

Informe

INFLUENCIA DE LA ESTRATEGIA DE LUCHA FITOSANITARIA EN EL VIÑEDO SOBRE LA PRESENCIA DE OCRATOXINA A EN EL VINO

Introducción

Diversos estudios realizados anteriormente han permitido ver que los posibles factores condicionantes de la presencia de OTA en el vino se sitúan en el ámbito de las prácticas vitícolas (entre ellas la protección fitosanitaria de la viña), las operaciones prefermentativas (principalmente el periodo de extracción de la materia colorante y aromas) y la clarificación (Mínguez y col, 2000).

En dicho trabajo, se pudo observar que las condiciones sanitarias de la uva y la cobertura fitosanitaria durante la maduración y sobremaduración, podían jugar un papel destacado en la presencia de OTA en el vino, por lo que debían desarrollarse los mecanismos más eficaces para evitar la proliferación de los hongos causantes.

En el presente informe se presentan las pautas del programa de protección fitosanitaria más adecuada para el control de los hongos productores de Ocratoxina A (OTA) en el viñedo. Este trabajo, realizado durante tres años, ha tenido tres fases de actuación:

Año 2001: Determinación *in Vitro* de los productos fungicidas más efectivos en la lucha contra los hongos productores de OTA, (Comunicación GE Enfermedades de la Vid , OIV, Marzo 2003)

Año 2002: Comprobación en viñedo de la efectividad de los productos que presentaron *in Vitro* mejor contención de los hongos productores de OTA, (Comunicación GE Enfermedades de la Vid , OIV, Marzo 2003).

Año 2003: Estudio en viñedo de la mejor estrategia fitosanitaria para reducir la presencia de OTA en vino (Año 2003).

1. Control *in Vitro* de hongos productores de OTA

1.1. Metodología del estudio

Se seleccionaron 4 cepas productoras de OTA de las especies fúngicas descritas como típicamente ocratoxigénicas pertenecientes a los *Aspergillus carbonarius* (P23D3); *Aspergillus niger* (A75); *Aspergillus ochraceus* (A8) y *Penicillium verrucosum* (P214). Estas cepas procedían de la colección existente en el Departamento de Sanidad y Patología Animal de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Sobre ellas se estudió el control que ejercían diversos fungicidas de uso común o potencial en viñedo, que tuvieran acción contra *Botrytis*, mildiu y oidio. Dichos productos fueron:

Materia activa	Acción principal contra
Penconazol	Oidio
Mefenoxam+ folpet	Mildiu
Azoxystrobin+ cimoxanilo	Mildiu y Oidio
Ciprodinil + Fludioxonil	Botrytis
Ciprodinil	Botrytis
Fludioxonil	Botrytis
Fluazinam	Mildiu y Botrytis
Azufre	Oidio
Azoxystrobin	Mildiu y Odio
Oxicloruro de Cobre	Mildiu
Procimidona	Botrytis
CGA 302130	Botrytis
CGA 379438	Botrytis

Los fungicidas se valoraron siguiendo el método de difusión en agar (*screening*), cuyo protocolo era el siguiente: partiendo de un cultivo joven del hongo, se prepara una suspensión de conidios en suero fisiológico estéril que se siembra en placas de agar extracto de malta. En unos pocillos realizados en la placa se inocula el fungicida. Después de 5 días de incubación se miden los diámetros de los halos de inhibición.

En el siguiente cuadro se resume la graduación de la efectividad o actividad hallada, medida por la amplitud del halo de inhibición. Esta actividad se clasificó en cuatro categorías: **A**, actividad alta contra el hongo (presenta halo de inhibición grande); **mA**, actividad media; **pA**: actividad moderada y **nA**: actividad contra el hongo nula (no presenta halo de inhibición).

	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>P. verrucosum</i>
Penconazol	nA	pA	nA	nA
Mefenoxam+ Folpet	mA	mA	mA	mA
Azoxystrobin+cimoxanilo	nA	nA	nA	nA
Ciprodinil+Fludioxinil	A	A	A	mA
CGA 302130	A	nA	A	nA
CGA 379438	nA	nA	nA	nA
Ciprodinil	A	pA	A	nA
Fludioxinil	A	A	mA	mA
Fluazinam	mA	mA	mA	mA
Azufre	nA	nA	nA	nA
Azoxystrobin	nA	nA	nA	A
Oxicloruro de cobre	nA	nA	nA	nA
Procimidona	nA	nA	nA	nA

1.2. Resultados

Según el tipo de hongo sobre el que actúan, los productos que presentan la mejor acción protectora de todos ellos son:

- Frente al *A. carbonarius*: CGA 302130, ciprodinil, ciprodinil+fludioxonil y fludioxonil.
- Frente al *A. niger*: ciprodinil+ fludioxonil y fludioxonil.
- Frente al *A. ochraceus*: CGA 302130, ciprodinil y ciprodinil+fludioxonil.
- Frente al *P. Verrucosum*: azoxystrobin.

De estos resultados se puede observar que para los hongos potencialmente ocratoxigénicos más habituales en los ambientes mediterráneos (*A. carbonarius*, *A.niger* y *A. ochraceus*) el producto con más amplio espectro de acción, en las condiciones de control detallado más arriba, es ciprodinil y fludioxonil. Éstos últimos actúan con acción complementaria cuando se combinan en una misma formulación.

2. Control de la contaminación de hongos productores de OTA en la viña y presencia de ésta en el vino.

Conocidos los resultados *in Vitro*, se consideró de interés comprobar cual podría ser su uso para el control en el viñedo del ataque de dichos hongos.

2.1. Plan experimental de tratamientos.

Se realizaron varios ensayos en diferentes localizaciones, sobre viñas con alto riesgo de contaminación de hongos OTA-génicos y de contaminación de OTA en mostos y vinos, de entre estos ensayos mostramos los datos de uno de los más representativos sobre la variedad Tempranillo (EA209).

El plan de tratamientos propuesto y las referencias, fue el siguiente:

- Tratam. 1. Sin ningún tratamiento anticriptogámico: (Check, without treatments)
- Tratam. 2. Standard local (LS) sin anti-*Botrytis*;
- Tratam. 3. LS⁽¹⁾+ formulación SWITCH⁽²⁾, a 42 y 21 PHI⁽³⁾, dosis a 1kg/ha
- Tratam. 4. LS + formulación SWITCH a 63, 42, 21 PHI, dosis a 1kg/ha
- Tratam. 5. LS + formulación SWITCH a 42, 21, 7 PHI, dosis a 1kg/ha
- Tratam. 6. LS + formulación CHORUS⁽⁴⁾ a 42, 21 PHI, dosis a 0.75kg/ha
- Tratam. 7. LS+ formulación CHORUS a 7 PHI, dosis a 0.75kg/ha
- Tratam. 8. Control o tratamientos a criterio del viticultor (Farmer plot), con dos tratamientos de Captan 50 WP A 2,5 kg/ha, 42 y 21 días antes de vendimia.

⁽¹⁾ LS: tratamientos contra polilla del racimo, oidio y mildiu siguiendo la práctica comúnmente utilizada en la zona.

⁽²⁾ SWITCH: Formulación (37,5% ciprodinil + 25% fludioxonil).

⁽³⁾ PHI ("Pre-Harvest Interval"): tratamientos hechos a 7, 21, 42 o 63 días antes de vendimia, según el caso.

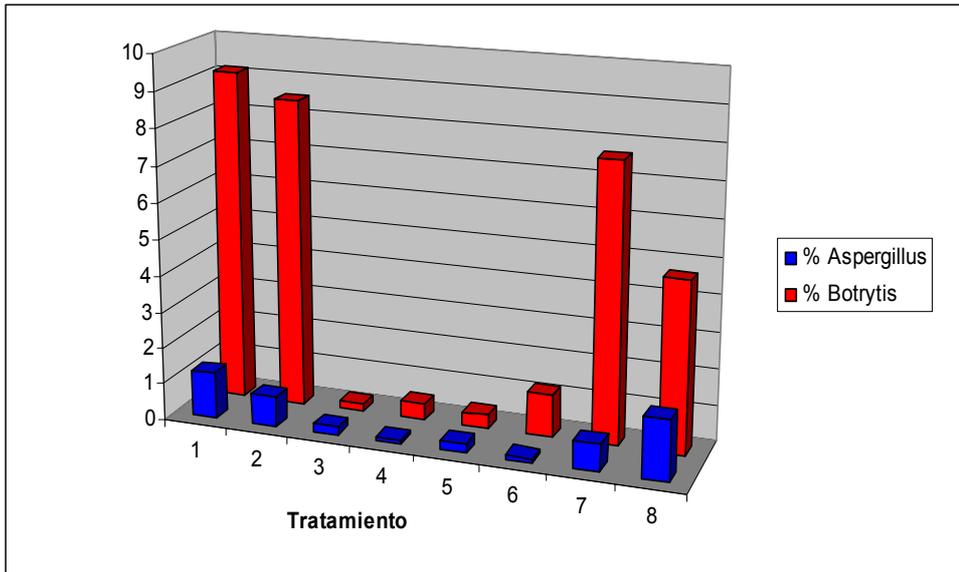
⁽⁴⁾ CHORUS: Formulación 50% ciprodinil.

Cada tratamiento estaba realizado con tres repeticiones al azar. Los tratamientos se realizaron directamente por el equipo investigador, excepto el tratamiento 8 (Farmer plot) que fue realizado directamente por el viticultor.

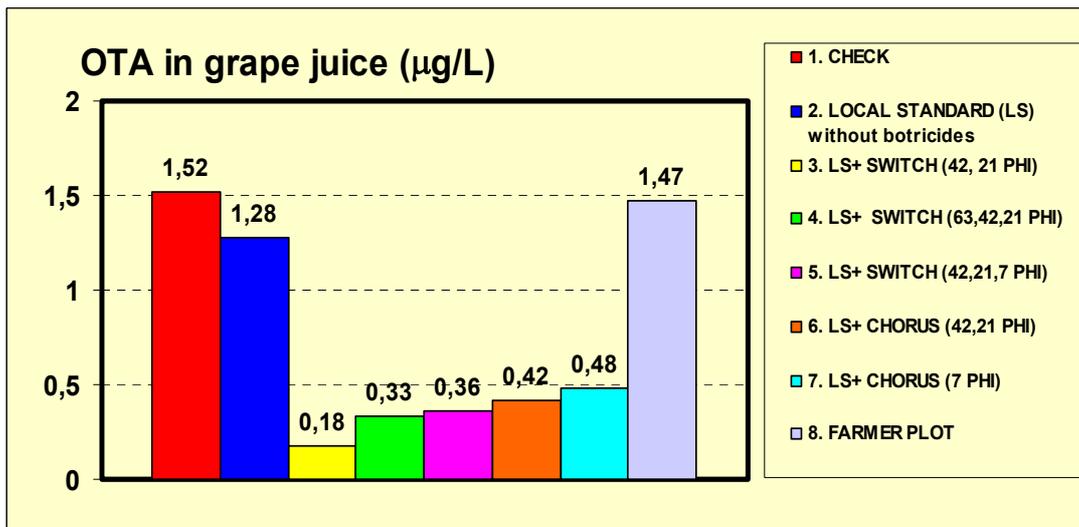
Se realizó la valoración de la incidencia de ataques de hongos en la vendimia, (*Aspergillus*, *Botrytis* y presencia de podredumbre ácida en 50 racimos de los diferentes tratamientos) así como los parámetros clásicos de calidad de ésta (azúcar, acidez, pH, ácido glucónico, glicerol) y OTA.

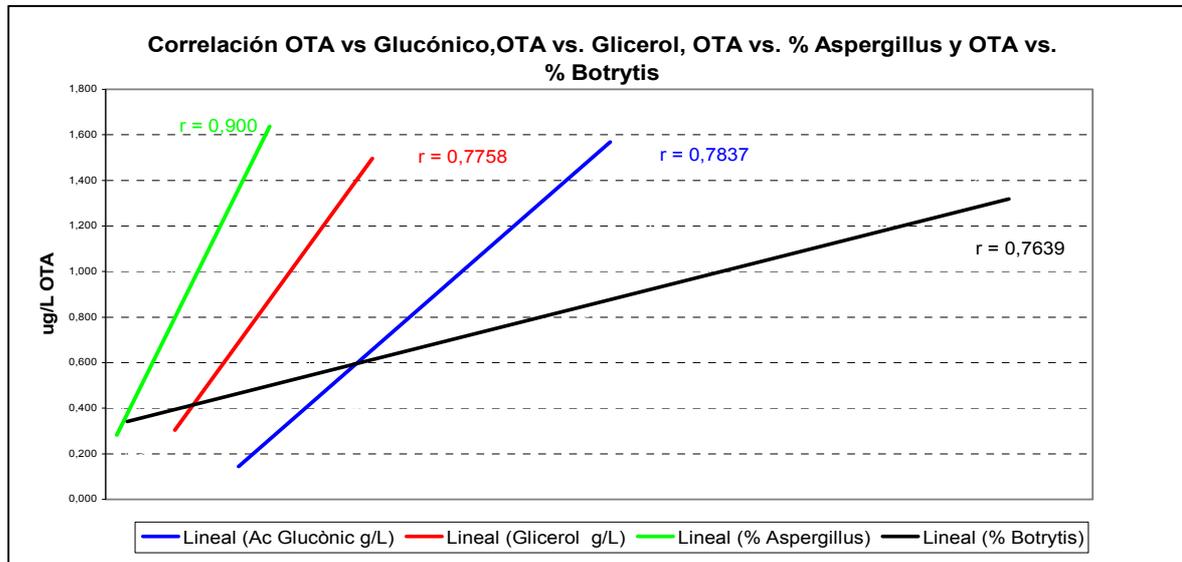
2.2. Resultados

La incidencia del ataque de hongos, sobre la viña de la variedad Tempranillo, valorado por el % de superficie de racimo atacado fue el siguiente:



Se observa la presencia de una mayor cantidad de focos de *Botrytis* en el tratamiento 2 (sin botricidas) y un repunte también en el tratamiento 7, que es similar al obtenido por el tratamiento convencional del viticultor (tratamiento 8). En todos los tratamientos se observa que los niveles altos de *Aspergillus* se corresponden también con altos de *Botrytis*.





Los mayores niveles de OTA se producen en aquellos tratamientos que proporcionan una escasa cobertura fitosanitaria: es decir los tratamientos 1, 2 y 8. Tampoco proporcionan una eficiente protección aquellos tratamientos basados en estrategias tardías, como por ejemplo el tratamiento 7.

Los tratamientos 4, 5 y 6, sitúan la vendimia en concentraciones menores de OTA. Sin embargo sólo la estrategia 3, LS+ Switch (42, 21 PHI), ha proporcionado la menor contaminación por OTA en relación a los otros tratamientos, aún cuando se observa una menor presencia de ataques de *Aspergillus* con el tratamiento 4 y 6.

Un hecho a tener en cuenta a la hora de interpretar estos resultados es la dificultad que puede existir en la evaluación del porcentaje de racimo atacado en campo por *Aspergillus* ya que el hongo habitualmente se desarrolla en el interior del racimo y, en algunos casos, en el interior de las bayas. Por otro lado niveles bajos de *Aspergillus* en algunos casos son capaces de conferir niveles altos de OTA en mostos y vinos-

Por lo que respecta a la relación existente entre parámetros de sanidad de la vendimia, (ácido glucónico y glicerol), éstos presentan una correlación muy alta entre infecciones de *Aspergillus*, *Botrytis* y podredumbre ácida y contenido en OTA, en el mosto, siendo unos parámetros que pueden presentar un interés para conocer, a la entrada en bodega, los riesgos de contaminación del mosto o vino en OTA.

3. Efecto de diferentes estrategias de tratamientos sobre la presencia de OTA en vino

3.1. Plan experimental y metodología

Los objetivos de esta fase fueron determinar la influencia de diferentes estrategias en la lucha contra Lobesia, Oidio, (afecciones que pueden dañar la integridad de la baya), *Botrytis* y *Aspergillus* en el contenido en OTA de los vinos.

Asimismo se pretendía conocer:

- el efecto del número de aplicaciones contra *Aspergillus* (2 aplicaciones: una en C, envero, y en D, 21 PHI, comparándolo con sólo una aplicación en D);
- la eficacia entre diversas formulaciones (Chorus vs. Switch) contra *Botrytis* y *Aspergillus* y los niveles de OTA en vinos que presentaban los diferentes tratamientos.

Los tratamientos se realizaron sobre una viña de Macabeo (B) donde se tenía la constancia, en años anteriores, de que la uva tenía alto riesgo de contaminación de hongos OTA-génicos y de contaminación de OTA.

El plan experimental y las referencias de los diferentes tratamientos fue el siguiente:

- Tratam. 1: NO Powdery ⁽¹⁾ + NO Lobesia ⁽²⁾ + NO *Aspergillus* ⁽³⁾ + 2 CGA379438 ⁽⁴⁾ en C y D
- Tratam. 2. Powdery Strategy B + Lufox ⁽⁵⁾+ 2 Switch⁽⁶⁾ en C y D
- Tratam. 3. NO Powdery + Lufox+ 2 Switch en C y D
- Tratam. 4. Powdery Strategy B⁽⁷⁾ + NO Lobesia + 2 Switch en C y D
- Tratam. 5. Powdery Strategy B + Lufox + NO *Aspergillus* + 2 CGA379438 en C y D
- Tratam. 6. Powdery Strategy B. + Lufox + 1 Switch en D
- Tratam. 7. Powdery Strategy B. + Lufox + 2 Chorus⁽⁸⁾ en C y D
- Tratam. 8. Powdery Strategy A⁽⁹⁾ + Lufox + 2 Switch en C y D
- Tratam. 9. Control o tratamientos a criterio del viticultor (Farmer plot)

(1) No protección contra oidio

(2) No protección contra Lobesia

(3) No protección contra *Aspergillus*

(4) CGA 379438 producto con control de *Botrytis* pero sin control de *Aspergillus*

(5) Formulación Lufox (75 gr/l Fenoxycarb+ 30 gr/l Lufenuron), producto para control de Lobesia

(6) Formulación Switch (37,5% ciprodinil+ 25% fludioxonil) producto contra *Botrytis* y *Aspergillus*

(7) Powdery strategy B, estrategia contra oidio con productos en desarrollo

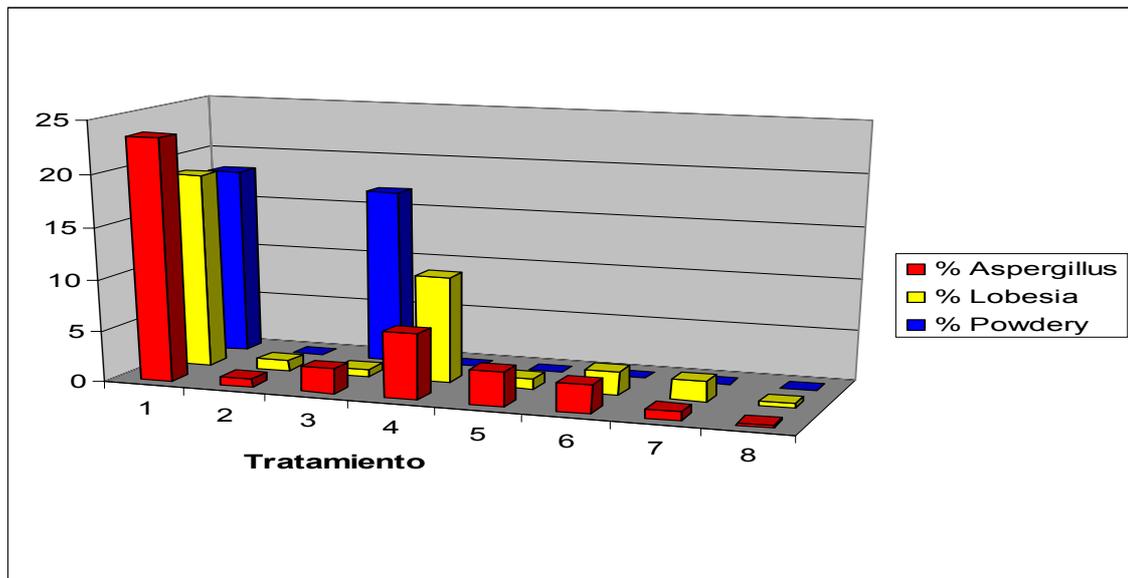
(8) Formulación Chorus (50% ciprodinil), contra *Botrytis* y *Aspergillus*

(9) Powdery strategy A, solución Syngenta actual contra Oidio

El dispositivo del ensayo fue en bloques completamente randomizados con 3 repeticiones por tratamiento. Se evaluó en la vendimia la incidencia de *Aspergillus*, *Botrytis*, Oidio y Lobesia en 50 racimos de los diferentes tratamientos. La vinificación se realizó con maceración de la piel (aproximadamente 5 días), con el fin de extraer el máximo de OTA presente en la uva. Se analizaron los parámetros clásicos en mosto y vino y el respectivo nivel de OTA

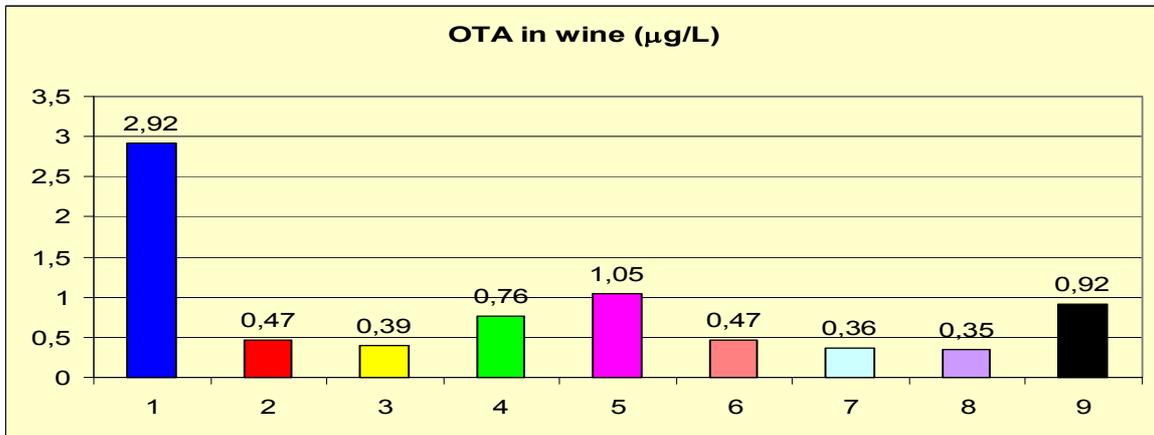
3.2. Resultados

La incidencia de ataques fúngicos y de Lobesia se ofrecen en el siguiente gráfico:

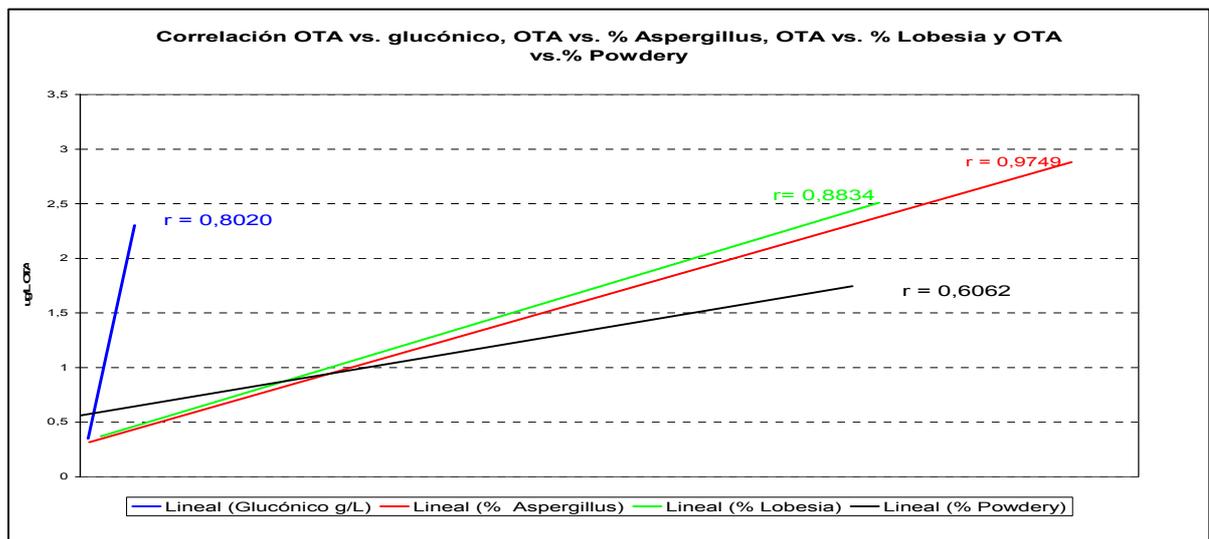


Se observan unos focos de infección de Oidio muy elevados en los tratamientos 1 y 3 que son aquellos que no ofrecen protección contra éste. Así mismo en los 1 y 4, sin protección contra Lobesia, poseen los más altos niveles de *Aspergillus*. Por el contrario, los tratamientos 2 y 8 destacan por una menor incidencia de ataques de hongos, siendo los tratamientos 2, 7 y 8 son los que presentan mejor control del *Aspergillus*.

El contenido de OTA de los vinos de los diferentes tratamientos se muestra en el siguiente gráfico:



Los niveles de OTA aparecen sensiblemente superiores en aquellos vinos procedentes de niveles altos de infecciones criptogámicas y ataques de Lobesia. El tratamiento 1 que parece haber sufrido un elevado ataque fúngico presenta un elevado contenido de OTA, seguido del tratamiento 5 (con cobertura de oidio, Lobesia y *Botrytis* pero sin cobertura contra *Aspergillus*), del tratamiento 9 (parcela del viticultor) y de aquella situación provocada por la falta de tratamiento contra Lobesia (tratamiento 4).



También en esta experiencia, se comprobó una alta correlación entre infecciones de *Aspergillus*, Lobesia y Oidio, entre sí y con los niveles de glucónico, glicerol y OTA en vino.

En cuanto a los objetivos iniciales de la experiencia, puede decirse que los tratamientos 2 y 6, aunque se aprecia un mejor control del *Aspergillus* con la estrategia 2, no presentan diferencias entre el contenido de OTA, lo cual confirma que una estrategia de control eficaz de Lobesia se convierte en fundamental.

Las diferencias entre las formulaciones que más eficacia han tenido para el control de *Aspergillus carbonarius*, se aprecian bajas, aún cuando confirman que la formulación Chorus presenta menores niveles de OTA

4. Conclusiones

La presencia de OTA en mosto y vino se correlaciona de forma significativa con las agresiones sufridas en las bayas por hongos (principalmente oidio) y plagas (principalmente Lobesia). A partir de cualquiera de sus heridas, se puede desencadenar una invasión de los hongos *Aspergillus* y entre éstos aquellos OTA-génicos. Cualquier protección antifúngica contra *Aspergillus* debe ir precedida por una adecuada protección contra Lobesia.

La utilización de productos eficaces contra *Aspergillus*, (en nuestra experiencia: estrategia basada en ciprodinil sólo o asociado con fludioxonil), ha proporcionado los niveles de OTA más bajos, alejándolos, en las condiciones más difíciles de los límites máximos propuestos por la Organización Internacional de la Viña y el Vino.

El viticultor debe incorporar a su código de buenas prácticas vitícolas las siguientes:

- Evitar aquellas prácticas culturales que proporcionen un excesivo vigor, un aumento inadecuado de los rendimientos y del tamaño de baya y una compactación excesiva del racimo.
- Realizar una cobertura fitosanitaria diseñada con productos eficaces para los hongos e insectos que se quieren controlar, ejecutándola con la dosis y momentos adecuados, y favoreciendo que las materias activas pueda llegar a todas las partes del racimo y penetrar en el interior de éste.

Y para la bodega:

- Favorecer, con una justa valoración del precio de la uva, que la sanidad de la vendimia (es decir: su calidad) sea la clave para la rentabilidad de la viña, alejando al viticultor de la idea que el máximo beneficio debe conseguirse exclusivamente con altas producciones.

Informe técnico elaborado por:

INCAVI: S.Mínguez, C.Masqué, X.Elorduy, Ll.Giralt, M.Vilavella, S.Rico, C. Domingo, M.Blasco y J. Capdevila.

Syngenta AGRO S.A.: J.M. Cantus y P.Margot.

Dept. Sanitat i Anatomia Animals, Area Microbiologia, UAB: F.X.Cabañes y F.Accensi.

Laboratorio Arbitral Agroalimentario. MAPA: A.Pons

5. Bibliografia

Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Castellá, G., Cabañes, F.J. 2003. Journal of Food Protection, 66, 504-506.

Accensi, F., Cabañes, F.J., Giralt, Ll., Domingo, C., Mínguez, S. 2001. Memoria Técnica de l'INCAVI. Año 2001.

Bau, M., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Mínguez, S., Cabañes, F.J. 2004. –in rev. International Journal of Food Microbiology.

Cabañes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G., Mínguez, S., Pons, A. 2002. Internantional Journal of Food Microbiology, 79, 213-215.

Mínguez, S., Cabañes, F.J., Pons, A. 2001. Proceedings report of wine Technology G.E., O.I.V.

Mínguez, S., Pons, A., Masqué, C., Vilavella, M., Elorduy, x., Capdevila, J. 2002. Proceedings report of Wine Technology G.E.; O.I.V.

Mínguez, S., Pons, A., Cabañes, F.J., Masqué, C., Giralt, Ll., Vilavella, M., Accensi, F., Domingo, C., Elorduy, X., Margot, P., Cantus, J.M., Capdevila, J. 2003. Proceedings report of Diseases, Pest and Vine Protection G.E.; OIV

Mínguez, S., Cantus, J.M., Pons, A., Margot, P., F.J. Cabañes, Masqué, C., Accensi, F., Elorduy, X., Giralt, Ll., Vilavella, M., Rico, S., Domingo, C., Blasco, M., Capdevila, J. 2004. Bulletin de l'O.I.V. Vol. 77. 885-886.

Vilafranca del Penedès, mayo 2004