

Proyecto de Investigación

23 de marzo del 2016

Reporte final sobre potenciales modificaciones en el empacado de mango para mejorar el control poscosecha de antracnosis.

Investigadores Principales:

Dr. Jerry A. Bartz

University of Florida, IFAS
Plant Pathology Department
Gainesville, FL

Dr. Jeffrey K. Brecht

University of Florida, IFAS
Horticultural Sciences Department
Gainesville, FL

Abstract/resumen de la investigación

Hemos integrado etanol diluido (5 a 10% v / v) en una simulación de laboratorio de prácticas de empaque existentes como un refuerzo para mejorar el control de la antracnosis del mango que proporciona actualmente el tratamiento de cuarentena de agua caliente. El etanol es bien conocido por aumentar sinérgicamente la letalidad de agua caliente para patógenos poscosecha. En una investigación preliminar llevada a cabo aquí en UF, Gainesville, soluciones calientes de etanol (2-8%) inactivaron completamente el patógeno de la antracnosis en los tejidos de frutas enfermas, mientras que el etanol diluido en agua fría o agua caliente solo fue fungistático (inhibición temporal). El tratamiento con agua caliente es una operación común en las empacadoras que participan en el comercio de exportación de mango. Nosotros propusimos diseñar un tratamiento con etanol diluido que puede lograr el mismo control sinérgico observado en el laboratorio en los mangos empacados para uso comercial. El etanol es un producto químico GRAS y no requeriría un registro si es usado como aditivo en la empacadora. Las bacterias y los hongos expuestos a niveles letales de etanol no han mostrado signos de desarrollar resistencia. Ciertos microbios pueden desarrollar cierta resistencia a niveles dañinos (no letales) de calor, pero esta tolerancia no parece persistir dentro de la población tratada.

Objetivos:

Prevenir el desarrollo de infecciones latentes de antracnosis que no son visibles en los mangos al momento del empaque y hacerlo mediante modificaciones de bajo costo en los equipos y procedimientos de las empacadoras.

Importancia y Antecedentes:

La antracnosis es el principal causante de la pudrición de los frutos de mango en poscosecha. Lesiones de color negro con borde indefinido y de más de 2 cm de diámetro son comunes en los frutos de mango maduro destinados al mercado (Aruaz, 2000). La incidencia de antracnosis es de casi el 100% en fruta producida en climas con alta humedad y fuertes precipitaciones. Las lesiones tempranas se limitan principalmente a la piel, pero el patógeno crece en la pulpa cuando la fruta madura. En la cosecha, la fruta tiene muchas infecciones latentes donde el patógeno, *Colletotrichum gloeosporioides* existe como un apresorio unido a las células epiteliales de la fruta, inclusive si la hifa infectiva no ha penetrado la capa celular. En fruta verde el desarrollo del hongo es inhibido por los metabolitos endógenos producidos en la fruta. Cuando la fruta comienza a madurar estos compuestos fungicidas se disipan y el patógeno continúa colonizando el fruto. Las estructuras infecciosas del patógeno se encuentran en o muy cerca de la superficie de las frutas durante la fase latente del ciclo de infección. Esto proporciona una oportunidad para obtener un mejor control post-cosecha en la superficie de la fruta, en el momento en que el patógeno está latente.

El tratamiento de agua caliente en el mango es requerido por las normas de cuarentena para evitar la introducción de ciertos insectos en áreas protegidas, haciendo uso de los protocolos para la importación de mangos en los mercados de Estados Unidos suscritos por el USDA - APHIS (Aruaz de 2000, el USDA, 2013). El desarrollo del patógeno causante de antracnosis es sensible a temperaturas elevadas ($> 30^{\circ}\text{C}$ / 86°F). La infección se produce rápidamente a temperaturas que van desde 20 a 30°C (68 a 86°F) y las temperaturas óptimas varían de acuerdo a la cepa del patógeno (Aruaz, 2000). Sin embargo, el desarrollo del patógeno se inhibe o se previene a temperaturas fuera de este intervalo. Temperaturas altas pueden ser letales para el patógeno pero la superficie de mango puede ser dañada por la exposición a altas temperaturas, causando lenticelas hundidas, escaldadura superficial, capas almidonosas en la pulpa, hombros hundidos y formación de cavidades internas. En general, el tratamiento cuarentenario con agua caliente a una temperatura constante de 46.1°C (115°F) como es requerido por la reglamentación cuarentenaria tiene un control parcial de la antracnosis, principalmente cuando los niveles de infección son bajos (McGuire, 1991). Sin embargo, este tratamiento no es capaz de controlar completamente la infección. En nuestra previa investigación (Bartz et al., no publicada), las temperaturas y la duración de los tratamientos requeridos para la inhibición de la antracnosis fueron reducidas cuando el agua caliente contenía etanol. El etanol aplicado como vapor también retarda la maduración y reduce el desarrollo de microorganismos en rebanadas de mango (Plotto et al., 2003). El equipo de investigación de Plotto también determinó los límites máximos de la concentración de etanol para evitar el desarrollo de aromas anormales, causantes del mal sabor, en las rebanadas de mango.

El trabajo no publicado de nuestro laboratorio (citado antes) fue realizado por un investigador invitado de la India quien aplicó a mangos de la variedad 'Tommy Atkins' un tratamiento de 1 hora en agua caliente (46.1°C / 115°F) simulando el tratamiento cuarentenario y luego almacenó las frutas a 24°C (75°F). Cuando el almacenamiento fue concluido (20 días después del tratamiento), las frutas que fueron tratadas con agua caliente conteniendo 4% de etanol estuvieron completamente libres de antracnosis. Las frutas tratadas con solo agua

caliente, con agua caliente al 2% de etanol o agua a temperatura ambiente (24°C) conteniendo 2, 4 o 8% de etanol presentaron lesiones. Un mejor control fue conseguido cuando las frutas fueron almacenadas a 40°C (104°F) por 24 horas además de la aplicación del tratamiento con agua caliente conteniendo 4% de etanol.

Gabler, et al. (2004) proporciono evidencia que las soluciones calentadas de etanol tienen un efecto sinérgico sobre las esporas de diversos patógenos causantes de pudrición en comparación con calor solo o etanol solo. Gutiérrez-Martínez et al. (2012) reporto acerca de la combinación de etanol y agua caliente para controlar otros dos patógenos poscosecha de mango, pero las concentraciones utilizadas en las pruebas fueron de 10 a 30%. Sin embargo, no consideramos práctico la adición de etanol directamente a los tanques de tratamiento de cuarentena de agua caliente, dado el volumen de los tanques y la probable evaporación del etanol del agua caliente. Por otra parte, no creemos que un tratamiento de almacenamiento de calor de aire seco de 24 horas es viable en las empacadoras de mango comerciales. Proponemos que el etanol diluido podría ser aplicado a los mangos de tres maneras que a su vez ofrezcan mínimos cambios en el diseño y operación de empaque:

1. Como un enjuague de aspersion recuperable aplicada a las frutas a la salida del tanque de lavado, antes de la pre-calibración y del tratamiento cuarentenario con agua caliente. Este tratamiento podría causar una pequeña demora entre el enjuague y el tratamiento cuarentenario con agua caliente para permitir que el etanol residual pueda ser absorbido por la superficie de la fruta.
2. Como un tratamiento de vapor cuando las frutas se recuperan del tratamiento cuarentenario con agua caliente (poner una cobertura plástica sobre cada cajón de fruta tratada con agua caliente e inyectar etanol bajo la cobertura o rociar frutas tratadas con agua caliente con etanol justo antes de colocar la cobertura sobre la paleta)
3. Como aditivo del agua de hidro-enfriado para aquellas empacadoras que usan hidro-enfriado después del tratamiento cuarentenario con agua caliente

Métodos:

En ensayos iniciales, secciones de tejido de la fruta que mostraba síntomas resientes de pudrición fueron cortados y expuestos a varios niveles de calor (hasta 54°C) con la dilución de etanol, por diferentes intervalos de tiempo para poder establecer la sensibilidad de las estructuras del patógeno al calor y al etanol. Concentraciones de etanol en ambiente (24°C/75°F) y en agua caliente (46.1°C/115°F) fueron basadas en investigaciones previas, así como en publicaciones científicas (alrededor 2 to 40%). El tratamiento de vapor fue basado en el reporte de Plotto et al. (2003), pero se evitó usar niveles que produzcan mal sabor en la fruta. Los tratamientos control incluyeron: (1) tratamiento de calor sin etanol; (2) tratamiento con etanol sin calor; (3) sin tratamiento de calor ni etanol y (4) etanol incorporado al tratamiento cuarentenario como se discutió en nuestros ensayos preliminares. La eficacia de la prueba sería

basada en el desarrollo de lesiones o el crecimiento de patógenos en medio de cultivo en placa Petri o en la calidad de la fruta en almacenamiento.

Tratamientos y evaluación:

Tres procedimientos fueron usados para evaluar el efecto de etanol en el tratamiento de agua caliente (tratamiento cuarentenario) del mango.

1. Etanol fue incorporado al agua caliente a una concentración final de 10%.
2. Fruta tratada con agua caliente (tratamiento cuarentenario) fue hydro-enfriada con soluciones de etanol de 5 o 10%.
3. Fruta tratada con temperaturas altas fue expuesta a un enjuague de etanol como una simulación del tratamiento de vapor.

Resultados:

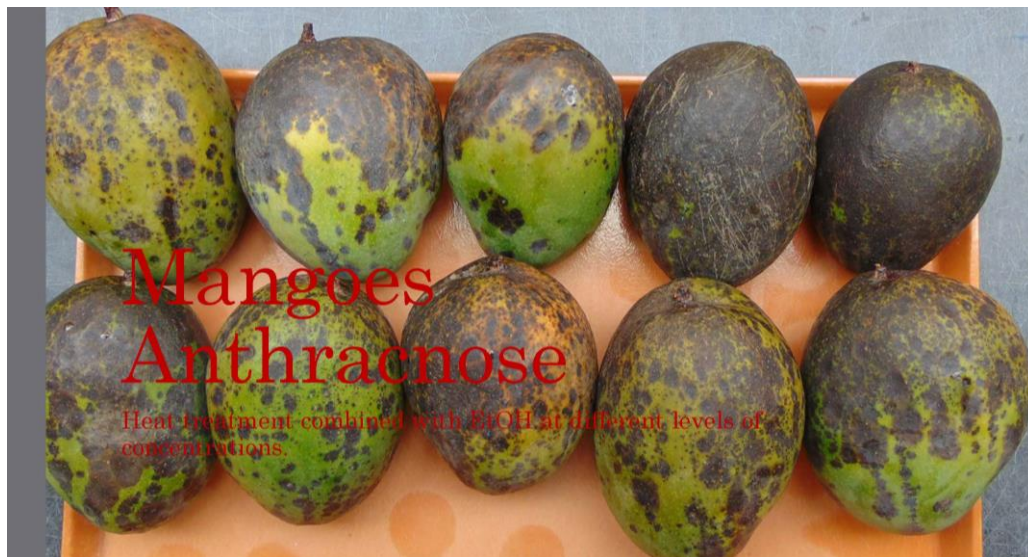
Dos grandes ensayos fueron ejecutados en el laboratorio post-cosecha en Gainesville con fruta cosechada en los campos del Centro de Investigación y Educación Tropical (TREC siglas en inglés) UF/IFAS en Homestead. En la primera prueba, la fruta fue contaminada con látex. Etanol, particularmente cuando es combinado con calor, aparentemente disolvió el látex, lo que ocasiono severas escalduras en la superficie de la fruta. El daño usualmente ocurre sobre las superficies que fueron expuestas a un chorreo de látex durante la cosecha (Fig. 1) impidiendo una evaluación del control de antracnosis.

Fruta obtenida de TREC para el Segundo ensayo tuvo severos daños de antracnosis antes de ser tratada (Fig. 2). Ninguno de los experimentos paro o redujo el desarrollo de los síntomas.

Figura 1. Evidencia de que la superficie afectada por el etanol caliente diluido estaba relacionado a los depositos de latex secos en la superficie de la fruta—flechas indican los daños.



Figure 2: Mangos usados en el segundo ensayo. Sintomas severos de antracnosis fueron observados previo a los tratamientos y continuaron su expansion despues del tratamiento.



Un tercer ensayo fue ejecutado en mango ('Keitt') comprado a un agricultor en un fundo localizado en Pine Island, FL. La fruta control estaba severamente infectada a los 16 días de almacenamiento, con un promedio de 74% de la superficie de la fruta cubierta de lesiones.

Tabla 1. Tratamiento de 'Keitt' obtenido de Pine Island (otoño, 2014)

Tratamientos	Área con pudrición	significancia
Control	74.17	A
QHW con 5% etanol	12.93	B
QHW +HC	9.85	BC
QHW + HC con 5% etanol	7.83	CD
QHW	7.13	CD
QHW + HC con 10% etanol	6.00	D

Fruta almacenada por 16 días a 20°C

QHW = 60-minutos a 46.1°C tratamiento cuarentenario de agua caliente

HC=agua más etanol a 21°C aplicado a la fruta por 20 minutos después de los reglamentados 30 minutos de reposo seguido de QHW. Temperatura final de la pulpa= aprox. 25°C.

La fruta con menos daño al final del almacenamiento fue la fruta que recibió el tratamiento cuarentenario de agua caliente y la fruta que fue hidro-enfriada con 5 o 10% de etanol después del tratamiento cuarentenario con 6 hasta menos de 8% de la superficie cubierta con lesiones. El tratamiento caliente (tratamiento regular cuarentenario) con 5% de etanol también mostro una reducción significativa en la severidad de la pudrición. Sin embargo, la fruta que solo recibió el tratamiento cuarentenario sin etanol mostro menos daño por antracnosis de manera significativa (12.93 versus 7.13%, respectivamente). No hubo evidencia que el tratamiento por etanol estuviera relacionado al daño en la piel de la fruta.

Appearance of fruit at time of evaluation.



Hot water
alone

Hwt in 5%
ETOH

Hwt+
hydrocool

Hydrocool
5% ETOH

Hydrocool
10% ETOH

Not heat
treated

Durante la baja de producción de mango en Florida, fruta ligeramente afectada fue obtenida de mercados locales. Lesiones pequeñas con un poco de tejido fueron removidas de la fruta. Este tejido fue expuesto a varios tratamientos, luego fue cultivado en un medio de cultivo (APDA) para determinar si la viabilidad del patógeno fue afectada. Un nuevo tratamiento de calor, de corto tiempo (5-10 minutos) a altas temperaturas (54°C) fue usado, debido a que se encontró en la literatura que 54°C es la temperatura más alta tolerable para la fruta de mango. En la fruta entera (comprada de mercados locales) expuesta a esta temperatura por 10 minutos no se observó ningún daño. El patógeno fue erradicado de las partes de la fruta que presentaron pequeños signos de infección, cuando estos fueron expuestos a 54°C por 5 o 10 minutos. No se observó ningún crecimiento en estas partes de la fruta, por otro lado, un alto crecimiento del hongo se observó en partes de la fruta tratada por 5 o 10 minutos con etanol al 4 o 8% pero a temperatura ambiente. No se detectó ningún efecto en la erradicación del patógeno cuando el etanol fue adicionado a agua caliente a 54°C, debido a que el agua caliente fue 100% efectiva.

En la segunda cosecha, los mangos para el ensayo fueron obtenidos del área de producción de Homestead, FL. 'Keitt' y 'Kent' fueron cosechados de un fundo en buenas condiciones localizado en TREC (Centro de Investigación y Educación Tropical). 'Tommy Atkins' fue comprado de un agricultor local del área de Homestead. No se observó ningún daño en la cascara del mango debido al tratamiento de agua caliente más etanol. Esto confirma que los daños observados en los ensayos iniciales realizados en la campaña anterior fueron causados por el derrame de látex en la cascara de la fruta.

La incidencia de antracnosis en la fruta del tratamiento control fue mucho más baja que las muestras obtenidas de la segunda cosecha en otras campañas. Casi todos los tratamientos redujeron antracnosis comparado con el control, con la única excepción de "Keitt." En general, los niveles más bajos de antracnosis fueron observados en las tres variedades cuando la fruta fue expuesta al tratamiento cuarentenario regular de agua caliente, seguido de un reposo (procedimiento actual) de 30 minutos y de un tratamiento de hidro-enfriado con 10 % de etanol

hasta que la temperatura de pulpa alcanzo 25°C (Tabla 2). Sin embargo, no fue significativamente diferente de los otros tratamientos aplicados a las variedades analizadas en los ensayos. El control de antracnosis en 'Keitt' y 'Kent' no mostró mejores resultados de los obtenidos por el tratamiento cuarentenario de agua caliente, cuando este fue precedido o seguido por 10 minutos a 54°C, pero esta práctica no fue muy efectiva para la variedad 'Tommy Atkins'.

Tabla 2. Porcentaje de la superficie del mango afectada por antracnosis 7 días después de la aplicación de los tratamientos

tratamientos	'Tommy Atkins'	'Keitt'	'Kent'
Control	31.3 A	9.5 A	11.6 A
QHW	8.2 B	5.1 B	6.3 B
QHW seguido de HW	8.1 B	6.0 B	6.0 B
QHW luego HW mas HC with 10% ethanol	4.4 C	10.0 A	6.9 B
QHW seguido de HC with 10% ETOH	2.6 C	5.1 B	5.1 B
HW seguido de QHW	2.5 C	9.4 A	5.4 B

Almacenamiento at 20°C.

QHW = 60 minutos a 46.1°C tratamiento cuarentenario de agua caliente.

HW = sumergido en agua a 54°C por 10 minutos.

HC = fruta caliente dejada en reposo 30 minutos a temperatura ambiente y luego sumergida en 10% etanol a 21°C hasta que la fruta llegara a aprox. 25°C

Promedios con letras diferentes son significamente diferentes $P \leq 0.05$.

Discusión:

Nuestras observaciones confirman que los tratamientos de calor, incluyendo el tratamiento cuarentenario de agua caliente, proveen un buen control de la antracnosis. Lo cual es un importante factor en la comercialización del mango en regiones húmedas. En los ensayos realizados no hemos podido demostrar que añadiendo etanol al agua caliente aumentara su efectividad para el control de antracnosis en el mango. Una precaución a tener en cuenta es, si látex se ha secado en la superficie de la fruta, el tratamiento de etanol causa escaldaduras en la superficie de la fruta. Sin embargo, cuando el etanol es agregado al agua del hidro-enfriado a una concentración de 10%, se obtuvo ligeros daños de antracnosis en unos de los ensayos con mango de la variedad 'Tommy Atkins'. Ensayos con agua caliente a 54°C (129°F), fueron vistos como ensayos con un valor agregado, el cual pueden ser usados por los clientes en los lugares de destino cuando el mango muestra signos de antracnosis. Este tratamiento fue efectivo en lesiones en desarrollo, pero no controló completamente la enfermedad en infecciones latentes. Por lo tanto, es probable que el apesorio del hongo y la hifa de infección son más resistentes al calor que el micelio en desarrollo. De la misma manera infecciones muy desarrolladas parecen ser resistentes al calor. Ensayos adicionales serán necesarios para confirmar que el tratamiento de agua a 54°C es con seguridad un tratamiento con valor agregado o si añadiendo etanol al agua permitirá el uso de una temperatura ligeramente baja.

Revisión de Literatura:

- Aruaz, L. F. 2000. Mango Anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Dis.* 84:600-611.
- Gabler, F. M., Mansour, M. F., Smilanick, J. L. and Mackey, B. E. 2004. Survival of spores of *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* after exposure to ethanol solutions at various temperatures. *J. Appl. Microbiol.* 96: 1354-1360.
- Gutiérrez-Martínez, P., Osuna-López, S. G., Calderón-Santoyo, M., Cruz-Hernández, A. and Bautista-Baños, S. 2012. Influence of ethanol and heat on disease control and quality in stored mango fruits. *LWT - Food Science and Technology* 45: 20-27.
- McGuire, R. G. 1991. Concomitant decay reductions when mangoes are treated with heat to control infestations of Caribbean fruit flies. *Plant Dis.* 75:946-949.
- Plotto, A., Bai, J., Baldwin, E.A., and Brecht, J.K. 2003. Effect of pretreatment of intact 'Kent' and 'Tommy Atkins' mangoes with ethanol vapor, heat or 1-methylcyclopropene on quality and shelf life of fresh-cut slices. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 116:394-400.
- USDA, 2013, Mango, T102-a, Hot water immersion, pages 356 -358 in: Treatment Manual. 11/2013-100 PPQ.