

## Residuos en frutos de naranja del fungicida imazalil aplicado en postcosecha y su efecto en el control de moho verde

Lado Joanna<sup>1</sup>, Pérez Faggiani Elena<sup>1</sup>, De Nigris Andrea<sup>2</sup>, Dol Isabel<sup>2</sup>, Knochen Moisés<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Estación Experimental Salto Grande. Camino a la Represa s/n, 50000 Salto, Uruguay. Correo electrónico: jlado@sg.inia.org.uy.

<sup>2</sup>Cátedra de Química Analítica, Facultad de Química, DEC, Universidad de la República. Avenida General Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay.

Recibido: 26/7/12 Aceptado: 18/10/13

### Resumen

El control del moho verde (causado por el hongo *Penicillium digitatum*) en las plantas de empaque de cítricos de Uruguay se basa principalmente en el uso del fungicida imazalil (IMZ). La aplicación continuada de este fungicida generó un aumento en la frecuencia de cepas resistentes y, por tanto, de la dosis del fungicida utilizada. El objetivo del presente trabajo fue determinar la residualidad del fungicida IMZ durante el almacenamiento refrigerado de las variedades de naranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) Washington Navel y Valencia y su relación con el control del moho verde. Para ello, frutos de naranja var. Valencia fueron artificialmente inoculados con los aislamientos de *P. digitatum* sensible y resistente a IMZ y frutos de naranja var. Washington Navel solo con el aislamiento resistente. Luego de 18-20 h, los frutos fueron tratados con Imazalil a 500 y 1000 mg kg<sup>-1</sup> aplicado en solución acuosa solo o en combinación con bicarbonato de sodio (BCS) al 3%. Con la aplicación de la cera se aplicó IMZ a una concentración de 3000 mg kg<sup>-1</sup>. Las variables analizadas fueron la incidencia del moho verde y el nivel de residuo del fungicida imazalil. Las evaluaciones fueron realizadas luego de 12, 19, 26 y 33 días de almacenamiento en frío y luego de siete días de vida comercial. En naranjas de la variedad Washington Navel, el residuo de IMZ fue menor a 2,0 mg kg<sup>-1</sup> en todos los tratamientos, tanto aplicado en solución a 20 °C ó 50 °C como solo o en mezcla con BCS. La aplicación de IMZ en la cera determinó un nivel de residuos mínimo sobre la fruta de 2,48 mg kg<sup>-1</sup> y se mantuvo alto hasta el final del período de evaluación. En la variedad Valencia, los residuos de IMZ fueron menores a 0,70 mg kg<sup>-1</sup> para dosis de 1000 mg kg<sup>-1</sup> y se duplicaron con la aplicación a 50 °C; mientras que los residuos de la aplicación de IMZ en cera fueron siempre mayores a 3,0 mg kg<sup>-1</sup>. En ninguna de las variedades el aislamiento resistente a IMZ fue controlado, aún con niveles de residuos de IMZ superiores a 3,0 mg kg<sup>-1</sup>. En cambio el aislamiento sensible fue controlado con un residuo promedio de IMZ superior a 2,0 mg kg<sup>-1</sup> o cuando el fungicida fue combinado con BCS.

**Palabras clave:** citrus, bicarbonato sódico, *Penicillium*, residualidad, resistencia

### Summary

## Residues in Orange Fruits of Postharvest Application of Imazalil and its Effect in Green Mold Control

The control of green mold (caused by the fungus *Penicillium digitatum*) in citrus packinghouses is mainly based on the use of the fungicide imazalil (IMZ). Continued application of this fungicide caused an increase in the frequency of resistant strains, and therefore an increase in the dosage of the fungicide used. The objective of this work was to determine the IMZ fungicide residue during refrigerated storage of varieties of orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) cultivars Washington Navel and Valencia and its relation with green mold control. Orange fruits var. Valencia were artificially inoculated with both IMZ sensitive and IMZ resistant *P. digitatum* isolates while Washington Navel fruit was inoculated only with the resistant isolate. After 18-20

hours, the fruit was treated with 500 or 1000 mg. g<sup>-1</sup> IMZ, either alone or combined with sodium bicarbonate (SBC) at 3%. The application of the wax included IMZ at 3000 mg.kg<sup>-1</sup>. The variables analyzed were green mold incidence and IMZ residue on the fruit. The fruit was evaluated at 12, 19, 26 and 33 days after storage and after seven days of shelf life. For Washington Navel oranges, residual IMZ was below 2.0 mg kg<sup>-1</sup> for all treatments, applied in solution at 20 °C or 50 °C, alone or mixed with SBC. IMZ wax application resulted in a minimum residue level of 2.48 mg kg<sup>-1</sup> and remained high until the end of the evaluation period. For Valencia oranges, residual IMZ was below 0.70 mg kg<sup>-1</sup> for a 1000 mg.kg<sup>-1</sup> dosis, and doubled when applied at 50 °C, whereas residual IMZ in wax application was always higher than 3.0 mg kg<sup>-1</sup>. IMZ resistant isolate was not controlled in any variety, even with residual IMZ levels above 3.0 mg kg<sup>-1</sup>. Sensitive isolate was effectively controlled, instead, with an average 2.0 mg kg<sup>-1</sup> of IMZ residue, or when the fungicide was combined with SBC.

**Keywords:** citrus, sodium bicarbonate, *Penicillium*, residuality, resistance

## Introducción

Una de las principales causas de pérdida de la calidad de la fruta cítrica durante su transporte, almacenamiento y vida comercial es provocada por hongos del género *Penicillium* (Plaza *et al.*, 2003). Este patógeno es capaz de provocar más del 90% del total de las pérdidas en postcosecha si las condiciones climáticas son favorables para su desarrollo (Eckert y Eaks, 1989). A nivel mundial, el control de *Penicillium* spp. se basa principalmente en el uso de fungicidas de síntesis. Los principios activos más utilizados son imazalil (IMZ), procloraz (PRO), orto-fenil fenato de sodio (SOPP) y tiabendazol (TBZ) (Smilanick *et al.*, 2008). En ambientes donde se ha hecho un uso continuo de ellos, se han observado incrementos en las poblaciones del patógeno capaces de resistir las dosis comerciales de estos fungicidas. En California, por ejemplo, la proporción de aislamientos resistentes a IMZ, SOPP y TBZ, aumentó en plantas de empaque de un 43,1% en 1988 a 74,2% en 1994 (Holmes y Eckert, 1999). En Uruguay, el fungicida TBZ se utilizó en la década del 70 y 80 del siglo pasado y fue sustituido por IMZ debido a la alta incidencia de aislamientos resistentes que provocaron una pérdida en la efectividad comercial del producto. En el caso del IMZ, aunque se han reportado cepas resistentes (Pérez *et al.*, 2011; Lado y Pérez, 2009; Delgado *et al.*, 1997), sigue siendo una alternativa efectiva a nivel comercial, utilizándose en todas las plantas de empaque uruguayas que procesan fruta para exportación. Sin embargo, para intentar mantener un control adecuado del patógeno, las concentraciones de IMZ utilizadas aumentaron gradualmente de 500 mg kg<sup>-1</sup> a 2500-3000 mg kg<sup>-1</sup>. Esta situación es altamente preocupante, debido a que se ha alcanzado el límite máximo sugerido para mantener el nivel de residuo del producto en frutos en cantidades admisibles (5 mg kg<sup>-1</sup>). En este sentido, se han evaluado diferentes alternativas que permiten potenciar el

control de las cepas resistentes (Lado *et al.*, 2011). Entre ellas, se encuentra la utilización de sales con efecto fungistático sobre *Penicillium* spp. El bicarbonato de sodio (BCS) ha surgido como alternativa para ser aplicado solo o en conjunto con fungicidas (Lado *et al.*, 2011; Smilanick *et al.*, 2008). Su acción es principalmente fungistática, enlenteciendo el crecimiento del patógeno, afectando la fisiología celular y por lo tanto, la germinación de esporas y la producción de enzimas (Obagwu y Korsten, 2003; Smilanick *et al.*, 2005). Existen trabajos que indican que la aplicación de BCS en conjunto con IMZ induce un aumento de los residuos en frutos con heridas (Dore *et al.*, 2010), sin embargo, se desconoce su efecto sobre el nivel de residuos de IMZ en naranjas intactas.

El objetivo de este trabajo es investigar el nivel de residuos de IMZ en frutos de naranja en diferentes condiciones de aplicación postcosecha y tiempos de almacenamiento de los frutos, así como determinar la relación entre el nivel de residuos de IMZ y el control del moho verde causado por la inoculación con cepas de *P. digitatum* sensibles y resistentes a ese fungicida.

## Materiales y métodos

### Patógeno y material vegetal

Se utilizaron las cepas S-22 y R-20 del hongo *Penicillium digitatum*, caracterizados en trabajos previos por su resistencia cuantitativa y cualitativa a IMZ (Pérez *et al.*, 2011) y su alta patogenicidad en *Citrus limon* var. Lisbon, *Citrus sinensis* var. Spring Navel y tangor Ellendale (datos no publicados). La cepa S-22 es sensible a 0,1 mg kg<sup>-1</sup> de IMZ *in vitro*, siendo incapaz de esporular sobre fruta tratada con 0,5 mg kg<sup>-1</sup> de IMZ; la cepa R-22 es resistente a 3,0 mg kg<sup>-1</sup> de IMZ *in vitro* (Pérez *et al.*, 2011). La cepa S-22 fue aislada a partir de muestras con síntomas prove-

nientes de un campo en producción comercial y la cepa R-20 a partir de frutas de naranja Washington Navel tratadas con IMZ por inmersión y en la cera y almacenadas durante 20 días en una cámara de frío en una planta de empaque comercial. Para la inoculación se utilizaron frutos de naranja dulce (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) var. Valencia y var. Washington Navel seleccionados por calibre, color y sin lesiones aparentes.

### Inoculación del patógeno y tratamientos postcosecha

En laboratorio, los frutos de naranja fueron desinfectados superficialmente mediante inmersión por 60 s en una solución al 1% de cloro activo (pH 7,0) y enjuagados una vez en abundante agua destilada. A continuación permanecieron a temperatura ambiente durante 6 h para permitir el secado. La inoculación fue realizada utilizando un punzón de 2 mm de longitud y 1 mm de diámetro, sumergido previamente en una solución de  $1,0 \times 10^6$  esporas. $\text{mL}^{-1}$  del patógeno *P. digitatum* (Eckert y Brown, 1986). Los frutos de la variedad Washington Navel fueron inoculados únicamente con la cepa resistente, mientras que los frutos de la variedad Valencia lo fueron con los aislamientos sensible y resistente. Los frutos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 18-20 h, realizándose la aplicación de los distintos tratamientos (Cuadro 1) mediante cascada (pasaje de los frutos a través de una cortina continua de agua que contiene el fungicida en solución, en una minilínea experimental). Los frutos destinados a determinación de residuos no fueron inoculados y fueron sometidos a los mismos tratamientos que la fruta inoculada conjuntamente con esta. Los productos utilizados

fueron: IMZ (Fungaflor 75 PS, 75% p.a, Janssen Pharmaceutica, Bélgica), BCS (Pharma Chemical, 100% p.a., Jiangsu, China) y cera (Fruitgard I 50 - Imazalil o Brillaqua UED, cera de polietileno + goma laca Brilllocera Sudamericana S.A.). La fruta inoculada fue evaluada en los mismos momentos en que se enviaron muestras para la determinación de residuos: a los 12, 19, 26 y 33 días de almacenamiento a  $6 \pm 2$  °C y 80-90% de HR y siete días de simulación de vida comercial ( $13 \pm 2$  °C), registrándose el porcentaje de incidencia de la enfermedad ([Número de frutos con pudrición/total de frutas por repetición] \* 100).

### Determinación de residuos de IMZ en la fruta

Los frutos fueron pesados y pelados, calculándose la relación de pesos cáscara/fruto entero. Las cáscaras fueron trituradas y homogeneizadas en mixer. Posteriormente se pesaron 2,5 g de muestra en un tubo de centrifuga, se adicionó 10 mL de acetonitrilo (Carlo Erba Reagents), 8 mL de agua, 4 g de sulfato de sodio anhidro (J.T. Baker Chemical) y 1,5 g de cloruro de sodio. La mezcla se agitó en vortex (marca Qilinbeier 5) durante 60 segundos y luego se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos. El sobrenadante se transfirió a un vial, previa filtración con membrana de poliamida de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. Una alícuota de muestra filtrada (20  $\mu\text{L}$ ) se inyectó en el cromatógrafo. El método de QuEChERS modificado (Anastassiades, 2003; Lehotay, 2005) fue utilizado para la extracción. Las determinaciones se realizaron mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). Se empleó un cromatógrafo Shimadzu Prominence LC-20 dotado de detector de arreglo de

**Cuadro 1.** Tratamientos aplicados en naranjas var. Washington Navel y var. Valencia mediante cascada.

Tratamiento	pH	T (°C)	Detalles del tratamiento
Control agua 20 °C	6,38	20,0	
Control agua 50 °C	6,38	50,0	
Control cera	10,00	22,0	
Control BCS 3%	7,80	20,7	
BCS 3% + IMZ 500/1000 mg kg <sup>-1</sup> (Tratamiento A)*	7,56	19,9	- Aplicación de IMZ en solución acuosa (formulación PS) mediante cascada
IMZ 1000 mg.kg <sup>-1</sup> agua 20 °C (Tratamiento B)*	4,99	20,9	- Pre-secado: horno a 43 °C(10-15 s) - Encerado: aplicación de cera mediante aspersión y secado
IMZ 1000 mg kg <sup>-1</sup> agua 50 °C (Tratamiento C)*	3,31	50,0	
IMZ 3000 mg kg <sup>-1</sup> en cera (Tratamiento D)	10,5	20,9	- Aplicación de IMZ junto con la cera (formulación CE), en la cascada se aplicó agua

Referencias: IMZ= Imazalil; BCS= Bicarbonato de sodio \*En las aplicaciones realizadas en naranja Valencia, la concentración de IMZ aplicada fue de 1000 mg kg<sup>-1</sup>, adicionándose posteriormente cera en los frutos.

fordiodos y horno de columna. El sistema cromatográfico consistió en una columna Phenomenex Luna tipo C18, de 150 x 4,6 mm y relleno de 5  $\mu\text{m}$  y fase móvil metanol-agua empleándose gradiente de elución. El flujo del sistema fue 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ , la temperatura de horno 40 °C, y el volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ ; y la detección se realizó a 202 nm. Las cifras de mérito obtenidas fueron las siguientes: rango lineal (0,2-20 mg  $\text{kg}^{-1}$ ), precisión intermedia  $s_r$  (%)  $n = 15$  (5,6), porcentaje de recuperación (100%). Límite de Detección-LOD (0,06 mg  $\text{kg}^{-1}$ ) y Límite de Cuantificación-LOQ (0,20 mg  $\text{kg}^{-1}$ ). Luego de las determinaciones analíticas, los resultados obtenidos de imazalil en cáscara fueron corregidos por la relación de pesos y expresados como contenido en la fruta.

### Diseño experimental y análisis estadístico

El efecto de los tratamientos en el control del moho verde fue evaluado a través de la incidencia de la enfermedad. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones. La unidad experimental fue constituida por 20 frutas. Los datos fueron transformados por la función arcoseno raíz de la proporción para el análisis de varianza y posterior comparación de medias utilizando el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Los muestreos de frutos para el análisis de residuos se realizaron en forma aleatoria a los 12, 19, 26 y 33 días de almacenamiento más la correspondiente simulación de vida comercial durante siete días. Cada muestreo consistió en una muestra compuesta por cuatro repeticiones de tres frutas. Se realizó un análisis de varianza del nivel de residuos entre tratamientos, realizándose poste-

riormente la prueba de comparación de medias utilizando el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## Resultados

### Control del moho verde

Los primeros síntomas de la enfermedad se observaron a los 12 días de la inoculación en la variedad Washington Navel. La incidencia aumentó paulatinamente en cada fecha de evaluación y a partir de los 26 días, se observaron diferencias significativas entre los controles (frutos tratados con agua o con cera) y los tratamientos con IMZ o BCS solos o en mezcla. Estas diferencias se mantuvieron hasta los 33 días pos-inoculación (Cuadro 2). La incidencia de la cepa resistente en frutos de var. Washington Navel no tratados ascendió a un 45-65% al finalizar el almacenamiento refrigerado, no diferenciándose significativamente del resto de los tratamientos aplicados (Cuadro 2). Luego de que la fruta fue retirada de la cámara de frío y se mantuvo siete días a temperatura ambiente, no se observaron diferencias entre los tratamientos y los controles sin IMZ o BCS (Cuadro 2).

En el caso de la variedad Valencia, los primeros síntomas de la enfermedad se observaron a los 19 días de conservación en frío y no se registraron diferencias entre los controles y los tratamientos con IMZ en los frutos inoculados con la cepa resistente (Cuadro 3). Al finalizar el almacenamiento refrigerado, la incidencia de moho verde en frutos no tratados inoculados con la cepa resistente fue del 45-48%, siendo reducida a un 20% cuando el IMZ se com-

**Cuadro 2.** Incidencia (%) de moho verde luego de la inoculación con aislamiento de *P. digitatum* resistente (IMZ-R) a Imazalil en naranja var. Washington Navel luego de 12, 19, 26, 33 días a  $6 \pm 2$  °C y un período de vida comercial de siete días a  $13 \pm 2$  °C.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)				
	12	19	26	33	33 + 7
Control agua 20 °C	3,3 ab	16,7 ab	33,3 b	45,0 abc	60,0 ab
Control cera	10,0 a	40,0 a	56,7 a	65,0 a	75,0 a
Control agua 50 °C	5,0 ab	26,7 ab	41,7 ab	55,0 ab	73,3 a
Control BCS 3%	0,0 b	11,7 b	20,0 c	33,3 c	46,7 ab
BCS 3% + IMZ 500 mg $\text{kg}^{-1}$ (A)	5,0 ab	20,0 ab	25,0 c	30,0 c	45,0 ab
IMZ 1000 mg $\text{kg}^{-1}$ 20 °C (B)	3,3 ab	15,0 ab	30,0 bc	40,0 bc	55,0 ab
IMZ 1000 mg $\text{kg}^{-1}$ a 50 °C (C)	0,0 b	11,7 b	23,3 c	33,3 c	51,7 ab
IMZ 3000 mg $\text{kg}^{-1}$ (D)	0,0 b	13,3 b	20,0 c	35,0 bc	45,0 ab

Medias seguidas de igual letra entre tratamientos no difieren significativamente (Tukey  $p \leq 0,05$ ). Referencias: IMZ= Imazalil; BCS= Bicarbonato de sodio.

**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  $6 \pm 2$  °C y un período de vida comercial de 7 días a  $13 \pm 2$  °C.

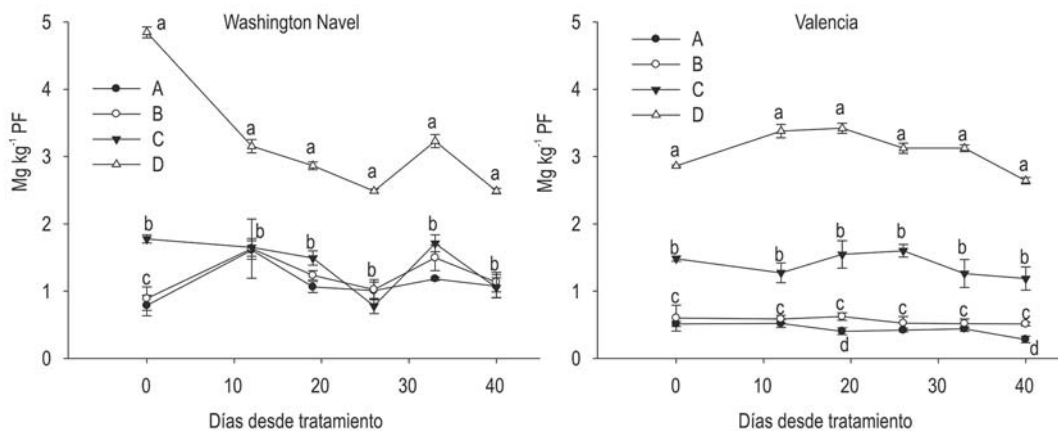
Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)							
	19		26		33		33 + 7	
	IMZ-R	IMZ-S	IMZ-R	IMZ-S	IMZ-R	IMZ-S	IMZ-R	IMZ-S
Control agua 20 °C	18,3 a	10,0 a	23,3 a	21,7 a	45,0 abc	26,7 a	63,3 a	63,3 a
Control cera	18,3 a	1,7 b	31,7 a	3,3 b	48,3 ab	13,3 b	56,7 ab	20,0 cd
Control agua 50 °C	13,3 a	1,7 b	16,7 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 <sup>-1</sup> (A)	5,0 a	1,7 b	11,7 a	1,7 b	20,0 d	3,3 c	<b>26,7 d</b>	<b>3,3 e</b>
IMZ 1000 mg kg <sup>-1</sup> 20 °C (B)	6,7 a	0,0 b	11,7 a	0,0 b	28,3 bcd	15,0 b	<b>33,3 cd</b>	<b>20,0 cd</b>
IMZ 1000 mg kg <sup>-1</sup> 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 <sup>-1</sup> (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

Medias seguidas de igual letra entre tratamientos no difieren significativamente (Tukey  $p \leq 0,05$ ). Referencias: IMZ= Imazalil; BCS= Bicarbonato de sodio; R, biotipo resistente; S, biotipo sensible.

binó con BCS al 3% (Cuadro 3). Sin embargo, el control de la cepa sensible fue más efectivo, destacando el control obtenido en los tratamientos que combinan IMZ con agua a 50 °C o con BCS, así como en la aplicación realizada conjuntamente con la cera (Cuadro 3). Estos tratamientos registraron una incidencia inferior o igual al 5% (Cuadro 3). Luego de 33 días de almacenamiento refrigerado, los frutos no tratados que habían sido inoculados con la cepa sensible registraron una incidencia del 27%, aumentando al 63% luego de siete días a temperatura ambiente (Cuadro 3).

### Residualidad de imazalil en los frutos

En ambas variedades de naranja, el nivel de residuos de IMZ detectado luego de la aplicación y durante el almacenamiento fue significativamente mayor para el tratamiento con cera, comprendido entre 2,5 y 4,8 mg kg<sup>-1</sup> durante todo el almacenamiento, coincidiendo con una mayor concentración del principio activo en este tratamiento (3000 mg kg<sup>-1</sup>). En los tratamientos realizados con IMZ en solución acuosa a temperatura ambiente (20 °C), con o sin BCS, el nivel de residuos medido inmediatamente después de la aplicación fue



**Figura 1.** Nivel de residuos de Imazalil en la fruta (mg kg<sup>-1</sup> peso fresco-PF) durante el almacenamiento (días) de naranjas var. Washington Navel y var. Valencia.

Tratamientos: a, Bicarbonato de sodio + IMZ (500 ó 1000 mg kg<sup>-1</sup>); b, IMZ 1000 mg kg<sup>-1</sup>; c, IMZ 1000 mg kg<sup>-1</sup> a 50°C; d, IMZ 3000 mg kg<sup>-1</sup> con la cera. Medias seguidas de igual letra entre tratamientos no difieren significativamente (Tukey  $p \leq 0,05$ ).

mayor en la var. Washington Navel ( $0,89 \text{ mg kg}^{-1}$ ) que en la var. Valencia ( $0,60 \text{ mg kg}^{-1}$ ). La aplicación con agua a  $50^\circ\text{C}$  provocó una duplicación en la deposición de residuos medidos inmediatamente después de la aplicación, aumentando a  $1,8$  y  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente (Figura 1). La adición de BCS en la mezcla no modificó el nivel de residuos de IMZ en naranja Valencia. En el caso de Washington Navel sí existió un efecto sobre el nivel de residuos, registrando el tratamiento de BCS y  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  de IMZ el mismo nivel de residuos que  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  en solución acuosa. Por tanto, el nivel de residuos alcanzado y el efecto del BCS en los mismos fue dependiente de la variedad, ya que existieron diferencias para un mismo tratamiento entre las dos variedades evaluadas (Figura 1).

En general, la residualidad de imazalil permaneció constante desde la aplicación hasta el final del almacenamiento refrigerado, con excepción del tratamiento realizado con cera en Washington Navel, en donde hubo una reducción significativa en la var. Washington navel, lo cual no ocurrió en la var. Valencia (Figura 1).

## Discusión

Conocer el nivel de residuos de fungicidas que los tratamientos postcosecha generan sobre los frutos cítricos en las condiciones de aplicación nacionales es necesario, no solo por la relevancia que presenta la inocuidad de los alimentos, sino también por la importancia de la efectividad de los tratamientos y del manejo del desarrollo de resistencia por parte de los patógenos. Según Smilanick *et al.* (1997), es necesario obtener en postcosecha un residuo de IMZ en la fruta de al menos  $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$  en naranjas y de  $3,5 \text{ mg kg}^{-1}$  en limones, para alcanzar un control adecuado de *Penicillium digitatum*. El presente trabajo coincide con los antecedentes mencionados (Smilanick *et al.*, 1997) para el control de la cepa sensible a imazalil y demuestra que los niveles de resistencia alcanzados por los patógenos presentes en las plantas de empaque de Uruguay no son controlados, incluso con un nivel de residuos mayor a  $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$  (Figura 1 y Cuadro 3).

Existen diversas estrategias que permiten potenciar el efecto del IMZ. La aplicación de IMZ en conjunto con agua caliente ( $50^\circ\text{C}$ ) duplicó el nivel de residuos en los frutos de naranja var. Valencia, potenciando el control de la cepa sensible al finalizar el almacenamiento refrigerado (Figura 1 y Cuadro 3). Resultados similares fueron descritos en esta variedad por Smilanick *et al.* (2008), en donde el nivel de residuos de IMZ, aplicado en solución acuosa a una concentración de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  mediante inmersión durante 30 s

a  $50^\circ\text{C}$ , fue significativamente mayor que a  $25^\circ\text{C}$ . Sin embargo, según estos autores, el incremento en el nivel de residuos registrado no fue suficiente para explicar la magnitud del aumento en el control del patógeno. Existen entonces otros factores, como lo es la activación de las propias defensas de la fruta o cierta inhibición térmica directa sobre el patógeno por parte del agua caliente que potencian el control (Schirra *et al.*, 2000; Palou *et al.*, 2002; Inkha y Boonyakiat, 2010). En otros casos, tratamientos más largos por inmersión (3 min) en agua a  $50^\circ\text{C}$ , lograron una deposición de residuos 4,59 veces mayor que en aplicaciones de IMZ a  $20^\circ\text{C}$  (Schirra *et al.*, 1996). El incremento en el nivel de residuos provocado por aplicaciones a mayor temperatura podría estar explicado por un aumento en la tasa de difusión del fungicida a través de la cutícula de la fruta (Smilanick *et al.*, 2008). Sin embargo, según Kanetis *et al.* (2008), el aumento del nivel de residuos que ocurre en aplicaciones de fungicidas con agua caliente, no siempre resulta en un mayor control de *P. digitatum*. Según estos autores, el efecto de la temperatura es más significativo cuando se trabaja con soluciones menos concentradas, de entre  $50$  y  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de IMZ y este efecto se pierde en la medida en que aumenta dicha concentración en solución.

En este sentido, los tratamientos del fungicida en solución con agua caliente constituyen una alternativa que permite reducir la dosis del fungicida aplicada, potenciando su acción. El control del moho verde (*P. digitatum*) en limones fue cuatro veces superior con aplicaciones de IMZ ( $100$  a  $400 \text{ mg kg}^{-1}$ ) mediante inmersión en agua a  $37^\circ\text{C}$  durante 15 s que cuando el producto fue aplicado conjuntamente con la cera ( $1000$  a  $4000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Smilanick *et al.*, 1997). Según estos autores, un mismo nivel de residuos ( $3,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) de IMZ en fruta, obtenido mediante dos métodos de aplicación diferentes (en solución acuosa a alta temperatura y conjuntamente con la cera) produjo distintos grados de incidencia del moho verde, sugiriendo la existencia de otros mecanismos que complementan la acción del fungicida y potencian el control. En este mismo sentido, la incidencia del moho verde en frutos no tratados fue del 94% (sin residuos del fungicida) y la misma se redujo a 11% al aplicar el IMZ conjuntamente con la cera y a menos de 1%, para tratamientos en solución acuosa a alta temperatura (Smilanick *et al.*, 1997). Resultados similares fueron observados en este trabajo, siendo igualmente efectivas en el control del moho verde (Cuadros 2 y 3) la aplicación en conjunto con la cera que la aplicación acuosa a  $50^\circ\text{C}$ , a pesar de contar con un mayor nivel de residuos en la fruta en el primer caso (Figura 1). Otros trabajos han demostra-

do que la inmersión de la fruta durante pocos segundos en una solución acuosa de IMZ (1,0 a 3,0 mg kg<sup>-1</sup> de residuos en fruta) redujo la incidencia del moho verde en un 95%, mientras que para un mismo nivel de residuo alcanzado mediante aplicaciones en cera, la reducción fue únicamente del 60% (Smilanick *et al.*, 1997). Estas diferencias podrían estar explicadas por una mayor retención del producto en la cera, debido a su alta viscosidad, lo que conlleva a una menor penetración efectiva en las heridas existentes en la fruta y por lo tanto, una menor efectividad en el control del patógeno en el sitio de colonización (Brown, revisado en Smilanick *et al.*, 1997).

Otra alternativa que potenció la acción del IMZ en el control del biotipo sensible, fue la adición en solución acuosa de BCS al 3%. En trabajos anteriores, la combinación de 3% de BCS con IMZ aplicado a 500 mg.kg<sup>-1</sup> potenció el control del biotipo resistente en tangor Ellendale, pasando de un 41,3% de incidencia de moho verde a un 3,6% al adicionar BCS a la mezcla (Lado *et al.*, 2011), lo cual no fue observado en el presente trabajo en naranjas var. Washington Navel (Cuadro 2) y var. Valencia (Cuadro 3). Existen diversos trabajos que describen la existencia de potenciación en el control de *Penicillium* spp. cuando los fungicidas son aplicados con sales y/o agua caliente (Lado *et al.*, 2011; Palou *et al.*, 2000; Smilanick *et al.*, 1999, 2005). En este trabajo, el BCS logró potenciar el efecto del IMZ en el control del biotipo sensible, no así en el caso del biotipo resistente, difiriendo de lo descrito por Smilanick *et al.* (2005), quienes sí observaron una potenciación en el control de aislamientos resistentes. Estas diferencias pueden estar dadas por el tipo de aplicación (cascada o inmersión), con una mayor eficiencia de esta última en el control (Smilanick *et al.*, 1997) o también debido a diferencias fisiológicas y estructurales entre las variedades (Montesinos-Herrero *et al.*, 2009). Es importante destacar que para ambas variedades, el control del aislamiento resistente alcanzado con la aplicación de BCS al 3% no se diferenció del control logrado por el IMZ (Cuadros 2 y 3), cualquiera sea la dosis aplicada y el nivel de residuo sobre la fruta, demostrando también la ineffectividad del IMZ para controlar este tipo de aislamientos.

En general, la adición de la sal no provocó un aumento en el nivel de residuos en la fruta (Figura 1), por lo que el efecto del BCS no debería ser explicado por una mayor residualidad del fungicida, sino por un efecto fungistático directo (Smilanick *et al.*, 1999) y/o por la inducción de resistencia en la fruta (Dore *et al.*, 2010). El efecto fungistático es provocado principalmente por la inactivación de enzimas producidas por el patógeno (fumarasa, aspartasa y succí-

nico-dehidrogenasa) relacionadas con su crecimiento (York y Vaughn, 1964), modificando también la permeabilidad de las membranas y la fisiología de sus células (Smilanick *et al.*, 2005). Por otro lado, Dore *et al.* (2010) han descrito una estimulación en la producción de la fitoalexina scoparona en el albedo de frutos cítricos tratados con BCS, pudiendo estar relacionado con la inducción de resistencia en los frutos por parte del BCS.

El efecto de la residualidad en la fruta de imazalil aplicado para el control del moho verde (causado por *P. digitatum*) ha sido de interés desde que se produjeron las primeras pérdidas provocadas por el surgimiento de cepas resistentes del hongo (Brown *et al.*, 1983). En plantas de empaque de California, se observó que una residualidad de 3,4 mg kg<sup>-1</sup> o más alta del producto, reducía en un 80–90% el decaimiento provocado por aislamientos resistentes, pero no la esporulación, mientras que una residualidad de 1,0–2,0 mg kg<sup>-1</sup> no era efectiva para el control ni del decaimiento ni de la esporulación de estos aislamientos (Eckert, 1990). Los resultados del presente trabajo coinciden con los antecedentes mencionados, ya que no hubo un control comercialmente aceptable (inferior al 5% de incidencia en frutos inoculados, datos no publicados) con niveles de residuos inferiores a 2,0 mg kg<sup>-1</sup>. En la aplicación con la cera, la residualidad estuvo por encima de 3,0 mg kg<sup>-1</sup> durante los primeros 20 días en naranja var. Washington Navel y durante todo el experimento en naranja var. Valencia. A pesar de ello, el control del decaimiento provocado por la cepa resistente tampoco fue comercialmente aceptable, alcanzando una incidencia del 45% en ambas variedades luego de siete días a temperatura ambiente.

Es importante destacar la ineffectividad del IMZ para controlar los aislamientos resistentes, en forma independiente del residuo del fungicida en la fruta. En ausencia del IMZ, los aislamientos resistentes son menos competitivos que los no resistentes (Holmes y Eckert, 1995), siendo deseable no mantener constante dicha presión de selección, aplicando estrategias que combinen distintos principios activos con sales y/o nuevas alternativas (Lado *et al.*, 2011).

## Conclusiones

La degradación del IMZ es mínima durante el almacenamiento refrigerado de las naranjas var. Washington Navel y var. Valencia, por lo que es importante cumplir con los límites de residuos estipulados por los mercados en el momento de la aplicación del producto. El residuo de IMZ en los frutos debería superar los 2,0 mg kg<sup>-1</sup> en soluciones

acuosas y 3,0-4,0 mg kg<sup>-1</sup> al ser aplicado con la cera para obtener un control adecuado de biotipos sensibles a IMZ. En el caso del biotipo resistente, la incidencia del patógeno es independiente del nivel de residuos en la piel de los frutos, siendo elevada en todos los tratamientos evaluados. La adición de BCS al IMZ potenció el control del biotipo sensible pero no del biotipo resistente en naranjas var. Washington Navel y var. Valencia, no modificando el nivel de residuos del fungicida en la fruta. La aplicación de alta temperatura (50 °C) potenció el control del biotipo sensible del patógeno provocando un aumento en el nivel de residuos sobre la fruta.

## Agradecimientos

A INIA, por la financiación del proyecto FPTA-267 que hizo posible estos trabajos. A las empresas citrícolas uruguayas Citrícola Salteña, Milagro y URUDOR por la colaboración constante con fruta, por su participación directa en la definición de los ensayos y por sus valiosos aportes en la construcción de la Minilínea Experimental en INIA Salto Grande. A todo el equipo de trabajo de postcosecha, fitopatología y operaciones de INIA Salto Grande que hizo posible el desarrollo de estos trabajos.

## Bibliografía

- Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and «dispersive solid-phase extraction» for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 86(2): 412-431.
- Brown GE, Nagy S, Maraulija M. 1983. Residues from postharvest non recovery spray applications of imazalil to oranges and effects on Green Mold caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Disease*, 67: 954-957.
- Delgado RA, Pérez G Díaz L. 1997. Comportamiento de *Penicillium digitatum*, *P. italicum* y *P. ulaiense* en postcosecha de citrus en Uruguay. En: IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología; 12 - 17 octubre 1997; Montevideo, Uruguay.
- Dore A, Molinu MG, Venditti T, D'Hallewin G. 2010. Sodium BCSarbonate induces crystalline wax generation, activates host-resistance, and increases imazalil level in rind wounds of oranges, improving the control of green mold during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12): 7297 -7304.
- Eckert JW. 1990. Impact of fungicide resistance on Citrus fruit decay control. En: Green MB, LeBaron HM, Moberg WR. [Eds.], Managing resistance to agrochemicals. Washington: American Chemical Society. pp. 286-302.
- Eckert JW, Eaks IL. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruit. En: Reuter W, Calavan EC, Carman GE. [Eds.] The Citrus Industry. Vol. 5. Press. pp. 179-260.
- Eckert JW, Brown GE. 1986. Evaluation of postharvest fungicide treatments for Citrus fruits. En: Hickey KD. [Ed.], Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens. St. Paul: APS Press. pp. 92-97.
- Holmes GJ, Eckert JW. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology*, 89: 716-721.
- Holmes GJ, Eckert JW. 1995. Relative fitness of imazalil-resistant and sensitive biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant Disease*, 79:1068-1063.
- Inkha S, Boonyakiat D. 2010. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in tangerine fruit cv. Sai Num Phung flavado by hot water treatment. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 32(5): 445-451.
- Kanetis L, Förster H, Adaskaveg JE. 2008. Optimizing efficacy of new postharvest fungicides and evaluation of sanitizing agents for managing citrus green mold. *Plant Disease*, 92: 261-269.
- Lado J, Luque E, Blanco O, Pérez Faggiani E. 2011. Evaluación de alternativas para el control postcosecha de aislamientos de *Penicillium digitatum* resistentes a imazalil. *Agrociencia (Uruguay)*, 15(1): 55-63.
- Lado J, Pérez E. 2009. Hacia un manejo integrado y sustentable de *Penicillium* en postcosecha de cítricos. Montevideo: INIA. 25p. (Actividades de Difusión: 597).
- Lehotay SJ. 2005. Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) approach for determining pesticide residues. En: Vidal JL, Garrido A. [Eds.], Pesticide Protocols. Martínez. Humana Press. (Methods in Biotechnology; 19). pp. 239-261.
- Montesinos-Herrero C, Del río MA, Pastor C, Brunetti O, Palou L. 2009. Evaluation of brief potassium sorbate dips to control postharvest *Penicillium* decay on major citrus species and cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 52: 117-125.
- Obagwu J, Korsten L. 2003. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium carbonate or hot water. *Postharvest Biology and Technology*, 28: 187-194.
- Palou L, Usall J, Muñoz JA, Smilanick JL, Viñas I. 2002. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. *Postharvest Biology and Technology*, 24(1): 93 -96.
- Palou L, Smilanick JL, Usall J, Viñas I. 2000. Control of postharvest blue mold of oranges by sodium carbonate and sodium Bicarbonate. *Phytopathology*, 90: S58.
- 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 Biology and Technology*, 60(3): 258-262.
- Plaza P, Usall J, Teixidó N, Viñas I. 2003 Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 549-554.
- Schirra M, D'hallewin G, Ben-Yehoshua S, Fallik E. 2000. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 21: 71-85.
- Schirra M, Cabras P, Angion A, Melis M. 1996. Residue level of imazalil fungicide in lemons following prestorage dip treatment at 20 and 50 degrees C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9): 2865-2869.
- Smilanick JL, Mansour MF, Mlikota-Gabler F, Sorenson D. 2008. Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. *Postharvest Biology and Technology*, 47: 226-238.
- Smilanick JL, Mansour MF, Margosan DA, Mlikota-Gabler F. 2005. Influence of pH and NaHCO<sub>3</sub> on effectiveness of imazalil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control postharvest green mold on citrus fruit. *Plant Disease*, 89: 640-648.
- Smilanick JL, Margosan DA, Mlikota-Gabler F, Usall J, Michael IF. 1999. Control of citrus green mold by carbonate and BCSarbonate salts and the influence of comercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Disease*, 83: 139-145.
- Smilanick JL, Michael IF, Mansour MF, Mackey BE, Margosan DA, Flores D, Weist CF. 1997. Improved control of green mold of citrus with imazalil in warm water compared with its use in wax. *Plant Disease*, 81: 1299-1304.
- York GK, Vaughn RH. 1964. Mechanisms in the inhibition of microorganisms by sorBCS acid. *Journal of Bacteriology*, 88: 411-417.