidad es un cultivo con un fuerte potencial de desarrollo en la Argentina con promisorias posibilidades de comercialización. Hasta el presente, en nuestro país no se han realizado estudios sistemáticos sobre la calidad microbiológica de las nueces de pecán. Este trabajo representa una contribución al estudio de la micota de las nueces de producción argentina.

Se analizaron dos muestras, de 200 nueces de pecán cada una, en avanzado estado de deterioro de las que se aislaron e identificaron las especies fúngicas capaces de establecer relaciones saprofitas con la nuez durante su almacenamiento. Se realizaron, además, recuentos fúngicos con el objeto de establecer niveles de contaminación vinculados con situaciones de deterioro manifiesto. De una de las muestras, cosechada en 2004, se obtuvieron 124 aislamientos encontrándose con más frecuencia los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria* y *Eurotium*. De la segunda muestra, cosechada en 2005, se obtuvieron 33 aislamientos, siendo los géneros más frecuentes *Neofusicoccum* y *Alternaria*. Los recuentos de hongos en ambas muestras resultaron ser muy elevados ($> 10^4$ ufc/g).

En una segunda etapa se analizaron catorce muestras de nueces de pecán frescas de 1 kg cada una. En una baja proporción de estas nueces se pudo detectar a simple vista la presencia de lesiones que, en la mayoría de los casos, se vincularon con la presencia de hongos. De estas lesiones se obtuvieron 42 aislamientos, siendo *Neofusicoccum* el género que

se manifestó en mayor proporción. Entre las especies de otros géneros aislados cabe destacar la presencia de algunas potencialmente toxicogénicas como *Penicillium crustosum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum* y *F. equiseti*. Todas las muestras analizadas presentan valores de recuento inferiores a 10^4 ufc/g y casi el 80% de las muestras dieron valores inferiores a 10^3 ufc/g. En base a los resultados obtenidos, se sugirió un plan de muestreo de tres clases.

El estudio de las nueces se completó con el análisis de dos muestras de 100g de nueces peladas, una muestra de 250 g de nueces con cáscara y una muestra de 500 g de nueces peladas envasada al vacío que fueron adquiridas en comercios de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Los géneros fúngicos aislados fueron *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Neofusicoccum*, *Eurotium*. En cuanto al recuento combinado ninguna de las muestras comerciales superó el recuento de 10^4 ufc/g.

Finalmente, y como una aproximación al tema, se realizó un estudio de la contaminación de 100 flores femeninas de pecán con el objeto de analizar a este órgano como una posible vía de infección.

I. INTRODUCCION

I.1. ORIGEN DEL CULTIVO DE PECAN

El pecán, *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch¹, es el único nogal originario de América del Norte y es considerado como la especie de producción de nuez más valiosa de ese subcontinente.

Inicialmente, su distribución ocupaba una región que abarcaba las costas del río Mississippi y sus afluentes, en los estados de Illinois, Indiana, Missouri, Kansas, Kentucky, Alabama, Oklahoma, Arkansas, Louisiana y Texas, llegando hasta la costa del Golfo de México. También se encontraron regeneraciones en zonas más alejadas como Zaachila, en Oaxaca, México (Figura I.1).

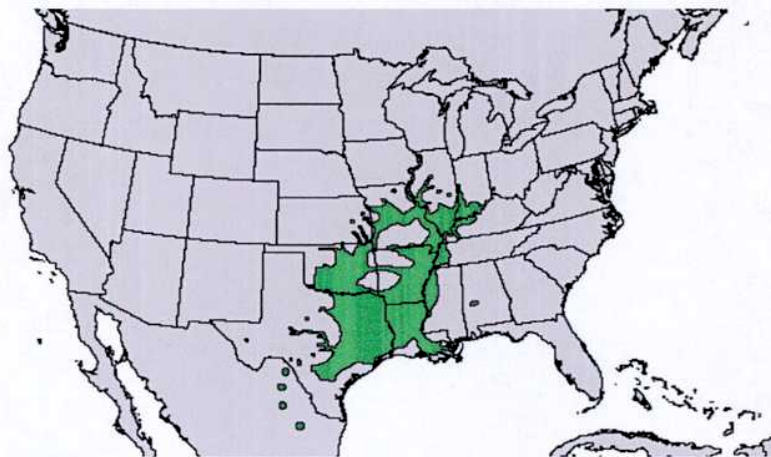


Figura I.1: Distribución geográfica originaria de *Carya illinoensis*

Fuente: Little, E. L. (1971)

Semillas y hojas de pecán fueron encontradas junto con herramientas de uso humano dentro de Baker's Cave en el río del Diablo en Val Verde, Texas y se determinó que su antigüedad se remontaba a 6100 años. Debido a su disponibilidad, muchas tribus indígenas

¹ Nomenclatura según United States Department of Agriculture (USDA). National Resources Conservation Service.

de EE.UU y México lo utilizaban como una de sus principales fuentes de alimento durante el otoño. De hecho su nombre, de origen indio, significa *“la nuez que requiere una piedra para romperse”*. Las primeras ponderaciones sobre el potencial económico del pecán fueron realizadas hacia finales del siglo XVIII por colonos franceses y españoles instalados a lo largo de la costa del Golfo de México. Los primeros cultivos comerciales en EE.UU fueron implantados en Long Island en 1772 y en esos años también fue adoptada como la especie predominante de los jardines de las fincas de la época, como las de los presidentes George Washington y Thomas Jefferson. En 1802 se realizaron las primeras exportaciones de nueces hacia Europa y en Londres se lo comenzó a considerar como *“un árbol que merece ser tenido en cuenta como cultivo”*. En 1846, un esclavo africano que se desempeñaba como jardinero en Louisiana, logró, mediante un injerto, la multiplicación de una planta de pecán seleccionada. Esta variedad fue llamada *“Centennial”* y de ella se realizó una plantación de 126 ejemplares que se convirtió en el primer cultivo con plantas de variedades injertadas. A partir de 1880 comenzaron a desarrollarse viveros que producían plantas injertadas tanto en Louisiana como en Texas (Madero, 2007).

Además, el pecán es un árbol multipropósito: las semillas de su fruto, conocidas como *“nueces”*, tienen un exquisito sabor y un alto valor nutritivo; su aceite, usado en la fabricación de drogas y cosméticos, también es comestible. El árbol tiene aptitud ornamental y su madera, además, es utilizada en ebanistería, parquets, cabos de herramientas y para la fabricación de madera terciada (Madero, 2007).

I.2. DESCRIPCION BOTANICA

El pecán, que pertenece a la familia Juglandáceas, es una planta diclino monoica de gran porte. Sus flores masculinas están dispuestas en amentos, mientras que las femeninas se reúnen en un corto número sobre las ramitas nuevas. Su fruto (Foto I.1), una drupa de 3 a 5 cm de largo, está formado por un embrión o semilla (parte comestible), un endocarpio liso y delgado (cáscara de la nuez) y un epicarpio y mesocarpio carnosos los cuales se abren a la madurez en cuatro valvas longitudinales (ruezn).



Foto I.1. Fruto de pecán

Sus hojas alternas, imparipinadas están compuestas por 11 a 17 folíolos asimétricos, oblongo-lanceolados, falcados y aserrados (Parodi, 1972). La figura I.2 muestra una rama, la inflorescencia y la flor masculina y el fruto del pecán.

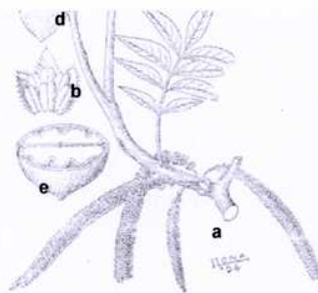


Figura I.2: a. Rama e inflorescencia masculina, b: flor masculina, c y d: fruto, e: corte del fruto
Fuente: Parodi, L. (1972)

I.3. VALOR NUTRICIONAL

La nuez de pecán está incluida dentro del grupo de alimentos de alto valor proteico junto con la carne, el pescado, los huevos y las legumbres. Tiene altos contenidos de gama tocoferol (una de las formas químicas de la vitamina E), taninos condensados y proantocianidinas. Contiene más de 19 vitaminas y minerales, incluyendo vitamina A, vitamina E, ácido fólico, calcio, fósforo, magnesio, potasio, vitamina B y zinc. Además, posee casi el 50% de ácidos grasos monoinsaturados, entre los que se destaca el ácido oleico (omega-9). Por otra parte, una porción de aproximadamente 30 gramos de pecán provee el 10% de la fibra recomendada en la dieta diaria de un individuo adulto (National Pecan Shellers Association, 2009).

Las tablas I.1 y I.2 muestran el valor nutricional de las nueces de pecán.

Tabla I.1: Valor nutricional de la nuez de pecán (cada 100 g)

Calorías		667	
Agua	4,82 g	Vitamina B6 – Piridoxina	0,188 ng
Proteínas	7,75 g	Folacina	32,9 microg
Hidratos de Carbono	18,2 g	Acido Pantoténico	1,70 mg
Fibra	1,6 g	Vitamina C	2,00 ng
Lípidos totales	67,7 g	Vitamina E	3,15 mg
Lípidos saturados	5,42 g	Calcio	0,036 g
Lípidos Monoinsaturados	42,2 g	Cobre	1,19 ng
Lípidos Poliinsaturados	16,8 g	Hierro	2,13 ng
Colesterol	0 mg	Magnesio	0,128 g
Vitamina A	12,8 RE	Fósforo	0,291 g
Tiamina	0,848 ng	Potasio	0,392 g
Riboflavina	0,128 ng	Selenio	5,09 microg
Niacina	0,887 ng	Sodio	0,926 mg
		Zinc	5,47 mg

Fuente: Santerre, Ch. R. (1994).

Tabla I.2: Amino ácidos esenciales de la nuez de pecán (en 100 g)

Isoleucina	0,322 g
Leucina	0,520 g
Lisina	0,292 g
Metionina	0,186 g
Fenilalanina	0,409 g
Treonina	0,253 g
Triptofano	0,199 g
Valina	0,386 g

Fuente: Santerre, Ch. R. (1994).

I.4. CULTIVO Y COMERCIALIZACION

El pecán se desarrolla en climas húmedos. Tolerar un mínimo de precipitación anual de aproximadamente 750 mm, mientras que el máximo se ubica en el orden de 2000 mm,

debiendo producirse durante la estación de crecimiento por lo menos 500 mm de precipitación. La temperatura media del verano puede alcanzar hasta 27 °C, con valores extremos entre 41 y 46 °C y la del invierno varía entre -1 y 10 °C, con extremos entre -18 y -29 °C (Peterson, 1990). Requiere suelos ricos, de texturas medias y pH aproximado de 5,6 a 6. Es un árbol que puede alcanzar una altura de entre 20 y 30 m y el diámetro de su copa puede llegar a medir entre 10 y 15 m. Esta magnitud determina que su cultivo se realice con una separación entre plantas de 10 a 15 metros (p. ej. grillas de 10 x 10 o 15 x 15 m). Las plantaciones se hacen con ejemplares injertados que garantizan una mayor producción y una mejor calidad que la obtenida de los árboles silvestres.

En Argentina, el pecán puede ser plantado desde junio hasta mediados de agosto y es de gran importancia la procedencia de las plantas, la identificación varietal y el estado sanitario de las mismas.

Las flores femeninas y las masculinas de un mismo cultivar no maduran al mismo tiempo (dicogamia), lo que dificulta la polinización. Por esto, es muy importante conocer los períodos de liberación del polen y de receptividad de los estigmas de cada cultivar, para poder ubicar en el campo los cultivares más adecuados que permitan una polinización cruzada.

En este sentido, el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) ha establecido los períodos de floración de once cultivares con información recopilada en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Delta del Paraná.

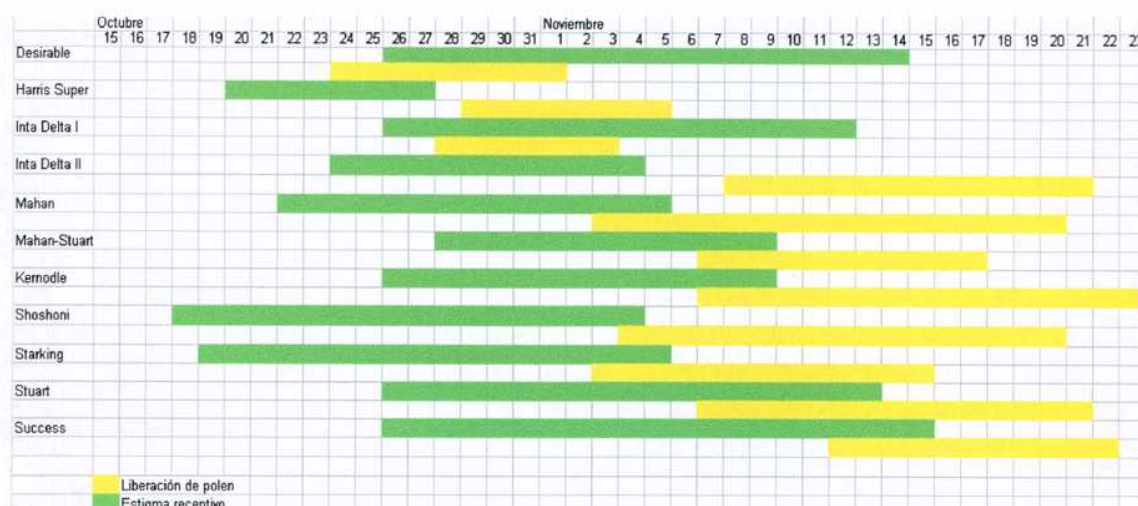


Figura 1.3: Períodos de floración de diferentes cultivares
Fuente: INTA-PROPECAN (2009)

En la figura 1.3 puede observarse, por ejemplo, que el cultivar Desirable es “protandro”, es decir que libera el polen en forma temprana, mientras que el cultivar Success es “protogino”, o sea que primero maduran las flores femeninas (estigma receptivo) y luego es liberado el polen en forma tardía. La utilización de distintas variedades es necesaria para lograr una polinización adecuada. Un factor muy importante en la planificación de la plantación y la ubicación de los cultivares es el de los vientos predominantes en la época de la floración.

El riego es imprescindible para garantizar la supervivencia inicial de los árboles y es la herramienta que garantiza la obtención de cosechas consecutivas y abundantes. El mismo deberá ser proyectado para satisfacer las necesidades de las plantas a lo largo de toda su vida productiva. En los primeros años la planta debe ser cuidada de los ataques de hormigas, insectos voladores y liebres. Es necesario realizar una poda de formación para lograr un eje vertical dominante y copas equilibradas que en el futuro resistan el peso de los frutos y soporten el viento. En cuanto a la producción de nueces, la alternancia es muy ca-

racterística de esta especie, dando una muy alta producción un año y una baja producción al año siguiente. La obtención de frutos demanda entre 5 y 6 años, con rendimientos de 40 a 80 kg por ha, considerando una distancia de plantación de 15 x 15, lo que implica una densidad de 45 plantas por hectárea y una producción de 0,9 a 2 kg/planta. Luego de 10 años se puede esperar una producción del orden de 400 a 500 kg/ha, con un rendimiento por planta de 10 a 11 kg, mientras que a los 15 años se estima una producción de 900 a 1.000 kg/ha, con un rendimiento por planta de 20 a 24 kg. A partir del año 15 deberá analizarse la necesidad de efectuar podas de aclareo a fin de mantener los niveles de rendimiento. La producción seguirá aumentando de año en año llegando a los 1.800 a 2.000 kg/ha a los 20 a 25 años, con un rendimiento por planta de 40 a 50 kg (Madero & Frusso, 2002).

La aplicación de buenas prácticas sanitarias a través de la producción, la manipulación y el procesamiento es esencial para mantener una buena calidad microbiológica de las nueces. Las precauciones incluyen recoger las nueces del suelo apenas caen del árbol, secarlas lo más rápidamente posible hasta un valor de humedad del 4,3% y realizar un almacenamiento a un valor de humedad relativa del 65% o menos en refrigeración o congelación (Beuchat, 1994).

1.5. SITUACION ACTUAL DE LA PRODUCCION DE PECANES EN EL MUNDO

En la actualidad, EE.UU es el mayor productor de pecanes del mundo (80% de la producción total), siendo los mayores productores los estados de Georgia, Texas y Nuevo México. Otros países productores son Australia, Brasil, Israel, Perú y Sudáfrica (Madero, 2007).

Además, EE.UU es un importante importador de pecanes (35.642 toneladas en 2007), especialmente desde México y, también, un importante exportador (37.053 toneladas en 2007) hacia México (nueces con cáscara que luego de peladas son reimportadas a EE.UU), China, Canadá y la Unión Europea. Estos dos últimos son los mayores compradores de nueces peladas.

La Tabla I.3 muestra la producción, importación, exportación y consumo per cápita de la nuez de pecán en EE.UU desde 1980 hasta el año 2007.

Tabla I.3: Producción, importación, exportación y consumo de nueces de pecan en EE.UU (en miles de libras)

AÑO	STOCK INICIAL	PRODUCCION	IMPORTACION	TOTAL	CONSUMO INTERNO	EXPORTACION	STOCK FINAL
1980/81	47.245	85.144	952	133.341	97.824	4.665	30.852
1981/82	30.852	149.882	849	181.583	103.983	4.194	73.406
1982/83	73.406	102.742	1.625	177.773	113.186	7.298	57.289
1983/84	57.289	122.580	5.789	185.658	112.567	3.376	69.715
1984/85	69.715	108.531	1.934	180.180	127.090	2.720	50.370
1985/86	50.370	110.958	14.298	175.626	113.410	2.264	59.952
1986/87	59.952	125.442	10.918	196.312	130.134	2.755	63.423
1987/88	63.423	121.136	12.966	197.525	131.071	3.935	62.520
1988/89	62.520	135.030	2.718	200.267	123.598	5.885	70.785
1989/90	70.785	101.989	15.855	182.764	114.996	11.215	58.260
1990/91	58.260	97.530	26.235	186.284	122.599	17.740	45.892
1991/92	45.892	118.933	20.480	183.550	116.750	17.082	49.585
1992/93	49.585	74.147	31.099	154.043	89.347	15.045	48.160
1993/94	48.160	156.896	21.728	228.971	137.075	17.213	76.731
1994/95	76.731	86.233	34.221	195.576	127.082	13.739	55.035
1995/96	55.035	122.191	32.604	204.938	101.672	18.311	85.907
1996/97	85.907	93.894	27.064	207.925	128.633	19.838	59.723
1997/98	59.723	148.141	35.621	244.261	125.426	22.011	98.027
1998/99	98.027	65.501	40.383	205.183	134.941	17.605	50.283
1999/00	50.283	160.396	28.963	239.119	110.001	20.335	110.265
2000/01	110.265	92.647	32.990	239.809	133.160	20.045	86.084
2001/02	86.084	145.580	35.456	263.701	136.637	24.972	104.772
2002/03	104.772	78.444	41.672	223.534	123.608	30.523	68.385
2003/04	68.385	116.968	62.719	245.608	121.843	34.169	92.400
2004/05	41.177	82.552	81.017	204.746	116.834	30.565	57.346
2005/06	57.346	122.622	75.270	255.238	148.265	37.745	69.228
2006/07	69.228	90.949	85.888	246.066	148.708	37.447	59.911

Fuente: USDA (2009)

En la Figura I.4 se puede observar una de las características principales de la producción norteamericana de pecanes, que es su alternancia marcada año a año. La producción de

plantas nativas incide en este hecho, ya que una cuarta parte de la producción general proviene de ese origen. Esta alternancia se refleja también en el Producto Bruto anual, aunque las caídas de producción no se reflejan proporcionalmente en la baja de valor ya que la ley de oferta y demanda eleva los precios a menor oferta de producto (USDA, 2009).

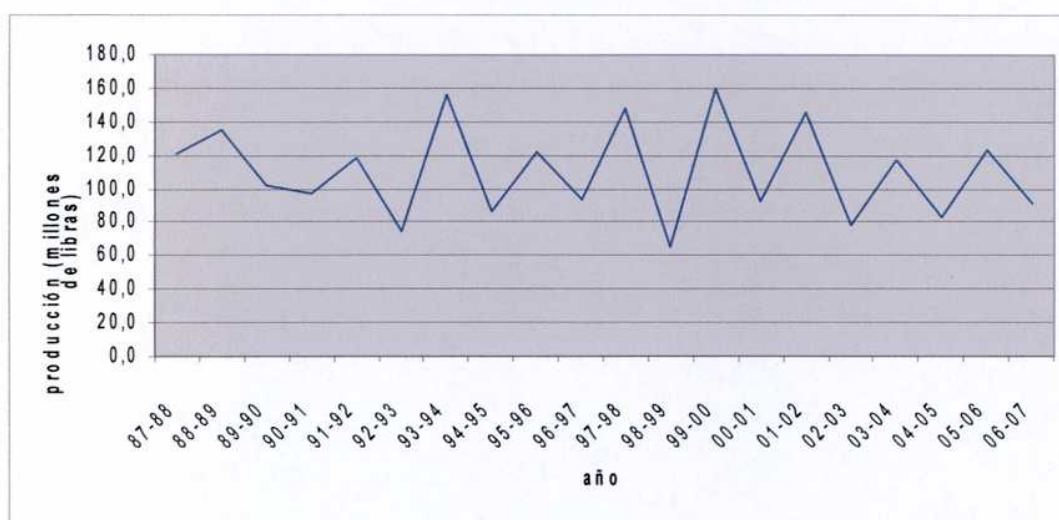


Figura I.4: Alternancia en la producción de pecanes
Fuente: USDA (2009)

1.6. DESARROLLO DEL CULTIVO DE PECAN EN LA ARGENTINA

El pecán fue introducido en la Argentina en el siglo XIX por Domingo F. Sarmiento. En el Delta del Río Paraná, en la Provincia de Buenos Aires, las plantaciones más antiguas fueron implantadas por un grupo de ingleses en 1918, en el lugar donde se había instalado la empresa *Tigre Packing*. En la década de 1950, el Ministerio de Hacienda, Economía y Previsión de la Provincia de Buenos Aires, envió semillas obtenidas del vivero del bosque de La Plata y de la empresa *Tigre Packing* a varios sitios, entre los que se encontraban el vi-

vero forestal de Junín, el de Sierra de la Ventana y el vivero forestal situado en el canal Laurentino Comas del Delta Bonaerense, donde luego se crearía la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Delta del Paraná del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). En esos años, esa Estación Experimental realizó una intensa campaña de distribución de semillas entre los isleños y, actualmente, esas plantas se encuentran diseminadas por el Delta Inferior desde el Tigre hasta el arroyo Ñancay sobre el río Uruguay (Madero & Frusso, 2002).

En 1999, mediante el aporte del INTA y el Fondo Tecnológico Argentino – FONTAR, se inició la ejecución del Proyecto PROPECAN con la finalidad de promover el desarrollo de plantaciones de pecán en la Argentina. Este proyecto tiende al desarrollo de un completo paquete tecnológico para el manejo del cultivo, que abarca desde los aspectos productivos hasta el estudio de la cadena de comercialización y mercados, tanto internos como externos. En el INTA, el Instituto de Recursos Biológicos está desarrollando la identificación de cultivares a través de marcadores moleculares, los Institutos de Suelos y de Clima y Agua realizan la demarcación de zonas aptas para el cultivo y el Instituto de Tecnología de Alimentos investiga sobre la conservación durante el período de post cosecha de la nuez. La etapa experimental de la presente tesis, enfocada sobre la calidad higiénico-sanitaria de las nueces, con particular énfasis en la contaminación fúngica, se realizó en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola. Además, la EEA Delta del Paraná cuenta con un vivero de 4 ha que ofrece a los productores plantas de variedades de alto rendimiento, calidad y sanidad para distintas zonas del país. Actualmente dispone de 14 cultivares, de los cuales INTA Delta I e INTA Delta II fueron seleccionados en esa estación.

PROPECAN y la Cátedra de Climatología y Fenología Agrícola de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires han realizado la zonificación termo hídrica del territorio argentino, señalando las zonas más aptas para este cultivo que se muestran en la Figura 1.5.

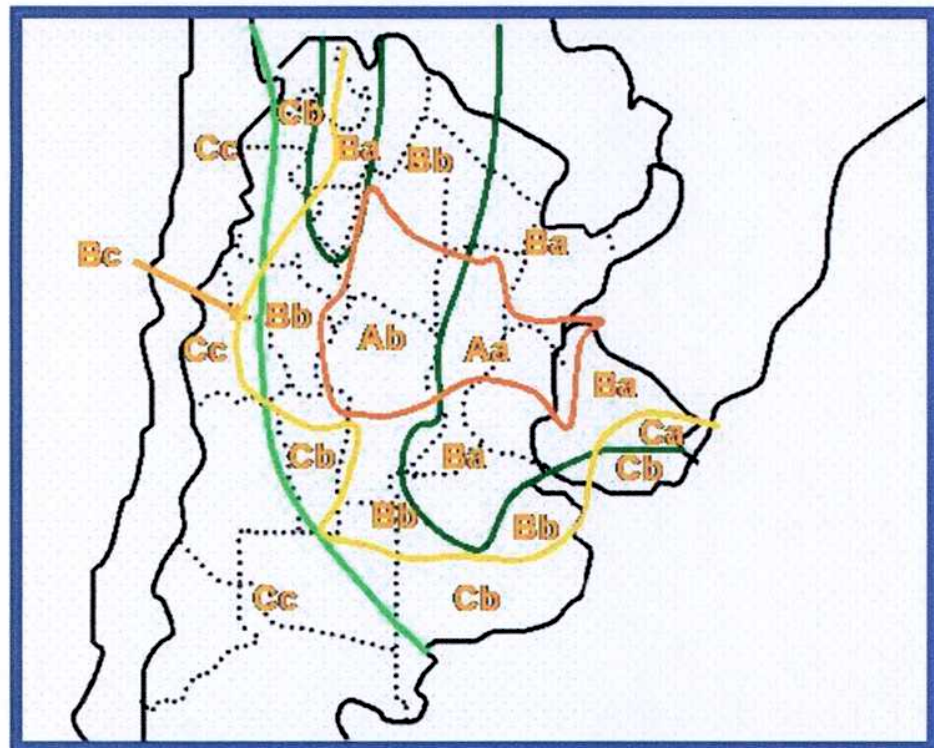


Figura 1.5: Zonas aptas para el cultivo de pecán en Argentina

Referencias: Aa: óptima seco; Ab: óptima riego complementario; Ac: óptima riego obligatorio; Ba: apta seco; Bb: apta riego complementario; Bc: apta riego obligatorio; Ca: marginal seco; Cb: marginal riego complementario; marginal riego obligatorio

Fuente: INTA-PROPECAN.

El mapa anterior muestra que el clima argentino ofrece una amplia gama de condiciones aptas para el cultivo del pecán, que abarca una importante superficie en el norte y centro del país.

Un buen aprovechamiento de estas disponibilidades agroclimáticas posibilitaría la emergencia de Argentina como uno de los principales productores de esta especie, especial-

mente a través de la posibilidad de producir en contraestación con respecto a los países del Hemisferio Norte.

El INTA estima que en Argentina hay actualmente plantadas unas 6.500 ha de pecanes (Enrique Frusso, comunicación personal) y que su cultivo tiene un amplio horizonte de desarrollo en nuestro país, observándose un incremento anual de entre 150 a 300 ha (INTA-PROPECAN, 2009).

Las principales zonas de plantación se encuentran en las provincias de Buenos Aires, Corrientes, Córdoba, Entre Ríos y Santa Fe. La participación por provincias o regiones aparece en la Tabla I.4.

Tabla I.4: Participación de las provincias argentinas en la plantación de pecanes

PROVINCIA	AREA PLANTADA (%)
Buenos Aires - continente	40
Buenos Aires - Delta del Paraná	19
Entre Ríos	23
Corrientes, Córdoba y Santa Fe	12
Chaco, Salta, Santiago del Estero y Formosa	3
Otros	3

Fuente: INTA-PROPECAN (2009)

Con la incorporación de nuevos cultivares, se estima que la próxima área de fuerte expansión de producción del pecán será el Noroeste Argentino.

También se han incorporado nuevos cultivares de ciclo corto, que amplían el área de cultivo hacia la región sur del país: norte de Río Negro y Neuquén y sur de Buenos Aires y La Pampa.

Con el aumento de la producción a través de cultivares comerciales reconocidos, se han comenzado a desarrollar nuevos proyectos de mayor magnitud, así como proyectos de plantas industrializadoras con fuertes inversiones de origen local y externo (INTA-PROPECAN, 2009).

1.7. PERSPECTIVAS DE COMERCIALIZACION

En la Argentina, el rendimiento del pecán se encuentra entre los 1.000 y 1.500 kg/ha en cultivos bajo riego y el precio al productor es de 3 U\$/kg de nueces con cáscara y de 12 U\$/kg de nueces peladas.

En la actualidad, el total producido se comercializa en el mercado interno y hay posibilidades de exportar a China, Europa y EE.UU (Enrique Frusso, comunicación personal).

Se estima que la producción futura de nuestro país deberá encaminarse hacia mercados externos como los EE.UU y México que, como se comentó anteriormente, necesitan contar con nueces frescas en contraestación.

Otros países con demanda creciente de nueces de pecán son Alemania, Inglaterra, España y países latinoamericanos como Brasil, Chile, Uruguay, Perú, Colombia y Venezuela.

También habría que tener en cuenta a países como Japón, China, Turquía, Egipto e India que son buenos consumidores de frutos secos.

Para lograr este fin, se deben desarrollar buenas plantaciones que permitan no sólo buenos rendimientos, sino una muy buena calidad de producto.

Actualmente, en el mercado local se encuentran calidades de producto muy diferentes, por lo que se hace imprescindible el desarrollo de estándares de comercialización y de sistemas de trazabilidad que permitan homogeneizar la calidad del producto e identificar su origen.

1.8. ANTECEDENTES SOBRE EL ANALISIS MICROBIOLOGICO DE NUECES DE PECAN

Al igual que otros tipos de nueces, los pecanes están sujetos a la contaminación microbiana en las etapas precosecha y poscosecha y durante su procesado. Los hongos han sido señalados como los principales agentes de deterioro en algunos productos, tales como almendras, pistachos y nueces (Bayman *et al.*, 2002), castañas de cajú (Freire *et al.*, 1999) y castañas (Overy *et al.*, 2003). En diversos estudios realizados se identificaron hongos potencialmente toxicogénicos como integrantes de la micota de estos productos; la presencia de estos hongos implica un riesgo de exposición a diversas micotoxinas (Sommer *et al.*, 1976; Pitt *et al.*, 1993; Chun *et al.*, 2007). Sin embargo, existen pocos antecedentes en la bibliografía sobre datos provenientes de estudios exhaustivos para determinar la micota presente en nueces de pecán procedentes de distintas localidades y sujetas a variadas condiciones de procesamiento, empaque y sistemas de distribución. Según Beuchat (1994), el trabajo más completo sobre la contaminación fúngica de pecanes ha sido realizado en la Universidad de Georgia, donde se cuantificaron e identificaron los hongos que aparecen desde poco después de la fertilización hasta la maduración del fruto (Huang & Hanlin, 1975). Estos estudios demostraron que los frutos recién formados son invadidos por una variedad de hongos en cuanto comienzan su desarrollo en el árbol. Según se pudo determinar, los hongos presentes en la semilla son muy similares a los que

se hallaban en la “cáscara” (endocarpio), sugiriendo que la infección tiene lugar mientras la nuez se encuentra dentro del fruto entero.

Los géneros que Beuchat (1994) cita como presentes en pecán aparecen en la tabla I.5

Tabla I.5: Géneros de hongos aislados en pecan

<i>Absidia</i>	<i>Emericella</i>	<i>Pestalotia</i>
<i>Alternaria</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>Petriella</i>
<i>Arthrinium</i>	<i>Eurotium</i>	<i>Phoma</i>
<i>Ascochyta</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Plespora</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Geniculisporium</i>	<i>Rhinocladiella</i>
<i>Aureobasidium</i>	<i>Humicola</i>	<i>Rhizopus</i>
<i>Botryodiplodia</i>	<i>Itersonilia</i>	<i>Scopulariopsis</i>
<i>Cephalosporium</i>	<i>Libertella</i>	<i>Sordaria</i>
<i>Chaetomium</i>	<i>Microascus</i>	<i>Syncephalastrum</i>
<i>Cladosporium</i>	<i>Mucor</i>	<i>Talaromyces</i>
<i>Coniothyrium</i>	<i>Nigrospora</i>	<i>Torula</i>
<i>Curvularia</i>	<i>Nodulisporium</i>	<i>Trichothecium</i>
<i>Diaporthe</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Wallemia</i>
<i>Didymella</i>	<i>Periconia</i>	<i>Xylaria</i>
<i>Diplodia</i>		

Fuente: Beuchat (1994)

Hanlin y Blanchard (1974) informaron que los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Pestalotia* y *Phoma* estaban presentes en todas las piezas del fruto de pecán y que aparecían en la mayoría de los aislamientos.

Huang y Hanlin (1975) llevaron adelante un estudio para determinar los hongos asociados con pecanes recién cosechados y pecanes obtenidos en el mercado. Identificaron 44 géneros y 119 especies. En los pecanes recién cosechados las especies de *Penicillium* fueron las más comunes, seguidas por especies de *Aspergillus*, *Pestalotia*, *Rhizopus* y *Fusarium*. En las muestras provenientes del mercado se identificó a *Aspergillus* como el género dominante, siendo *Penicillium* el segundo en predominancia. Estos autores dividieron a las especies de *Penicillium* y *Aspergillus* (teleomorfo: *Eurotium*) en cuatro categorías:

1. *Penicillium* de campo: *P. cyclopium*, serie de *P. decumbens*, *P. steckii* y *P. urticae*.
2. *Penicillium* de almacenamiento: *P. citrinum*, *P. expansum*, *P. lanosum* y *P. roquefortii*.
3. *Aspergillus* de almacenamiento: *A. flavus*, *A. niger* y *A. parasiticus*.
4. *Eurotium* de almacenamiento: *E. repens* y *E. rubrum*.

Consideraron, además, que la presencia de *A. flavus* y *A. parasiticus* en las nueces almacenadas era de importancia para la salud pública debido a la posibilidad de contaminación con aflatoxinas. Asimismo, en relación con la presencia de hongos toxicogénicos, Wells y Payne (1976) examinaron la micoflora en pecanes dañados por gorgojos y encontraron que 3 de 23 aislamientos de *Aspergillus* resultaron tóxicos para pollitos de un día de vida. Por otra parte, ocho extractos tóxicos de especies de *Penicillium* presentaron actividad tremorgénica. Estos hongos toxicogénicos no fueron aislados de la superficie de la nuez, sino del tejido con coloración anormal presente en las adyacencias del daño producido por el insecto.

Koehler *et al.* (1975) obtuvieron 148 aislamientos de *A. flavus* y *A. parasiticus* de 5608 pecanes provenientes de muestras comerciales. El porcentaje de contaminación interna osciló entre 1,7% y 7,3% según la localización del mercado. El 57% de los aislamientos fue capaz de producir aflatoxinas.

Las aflatoxinas son extremadamente resistentes al calor y continúan activas a las temperaturas normales de cocción. Su resistencia a la inactivación fue demostrada por Escher *et al.* (1973) en aceite a 191°C usado para tostar pecanes que contenían aflatoxinas.

1.9. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

El crecimiento comercial de este cultivo, como parte de la agricultura argentina, sugiere sumar aportes que potencien su desarrollo en nuestro país. En este sentido, el estudio cualitativo y cuantitativo de los microorganismos presentes en las semillas contribuiría al establecimiento de niveles de tolerancia (cantidad y tipo de microorganismos admitidos en el producto para su comercialización y consumo). Por otra parte, dicho estudio podría tener impacto en el área de la salud pública.

De acuerdo a todo lo expuesto, los objetivos del presente trabajo fueron:

- Establecer cuáles son las especies fúngicas más frecuentemente involucradas en el deterioro de nueces de pecán de producción argentina.
- Evaluar cuantitativamente el nivel de contaminación fúngica en muestras de diferente procedencia.
- Aportar datos que contribuyan a la evaluación del riesgo de contaminación con micotoxinas de los pecanes del país.

II. MATERIALES Y METODOS

II.1. ANALISIS DE NUECES DE PECAN VISIBLEMENTE ALTERADAS

El estudio de las nueces de pecán (semillas) visiblemente alteradas involucró actividades de muestreo, acondicionamiento de la muestra y análisis cualitativos y cuantitativos. Un esquema general de la metodología empleada se presenta en la figura II.1.

II.1.1. Muestras

Se analizaron dos muestras de nueces de pecán deterioradas cosechadas en la EEA-INTA Delta del Paraná correspondientes a los años 2004 y 2005.

II.1.2. Obtención aséptica de las semillas

Cada muestra, de 200 nueces, se esparció sobre la mesada del laboratorio y se realizó un cuarteo. Se obtuvo una muestra final de 50 nueces de la cosecha 2004 y otra de 25 nueces correspondiente a 2005. Las nueces se lavaron con agua y detergente, se sumergieron durante cinco minutos en etanol 70 % y se abrieron en condiciones asépticas utilizando cascanueces, pinzas y bisturíes flameados con alcohol 96 %. Se tomó cada nuez con una pinza, se flameó y se abrió con un cascanueces. La cáscara (endocarpio) se separó utilizando un bisturí a fin de obtener las semillas destinadas a los análisis cualitativo y cuantitativo.

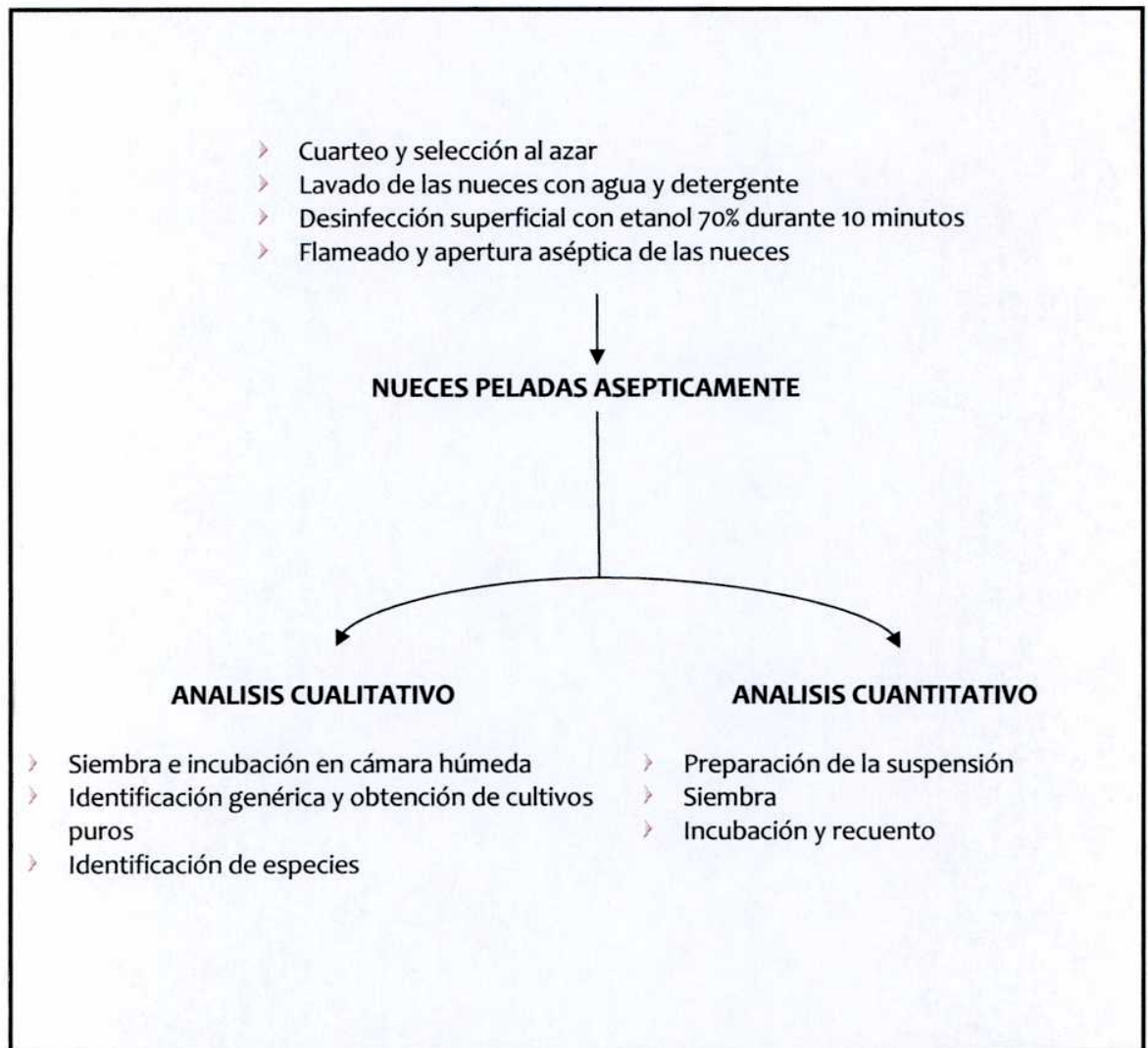


Figura II.1: Metodología de análisis de pecanes visiblemente alterados

II.1.3. Análisis cualitativo

II.1.3.1. Siembra e incubación

Para aislar e identificar las especies fúngicas presentes en las muestras deterioradas se utilizó la metodología de incubación en cámara húmeda.

A modo de cámaras se utilizaron cajas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro. En cada una de ellas se colocó un papel de filtro (Whatman® N° 1). Las cajas se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. El papel de filtro se humedeció con 0,5 ml de agua destilada estéril y en cada caja se colocó asépticamente una semilla. Las cámaras húmedas se incubaron a 25° C, en oscuridad, durante 10 días. A fin de mantener las condiciones adecuadas de cultivo, las cámaras se rehumedecieron diariamente con agua destilada estéril.

II.1.3.2. Identificación genérica y obtención de cultivos puros

Las estructuras vegetativas y reproductivas desarrolladas se observaron utilizando un microscopio estereoscópico Wild M5A. Con el objeto de realizar la identificación preliminar de los géneros fúngicos involucrados, las estructuras reproductivas halladas se montaron entre portaobjetos y cubreobjetos con una gota de azul de anilina al 0,1% en ácido láctico 85%. Los preparados se observaron con un microscopio Zeiss Axiostar Plus. Para la identificación a nivel de género se utilizó Samson *et al.*, 2000.

De acuerdo con la identificación genérica preliminar, se realizaron siembras en diferentes medios agarizados con el propósito de obtener cultivos puros. A fin de estimular la esporulación de los aislamientos se utilizaron los siguientes medios de cultivo: Agar Agua con Hojas de Pino (AAP), Agar Creatinina Sacarosa (CREA), Agar Czapek (CZ), Agar Czapek

Extracto de Levadura (CYA), Agar Czapek Sacarosa 20% (CZ20), Agar Extracto de Levadura Sacarosa (YES), Agar Extracto de Malta (MEA), Agar Extracto de Malta con Sacarosa 20% (M20), Agar Harina de Maíz con Hojas de Banano (BLA), Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Papa Zanahoria (PCA) y Agar Pobre en Nutrientes Sintéticos (SNA), según la metodología descrita en el Apéndice 2. Para tomar material fúngico y lograr los cultivos puros correspondientes, se trabajó bajo el microscopio estereoscópico con agujas de vidrio.

Los cultivos se incubaron durante 7 días a 25°C bajo ciclos de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz ultravioleta, 345-400 nm (Leach, 1971).

II.1.3.3. Identificación de especies

Una vez puros, los aislamientos se sembraron en placas de diferentes medios de cultivo para la determinación de las especies. Se utilizaron cajas de Petri de plástico de 9 cm de diámetro. Como líquido de montaje general se utilizó azul de anilina al 0,1% en ácido láctico 85% (Samson *et al.*, 2000). Para la observación detallada de células conidiógenas producidas en picnidios se utilizó como líquido de montaje eritrosina al 3 % en solución acuosa de hidróxido de amonio al 10 % (Sutton, 1980). Las estructuras fúngicas frágiles se montaron utilizando la técnica de la cinta adhesiva transparente (Samson *et al.*, 2000). Los preparados se observaron con un microscopio Zeiss Axiostar Plus.

En el Apéndice 1 se presentan los esquemas de siembra utilizados para la identificación de las especies pertenecientes a los géneros hallados.

II.1.4. Análisis cuantitativo

II.1.4.1. Preparación de la suspensión

Las semillas de cada muestra se molieron en un molinillo (De Longhi, KG 30) durante 30 segundos. La superficie del vaso de molienda y las cuchillas se desinfectaron utilizando sendos algodones embebidos en hipoclorito de sodio 10 % y etanol 70 %. Diez gramos de material molido se suspendieron en 90 ml de agua peptona 0,1%. El material se dejó humectar durante una hora.

II.1.4.2. Siembra

Se realizaron recuentos combinados en superficie utilizando Agar Diclorán Glicerol 18 % (DG18) en cajas de Petri de plástico de 9 cm de diámetro. La suspensión se agitó manualmente hasta homogeneizar y se tomó 1 ml con una pipeta de vidrio estéril de punta rota. Dicho volumen se repartió en 5 placas, colocando 0,2 ml de suspensión sobre la superficie de cada una de ellas y se distribuyó con espátula de Drigalsky previamente flameada con etanol 96 %.

II.1.4.3. Incubación y recuento

Las cajas se incubaron a 25 °C, bajo ciclos de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz ultravioleta (345-400 nm). Se realizaron dos lecturas del número de colonias desarrolladas: a los tres días de incubación en primer término y a los siete días de incubación en segundo lugar. Se calculó el número de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (ufc/g).

II.2. ANALISIS DE PECANES EN BUEN ESTADO DE CONSERVACION

El estudio de nueces en buen estado de conservación involucró actividades de muestreo, acondicionamiento de la muestra, análisis cualitativos y cuantitativos (Figura II.2).

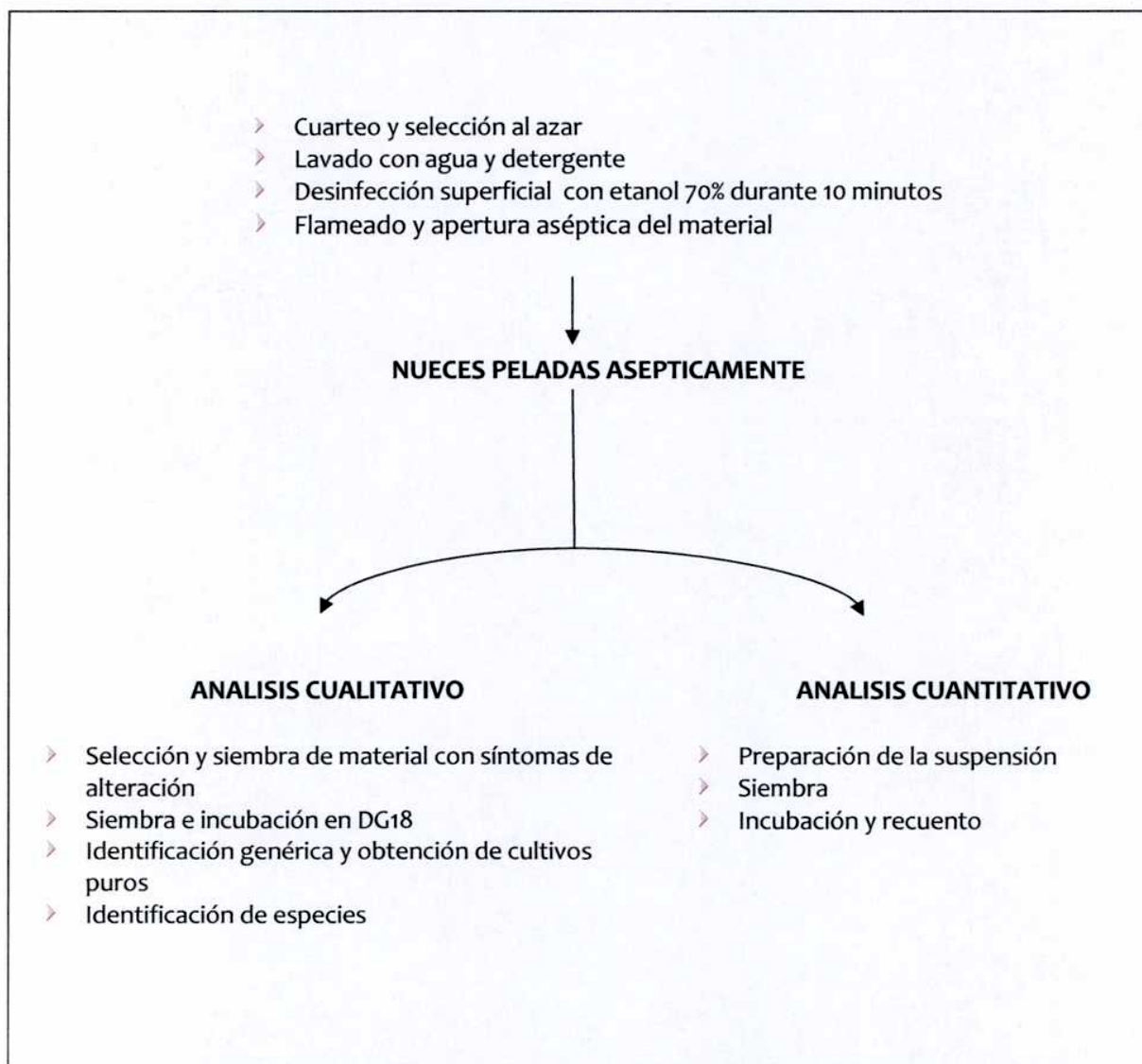


Figura II.2: Metodología de análisis de pecanes en buen estado de conservación

II.2.1. Muestras

Se analizaron catorce muestras de nueces de pecán frescas (1 kg cada una), aportadas por la EEA INTA Delta del Paraná. Las nueces fueron cosechadas en 2005 y 2006 en las Islas del Delta del Paraná (área de influencia de la Estación) y en las localidades de San Pedro, Mercedes y La Plata (Provincia de Buenos Aires) y en Paso de los Libres (Provincia de Corrientes). Las nueces procedían de árboles silvestres y de árboles de algunas de las principales variedades cultivadas en el país. En la tabla II.1 se presentan las características de las muestras analizadas.

Tabla II.1: Muestras de pecan analizadas según año de cosecha, procedencia y variedad o tipo silvestre.

AÑO DE COSECHA	TIPO DE CULTIVO	PROCEDENCIA
2005	Variedad Stuart	Islas del Delta del Paraná – Provincia de Buenos Aires
	Nueces silvestres	San Pedro – Provincia de Buenos Aires
	Nueces silvestres	Paso de los Libres – Provincia de Corrientes
	Nueces silvestres	Mercedes – Provincia de Buenos Aires
2006	Variedad Stuart	Islas del Delta del Paraná – Provincia de Buenos Aires
	Variedad Mahan	Islas del Delta del Paraná – Provincia de Buenos Aires
	Variedad INTA Delta II	Islas del Delta del Paraná – Provincia de Buenos Aires
	Variedad Starking	Islas del Delta del Paraná – Provincia de Buenos Aires
	Variedad Desirable	Islas del Delta del Paraná – Provincia de Buenos Aires
	Variedad Kernodle	Islas del Delta del Paraná – Provincia de Buenos Aires
	Variedad Success	Islas del Delta del Paraná – Provincia de Buenos Aires
	Variedad Harri Super	Islas del Delta del Paraná – Provincia de Buenos Aires
	Variedad Shoshoni	Islas del Delta del Paraná – Provincia de Buenos Aires
	Variedad Starking	La Plata – Provincia de Buenos Aires

II.2.2. Obtención aséptica de las semillas

De cada bolsa con 1 kg de nueces se obtuvieron por cuarteo submuestras de 50 nueces. Las nueces se lavaron con agua y detergente, se sumergieron durante cinco minutos en etanol 70% y se abrieron en condiciones asépticas utilizando cascanueces, pinzas y bistu-

ríes flameados con alcohol 96%. Se tomó cada nuez con una pinza, se flameó y se abrió con un cascanueces. La cáscara (endocarpio) se separó utilizando un bisturí.

II.2.3. Análisis cualitativo

En aquellos casos en que se observó que las nueces presentaban manchas, cambios de color o tejido rugoso se tomó una pequeña fracción del material alterado para su análisis cualitativo, destinándose el resto de la muestra a la molienda para el análisis cuantitativo.

II.2.3.1. Selección y siembra de material con síntomas de alteración

Se tomaron asépticamente, con un bisturí, pequeños fragmentos de los bordes de lesiones de distintas nueces y se sembraron asépticamente en placas de DG18.

II.2.3.2. Incubación

Las placas se incubaron a 25°C, bajo ciclos de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz ultravioleta (345-400 nm).

II.2.3.3. Identificación genérica y obtención de cultivos puros

Se realizó según lo descrito en el punto II.1.3.2

II.2.3.4. Identificación de especies

La identificación de las especies se realizó según la metodología descrita en II.1.3.3. y los esquemas de siembras descritos en el Apéndice 1.

II.2.4. Análisis cuantitativo

Se realizó de acuerdo a lo descrito en el punto II.1.4.

II.3. ANALISIS DE NUECES ADQUIRIDAS EN EL MERCADO

II.3.1. Muestras

Se analizaron muestras adquiridas en comercios de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Dos muestras de 100g de nueces peladas (Muestras 1 y 2), una muestra de 250 g de nueces con cáscara (Muestra 3) y una muestra de 500 g de nueces peladas y envasadas al vacío (Muestra 4).

II.3.2. Obtención aséptica de las semillas

Los envases de material plástico (Muestras 1, 2 y 4) se abrieron en condiciones asépticas y su contenido total se transfirió a sendas cajas de Petri de vidrio, de 15 cm de diámetro, estériles, para facilitar la observación de lesiones y los análisis posteriores. Las nueces de la Muestra 3 se lavaron con agua y detergente, se sumergieron durante cinco minutos en etanol 70% y se abrieron en condiciones asépticas utilizando cascanueces, pinzas y bisturíes flameados con alcohol 96%. Se tomó cada nuez con una pinza, se flameó y se abrió con un cascanueces. La cáscara (endocarpio) se separó utilizando un bisturí. Las semillas obtenidas se transfirieron a cajas de Petri de vidrio, de 15 cm de diámetro, estériles, para facilitar la observación de lesiones y los análisis posteriores.

II.3.3. Análisis cualitativo

Se realizó según lo descripto en II.2.3.

II.3.4. Análisis cuantitativo

Se realizó según lo descripto en II.1.4.

II.4. ANALISIS DE FLORES FEMENINAS

II.4.1. Muestras

Se analizaron flores femeninas de las variedades Success, Desirable, INTA Delta I, INTA Delta II, Kernodle, Mahan, Stuart, Harry Super y Shoshoni. El material fue provisto por la EEA INTA Delta del Paraná en el mes de noviembre del año 2007. Las flores se conservaron en freezer (4 – 6 meses) hasta su análisis.

II.4.2. Tratamiento de las flores

Diez flores de cada muestra se retiraron del freezer y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 60 minutos.

Las flores se desinfectaron con etanol 70% durante dos minutos y, seguidamente, con hipoclorito de sodio 10% durante tres minutos.

II.4.3. Siembra e incubación

Las flores se cortaron en mitades, longitudinalmente, bajo condiciones asépticas con un bisturí. Los fragmentos correspondientes se sembraron en placas de DG18. Las placas se incubaron durante 15 días a 25° C, bajo ciclos de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz ultravioleta (345-400 nm).

II.4.4. Identificación genérica y obtención de cultivos puros

Se realizó según la metodología descrita en el punto II.1.3.2.

II.4.5. Identificación de especies

Se realizó según los esquemas de siembra descritos en el punto II.1.3.3.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

En esta sección se discutirán los resultados de los análisis cuali y cuantitativos relacionados con pecanes visiblemente alterados, pecanes en buen estado de conservación y flores de pecanes.

El análisis de los pecanes alterados fue enfocado sobre el aislamiento y la caracterización de las especies fúngicas capaces de establecer, en alguna medida, relaciones saprofíticas con la nuez durante el almacenamiento. Se realizaron, además, recuentos fúngicos con el objeto de establecer niveles de contaminación vinculados con situaciones de deterioro manifiesto.

En el caso de las nueces frescas, en condiciones de ser comercializadas y consumidas, los análisis cualitativos tendieron al conocimiento de las especies fúngicas presumiblemente causantes manchas. Se obtuvo de este modo, información acerca de las especies fúngicas que se vincularían con la nuez de pecán como patógenos. Asimismo, se realizaron recuentos fúngicos con el objeto de reconocer los niveles de contaminación que podrían relacionarse con las nueces aptas para su consumo y comercialización, incluyendo el análisis de muestras del mercado.

El análisis de flores femeninas de pecán permitió determinar especies fúngicas presentes en su interior y relacionar su ocurrencia con la calidad de las nueces.

Estos enfoques, en conjunto, permitieron esbozar el panorama de las especies fúngicas que estarían involucradas con el deterioro de las nueces de pecán de producción nacional en condiciones de campo y de almacenamiento.

A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos realizados.

III.1. ANALISIS DE PECANES VISIBLEMENTE ALTERADOS

III.1.1. Análisis cualitativo

Las semillas analizadas presentaron alteraciones visibles a ojo desnudo (Foto III.1). En algunos casos se observaron estructuras fúngicas (micelio y estructuras de esporulación), en tanto que en otras semillas se observaron manchas oscuras y zonas necróticas.



Foto III.1: Nueces de pecán visiblemente alteradas

De la muestra procedente del Delta del Paraná, y que había sido cosechada en el año 2004, se obtuvieron 124 aislamientos, mientras que de la muestra del mismo origen, cosechada en 2005, se obtuvieron 33 aislamientos.

Los resultados sobre la identificación de los aislamientos y las frecuencias de los mismos se encuentran en las tablas III.1, III.2, III.3 y III.4. La frecuencia relativa expresada en porcentaje se calculó como el número de aislamientos de cada género (tablas III.1 y III.3) o de cada especie (tablas III.2 y III.4) sobre el número total de aislamientos.

Tabla III.1: Frecuencia relativa de los géneros encontrados en la muestra de nueces alteradas Delta del Paraná 2004 sobre un total de 124 aislamientos.

GENERO	Nº DE AISLAMIENTOS	FRECUENCIA RELATIVA (%)
<i>Penicillium</i>	40	32,3
<i>Eurotium</i>	35	28,2
<i>Aspergillus</i>	15	12,1
<i>Cladosporium</i>	11	8,9
<i>Alternaria</i>	8	6,5
<i>Epicoccum</i>	3	2,4
<i>Fusarium</i>	3	2,4
<i>Microphaeropsis</i>	3	2,4
<i>Beauveria</i>	2	1,6
<i>Acremonium</i>	1	0,8
<i>Engyodontium</i>	1	0,8
<i>Phoma</i>	1	0,8
<i>Rhizopus</i>	1	0,8

Tabla III.2: Frecuencia relativa de las especies, según género, encontradas en la muestra de nueces alteradas Delta del Paraná 2004 sobre un total de 124 aislamientos.

ESPECIE	NUMERO DE AISLAMIENTOS	FRECUENCIA RELATIVA (%)
Género <i>Penicillium</i>		
<i>Penicillium citrinum</i>	11	8,9
<i>Penicillium cf. variable</i>	7	5,6
<i>Penicillium chrysogenum</i>	7	5,6
<i>Penicillium lividum</i>	4	3,2
<i>Penicillium crustosum</i>	2	1,6
<i>Penicillium glabrum</i>	2	1,6
<i>Penicillium bilaiae</i>	1	0,8
<i>Penicillium discolor</i>	1	0,8
<i>Penicillium minioluteum</i>	1	0,8
<i>Penicillium olsonii</i>	1	0,8
<i>Penicillium paxilli</i>	1	0,8
<i>Penicillium purpurogenum</i>	1	0,8
<i>Penicillium purpurogenum var rubri-sclerotium</i>	1	0,8
Género <i>Eurotium</i>		
<i>Eurotium rubrum</i>	34	27,4
<i>Eurotium herbariorum</i>	1	0,8
Género <i>Aspergillus</i>		
<i>Aspergillus restrictus</i>	5	4,0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	1,6
<i>Aspergillus sydowii</i>	2	1,6
<i>Aspergillus alliaceus</i>	1	0,8
<i>Aspergillus carneus</i>	1	0,8

ESPECIE	NUMERO DE AISLAMIENTOS	FRECUENCIA RELATIVA (%)
<i>Aspergillus flavus</i>	1	0,8
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1	0,8
<i>Aspergillus ustus</i>	1	0,8
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	0,8
Género Cladosporium		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	8	6,5
<i>Cladosporium herbarum</i>	2	1,6
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	1	0,8
Género Alternaria		
<i>Alternaria alternata</i>	8	6,5
Género Epicoccum		
<i>Epicoccum nigrum</i>	3	2,4
Género Fusarium		
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	0,8
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	1	0,8
<i>Fusarium verticillioides</i>	1	0,8
Género Microsphaeropsis		
<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	3	2,4
Género Beauveria		
<i>Beauveria bassiana</i>	2	1,6
Género Acremonium		
<i>Acremonium strictum</i>	1	0,8
Género Engyodontium		
<i>Engyodontium album</i>	1	0,8
Género Phoma		
<i>Phoma glomerata</i>	1	0,8
Género Rhizopus		
<i>Rhizopus stolonifer</i>	1	0,8

Tabla III.3: Frecuencia relativa de los géneros encontrados en la muestra de nueces alteradas Delta del Paraná 2005 sobre un total de 33 aislamientos.

GENERO	Nº DE AISLAMIENTOS	FRECUENCIA RELATIVA (%)
<i>Alternaria</i>	9	27,3
<i>Neofusicoccum</i>	9	27,3
<i>Cladosporium</i>	3	9,1
<i>Fusarium</i>	3	9,1
<i>Cytospora</i>	2	6,1
<i>Penicillium</i>	2	6,1
<i>Phomopsis</i>	2	6,1
<i>Epicoccum</i>	1	3,0
<i>Pestalotia</i>	1	3,0
<i>Trichothecium</i>	1	3,0

Tabla III.4: Frecuencia relativa de las especies, según género, encontradas en la muestra de nueces alteradas Delta del Paraná 2005 sobre un total de 33 aislamientos.

ESPECIE	NUMERO DE AISLAMIENTOS	FRECUENCIA RELATIVA (%)
Género <i>Alternaria</i>		
<i>Alternaria alternata</i>	9	27,3
Género <i>Neofusicoccum</i>		
<i>Neofusicoccum ribis</i>	7	21,2
<i>Neofusicoccum luteum</i>	1	3,0
<i>Neofusicoccum parvum</i>	1	3,0
Género <i>Cladosporium</i>		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3	9,1
Género <i>Fusarium</i>		
<i>Fusarium graminearum</i>	2	6,1
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	3,0
Género <i>Cytospora</i>		
<i>Cytospora</i> sp.	2	6,1
Género <i>Penicillium</i>		
<i>Penicillium brevicompactum</i>	1	3,0
<i>Penicillium olsonii</i>	1	3,0
Género <i>Phomopsis</i>		
<i>Phomopsis</i> sp.	2	6,1
Género <i>Epicoccum</i>		
<i>Epicoccum nigrum</i>	1	3,0
Género <i>Pestalotia</i>		
<i>Pestalotia</i> cf. <i>gracilis</i>	1	3,0
Género <i>Trichothecium</i>		
<i>Trichothecium roseum</i>	1	3,0

Algunos de los géneros mencionados como predominantes en los trabajos citados anteriormente (Huang & Hanlin, 1975; Beauchat, 1994) aparecen con una incidencia relativamente alta en la muestra del año 2004, tal es el caso de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Alternaria*. *Fusarium* y *Phoma* son menos frecuentes. Se observó, asimismo, una alta frecuencia de *Eurotium* como género importante en el deterioro de las nueces alteradas (Tabla III.1).

En la muestra del año 2005 aparece *Neofusicoccum* como género predominante junto a *Alternaria* y en menor proporción *Cladosporium*, *Fusarium* y *Penicillium* (Tabla III.3).

Entre las especies identificadas (tablas III.2 y III.4), las de mayor interés desde el punto de vista de la contaminación potencial con micotoxinas son *P. citrinum*, *P. crustosum* (esta última en frecuencia muy baja) y *Alternaria alternata*.

Aspergillus flavus, de gran interés como productora de aflatoxinas, fue poco frecuente (un solo aislamiento en la muestra de 2004), al igual que *A. ochraceus*, productor potencial de ocratoxina A.

Las especies potencialmente toxicogénicas de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. sporotrichioides* y *F. verticillioides*) también fueron aisladas en baja proporción.

En ambas muestras alteradas se pudo observar una gran variedad de especies fúngicas capaces de causar el deterioro de las nueces y esta situación sería el reflejo de su incorrecto almacenamiento.

III.1.2. Análisis cuantitativo

Los resultados obtenidos en el recuento combinado para las dos muestras analizadas de pecanes visiblemente alterados se encuentran en la Tabla III.5.

Tabla III.5: Recuentos combinados en nueces alteradas (ufc/g de nuez)

Muestra	Recuento (ufc/g de nuez)
Delta del Paraná - 2004	100.000
Delta del Paraná - 2005	46.000

Los recuentos de hongos en ambas muestras resultaron ser muy elevados ($> 10^4$ ufc/g), como era de esperar en muestras con avanzado estado de deterioro fúngico. Estos resul-

tados se compararán más adelante con los obtenidos a partir de las muestras en buen estado de conservación.

III.2. ANALISIS DE PECANES EN BUEN ESTADO DE CONSERVACIÓN

III.2.1. Análisis cualitativo

La identificación de la micota se realizó sobre un total de 700 nueces correspondientes a 14 muestras. Si bien estas muestras no presentaron signos de deterioro avanzado como en el caso anterior, en una baja proporción de semillas se pudo detectar a simple vista la presencia de manchas oscuras que tienen incidencia directa sobre la calidad comercial del producto (Fotos III.2 y III.3).



Foto III.2: Nueces de pecán en buen estado de conservación

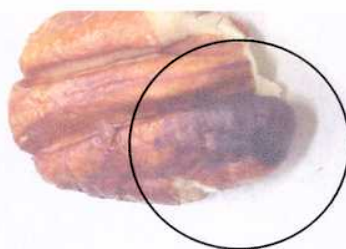


Foto III.3: Lesión encontrada en una muestra de nueces en buen estado de conservación

A fin de investigar la presencia de hongos que pudieran estar vinculados con este tipo de deterioro se realizó el análisis descripto en II.2.

En la tabla III.6 se presentan los géneros identificados y su frecuencia relativa.

Tabla III.6: Frecuencia relativa de los géneros vinculados con lesiones en las nueces frescas sobre un total de 42 aislamientos.

GENERO	Nº DE AISLAMIENTOS	FRECUENCIA RELATIVA
<i>Neofusicoccum</i>	10	23,8
<i>Penicillium</i>	8	19,1
<i>Fusarium</i>	6	14,3
<i>Alternaria</i>	4	9,5
<i>Pestalotia</i>	4	9,5
<i>Phomopsis</i>	3	7,1
<i>Cladosporium</i>	2	4,8
<i>Eurotium</i>	2	4,8
<i>Trichotecium</i>	2	4,8
<i>Aureobasidium</i>	1	2,4

Se obtuvieron 42 aislamientos y se detectaron géneros que no habían aparecido en las muestras deterioradas. *Neofusicoccum* fue el género que se presentó en mayor proporción.

Algunos de estos géneros (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichothecium*) han sido citados como causantes del “Kernel decay” de las nueces de

pecán (Teviotdale et al., 2002). Estos mismos autores citan a *Phomopsis* como posible causa de las manchas necróticas negras en el exterior del fruto (“stem-end blight”) y vinculan a *Neofusicoccum*, anamorfo de *Botryosphaeria*, con el “black nut syndrome” en Australia y en la India, aunque su patogenicidad no ha sido concluyentemente demostrada. Otro género citado como patógeno es *Pestalotia* (Huang & Hanlin, 1975).

La tabla III.7 muestra que, en la mayoría de los casos, las lesiones estuvieron asociadas con la presencia de hongos. Estos resultados coinciden con los de Overy et al. (2003), quienes encontraron relación entre la presencia de hongos y ciertos síntomas de alteración visibles en castañas (rotura de cáscaras, manchas en el tejido de la nuez, orificios causados por insectos o enmohecimiento visible).

Tabla III.7: Especies fúngicas determinadas a partir de lesiones de nueces de pecán frescas según variedad o tipo silvestre.

VARIEDAD	ORIGEN Y AÑO DE COSECHA	Nº DE NUECES CON LESIONES	ESPECIES DETERMINADAS A PARTIR DE LAS LESIONES	Nº DE AISLAMIENTOS POR ESPECIE
STUART	Delta del Paraná - 2005	3	<i>Neofusicoccum ribis</i>	1
NUECES SILVESTRES	San Pedro - 2005	4	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1
			<i>Eurotium rubrum</i>	1
			<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	1
NUECES SILVESTRES	Paso de los Libres - 2005	11	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1
			<i>Eurotium herbariorum</i>	1
			<i>Fusarium subglutinans</i>	1
			<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	1
			<i>Penicillium crustosum</i>	1
			<i>Penicillium discolor</i>	1
NUECES SILVESTRES	Mercedes - 2005	5	<i>Alternaria alternata</i>	1
			<i>Neofusicoccum ribis</i>	1
			<i>Phomopsis</i> sp.	1
INTA DELTA II	Delta del Paraná - 2006	2	<i>Fusarium equiseti</i>	1
			<i>Fusarium oxysporum</i>	1
MAHAN	Delta del Paraná - 2006	3	<i>Neofusicoccum ribis</i>	3
			<i>Fusarium graminearum</i>	1
			<i>Trichothecium roseum</i>	1
STARKING	Delta del Paraná - 2006	2	Sin crecimiento	0
DESIRABLE	Delta del Paraná - 2006	4	<i>Alternaria alternata</i>	1
			<i>Neofusicoccum ribis</i>	1
			<i>Penicillium crustosum</i>	1
KERNODLE	Delta del Paraná - 2006	9	<i>Alternaria alternata</i>	1
			<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1
			<i>Fusarium graminearum</i>	1
			<i>Pestalotia cf. gracilis</i>	3
SUCCESS	Delta del Paraná - 2006	2	<i>Phomopsis</i> sp.	1
HARRI SUPER	Delta del Paraná - 2006	2	Sin crecimiento	0
SHOSHONI	Delta del Paraná - 2006	5	<i>Trichothecium roseum</i>	1
STARKING	La Plata - 2006	2	<i>Alternaria alternata</i>	1
			<i>Fusarium graminearum</i>	1

En cuanto a la frecuencia relativa de las especies identificadas (tabla III.8) se destaca *Neofusicoccum ribis* como la predominante. Dentro de las especies de los otros géneros cabe destacar la presencia de algunas potencialmente toxicogénicas como *Penicillium crustosum* (penitrem), *Alternaria alternata* (alternariol), *Fusarium graminearum* (zearale-nona) y *F. equiseti* (tricotecenos tipo A y B, zearalenona y bauvericina, entre otras). *P.*

crustosum y *P. discolor* habían sido aislados de todas las muestras de castañas en el mencionado estudio de Overy et al. (2003), con frecuencias relativamente altas. Estos autores señalan a *P. crustosum* como un organismo alterante, particularmente ubicuo. Ambas especies de *Penicillium* han sido encontradas en distintos tipos de nueces, incluyendo a los pecanes (Huang & Hanlin, 1975; Frisvad et al., 1997). También ha sido hallado en coco y pistachos y es considerado peligroso por la posible producción de tremórgenos, sustancias capaces de producir efectos neurotóxicos, convulsiones y muerte en diversas especies animales (Overy et al., 2003)

Tabla III.8: Frecuencia relativa de las especies, según género, identificadas a partir de las lesiones de pecanes frescos sobre un total de 42 aislamientos

ESPECIE	Nº DE AISLAMIENTOS POR ESPECIE	FRECUENCIA RELATIVA
Género Neofusicoccum		
<i>Neofusicoccum ribis</i>	9	21,43
<i>Neofusicoccum parvum</i>	1	2,38
Género Penicillium		
<i>Penicillium crustosum</i>	4	9,52
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	2	4,76
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1	2,38
<i>Penicillium discolor</i>	1	2,38
Género Alternaria		
<i>Alternaria alternata</i>	4	9,52
Género Pestalotia		
<i>Pestalotia cf. gracilis</i>	4	7,14
Género Fusarium		
<i>Fusarium graminearum</i>	3	7,14
<i>Fusarium equiseti</i>	1	2,38
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	2,38
<i>Fusarium subglutinans</i>	1	2,38
Género Phomopsis		
<i>Phomopsis</i> sp.	3	7,14
Género Cladosporium		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2	4,76
Género Eurotium		
<i>Eurotium herbariorum</i>	1	2,38
<i>Eurotium rubrum</i>	1	2,38
Género Trichothecium		
<i>Trichothecium roseum</i>	2	4,76
Género Aureobasidium		
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	2,38

III.2.2. Análisis cuantitativo

Los resultados obtenidos en el recuento combinado para las muestras analizadas de pecanes en buen estado de conservación se encuentran en la Tabla III.9.

Tabla III.9: Número de unidades formadoras de colonias por gramo de nueces frescas según la técnica de recuento combinado.

Variedad	Origen	Año de cosecha	Resultado (ufc/g)
Stuart	Delta del Paraná	2005	280
Silvestres	San Pedro	2005	2
Silvestres	Paso de los Libres	2005	90
Silvestres	Mercedes	2005	970
Stuart	Delta del Paraná	2006	490
Mahan	Delta del Paraná	2006	9000
INTA Delta II	Delta del Paraná	2006	4200
Starking	Delta del Paraná	2006	250
Desirable	Delta del Paraná	2006	170
Kernodle	Delta del Paraná	2006	800
Success	Delta del Paraná	2006	220
Harri Super	Delta del Paraná	2006	34
Shoshoni	Delta del Paraná	2006	1
Starking	La Plata	2006	1500

En las nueces en buen estado de conservación, los recuentos fúngicos fueron bajos, lo que indicaría una buena calidad microbiológica.

Todas las muestras analizadas presentan valores de recuento inferiores a 10^4 ufc/g y casi el 80% de las muestras (11/14) dieron valores inferiores a 10^3 ufc/g. Estos niveles de contaminación fúngica coinciden con los informados para diferentes tipos de nueces, incluyendo las de pecán, encontrados en la bibliografía (King, 1986), en los cuales se los consideraron como valores realmente bajos, indicativos de buena calidad microbiológica de los productos. Poblaciones fúngicas de 10^3 ufc/g podrían ser consideradas como un nivel de contaminación aceptable (“baseline”), tal como se ha propuesto para otros tipos de pro-

ductos vegetales de baja actividad acuosa (a_w) como hortalizas deshidratadas, frutas secas y especias, entre otros (Andrews, 1992). En base a los resultados obtenidos, se podría sugerir un posible plan de muestreo de tres clases, similar al propuesto por la ICMSF (1974) para cereales, frutas secas, cacao, coco, nueces y especias.

Los parámetros correspondientes a dicho plan serían:

$n = 5$	$m = 10^3$
$c = 2$	$M = 10^4$

Donde:

n : número de muestras que se deben obtener de un lote

M : recuento que si es sobrepasado por cualquiera de las muestras seleccionadas determinaría el rechazo del lote.

m : recuento que diferencia la calidad adecuada de la calidad marginal y que la mayoría de las muestras no debe sobrepasar.

c : número máximo de muestras examinadas que pueden ser clasificadas en la categoría de marginalmente aceptables sin que sea rechazado el lote.

En este caso estaríamos considerando que valores superiores a 10^3 podrían ser marginalmente aceptables, sólo en dos muestras, y que ninguna muestra podría superar el recuento de 10^4 .

De hecho, las muestras de pecanes alterados (sección III.1.2) superarían este valor y, de acuerdo con este plan, serían rechazables.

En cuanto a las micotoxinas, es sabido que la ausencia de hongos toxicogénicos no garantiza que el producto esté exento de las toxinas. La baja frecuencia de aislamiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* parecería indicar una baja probabilidad de contaminación con aflatoxinas. Sería interesante realizar estudios en tal sentido, en vista de la escasa información con que se cuenta, aún a nivel mundial, en relación a la contaminación de este producto con las micotoxinas de importancia para la salud humana.

III.3. ANALISIS DE NUECES ADQUIRIDAS EN EL MERCADO

Las nueces de pecán adquiridas en el mercado presentaron muy pocas lesiones visibles a simple vista. Sobre estas lesiones se realizó la identificación de la micota. Cabe destacar que todas estas muestras tenían una buena calidad organoléptica, lo que permitiría suponer su aceptación por el consumidor, dado que la presencia de escasas manchas pequeñas podría haber pasado desapercibida.

III.3.1. Análisis cualitativo

La identificación de la micota se realizó según la metodología descrita para las nueces en buen estado de conservación (análisis descrito en II.2). En las tablas III.10, III.11, III.12 y III.13 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla III.10: Muestra 1. Frecuencia relativa de las especies, según género, identificadas de las lesiones de pecanes sin cáscara adquiridos en el mercado sobre un total de 13 aislamientos

TAXONES	NUMERO DE AISLAMIENTOS	FRECUENCIA RELATIVA
Género <i>Penicillium</i>		
<i>Penicillium brevicompactum</i>	3	23,08
<i>Penicillium crustosum</i>	1	7,69
<i>Penicillium glabrum</i>	1	7,69
Género <i>Cladosporium</i>		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3	23,08
Género <i>Alternaria</i>		
<i>Alternaria alternata</i>	2	15,38
Género <i>Pestalotia</i>		
<i>Pestalotia cf. gracilis</i>	2	15,38
Género <i>Colletotrichum</i>		
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	1	7,69

Tabla III.11: Muestra 2. Frecuencia relativa de las especies, según género, identificadas a partir de lesiones presentes en pecanes sin cáscara adquiridos en el mercado sobre un total de 13 aislamientos

TAXONES	NUMERO DE AISLAMIENTOS	FRECUENCIA RELATIVA
Género <i>Penicillium</i>		
<i>Penicillium brevicompactum</i>	4	30,77
<i>Penicillium crustosum</i>	3	23,08
<i>Penicillium discolor</i>	1	7,69
Género <i>Diplodia</i>		
<i>Diplodia seriata</i>	2	15,38
Género <i>Neofusicoccum</i>		
<i>Neofusicoccum ribis</i>	1	7,69
Género <i>Pestalotia</i>		
<i>Pestalotia cf. gracilis</i>	2	15,38

Tabla III.12: Muestra 3. Frecuencia relativa de las especies, según género, identificadas de las lesiones de pecanes con cáscara adquiridos en el mercado sobre un total de 2 aislamientos

TAXONES	NUMERO DE AISLAMIENTOS	FRECUENCIA RELATIVA
Género <i>Cladosporium</i>		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	50,00
Género <i>Penicillium</i>		
<i>Penicillium brevicompactum</i>	1	50,00

Tabla III.13: Muestra 4. Frecuencia relativa de las especies, según género, identificadas de las lesiones de pecanes pelados y envasados al vacío adquiridos en el mercado sobre un total de 2 aislamientos

TAXONES	NUMERO DE AISLAMIENTOS	FRECUENCIA RELATIVA
Género <i>Cladosporium</i>		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	50,00
Género <i>Eurotium</i>		
<i>Eurotium rubrum</i>	1	50,00

III.3.2. Análisis cuantitativo

Los resultados obtenidos en el recuento combinado para las muestras analizadas de pecanes adquiridos en el mercado se muestran en la Tabla III.14.

Tabla III.14. Resultados de los recuentos en muestras de nueces adquiridas en el mercado.

MUESTRA	RESULTADO (ufc/g de nuez)
Muestra 1	4800
Muestra 2	1500
Muestra 3	110
Muestra 4	20

Ninguna de las muestras comerciales supera el recuento de 10^4 ufc/g. De acuerdo al plan de muestreo propuesto, dos serían aceptables y dos marginalmente aceptables. El nivel de contaminación puede ser el producto de infecciones en pre-cosecha, cosecha o etapas posteriores como recolección, limpieza, pelado, envasado, almacenamiento y distribución hasta que llegan al consumidor (Pitt & Hocking, 1997).

III.4. ANALISIS DE FLORES DE PECAN

La determinación de especies fúngicas fitopatógenas a partir de tejido anormal de semillas de pecán condujo al estudio de la flor como una vía posible de infección. En muchas asociaciones hospedante-patógeno es común que ocurra la deposición, penetración y colonización de propágulos en las estructuras florales; de este modo los patógenos quedan localizados en la semilla (Agrios, 2005).

Se estudió la infección de flores femeninas de pecán con el objeto de asociar las especies fúngicas presentes en estadios tempranos con las que se encuentran en las nueces maduras.

Se analizaron 100 flores femeninas de plantas de distintas variedades de pecán provistas por la EEA INTA Delta del Paraná obteniéndose los resultados que se muestran en las tablas III.15 y III.16.

Tabla III.15: Géneros y especies fúngicas identificadas en 100 flores femeninas de pecán

VARIEDAD	TAXONES	Nº DE AISLAMIENTOS	TOTAL DE AISLAMIENTOS
INTA DELTA I	<i>Chaetomium globosum</i>	1	1
INTA DELTA II	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	6
	<i>Phomopsis</i> sp.	1	
	<i>Phoma</i> sp.	1	
	<i>Epicoccum nigrum</i>	1	
	<i>Alternaria alternata</i>	1	
	<i>Botrytis cinerea</i>	1	
KERNODLE	<i>Nigrospora sphaerica</i>	1	1
MAHAN	<i>Phomopsis</i> sp.	1	2
	<i>Neofusicoccum ribis</i>	1	
DESIRABLE	No hubo crecimiento	0	0
HARRY SUPER	<i>Epicoccum nigrum</i>	1	5
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	
	<i>Alternaria alternata</i>	1	
	<i>Phoma</i> sp.	1	
	<i>Phomopsis</i> sp.	1	
SHOSHONI	<i>Epicoccum nigrum</i>	1	5
	<i>Phomopsis</i> sp.	1	
	<i>Neofusicoccum ribis</i>	1	
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	
	<i>Alternaria alternata</i>	1	

Tabla III.16: Frecuencia relativa de los taxones identificados en flores femeninas de pecán sobre un total de 20 aislamientos

TAXONES	Nº AISLAMIENTOS	FRECUENCIA (%)
<i>Phomopsis</i> sp	4	20,00
<i>Alternaria alternata</i>	3	15,00
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3	15,00
<i>Epicoccum nigrum</i>	3	15,00
<i>Neofusicoccum ribis</i>	2	10,00
<i>Phoma</i> sp	2	10,00
<i>Botrytis cinerea</i>	1	5,00
<i>Chaetomium globosum</i>	1	5,00
<i>Nigrospora sphaerica</i>	1	5,00

Los géneros *Botrytis*, *Alternaria* y *Phomopsis* (teleomorfo: *Diaporthe*) incluyen especies con capacidad para infectar flores. Frecuentemente dicha capacidad se debe a la sincronización del ciclo de vida del patógeno con la fenología y la fisiología de la floración (Ngugi & Sherm, 2006).

Los taxones *Neofusicoccum ribis*, *Alternaria alternata* y *Phomopsis* sp. también se determinaron en las lesiones de las nueces, evidenciando que las flores podrían ser una vía de infección.

Cabe señalar que, a lo largo del presente trabajo de Tesis, fue muy conveniente la utilización del medio Agar Harina de Maíz con Hojas de Banano (BLA) para la identificación de algunos géneros, como *Neofusicoccum*, *Diplodia* y *Cytospora*, ya que fue el único medio en el que pudieron observarse sus estructuras de esporulación. En base a la utilización del Agar Harina de Maíz con Hojas de Banano se diseñó una clave útil para la identificación de los hongos contaminantes de nueces y flores de pecán (Apéndice 3).

IV. CONCLUSIONES

Los análisis realizados permiten concluir que los hongos son importantes agentes de biodeterioro de este producto, incluyendo una amplia diversidad de géneros y especies, algunos de ellos considerados como fitopatógenos típicamente asociados al cultivo.

El medio de cultivo BLA resulta adecuado para la identificación de la mayoría de los taxones presentados. Por otra parte, la siembra en paralelo de cultivos puros en BLA y DG18 permite, a través de la clave desarrollada, la determinación de todos los géneros fúngicos hallados en este trabajo.

Los resultados del análisis de muestras en buen estado de conservación, incluyendo algunas adquiridas en el mercado, indican que la aplicación de buenas prácticas agrícolas y de elaboración permitirá obtener productos con una buena calidad microbiológica, manteniendo los niveles de contaminación dentro de los límites aceptables para diferentes tipos de nueces de acuerdo con las reglamentaciones internacionales.

La incidencia de especies fúngicas potencialmente toxicogénicas fue relativamente baja. Por ejemplo, estuvieron prácticamente ausentes los hongos capaces de producir aflatoxinas. El género más importante desde este punto de vista fue *Alternaria*, presente tanto en las nueces muy alteradas como en las nueces frescas. No obstante, no se puede asegurar que las nueces de pecán estén exentas de contaminación con micotoxinas y sería de interés realizar estudios más amplios al respecto.

Considerando que de la mayoría de las lesiones visibles de las nueces (manchas) se aislaron diversas especies fúngicas, algunas potencialmente toxicogénicas, debería evitarse el consumo de nueces con estos defectos de calidad.

V. APENDICES

APENDICE 1: ESQUEMAS DE SIEMBRA UTILIZADOS PARA LA DETERMINACION DE LAS ESPECIES FUNGICAS PRESENTADAS

Género Acremonium

Se utilizaron placas de MEA. El material se sembró en un punto en el centro de la placa con un ansa recta. Los cultivos se incubaron en oscuridad durante 7 días a 25°C. La determinación de las especies se realizó según Samson *et al.* (2000).

Género Alternaria

Se utilizaron placas de PCA. El material se sembró en tres puntos con un ansa recta. Los cultivos se incubaron durante 10 días a 25 °C bajo ciclos de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz ultravioleta (345-400 nm). La determinación de las especies se realizó según Samson *et al.* (2000).

Género Aspergillus

Se realizó una suspensión de conidios en 0,5 ml de medio agarizado semisólido con Tween (agar-agar 0,1 %; Tween 80 0,05 %). Cada aislamiento se sembró en MEA y CZ. Las placas se sembraron en tres puntos con un ansa recta. Los cultivos se incubaron 7 días a 25 °C en oscuridad. Para la determinación de las especies se utilizaron los trabajos de Samson *et al.* (2000) y Klich (2002).

Género *Aureobasidium*

Se utilizaron placas de MEA. El material se sembró en una línea con un ansa recta. Los cultivos se incubaron en oscuridad durante 7 días a 25°C. La determinación de las especies se realizó según Samson *et al.* (2000).

Género *Beauveria*

Se utilizaron placas de MEA. El material se sembró en una línea con un ansa recta. Los cultivos se incubaron durante 10 días a 25°C en oscuridad. La determinación de las especies se realizó según De Hoog (1972).

Género *Cladosporium*

Se realizó una suspensión de conidios en 0,5 ml de medio agarizado semisólido con Tween (agar-agar 0,1 %, Tween 80 0,05 %). Cada aislamiento se sembró en MEA. Las placas se sembraron en tres puntos con un ansa recta. Los cultivos se incubaron 7 días a 25 °C en oscuridad. Para la determinación de las especies se utilizó Samson *et al.* (2000).

Género *Colletotrichum*

Se utilizaron placas de OA. El material se sembró en tres puntos con un ansa recta. Los cultivos se incubaron durante 10 días a 25° C bajo ciclos de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz ultravioleta (345-400 nm). La determinación de especies se realizó según Baxter *et al.* (1983) y Sutton (1980, 1992).

Género *Cytospora*

Se utilizaron placas de BLA. Con un ansa recta se colocó un trozo de material fúngico junto a la hoja de banano. Los cultivos se incubaron durante 10 días a 25° C, bajo ciclos de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz ultravioleta (345-400 nm). El género se determinó según Sutton (1980).

Género *Chaetomium*

Se utilizaron placas de OA y MEA. El material se sembró en tres puntos con un ansa recta. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 25° C bajo ciclos de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz ultravioleta (345-400 nm). La determinación de las especies se realizó según Samson *et al.* (2000).

Género *Diplodia*

Se utilizaron placas de BLA y placas de Agar Agua con hojas de pino (AAP). Con un ansa recta se colocó un trozo de material fúngico junto a la hoja de banano en las placas de BLA y un trozo junto a las hojas de pino en las placas de AAP. Los cultivos se incubaron durante 10 días a 25° C, bajo ciclos de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz ultravioleta (345-400 nm). La determinación de especies se realizó según Phillips (2002, 2009) y Crous *et al.* (2006)

Género *Engyodontium*

Se utilizaron placas de MEA. El material se sembró en una línea con ansa recta. Los cultivos se incubaron 7 días a 25°C en oscuridad. Para la determinación de especies se utilizó el trabajo de De Hoog (1972) y De Hoog *et al* (2000).

Género *Epicoccum*

Se utilizaron placas de OA y MEA. El material se sembró en tres puntos con un ansa recta. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 25° C bajo ciclos de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz ultravioleta (345-400 nm). La determinación de las especies se realizó según Samson *et al.* (2000).

Género *Eurotium*

Se realizó una suspensión de conidios en 0,5 ml de medio agarizado semisólido con Tween (agar-agar 0,1 %, Tween 80 0,05 %). Cada aislamiento se sembró en M20 y CZ20. Las placas se sembraron en tres puntos con un ansa recta. Los cultivos se incubaron 14 días a 25 °C en oscuridad. Para la determinación de las especies se utilizaron los trabajos de Samson *et al.* (2000) y Klich (2002).

Género *Fusarium*

Se utilizaron placas de SNA y de PDA. Se colocó un trozo de material fúngico junto al papel de filtro en las placas de SNA y con un ansa recta se sembró un punto en el centro de las placas de PDA. Las cajas se incubaron durante 7 días a 25° C bajo ciclos de 12 hs de oscuridad/12 de luz ultravioleta (345-400 nm) La determinación de especies se realizó según Samson *et al.* (2000), Nelson *et al.* (1983) y Summerell *et al.* (2003).

Género *Neofusicoccum*

Se utilizaron placas de BLA y placas de Agar Agua con hojas de pino (AAP). Con un ansa recta se colocó un trozo de material fúngico junto a la hoja de banano en las placas de BLA y un trozo junto a las hojas de pino en las placas de AAP. Los cultivos se incubaron durante 10 días a 25° C, bajo ciclos de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz ultravioleta (345-400 nm). La determinación de especies se realizó según Phillips (2002, 2009) y Crous et al. (2006)

Género *Microphaeropsis*

Se utilizaron placas de OA y MEA. El material se sembró en tres puntos con un ansa recta. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 25° C bajo ciclos de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz ultravioleta (345-400 nm). La determinación de especies se realizó según Sutton (1980).

Género *Nigrospora*

Se utilizaron placas de OA y MEA. El material se sembró en tres puntos con un ansa recta. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 25° C bajo ciclos de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz ultravioleta (345-400 nm). La determinación de las especies se realizó según Ellis (1971).

Género *Penicillium*

Se realizó una suspensión de conidios en 0,5 ml de medio agarizado semisólido con detergente (agar-agar 0,1 %; Tween 80 0,05 %). Cada aislamiento se sembró en los siguientes medios de cultivo: MEA, CZ, CYA, YES y CREA. Las placas se inocularon en

tres puntos con un ansa recta. Los cultivos se incubaron 7 días a 25 °C en oscuridad. Para la determinación de las especies se utilizaron los trabajos de Samson *et al.* (2000) y Pitt (1979, 1988).

Género *Pestalotia*

Se utilizaron placas de BLA. Con un ansa recta se colocó un fragmento de material fúngico junto a la hoja de banano. Los cultivos se incubaron durante 10 días a 25° C, bajo ciclos de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz ultravioleta (345-400 nm). Para la determinación de las especies se utilizó Guba (1961).

Género *Phoma*

Se utilizaron placas de MEA y OA. El material se sembró en un punto en el centro con un ansa recta. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 25° C bajo ciclos de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz ultravioleta (345-400 nm). La determinación de las especies se realizó según Samson *et al.* (2000).

Género *Phomopsis*

Se utilizaron placas de BLA. Con un ansa recta se colocó un trozo de material fúngico junto a la hoja de banano. Los cultivos se incubaron durante 10 días a 25° C, bajo ciclos de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz ultravioleta (345-400 nm). El género se determinó según Sutton (1980).

Género *Rhizopus*

Se utilizaron placas de MEA y PDA. El material se sembró en un punto en el centro de la placa con un ansa recta. Los cultivos se incubaron en oscuridad durante 7 días a 25°C. La determinación de las especies se realizó según Samson *et al.* (2000).

Género *Trichothecium*

Se realizó una suspensión de conidios en 0,5 ml de medio agarizado semisólido con detergente (agar-agar 0,1 %, Tween 80 0,05 %). Cada aislamiento se sembró en MEA. Las placas se sembraron en una línea con un ansa recta. Los cultivos se incubaron 7 días a 25 °C en oscuridad. La determinación de las especies se realizó según Samson *et al.* (2000).

APENDICE 2: COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO, LIQUIDOS DE MONTAJE, SOLUCIONES Y REACTIVOS

2.1. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS (Excepto aclaración todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos).

AGAR AGUA CON HOJAS DE PINO (AAP) (según Crous et al., 2006)

Agar agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Volcar el medio en cajas de Petri y, antes de que solidifique, colocar un pedacito de acícula de pino previamente esterilizada en autoclave.

AGAR AVENA (OA) (según Samson et al., 2000)

Avena	30 g
Agua destilada	1000 ml
Agar	15 g
Solución de metales traza	1 ml

AGAR CREATINA SACAROSA (CREA) (según Samson et al., 2000)

Creatina.H ₂ O	3 g
Sacarosa	30 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1,3 g
Púrpura de bromocresol	0,05 g

Agar agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Luego de esterilizar en autoclave ajustar el pH a $8,0 \pm 0,2$.

AGAR CZAPEK (CZ) (según Samson *et al.*, 2000)

Sacarosa	30 g
NaNO ₃	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Agar	15 g
MS	10 ml
TMS	1 ml
Agua destilada	1000 ml

AGAR CZAPEK EXTRACTO DE LEVADURA (CYA) (según Pitt & Hocking, 1997)

Sacarosa	30 g
NaNO ₃	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Extracto de levadura	5 g
Agar agar	15 g
MS	10 ml
TMS	1 ml
Agua destilada	1000 ml

AGAR CZAPEK SACAROSA 20% (CZ20%) (según Samson et al., 2000)

Sacarosa	200 g
NaNO ₃	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Agar	15 g
MS	10 ml
TMS	1 ml
Agua destilada	1000 ml

AGAR DICLORAN GLICEROL 18 % (DG18) (según Pitt & Hocking, 1997)

Peptona	5 g
Glucosa	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
Dicloran	1 ml
Glicerol	220 g
Cloranfenicol	0,1 g
Agar	15 g
Agua Destilada	1000 ml

AGAR SACAROSA EXTRACTO DE LEVADURA (YES) (según Frisvad & Samson, 2004)

Extracto de levadura	20 g
Sacarosa	150 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 g

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
Agar agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar en autoclave a 110°C durante 30 minutos.

AGAR EXTRACTO DE MALTA (MEA) (según Comerio & Mac Cormack, 2004)

Solución de Extracto de Malta:

Extracto de malta siruposo para repostería	50 g
Agua destilada	500 ml

Autoclavar y dejar precipitar las dextrinas durante 24 h.

Preparación del medio agarizado:

Decantar la solución de extracto de malta, tomar 400 ml y agregarlos a 600 ml de agua destilada, adicionar 1 g de peptona de carne, 4 g de peptona de soja, 15 g de agar agar y 1 ml de TMS. Llevar a hervor.

Autoclavar a 115°C por 10 minutos.

AGAR EXTRACTO DE MALTA CON SACAROSA (M20) (según Samson et al., 2000)

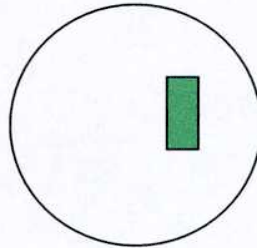
Adicionar 200 g de sacarosa al Agar Extracto de Malta.

Autoclavar a 115°C por 10 minutos.

AGAR HARINA DE MAIZ CON HOJA DE BANANO (BLA) (según Matsushima, 1971)

Harina de maiz	60 g
Agua destilada	1000 ml
Agar agar	15 g

Volcar el medio en cajas de Petri y, antes de que solidifique, colocar en la superficie un fragmento de hoja de banano previamente esterilizado en autoclave.



AGAR PAPA DEXTROSA (PDA) (según Samson *et al.*, 2000)

Papas	200 g
Dextrosa	15 g
Agar-agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Cortar 200 g de papas peladas y agregarle 1000 ml de agua destilada. Hervir durante 1 h. Llevar a 1 litro con agua destilada. Filtrar y agregar el agar-agar y la dextrosa. Llevar a hervor hasta disolver.

AGAR PAPA ZANAHORIA (PCA) (según Samson *et al.*, 2000)

Papas	20 g
Zanahorias	20 g
Agar agar	15 g

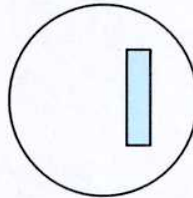
Hervir durante 5 minutos 40 g de zanahorias en 500 ml de agua destilada. Filtrar. Hervir durante 5 minutos 40 g de papas en 500 ml de agua destilada. Filtrar.

Tomar 250 ml de cada extracto. Agregar 500 ml de agua destilada y el agar agar. Llevar a hervor. Esterilizar en autoclave.

AGAR POBRE EN NUTRIENTES SINTETICOS (SNA) (Niremberg, 1976)

KH_2PO_4	1 g
KNO_3	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
KCl	0,5 g
Glucosa	0,2 g
Sacarosa	0,2 g
Agar-agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Volcar el medio en cajas de Petri y antes de que solidifique colocar, en la superficie, un fragmento de papel de filtro previamente esterilizado en autoclave.



2.2. COMPOSICIÓN DE LOS LIQUIDOS DE MONTAJE

AZUL DE ANILINA EN ACIDO LACTICO (según Samson et al., 2000)

Azul de anilina	0,1 g
Acido láctico 85 %	100ml

ERITROSINA EN AMONIACO (según Sutton, 1980)

Eritrosina	3 g
Amoníaco 10 %	100 ml

2.3. SOLUCIONES Y REACTIVOS

SOLUCION DE MINERALES (MS) (según Samson et al., 2000)

ClK	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
Agua destilada	100 ml

REACTIVO DE ERLICH (según Samson et al., 2000)

4-dimetilaminobenzaldeido	2 g
Etanol 96%	85 ml
Acido clorhídrico 37%	15 ml

SOLUCION DE METALES TRAZA (TMS) (según Samson et al., 2000)

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,5 g
Agua destilada	100 ml

AGUA PEPTONA (según FAO, 1981)

Peptona	1 g
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar 15 minutos a 121 °C.

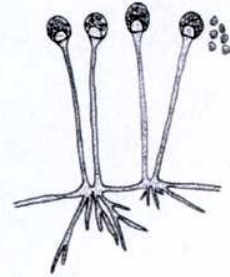
MEDIO AGARIZADO SEMISOLIDO CON DETERGENTE

Tween 80	0,05 g
Agar agar	0,1 g
Agua destilada	100ml

APENDICE 3: CLAVE PARA LA IDENTIFICACION DE GENEROS FUNGICOS PRESENTES EN NUECES Y FLORES DE PECAN

- 1.a. Micelio mayoritariamente no septado (cenocítico), abundante..... 2
 1.b. Micelio septado..... 3
 2.a. Esporangióforos generalmente pigmentados, con apófisis. Rizoides presentes. Esporangiosporas frecuentemente estriadas.....

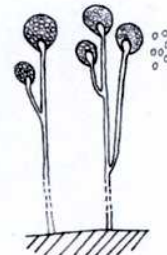
Rhizopus



2.a

- 2.b. Esporangióforos no pigmentados o sólo delicadamente pigmentados, sin apófisis. Rizoides ausentes. Esporangiosporas no estriadas.....

Mucor

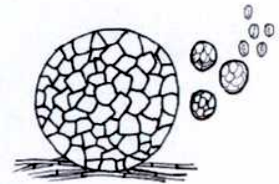


2.b

- 3.a. Ascomas presentes..... 4
 3.b. Ascomas ausentes..... 5

- 4.a. Ascomas globosos, sin ostíolo, amarillos. Ascospores globosos a subglobosos.....

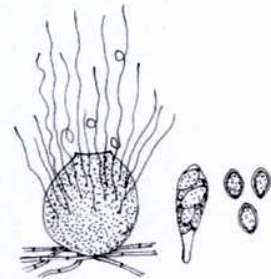
Eurotium



4.a

- 4.b. Ascomas globosos a ovoides, con ostíolo, castaño oscuros a negros presentando numerosos pelos. Ascospores clavados.....

Chaetomium



4.b.

- 5.a. Conidiomas picnidiales, acervulares, o estromáticos presentes..... 6
 5.b. Conidiomas picnidiales, acervulares, o estromáticos ausentes..... 13

6.a. Conidiomas acervulares..... 7



6.a

6.b. Conidiomas picnidiales o conidiomas estromáticos..... 8



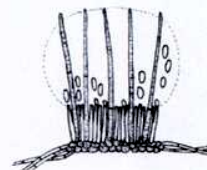
6.b

7.a. Conidioma sin setas. Conidios pigmentados, con apéndices..... *Pestalotia*



7.a

7.b. Conidioma generalmente con setas. Conidios hialinos, sin apéndices..... *Colletotrichum*



7.b

8.a. Conidios unicelulares, alantoides, cilíndricos, elipsoidales, fusiformes, menores de 10 μm long; en caso de ser mayores, filiformes..... 9

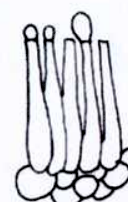
8.b. Conidios unicelulares, cilíndricos, elipsoidales, con base truncada, mayores de 10 μm long..... 12

9.a. Células conidiógenas doliformes, ampuliformes o muy ensanchadas en la base y angostas en el ápice..... 10

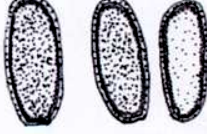
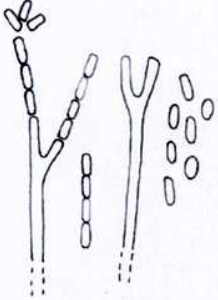


9a

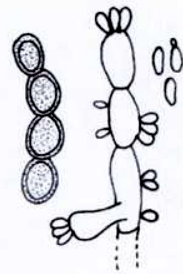
9.b. Células conidiógenas cilíndricas..... 11



9b

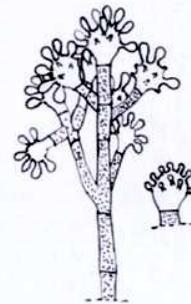
10.a.	Conidios pigmentados, oscuros.....	<i>Microsphaeropsis</i>		10.a
10.b.	Conidios hialinos.....	<i>Phoma</i>		10.b
11.a	Conidios alantoides, pequeños, hialinos.....	<i>Cytospora</i>		11a
11.b	Conidios unicelulares, fusiformes, frecuentemente con dos gúttulas subterminales; en ocasiones acompañados de conidios filiformes, curvados en el ápice.....	<i>Phomopsis</i>		11b
12.a.	Conidios fusiformes, mitriformes, hialinos.....	<i>Neofusicoccum</i>		12a
12.b.	Conidios elipsoidales o cilíndricos, pigmentados, oscuros.....	<i>Diplodia</i>		12b
13.a.	Sólo conidios originados por fragmentación de hifas fértiles (artroconidios), cilíndricos, hialinos, formando cadenas generalmente aéreas.....	<i>Geotrichum</i>		13.a
13.b.	Conidios originados por brotación (blastoconidios), o artroconidios y blastoconidios.....	14		
14.a.	Brotación de conidios simultánea.....	15		
14.b.	Brotación de conidios no simultánea.....	16		

- 15.a. Conidióforos poco diferenciados. Arthroconidios presentes. Colonias oscuras, con áreas mucoides color de crema y/o rosadas..... *Aureobasidium*



15.a

- 15.b Conidióforos diferenciados de las hifas, ramificados. Células conidiógenas hinchadas. Conidios sustentados por dentículos. Colonias grisáceas sin áreas mucoides..... *Botrytis*

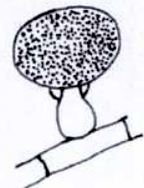


15.b

- 16.a Conidios solitarios o formados en sucesión acrópeta..... 17
16.b Conidios formados en sucesión basípeta..... 20

- 17.a. Conidios solitarios..... 18
17.b. Conidios en cadenas acrópetas..... 19

- 18.a. Conidios unicelulares, oscuros, lisos..... *Nigrospora*



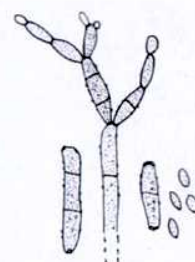
18.a

- 18.b. Conidios pluricelulares, oscuros, rugosos..... *Epicoccum*



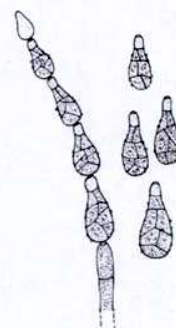
18.b

19.a. Conidios pigmentados, aseptados o sólo con septos transversales..... *Cladosporium*



19.a

19.b. Conidios pigmentados, con septos transversales y longitudinales..... *Alternaria*

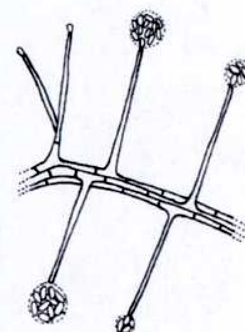


19.b

20.a. Conidios contenidos por una matriz limosa. 21

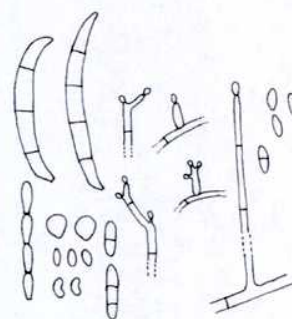
20.b. Conidios secos, pulverulentos en masa..... 22

21.a. Fiálides largas y delgadas, células poliblasticas ausentes. Conidios unicelulares agregados en cabezuelas limosas. Desarrollo lento..... *Acremonium*



21.a

21.b. Presencia de fiálides y/o de células conidiógenas poliblasticas. Macroconidios septados, con forma de banana; microconidios alantoides, clavados, elipsoidales. Desarrollo rápido..... *Fusarium*



21.b

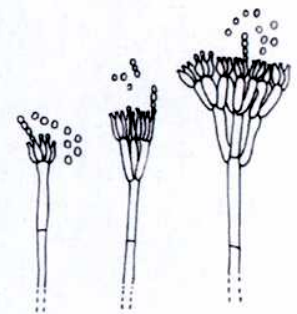
22.a. Fiálides presentes..... 23

22.b. Fiálides ausentes..... 25

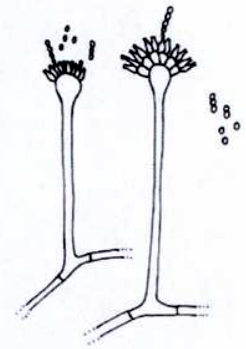
23.a. Conidios unicelulares exclusivamente, con morfología uniforme..... 24

23.b. Conidios unicelulares y/o pluricelulares. Macroconidios septados, con forma de banana; microconidios, citriformes, clavados, elipsoidales, piriformes..... *Fusarium*

- 24.a. Conidióforo con forma de pincel, presentando uno dos o tres niveles de ramificación..... *Penicillium*

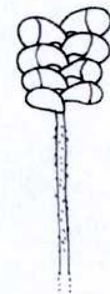


- 24.b. Conidióforo con el ápice ensanchado (vesícula), presentando uno o dos niveles de ramificación.... *Aspergillus*



24.b

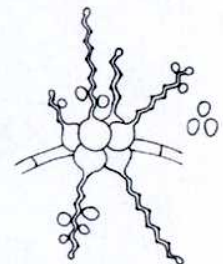
- 25.a. Conidios bicelulares, con base truncada, oblicua, imbricados. Colonias rosadas..... *Trichothecium*



25.a

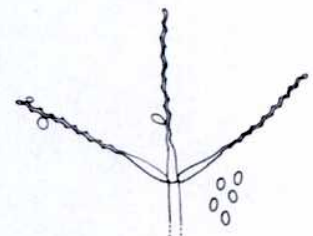
- 25.b. Conidios unicelulares. Celulas conidiógenas con raquis geniculado, angosto. Colonias blancas..... 26

- 26.a. Células conidiógenas con la zona basal ensanchada (globosa a subglobosa), agrupadas en cúmulos..... *Beauveria*



26.a

- 26.b. Células conidiógenas con la zona basal cilíndrica, solitarias o dispuestas en verticilos..... *Engyodontium*



VI. BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology fifth edition. Elsevier Academia Press, Amsterdam. 922 pp.
- Andrews, S. 1992. Specifications for fungi in Australian foods: 97-110. En: Modern Methods in Food Mycology. Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. and King A.D. (Eds.). Elsevier, Amsterdam.
- Baxter, A. P., van der Westhuizen, G. C. A. and Eicker, A. 1983. Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. *S.-Afr. Tydskr. Plantk.* 2(4): 260-289.
- Bayman, P., Baker J. L., Mahoney, N. E. 2002. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. *Mycopathologia* 155: 161-169.
- Beuchat, L.R. 1994. Microbiology and Sanitation: 87-97. En: Pecan Technology. Santerre, Ch.R. (Ed.), Aspen Publishers, New York.
- Chun, H.S., Kim, H.J., Ok, H.E., Hwang, J., Chung, D. 2007. Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. *Food Chemistry*, 102: 385-391.
- Comerio, R. M., Mac Cormack, W. 2004. Algunos micromicetes del suelo y de alimentos deteriorados en la Antártida Argentina. *Rev. Iberoam. Micol.* 21: 128-134.
- Crous, P. W., Slippers, M., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O, Alves, A. Burgess, T., Barber, P. and Groenwald, J. Z. 2006. Phylogenetic lineales in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* 55: 235-253.
- De Hoog, G. S. 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium*. *Stud. Mycol.* N° 1: 4-10.

De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J. & Figueras, M.J. 2000. Atlas of Clinical Fungi 2nd. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands & Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain. 1126 pp.

Ellis, M. B. 1971. Dermatiaceous Hyphomycetes. *Commonw. Mycol. Inst. Kew*. 688 pp.

Escher, F. E., Koehler P. E. and Ayres J. C. 1973. Effect of roasting on aflatoxin content of artificially contaminated pecans. *J. Food Sci.* 39: 1127-1129.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1992. Food and Nutrition Paper. Manual of Food Quality Control, 4. Rev. 1. Microbiological analysis. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 284 pp.

Freire, F. C. O., Kozakiewicz, Z., Russell R. and Paterson M. 1999. Mycoflora and mycotoxins of Brazilian cashew kernels. *Mycopathologia*. 145: 95-103.

Frisvad, J.C., Samson, R.A., Rassing, B.R., van der Horst, M.I., van Rijn, F.T., Stark, J. 1997. *Penicillium discolor*, a new species from cheese, nuts and vegetables. *Antoine van Leeuwenhoek*. 72: 119-126.

Frisvad, J. C. & Samson, RA. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.* 47: 1-174.

Guba, E. F. 1961. Monograph of *Monochaetia* and *Pestalotia*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, USA.

Hanlin, R. R. and Blanchard R. O. 1974. Fungi associated with developing pecan fruits. *Bul. Ga. Acad. Sci.* 32: 68-75.

Huang, L. H. y Hanlin R. T. 1975. Fungi occurring in freshly harvested and in-market pecans. *Mycologia* 67: 689-700.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1974. Microorganisms in foods. 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications. University of Toronto Press, Toronto. 213 pp.

INTA-PROPECAN (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Proyecto Pecan). 2009. www.inta.gov.ar/delta/propecan.

King, A.D. 1986. Fungal flora and counts on foods: 182-185. En: King, A.D., Pitt, J.I., Beuchat L.R. and Corry, J.E.L. (Eds.) *Methods for the Mycological Examination of Food*. New York, Academic Press.

Klich, M. 2002. Identification of common *Aspergillus* species, Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 116 pp.

Koehler, P. E., Hanlin R. T. and Beraha, L. 1975. Production of aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolated from market pecans. *Appl. Microbiol.* 30: 581-583.

Leach, C. M. 1971. A practical guide to the effects of visible and ultraviolet light on fungi: 609-664. En *Methods in microbiology* volume 4: Booth, C. (ed.). Academic Press, London and New York.

Little, Elbert L. 1971. Digital Representations of Tree Species Range Maps from Atlas of United States Trees, U.S. Geological Survey. [//esp.cr.usgs.gov/data/atlas/little/caryilli.pdf](http://esp.cr.usgs.gov/data/atlas/little/caryilli.pdf).

Madero, E. 2007. Antecedentes Históricos del Pecán en el Mundo y en Argentina, Capítulo I. En: La Producción de Pecán en Argentina. Lavado, R. & Frusso, E. (Eds.). Versión CD, ISBN 978-987-05-3647-5.

Madero E. R., Frusso, E. 2002. Desarrollo del Cultivo de la Nuez de Pecan en la Argentina. Estación Experimental Agropecuaria Delta del Paraná, Proyecto Pecán, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 39 pp.

Matsushima, T. 1971. Microfungi of the Solomon Islands and Papua-New Guinea. Kobe, Japan. 78 pp.

National Pecan Shellers Association. 2009. <http://www.ilovepecans.org/nutrition.html>.

Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium Species. An Illustrated Manual for Identification*. The Pennsylvania University Press. University Park and London. 193 pp.

Ngugi, H.K. & Sherm, H. 2006. Biology of flower-infecting fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 261-282.

Nirenberg, H. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem* 169: 1-117.

Overy, D.P., Seifert, K.A., Savard, M.E. & Frisvad, J.C. 2003. Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *International Journal of Food Microbiology* 88: 69-77.

Parodi, L. 1972. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Editorial Acme: 311-313, Buenos Aires.

Peterson, J. K. 1990. Pecan.

www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/silvics_manual/volume_2/carya/illinoesis.htm.

Phillips, A. 2009. The *Botryosphaeria* Site. www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/.

Phillips, A. 2002. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathol. Mediterr*: 41: 3-18.

Pitt J.I. 1979. The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London, Academic Press. 634 pp.

Pitt, J. I. 1988. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Research. North Ryde, Australia. 187 pp.

Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasamai K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., Tamboon-Ek, P. 1993. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. Nuts and oilseeds. *International Journal of Food Microbiology* 20: 211-226.

Pitt, J.I. & Hocking, A.D. 1997. *Fungi and Food Spoilage*. 2nd. Edition. Academic Press, London. 593 pp.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filteborg, O. (eds.). 2000. *Introduction to Food and Air-Borne Fungi*. Sixth edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht. 389 pp.

Santerre, Ch. R. 1994. Pecan Composition: 98-111. En: Pecan Technology. Santerre, Ch.R. (Ed.), Aspen Publishers, New York.

Sommer N. F., Buchanan J. R. and Fortlage R. J. 1976. Aflatoxin and Sterigmatocystin Contamination of Pistachio Nuts in Orchards. Applied and Environmental Microbiology. 32: 64-67.

Summerell, B.A., Salleh, B. & Leslie, J.F. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. Plant Disease 87: 117-128.

Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, London. 696 pp.

Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En: Bailey, J.A. & Jeguer, M.J. eds. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. CAB International, Wallingford: 1-25.

Teviotdale, B.L., Michaelides, T.J. & Pscheidt, J.W. (eds.). 2002. Compendium of Nut Crop Diseases in Temperate Zones. The American Phytopathological Society, USA. 89 pp.

USDA (United States Department of Agriculture). 2009. National Resources Conservation Service. [//plants.usda.gov](http://plants.usda.gov).

USDA (United States Department of Agriculture). 2009. Economics, Statistics and Market System Information. Pecans: Production (in-shell), season-average grower price, and value, United States, 1980 to date.

[//usda.mannlib.cornell.edu/usda/ers/.89022/2008/index.html](http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/ers/.89022/2008/index.html).

Wells J.M., Payne J.A. 1976. Toxigenic species of *Penicillium*, *Fusarium*, and *Aspergillus* from weevil-damaged pecans. *Can J Microbiol.* 22: 281-5.