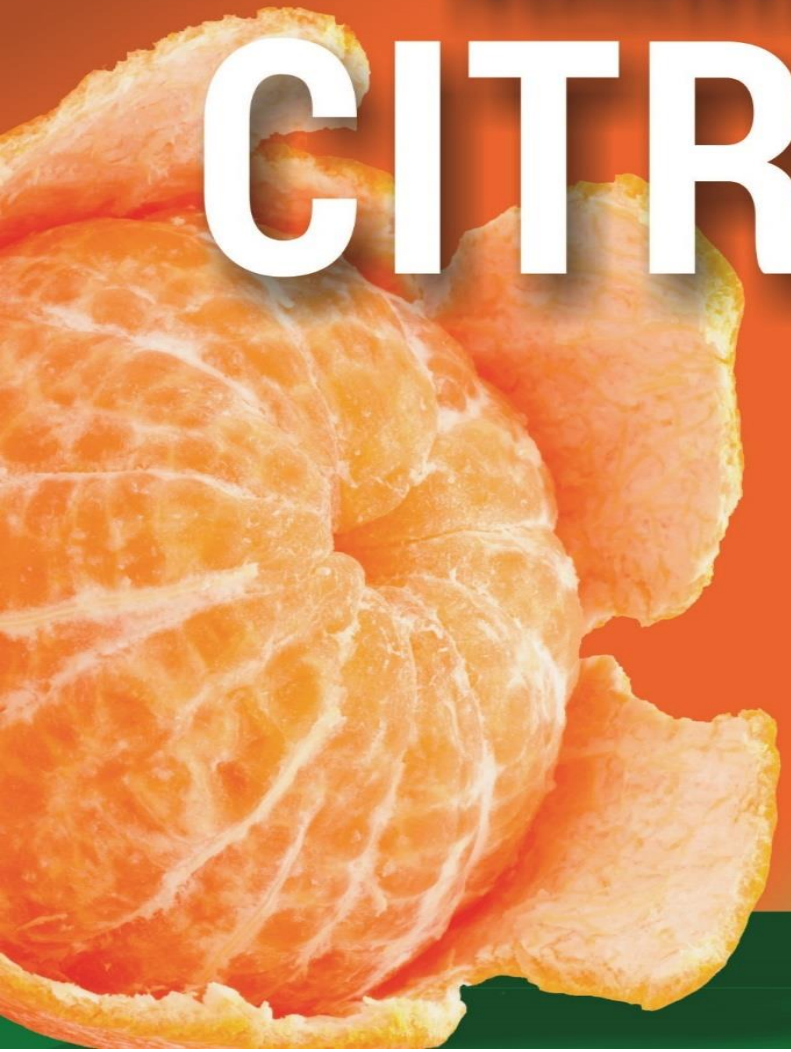
24 y 25 - SETIEMBRE 2015

Resultados de Investigación en CITRICULTURA



+ GENÉTICA SANIDAD PRODUCTIVIDAD

INIA
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
URUGUAY

Manejo de fungicidas y sales en el control de patógenos postcosecha

Joanna Lado, Elena Pérez, Pablo Varela,
Eleana Luque, Pedro Pintos, Oribe Blanco

Natalia Besil y Horacio Heinzen (FQ-UdelaR)

Programa Nacional de Producción Citrícola
INIA SG, 24 de Setiembre de 2015

Parte 1

Control de *Penicillium* en postcosecha de frutos cítricos

Parte 2

Evaluación de la efectividad del Propiconazole en el control de *Geotrichum*

Un enfoque global en el control de *Penicillium* en postcosecha de frutos cítricos

Problemática:

- Desarrollo de resistencia a los principales fungicidas de síntesis para el control de *Penicillium* en postcosecha de cítricos
- Cambios en las exigencias de residuos permitidos en la fruta (número máximo y cantidad)
- Cambios en los principios activos permitidos según mercados

Aislamiento y evaluación de resistencia al IMZ en *Penicillium digitatum*:

Aislamientos provenientes de campo y plantas de empaque

Sporulation on lemon fruit treated with 1500 mg L^{-1} of IMZ in water and the minimum imazalil (IMZ mg L^{-1}) concentrations (MIC) that inhibited el growth *in vitro* of field and packinghouse isolates of *Penicillium digitatum*.

Isolate	Origin	IMZ MIC	Sporulation[a]	Isolate	Origin	IMZ MIC	Sporulation[a]
7	Field	0.05	–	35	Field	0.05	–
12	Field	0.05	–	36	Field	0.05	–
20	Packinghouse	3.0	+	40	Field	0.05	–
21	Packinghouse	3.0	+	41	Packinghouse	0.05	–
22	Field	0.05	–	42	Field	0.05	–
23	Field	0.05	–	43	Packinghouse	3.0	+
28	Packinghouse	1.5	+	46	Packinghouse	1.5	+
29	Packinghouse	3.0	+	47	Packinghouse	1.5	+
30	Packinghouse	2.0	+	51	Packinghouse	1.5	+
31	Packinghouse	2.0	+	H	Field	0.05	–
32	Packinghouse	0.05	–	J	Field	0.05	–
34A	Packinghouse	2.0	+	P	Packinghouse	0.05	–
34I	Packinghouse	2.0	+	S	Packinghouse	1.5	+

[a] – = without sporulation; + = with sporulation.

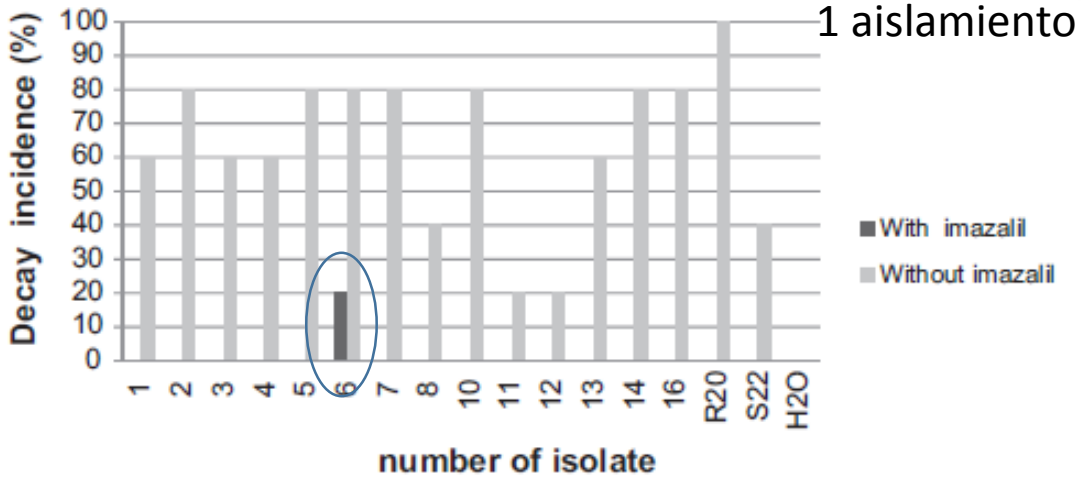
Pérez et al. 2011. Postharvest Biology and Technology

Crecimiento >1ppm: Resistente a aplicación comercial de IMZ

Aplicación de 3000ppm
15s inmersión

Residuo en fruta de 3,08 ppm

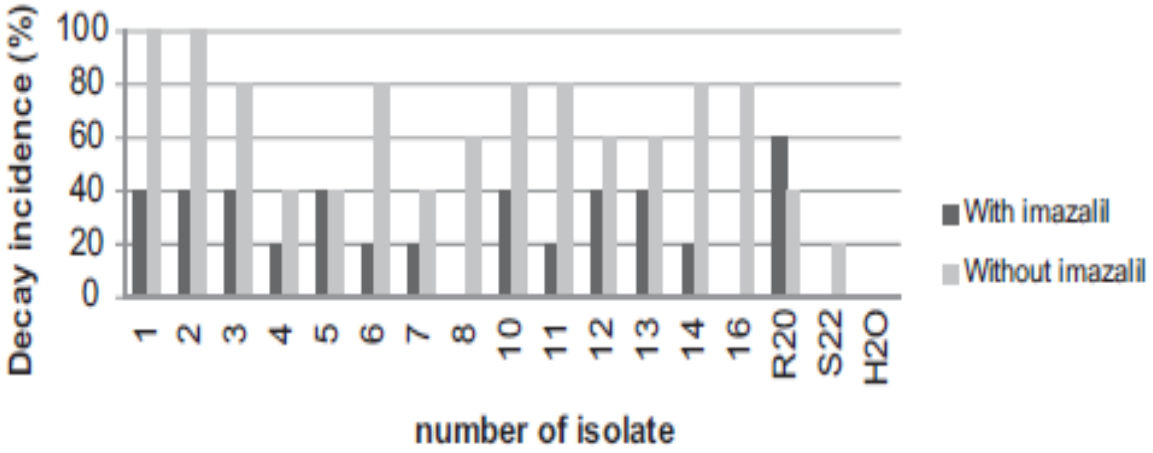
1 aislamiento



Aplicación de 1500ppm
Spray + 1500ppm cera

Residuo en fruta de 0,92 ppm

13 aislamientos



Pérez et al. 2011. Postharvest Biology and Technology

¿De qué depende el residuo en la fruta?

1 DOSIS-CONCENTRACIÓN APLICADA

2 MÉTODO DE APLICACIÓN

- Efectividad de la aplicación (residuos en la fruta) depende totalmente del método de aplicación empleado y de las condiciones del caldo en cada situación (Brown and Dezman, 1990; Smilanick 2005; 2008; Varela et al. 2012)

(Inmersión > cascada > aspersión)

- Aplicación con la cera es MENOS eficiente y debe aplicarse a mayor concentración. Ej. **2000ppm** en la cera = **250ppm** en inmersión 30s (Eckert 1987, 1994)

3 CONDICIONES DE APLICACIÓN

- Temperatura del caldo
- Nivel de materia orgánica (filtros)
- Surfactrantes, adherentes, otros componentes del caldo? Otros fungicidas? Sales?

4 VARIEDAD-ESPECIE CíTRICA

- Mandarinas vs Naranjas

Incidencia de Penicillium sensible y resistente a IMZ en naranjas W. Navel y Valencia

Cuadro 3. Incidencia (%) de moho verde después de la inoculación con aislamientos de *P. digitatum* **sensible** (IMZ-S) y **resistente** (IMZ-R) a Imazalil en naranja var. Valencia luego de 19, 26, 33 días a 6 ± 2 °C y un período de vida comercial de 7 días a 13 ± 2 °C.

	Tiempo de almacenamiento (días)							
	19		26		33		33 + 7	
Tratamiento	IMZ-R	IMZ-S	IMZ-R	IMZ-S	IMZ-R	IMZ-S	IMZ-R	IMZ-S
Control agua 20 °C	18,3 a	10,0 a	23,3 a	21,7 a	45,0 abc	26,7 a	63,3 a	63,3 a
Control cera	18,3 a	1,7 b	31,7 a	3,3 b	48,3 ab	13,3 b	56,7 ab	20,0 cd
Control agua 50 °C	13,3 a	1,7 b	16,7 a	3,3 b	50,0 a	10,0 b	66,7 a	38,3 b
Control BCS 3%	5,0 a	5,0 ab	6,7 a	5,0 ab	23,3 cd	26,7 a	30,0 cd	33,3 bc
BCS 3% + IMZ 1000 mg.kg^{-1} (A)	5,0 a	1,7 b	11,7 a	1,7 b	20,0 d	3,3 c	**26,7 d**	**3,3 e**
IMZ 1000 mg kg^{-1} 20 °C (B)	6,7 a	0,0 b	11,7 a	0,0 b	28,3 bcd	15,0 b	**33,3 cd**	**20,0 cd**
IMZ 1000 mg kg^{-1} 50 °C (C)	5,0 a	0,0 b	8,3 a	0,0 b	23,3 cd	5,0 c	35,0 cd	13,3 d
IMZ 3000 mg kg^{-1} (D)	15,0 a	0,0 b	28,3 a	0,0 b	31,7 c	4,0 c	45,0 bc	10,0 d

Lado et al. 2013, Agrociencia

Control efectivo de aislamientos sensibles con:

Residuo inicial en fruta entera

IMZ 1000ppm 50°C: 1,50-1,80 ppm
IMZ 1000ppm + 3% BIC: 0,60-0,90 ppm
IMZ 3000ppm en la cera- residuo: 3,0-4,8 ppm

Control no eficiente **(>10% incidencia en fruta inoculada)**
IMZ 1000ppm 20°C: 0,60-0,89 ppm

AISLAMIENTOS RESISTENTES NO SON CONTROLADOS CON NINGÚN RESIDUO!!

(Pérez et al 2011; Lado et al., 2013)

PARA LOGRAR UN CONTROL EFECTIVO DE CEPAS SENSIBLES ES NECESARIO UN RESIDUO DE 2-3 ppm EN LA FRUTA

(Lado et al. 2013)

Agua caliente duplica el nivel de residuos en la fruta y potencia control biotipos resistentes

Ojo!!

- Monitorear concentración en caldo (evaporación agua)
- Mayor absorción e incorporación en la fruta
- Cuidados especiales de tiempos en variedades sensibles-fitotoxicidad

Sales- Bicarbonato 1 o 3% y Sorbato de K 2%

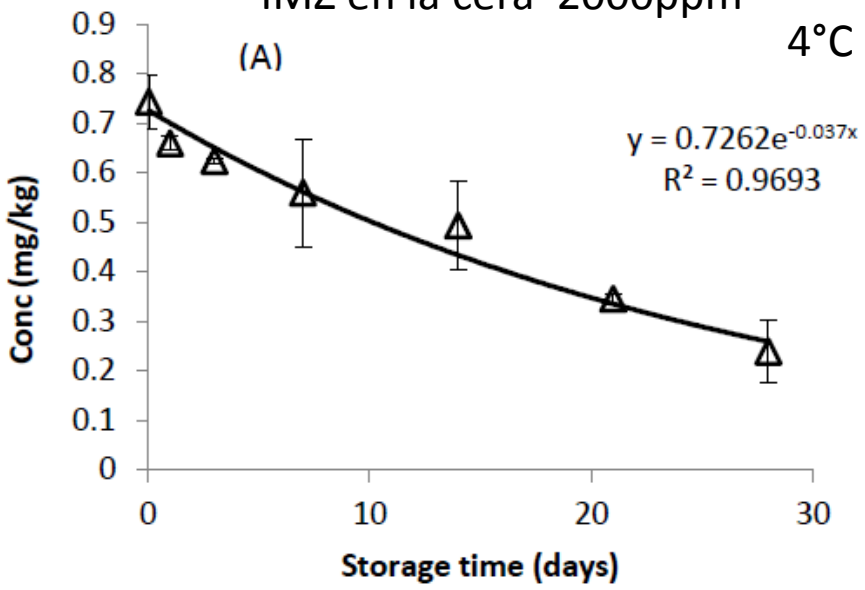
- En general no impactan en el nivel de residuos, aunque puede haber un efecto varietal o de pH del caldo

- Colaboran en enlentecer el crecimiento de ambos tipos de aislamientos y deben ser usadas en marco de estrategia de control integrado

Disipación del residuo de IMZ en la fruta durante el almacenamiento refrigerado

Treatment	IMZ in wax	
Application dose (mg L^{-1})	1000	2000
Residue T= 0 d (mg kg^{-1})	0.24 (0.03)	0.74 (0.05)
Residue T= 28 d (mg kg^{-1})	0.12 (0.01)	0.19 (0.06)

IMZ en la cera 2000ppm



Besil et al. 2015

Nivel de residuos de IMZ es prácticamente estable en naranjas Navel y Valencia almacenadas a **2°C** (Lado et al., 2013) mientras que a **4°C** ocurre una disipación del mismo en mandarinas Clementinas (Besil et al., 2015)

Evaluación de principios activos complementarios al IMZ en el control de Penicillium: Pirimetanil-PYR

Incidencia (%) de *P. digitatum* **sensible (IMZ-s)** y **resistente (IMZ-r)** al IMZ en W. Navel y Ellendale respecto al control, luego de 15 días a 20°C, según tratamiento y método de aplicación (cascada e inmersión 30 s).

	W. Navel				Ellendale			
	IMZ-Resistente		IMZ-Sensible		IMZ-Resistente		IMZ-Sensible	
	Inmersión	Cascada	Inmersión	Cascada	Inmersión	Cascada	Inmersión	Cascada
Control	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
IMZ 1000	19,3 b	12,2 b	1,9 b	3,1 b	21,2 b	28,8 b	0,3 b	3,3 b
PYR 1000	**7,6 bc**	**5,4 b**	6,3 b	8,3 b	**4,1 c**	**5,4 c**	1,7 b	6,4 b
IMZ + **PYR**	**3,4 c**	**3,7 b**	1,3 b	1,4 b	**1,4 c**	**5,2 c**	0,3 b	3,3 b

Lado et al. 2010

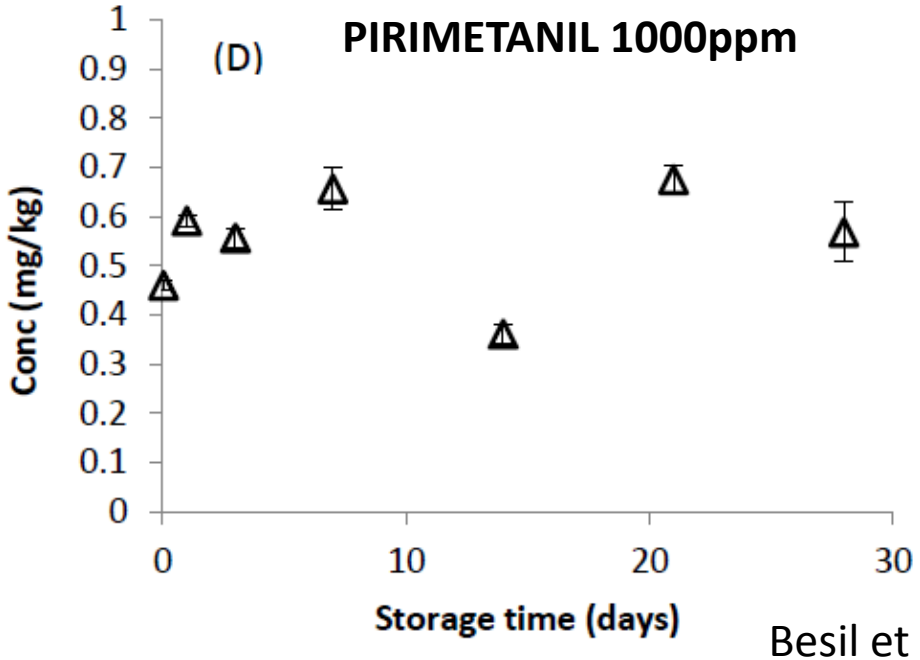
Incidencia (%) y esporulación (%) de *P. digitatum* (**sensible al IMZ**) en frutas de tangor Ellendale según tratamiento aplicado mediante "drencher", luego de 7 y 15 días a 20° C.

	7 días a 20° C		15 días a 20° C	
Tratamiento	Incidencia	Esporulación	Incidencia	Esporulación
Control	79,1 a	69,1 a	86,0 a	84,1 a
PYR500 Pyrus	2,3 b	1,0 b	5,8 b	3,9 b
PYR500 Fruitgard PIR	3,8 b	1,9 b	5,9 b	3,8 b

Lado et al. 2010

- Concentraciones de **1000ppm** son efectivas en mandarinas (Satsumas y Ellendale) para controlar **biotipo resistente**, incluso aplicadas con sorbato de K
- En naranjas **Navel** se logró un control efectivo con **500ppm** (Varela et al., 2012)

Evolución de los residuos de Pirimetanil en frutas de clemenules tratadas mediante cascada



- **Molécula MUY estable a 4°C**
- **No existe degradación durante almacenamiento**

Besil et al. (2015)

Naranjas y limones

Control efectivo *de P. digitatum*

60s inmersión en **300-500 ppm** PYR → **1-2 ppm** en fruta (Smilanick et al 2006)

Mínimo residuo efectivo**: 0,65-0,84 ppm** en fruta (D´Aquino et al. 2006)

NECESARIO monitorear concentración de residuos en caldos y en fruta luego de aplicación

¿Existe o es probable el desarrollo de resistencia al pirimetanil?

Table 2
Mean concentrations of PYR that inhibited the size of colonies of green mold on PDA by 50% (EC_{50}).

	EC_{50} (mg L^{-1}) (±SD)			
	Sensitive	n[a]	Resistant	n
Orchard	0.14 (0.03)	43	–	0
Packing house	0.13 (0.05)	65	3.40	1

Isolates were classified as sensitive or resistant according to their EC_{50}.
[a] n: number of isolates of *P. digitatum*.

109 aislamientos de *Penicillium digitatum*

A21!!!

Necesario combinar principios activos-uso eficiente de los mismos para evitar excesiva presión de selección

Table 3
Effectiveness of PYR to control green mold after inoculation of Salustiana oranges with an *P. digitatum* PYR-sensitive isolate (A133) and an PYR-resistant isolate (A21), both originated from packing houses.

PYR concentration (mg L^{-1})	Green mold (%)[a]	
	A133	A21
0	65 a[b]	83 a
PYR 500	18 b	54 a
PYR 1000	12 b	50 a

[a] Fruits stored at 20 °C and 90% RH for 10 d before green mold incidence was recorded.
[b] Within each row, unlike letters indicate significant differences according to Tukey test ($P \leq 0.05$).

Aislamiento resistente no controlado por la aplicación de 1000ppm

Vásquez et al 2014

Evaluación de otros principios activos como posibles alternativas-complemento

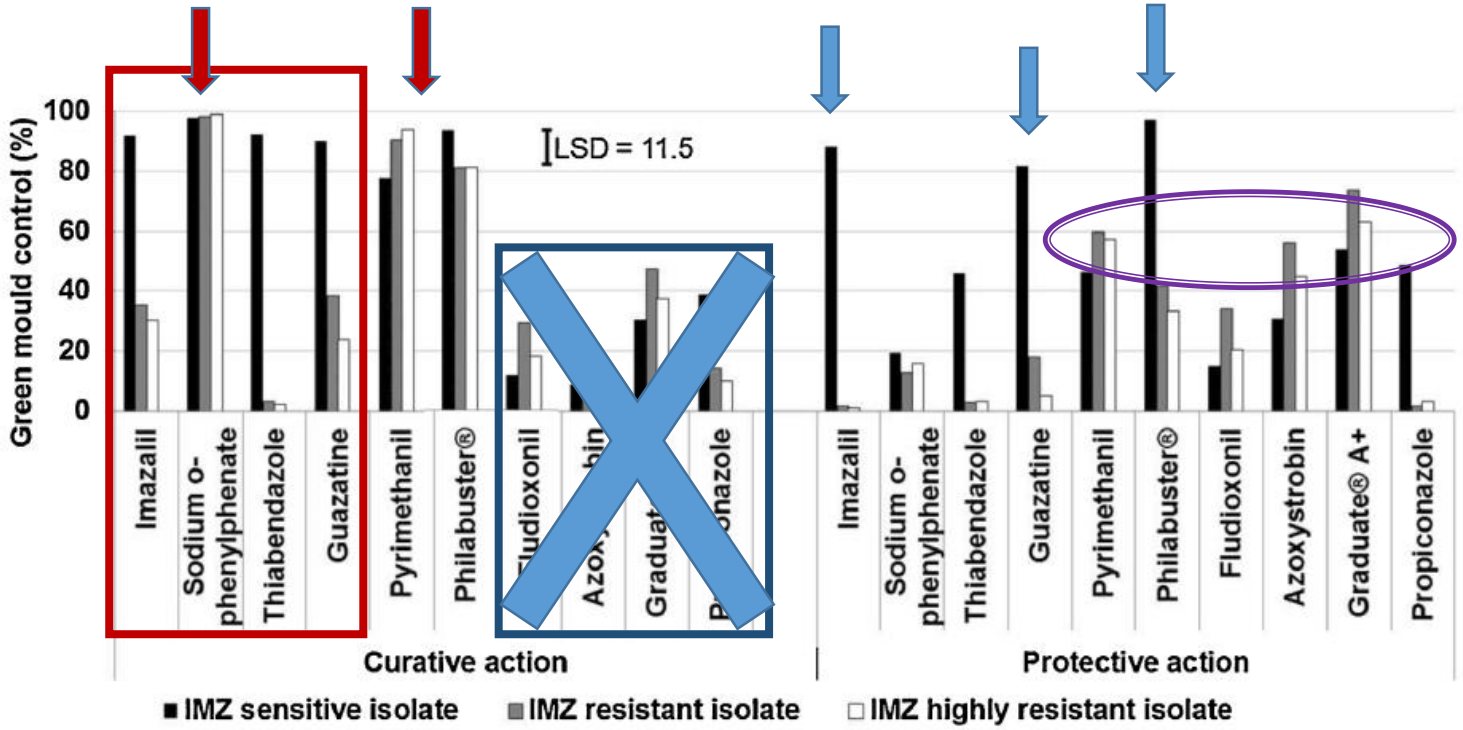


Fig. 1. Mean percentage green mould control on orange fruit inoculated with an imazalil (IMZ) sensitive, resistant or highly resistant *Pencillium digitatum* isolate 24 h prior to (curative) or ±4 h after (protective) 60 s aqueous dip treatment with 10 different fungicides at registered or experimental concentrations. The LSD value (11.5) was determined by means of Fisher's test ($P \leq 0.05$).

Erasmus et al. 2015 PBT

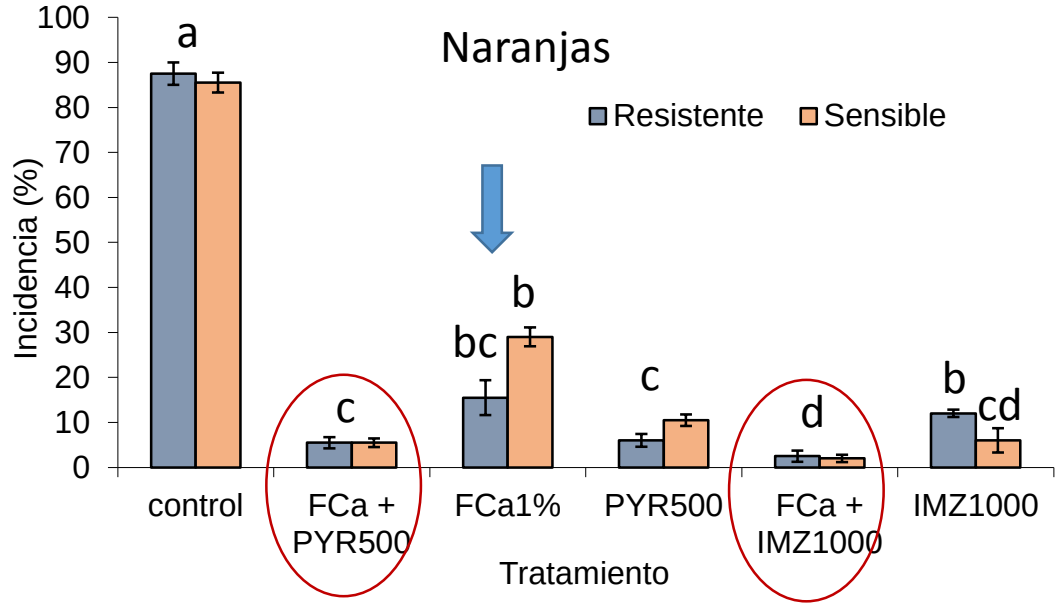
- Fungicidas convencionales (IMZ, SOPP, TBZ, GZT, PYR, PLB) proveen un control curativo excelente de los aislamientos **sensibles a IMZ**
- **Solo SOPP y PYR proveen este mismo control curativo en aislamientos resistentes**

Únicamente **PLB, IMZ y GZT** presentaron acción protectiva en aislamientos sensibles (>80%)

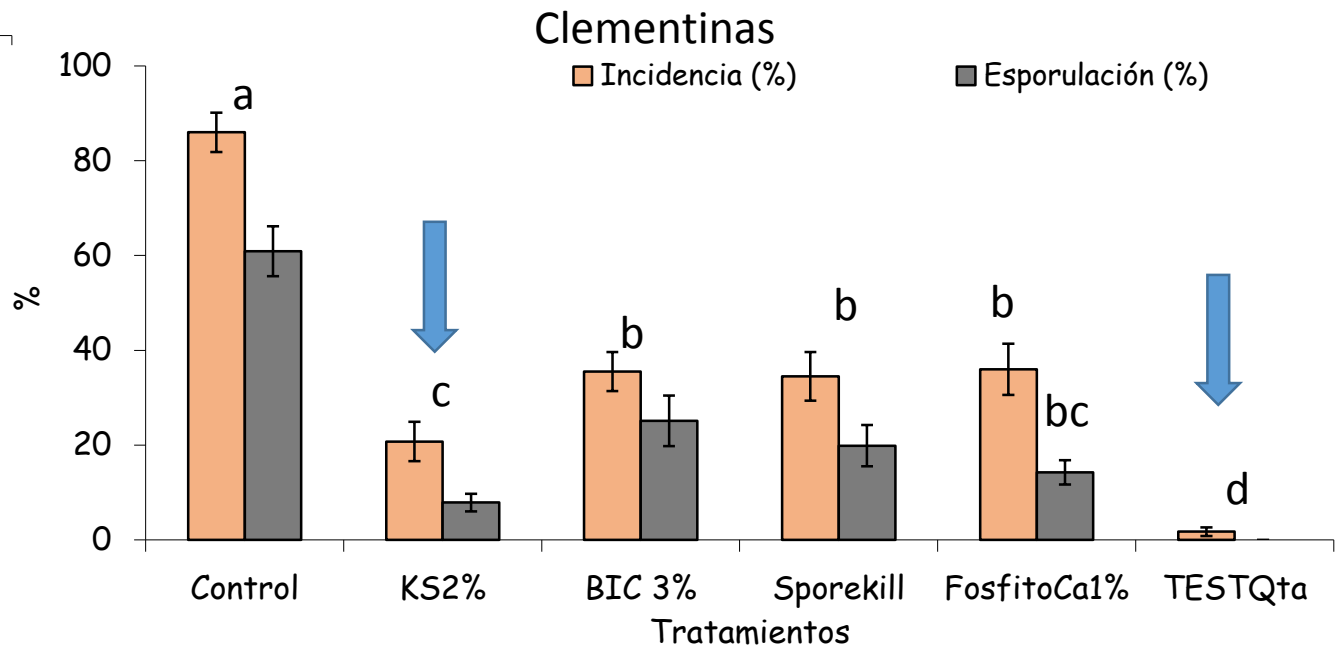
Acción protectiva muy pobre de TODOS en aislamientos resistentes en todos los fungicidas

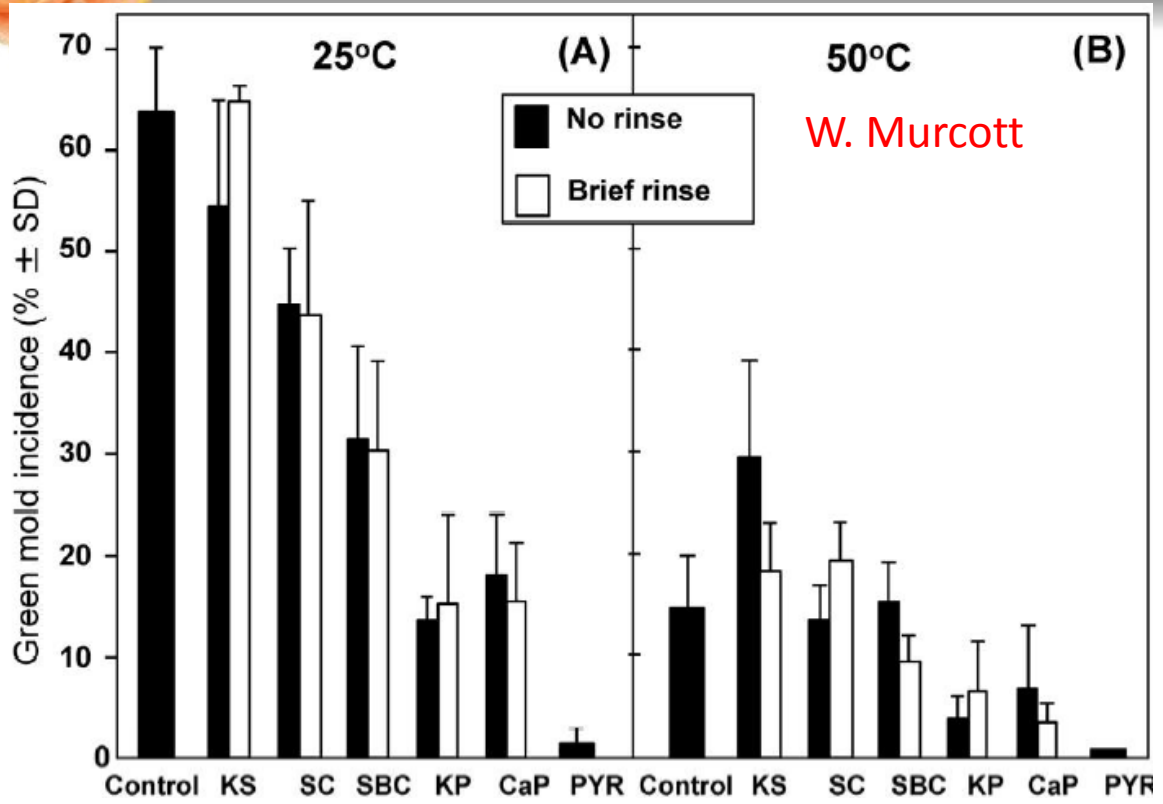
RESISTENCIA MULTIPLE: IMZ, GZT, TBZ and PPZ

Control de *Penicillium digitatum* en naranjas Navel y Clementinas durante el desverdizado



Fosfito de Ca 1%
Bicarbonato 1 o 3%
Sorbato de K 2%



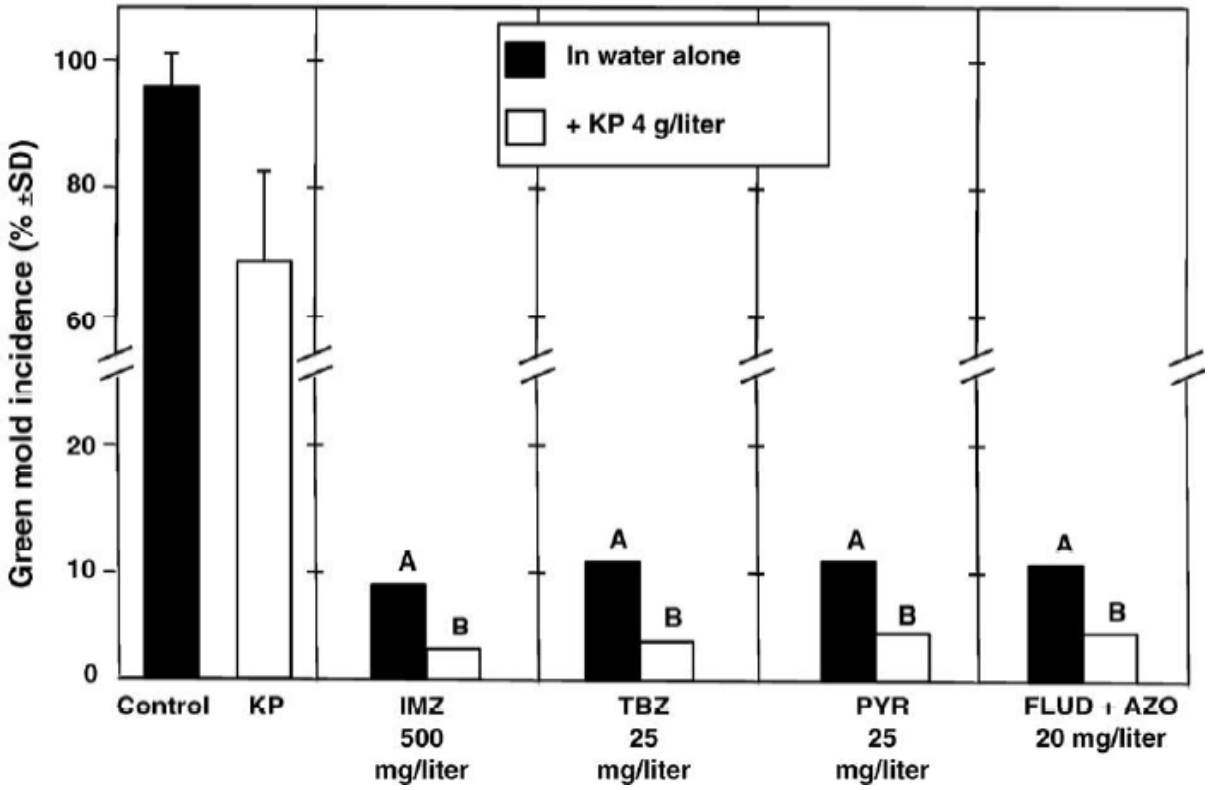


W. Murcott

Fosfitos de calcio y de potasio

En todos los casos se aplicó el tratamiento por inmersión 30s

Eureka Lemon



Cerioni et al., 2013

Aislamiento Resistente a IMZ

KS- 2%
SC- Carbonato de Na 2%
SBC-Cabonato de Na 2%
KP- Fosfito de K 2%
CaP-Fosfito de Ca 2%
PYR- 1000ppm

RESUMEN

El nivel de residuo de IMZ logrado en la fruta debe ser superior a 2ppm en aplicaciones acuosas y entre 3 y 4 ppm en aplicaciones con la cera para lograr un control efectivo de aislamientos sensibles (Lado et al., 2013)

La degradación/disipación del IMZ es lenta durante el almacenamiento refrigerado de las naranjas Washington Navel y Valencia- importancia cumplir con LMR en aplicación

La disipación del IMZ durante el almacenamiento refrigerado es menor a 2°C que a 4°C y más marcada en mandarinas que en naranjas (Lado et al., 2013; Besil et al., 2015)

En el caso de **aislamientos resistentes**, los mismos NO son controlados por el IMZ independientemente del residuo logrado, por lo que se debe combinar con otra estrategia de manejo integrado: temperatura, sales, otros p.a. Cuidar productos que hoy tenemos

Agregado de sales (Bicarbonato y Sorbato de K) y fosfitos potencia el control de aislamientos sensibles y colabora en reducir crecimiento de aislamientos resistentes, sin modificar el nivel de residuos en la fruta. Temperatura aumenta nivel de residuos.

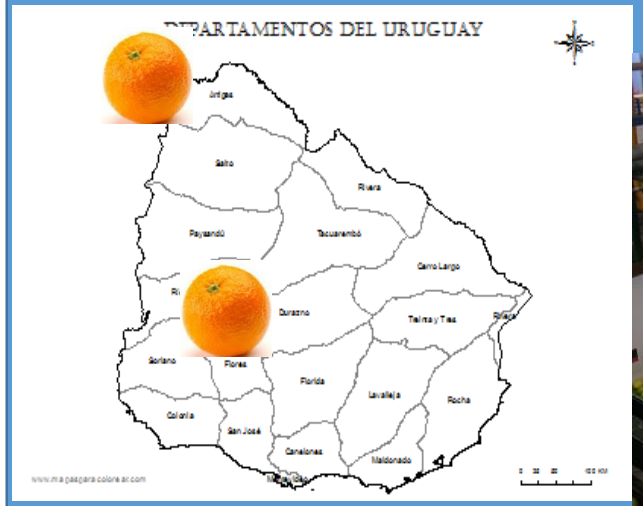
Necesidad de combinar con otras medidas de manejo: fruta en **madurez adecuada**, **limpieza** y desinfección de bins, plantas de empaque, cámaras, manejo eficiente de drencher (filtros para M.O.), proceso de desverdizado, refrigeración inmediata.

EVALUACIÓN DEL Fruitgard PZ100 (p.a. Propiconazole) PARA EL CONTROL DE *Geotrichum citri aurantii*

Equipo de trabajo: Oribe Blanco, Andrea Guimaraens, Fátima Rodriguez, Natalia Besil, Horacio Heinzen, Joanna Lado, Elena Pérez.

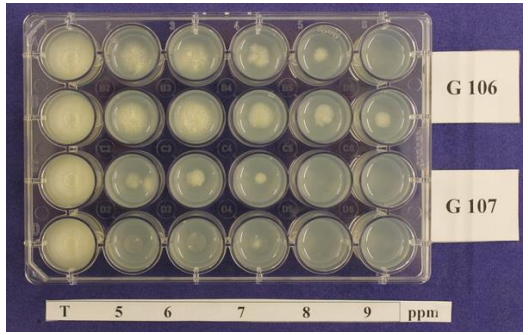
MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA

1. Prospección de aislamientos campo y plantas de empaque



2. Purificación, cultivos monospóricos y prueba de patogenicidad

3. Evaluación de la inhibición por diferentes dosis del producto



Evaluación de la efectividad del Propiconazole en naranja Valencia

Fruitgard AG20	Guazatina (20.4%) **1000 ppm**
Fruitgard PZ100	Propiconazole (9.8%) **600 ppm**
Testigo	

Evaluación del residuo efectivo de Propiconazole en fruta para el control de *Geotrichum* en mandarinas clementina

- ✓Concentraciones de Propiconazole evaluadas: 600, 1000 y 2000 ppm.
- ✓Determinación de residuos: en momento de aplicación del tratamiento y luego de 18 d a temperatura de 1 ± 0,5°C y 7 d a 20 ºC
- ✓Evaluación de la incidencia de enfermedad: a la salida de frío y luego de simulación de vida mostrador

RESULTADOS

Evaluación de la efectividad del fungicida

Incidencia de *Geotrichum citri aurantii* (%) en naranja Valencia artificialmente inoculada y tratada con fungicidas

	Tratamiento	Ensayo1	Ensayo2
	Control	90,0 a	76,0 a
1000ppm	Guazatina	20,0 b	2,60 b
600ppm	Propiconazol	2,60 c	0,60 b

Medias seguidas de la misma letra no se diferencian significativamente Test de Tukey ($p \leq 0,05$)

Evaluación del residuo efectivo de Propiconazole en fruta para el control de *Geotrichum* en mandarinas clementina

Incidencia (%) de ***Geotrichum*** tras 18 días de cuarentena por frío y 7 días de vida mostrador

18d 1°C + 7 días a 20°C	
Control	**80 ± 10 a**
600ppm	30 ± 5,0 b
1000ppm	6,7 ± 2,0 c
2000ppm	3,5 ± 2,0 c

Residuos logrados mediante **INMERSION 60s**!!

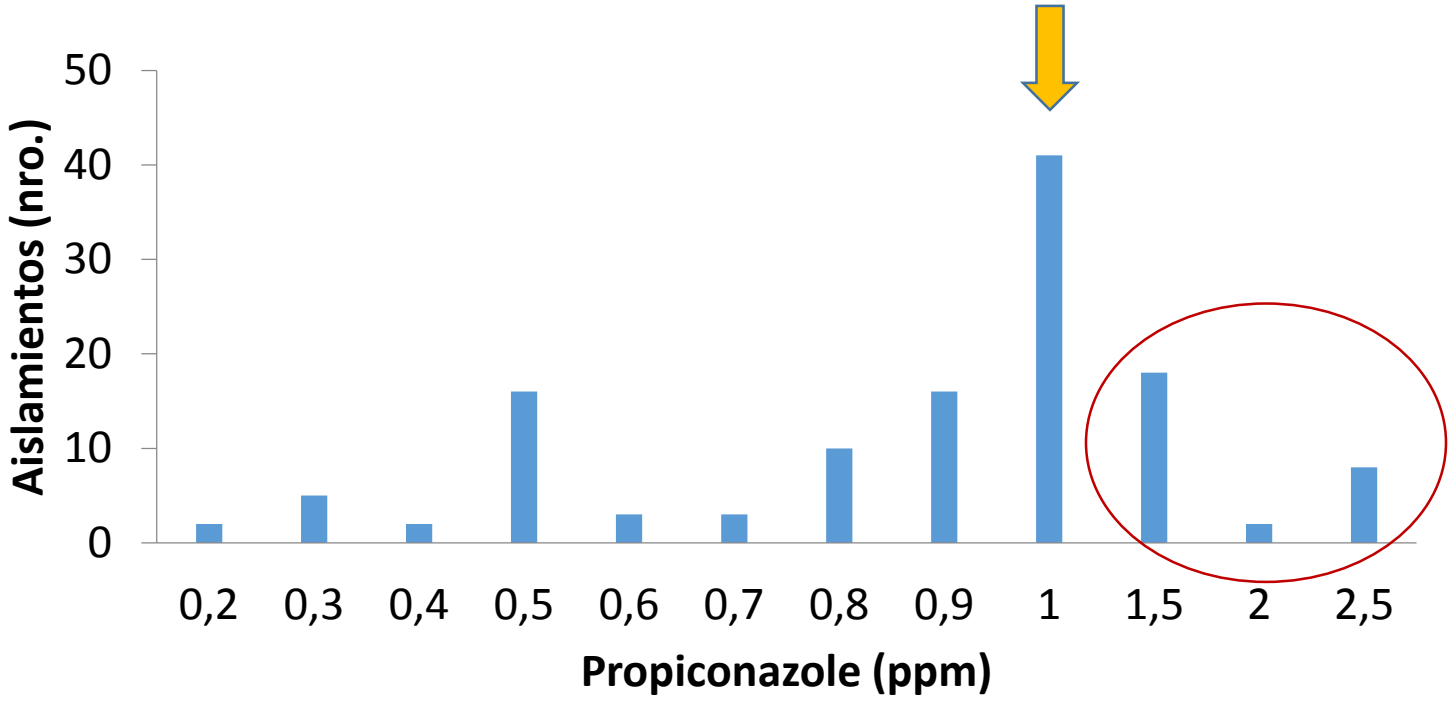
Residuos de propiconazol (ppm) en fruta entera en el momento de aplicación (0d) tras 18 días de cuarentena por frío y 7 días de vida mostrador

Tiempo	600ppm	1000ppm	2000ppm
0 d	1,82 ± 0,01	3,11 ± 0,11	3,68 ± 0,23
18 d 1ºC	1,39 ± 0,04	3,23 ± 0,07	3,63 ± 0,11
18d + 7d 20ºC	1,51 ± 0,04	3,11 ± 0,11	3,01 ± 0,11

Se recomienda la aplicación de **dosis mayores a 600ppm**, obteniéndose un control aceptable a partir de 1000ppm y con un residuo en fruta de al menos **3 ppm** en el momento de aplicación

MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA

Número de aislamientos inhibidos *in vitro* por diferentes concentraciones de Propiconazole (ppm).



100 aislamientos

Aislamientos de campo
10 aislamientos por chacra
En el norte y el sur
87 aislamientos

Aislamientos de **planta de empaque**
13 aislamientos

GRACIAS!!!