

# Caracterización de aislamientos de moho verde (*Penicillium digitatum*) resistentes al fungicida pirimetanil en la región citrícola del río Uruguay

PANOZZO, M.<sup>1</sup>; ALMIRÓN, N.<sup>1</sup>; BELLO, F.<sup>1</sup>; VÁZQUEZ, D.<sup>1</sup>

## RESUMEN

El uso continuado de los fungicidas tiabendazol e imazalil en los empaques citrícolas de la región del río Uruguay ha llevado a la selección y proliferación de aislamientos de moho verde resistentes; este hongo es la principal causa de podredumbres en poscosecha. Recientemente, el fungicida pirimetanil (anilino-pirimidina) (PYR) se ha incorporado a los programas de control de esta enfermedad. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la resistencia a este fungicida de una colección de aislamientos, obtenida luego de que este principio activo se incorporara a los programas de control en los empaques citrícolas durante un período de aproximadamente 5 años. 122 aislamientos de moho verde fueron recolectados desde Monte Caseros (Corrientes) hasta Concordia (Entre Ríos) durante 2015. Estos fueron obtenidos de frutos con síntomas del patógeno en campo y empaque. Se determinó la concentración de PYR que reduce el crecimiento de las colonias en un 50% ( $EC_{50}$ ) para cada aislamiento. La  $EC_{50}$  media de los aislamientos recolectados en campo fue de  $0,16 \pm 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ . No se observaron aislamientos resistentes en campo donde el fungicida no es usado. Por el contrario, el 64,4% de los aislamientos recolectados en empaques se muestran resistentes a PYR, con una  $EC_{50}$  media de  $5,51 \pm 0,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Los sensibles presentan una  $EC_{50}$  media de  $0,20 \pm 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ . La información suministrada en este trabajo resulta importante en el monitoreo de la susceptibilidad del moho verde al fungicida PYR en la región citrícola del río Uruguay. La incorporación de este fungicida en los programas de control de moho verde debe hacerse en forma cuidadosa, implementando distintas estrategias para lograr resultados efectivos.

**Palabras clave:** fungicida de síntesis, podredumbres de poscosecha de cítricos, resistencia.

## ABSTRACT

*The continuous use of the fungicides thiabendazol and imazalil in the citrus packing houses of the Uruguay River region has led to the selection and proliferation of resistant green mold isolates, being this fungus the main cause of postharvest rot. Recently, the fungicide pyrimethanil (anilino-pyrimidine) (PYR) has been incorporated into the control programs of this disease. The objective of the present work was to study the resistance to this fungicide of a collection of isolates, obtained after this active principle was incorporated into control programs in the citrus packaging houses during a period of approximately 5 years. 122 green mold isolates were collected from Monte Caseros (Corrientes) to Concordia (Entre Ríos) during 2015. They were obtained from fruits with symptoms of the pathogen in the field and packaging. The concentration of PYR which reduces*

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Concordia. Estación Yuquerí s/n Concordia, Entre Ríos, Argentina. Correo electrónico: vazquez.daniel@inta.gob.ar

colony growth by 50% ( $EC_{50}$ ) was determined for each isolation. The mean  $EC_{50}$  of the field-collected isolates was  $0.16 \pm 0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$ . No resistant isolates were observed in the field where the fungicide is not used. In contrast, 64.4% of those collected from packing houses were resistant to PYR, with an average  $EC_{50}$   $5.51 \pm 0.37 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Those sensible isolates showed an  $EC_{50}$  mean  $0.20 \pm 0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The information provided in this work is important for monitoring susceptibility of green mold to the fungicide PYR in the citrus region of the Uruguay River. The incorporation of this fungicide in green mold control programs must be done carefully, and different strategies must be implemented to achieve effective results.

**Keywords:** Synthesis fungicide, citrus postharvest rot, resistance.

## INTRODUCCIÓN

Las pérdidas económicas ocasionadas por las enfermedades de poscosecha representan actualmente uno de los principales problemas de la frutihorticultura mundial (Harvey, 1978; Kelman, 1989). Estas pérdidas varían en función de la zona de producción, de la especie y del cultivar, de la edad del árbol, de las condiciones climáticas y del manejo pre y poscosecha. En el caso de cítricos las podredumbres pueden ocurrir en el campo durante la cosecha, transporte, empaque, almacenamiento y conservación en frío y durante el proceso de comercialización (Garrán, 1996; Lado *et al.*, 2011). Los principales agentes causales de podredumbres en estos frutos son el moho verde (*Penicillium digitatum* Sacc.) y el moho azul (*P. italicum* Wehmer); el primero es el patógeno más común y de mayor actividad reproductiva (Garrán, 1996; Tuset, 1987). Para su control se recurre a un manejo integrado, en donde el uso de fungicidas de síntesis es un componente clave (Beattie *et al.*, 1992; Agustí, 2000; Kanetis *et al.*, 2010).

En los empaques del litoral del río Uruguay, los cítricos son tratados con tiabendazol e imazalil para el control de los mohos. No obstante, en ambientes donde se ha hecho un uso continuo de ellos, se ha observado una selección y proliferación de biotipos capaces de resistir las dosis comerciales de estos fungicidas (Burdyn *et al.*, 2010; Lado *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2011). En 2011 el uso del fungicida pirimetanil (PYR) no se encontraba ampliamente difundido en la región para el control de estos patógenos. Este producto, de bajo riesgo respecto al medioambiente y a la dieta humana, actúa bloqueando la síntesis de proteínas a través de la inhibición de la biosíntesis de la metionina (Kanetis, 2005; Smilanick *et al.*, 2006; 2008).

Vazquez *et al.* (2014) determinaron la línea base de sensibilidad del moho verde a este fungicida en la región citrícola del NE de Entre Ríos y SE de Corrientes en el año 2011. Para ello, se recolectaron 109 aislamientos de campo y empaque y se calculó la concentración del fungicida que inhibe el 50% del crecimiento del patógeno en medio de cultivo ( $EC_{50}$ ). La  $EC_{50}$  media de los aislamientos recolectados en el campo fue  $0,14 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ , no encontrándose aislamientos resistentes; la  $EC_{50}$  media de los recolectados en empaques fue  $0,13 \pm 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Un aislamiento originado en un empaque mostró una  $EC_{50}$  de  $3,40 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 26 veces superior al valor medio.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la resistencia a PYR de una colección de aislamientos de moho verde, obtenida luego de que este principio activo se incorporara a los programas de control en los empaques citrícolas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Origen de los aislamientos

122 aislamientos de moho verde fueron recolectados en la región citrícola del río Uruguay, desde Monte Caseros (Corrientes) hasta Concordia (Entre Ríos) durante 2015 (tabla 1). Dichos aislamientos fueron obtenidos de frutos de naranjas (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck), mandarinas (*C. unshiu*, *C. deliciosa*, *C. reticulata*) y pomelos (*C. paradisi*) con síntomas del patógeno en campo (63) y empaque (59), empleando un hisopo estéril, cuya punta fue rota dentro de un tubo con una solución de Tritón X-100 (0,01%). Dichos tubos fueron agitados para suspender los conidios. La siembra se realizó en placas de Petri con agar papa glucosado (PDA), las que fueron mantenidas a 25 °C durante 24 h. Para producir colonias monospóricas de cada aislamiento, se tomó un esporo germinado y se lo colocó en nuevas cajas con PDA (Kinay *et al.*, 2007).

### Determinación de la sensibilidad al fungicida

Se empleó PYR (97,5%, Janssen Pharmaceutica, Bélgica) y acetona como diluyente (Kinay *et al.*, 2007). El pH del medio fue  $5,6 \pm 0,1$ . Al medio de cultivo se le adicionó PYR a las concentraciones de 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,40; 0,50 en los aislamientos de campo y 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 4,50; 5,00; 5,50; 6,00; 6,50 en los de empaque según pruebas preliminares de sensibilidad. Como control se empleó PDA no adicionado con PYR para el crecimiento de todos los aislamientos.

A partir de cultivos monospóricos de hasta 10 días de edad se obtuvo una suspensión de esporos, la que fue diluida con agua a una absorbancia de 0,1 a 425 nm, medida con espectrofotómetro BOECO S-22 UV/Vis., densidad que contiene aproximadamente  $1 \times 10^6$  esporos/mL (Eckert y Brown, 1986). A partir de dicha suspensión de esporos se tomó 0,1 mL que se colocó en tubos con 10 mL de PDA a 45 °C. Se sembraron cajas de Petri que se incubaron a 20 °C.

Especie / Variedad	Lugar de Muestreo					
	Concordia		Federación		Monte Caseros	
	Campo	Empaque	Campo	Empaque	Campo	Empaque
Naranja "Salustiana"	4		1	3		
Naranja "Ombigo"	3					
Naranja "Común"	1					
Naranja "Valencia Late"	3		4	7		2
Naranja "Valencia Seedless"				1		
Naranja <sup>a</sup>	3	4			14	8
Mandarina "Nova"	10	3	4	2		
Mandarina "Ellendale"	1		6			
Mandarina "Clementina"				3	1	4
Mandarina "Común"			3			
Mandarina "Murcott"			2			
Mandarina "Dancy"			1			
Mandarina "Mor"			1			
Mandarina "Or"			1			
Mandarina "Okitsu"		4		2		
Mandarina "Satsuma"		7				
Mandarina <sup>a</sup>		4				4
Pomelo "Star Ruby"				1		

<sup>a</sup>No se identificó la variedad.

**Tabla 1.** Aislamientos de moho verde recolectados de la región citrícola del río Uruguay (Argentina).

durante 24 h. De ellas se extrajeron discos de 6 mm de diámetro de inóculo de *P. digitatum*, los que se colocaron en las placas control y en las adicionadas con PYR. Se emplearon 3 placas por cada concentración de fungicida estudiado y el control para cada aislamiento. Las cajas se incubaron a 20 °C durante 3 días. El diámetro de las colonias fue determinado como el promedio de los diámetros transversales de cada colonia y dicho valor fue promediado para las 3 repeticiones de cada concentración evaluada. El porcentaje de inhibición fue calculado con referencia al crecimiento de las colonias en el control (Kanetis *et al.*, 2008).

### Análisis estadístico

La concentración de PYR que reduce el crecimiento de las colonias en un 50% ( $EC_{50}$ ) es la medida de sensibilidad más precisa para evaluar las interacciones entre huésped y fungicida (Kanetis *et al.*, 2008). Esta fue determinada por la relación lineal entre el probit del porcentaje de reducción de crecimiento y el logaritmo de la concentración de fungicida (Brown, 1989).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En un estudio previo al uso masivo de PYR, realizado en la región citrícola del río Uruguay, se determinó que la

$EC_{50}$  media de los aislamientos recolectados en el campo fue  $0,14 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ , no encontrándose aislamientos resistentes; la  $EC_{50}$  media de los recolectados en empaques fue  $0,13 \pm 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Solo un aislamiento originado en un empaque mostró una  $EC_{50}$  de  $3,40 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 26 veces superior al valor medio (Vázquez *et al.*, 2014). Tomando estos valores como referencia, en el presente estudio no se observaron aislamientos resistentes en campo, donde el fungicida no es empleado. Esto coincide con numerosos estudios previos (Holmes y Eckert, 1995; Smilanick *et al.*, 2006; Kinay *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2009; 2011). La  $EC_{50}$  media de los aislamientos de campo, recolectados en 2015 fue de  $0,16 \pm 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Por el contrario, el 64,4% de los aislamientos recolectados en empaques (de bins, cámaras de frío / desverdizado, de frutas luego del proceso), se muestran resistentes a PYR, con una  $EC_{50}$  media de  $5,51 \pm 0,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Los sensibles presentan una  $EC_{50}$  media de  $0,20 \pm 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$  (tabla 2).

Kinay *et al.* (2007) mencionaron que la  $EC_{50}$  de los aislamientos sensibles de moho verde a PYR fue de  $0,30 \mu\text{g mL}^{-1}$  mientras que de aquellos resistentes  $2,39 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Kanetis *et al.* (2010) determinaron que todos los aislamientos resistentes a PYR presentaban una  $EC_{50} > 8 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Li y Xiao (2005) informaron que la  $EC_{50}$  para aislamientos de *P. expansum* era variable (entre  $0,52$  y  $2,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Es de men-

EC50 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ( $\pm\text{SD}$ )				
	Sensibles	n	Resistentes	n
Campo	0,16 (0,02)	63	--	--
Empaque	0,20 (0,02)	21	5,51 (0,37)	38

Los aislamientos fueron clasificados como sensibles o resistentes a PYR en función de su EC<sub>50</sub>  
n: Número de aislamientos de *P. digitatum*

**Tabla 2.** Concentración de PYR que inhibe el tamaño de las colonias de moho verde en PDA en 50 % (EC<sub>50</sub>).

cionar que estos estudios fueron realizados antes de que el fungicida haya sido introducido. Nuestros estudios demuestran que la resistencia del patógeno al fungicida de síntesis se incrementó con el uso del mismo en los empaques.

## CONCLUSIONES

La información suministrada en este trabajo resulta importante en el monitoreo de la susceptibilidad del moho verde al fungicida PYR en la región citrícola del río Uruguay. En muestreos en empaques realizados en el año 2011, solo un aislamiento mostró resistencia a PYR, lo que representaba el 1,5% de los aislamientos recolectados. Su EC<sub>50</sub> fue de 3,40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Vazquez *et al.*, 2014). Por el contrario, en 2015, el 64,4% de los aislamientos fueron resistentes, con una EC<sub>50</sub> media de 5,51  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En ambos muestreos todos los aislamientos de campo se mostraron sensibles a este agroquímico.

Se concluye que la incorporación de PYR en los programas de control de moho verde en los empaques cítricos debe hacerse en forma cuidadosa, debiendo implantarse distintas estrategias, como la limpieza y desinfección de los empaques, la rotación o su combinación con fungicidas con distinto modo de acción como el imazalil, la incorporación de sales de sodio como bicarbonato, etc. Estas estrategias minimizarían la selección de aislamientos resistentes del patógeno y contribuirían a lograr resultados efectivos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Sra. Laura Eyman por su apoyo técnico y a productores y empacadores de cítricos. Este estudio fue financiado por INTA (PNFRU 1105083 "Nuevas tecnologías para el mantenimiento de la calidad en la cosecha, acondicionamiento y logística de frutas frescas").

## BIBLIOGRAFÍA

AGUSTÍ, M. 2000. Citricultura. Mundi Prensa, Madrid, España, p. 416.

BEATTIE, B.; WILD, B.; TUGWELL, B.; BAGSHAW, J.; KEENAN, P. 1992. Postharvest management. En: BEATTIE, B.; REVELANT, L. (Eds.). Quality Management Guide. Australian Horticultural Corporation, NSW Agriculture, pp. 121-184.

BROWN, G.E. 1989. Baseline sensitivity of Florida isolates of *Penicillium digitatum* to imazalil. Plant Dis. 73, 773-774.

BURDYN, L.; GARRÁN, S.M.; AVANZA, M.M.; ALMIRÓN, N. 2010. Resistencia de *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* a los fungicidas de uso corriente en poscosecha. VI Congreso Argentino de Citricultura, San Miguel de Tucumán, Argentina.

ECKERT, J.W.; BROWN, G.E. 1986. Evaluation of postharvest treatments for citrus fruits. En: HICKEY, K.D. (Ed.). Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, pp. 92-97.

GARRÁN, S.M. 1996. Enfermedades durante la poscosecha. En: FABIANI, A.; MIKA, R.; LAROCCA, L.; ANDERSON, C. (Eds.). Manual para productores de naranjas y mandarinas de la región del río Uruguay, INTA, pp. 173-240.

HARVEY, J.M. 1978. Reduction of losses in fresh market fruits and vegetables. Annual Review of Phytopathol. 16:321-341.

HOLMES, G.J.; ECKERT, J.W. 1995. Relative fitness of imazalil-resistant and -sensitive biotypes of *Penicillium digitatum*. Plant Dis. 79, 1068-1073.

KANETIS, M. 2005. Resistance potential of azoxystrobin, fludioxonil, and pyrimethanil to the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. Phytopathol. 95, S51.

KANETIS, M.; FÖRSTER, H.; ADASKAVEG, J.E. 2008. Baseline sensitivities for new postharvest fungicides against *Penicillium* spp. on citrus and multiple resistance evaluation in *P. digitatum*. Plant Dis. 92, 301-310.

KANETIS, M.; FÖRSTER, H.; ADASKAVEG, J.E. 2010. Determination of natural resistance frequencies in *Penicillium digitatum* using a new air-sampling method and characterization of Fludioxonil- and Pyrimethanil-resistant isolates. Phytopathol. 100, 738-746.

KELMAN, A. 1989. Introduction: The importance of research on the control of postharvest diseases of perishable food crops. Phytopathol. 79:1374.

KINAY, P.; MANSOUR, M.F.; MLIKOTA GABLER, F.; MARGOSAN, D.A.; SMILANICK, J.L. 2007. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. Crop Protection 26, 647-656.

LADO, J.; LUQUE, E.; BLANCO, O.; PÉREZ FAGGIANI, E. 2011. Evaluación de alternativas para el control poscosecha de aislamientos de *Penicillium digitatum* resistentes a imazalil. Agrociencia Uruguay 15 (1), 55-63.

LI, H.; XIAO, C. 2005. Resistance to thiabendazole and baseline sensitivities to fludioxonil and pyrimethanil in *Penicillium expansum* populations from apple. Phytopathology 95, S59.

PÉREZ, E.; LADO, J.; LUQUE, E.; BLANCO, O.; ALVES, P.; SILVA, G. 2009. Sensibilidad a pyrimethanil, fludioxonil e imazalil en aislamientos de *Penicillium digitatum* colectados en Uruguay. Hacia un manejo integrado y sustentable de *Penicillium* en poscosecha de cítricos. Serie Actividades de Difusión INIA, N.º 597, 3-6.

PÉREZ, E.; BLANCO, O.; BERRETA, C.; DOL, I.; LADO, J. 2011. Imazalil concentration for in vitro monitoring of imazalil resistant isolates of *Penicillium digitatum* in citrus packinghouses. Postharvest Biol. and Technol. 60, 258-262.

SMILANICK, J.L.; MANSOUR, M.F.; MLIKOTA GABLER, F.; GOODWINE, W.R. 2006. The effectiveness of pyrimethanil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control citrus green mold after harvest. Postharvest Biol. and Technol. 42, 75-85.

SMILANICK, J.L.; BYLEMANS, D.; TORRES LEAL, G.J.; LESAR, K. 2008. Pyrimethanil a new fungicide for the control of postharvest decay of citrus fruit. Proc. Int. Soc. Citriculture, Wuhan, China, 1296.

TUSET, J.A. 1987. Podredumbres de los frutos cítricos. Generalitat Valenciana, Valencia, España, p. 206.

VAZQUEZ, D.; PANOZZO, M.; ALMIRÓN, N.; BELLO, F.; BURDYN, L.; GARRÁN, S. 2014. Characterization of sensitivity of grove and packing house isolates of *Penicillium digitatum* to pyrimethanil. Postharvest Biol. and Technol. 98, 1-6.