

# Aplicación en poscosecha de choques gaseosos para inhibir la mancha negra causada por *Alternaria alternata* en caqui 'Rojo Brillante'

Verónica Taberner y Lluís Palou (Laboratorio de Patología, Centro de Tecnología Poscosecha (CTP). Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Moncada, Valencia. e-mail: palou\_llu@gva.es)

Caquis 'Rojo Brillante' se inocularon artificialmente con *Alternaria alternata* y 24 h después se expusieron durante 48 h a 20 o 35°C y 90% HR a: aire (control), 95% CO<sub>2</sub> o 30% O<sub>2</sub> + 70% CO<sub>2</sub>. La fruta tratada se incubó a 20°C y 90% HR durante 10 días o bien se almacenó a 1°C y 90% HR durante 82 días, y se determinó periódicamente el desarrollo de la mancha negra. También se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la calidad en fruta no inoculada y frigoconservada. En general, estos choques gaseosos resultaron poco efectivos y persistentes, por lo cual no puede aconsejarse su implementación comercial para el control de la mancha negra causada por *Alternaria*.

PALABRAS CLAVE: *Diospyros kaki* Thunb., *Alternaria alternata*, dióxido de carbono, oxígeno, atmósfera controlada, control de podridos de poscosecha.

## INTRODUCCIÓN

El caqui (*Diospyros kaki* Thunb.) es un cultivo en expansión en España, siendo Valencia la mayor área productora y 'Rojo Brillante' el principal cultivo (Foto 1). Esto es debido a la aplicación actual de una tecnología poscosecha de desastringencia basada en la exposición de la fruta a una atmósfera controlada de 95% CO<sub>2</sub> a 20°C durante 24 h (Arnal y del Río, 2003). Este tratamiento elimina eficientemente la astringencia del fruto manteniendo un alto grado de firmeza, lo que permite comercializar el caqui con una apreciada textura crujiente y extender su comercialización a mercados cada vez más lejanos. Las podredumbres ocasionadas por hongos limitan la conservación prolongada del caqui y generan importantes pérdidas económicas. La mancha negra, causada por el patógeno *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissler es la principal enfermedad de poscosecha del caqui en España (Palou y col., 2012). En la actualidad, en España no está autorizado el uso de fungicidas químicos de poscosecha para el control de patógenos, por lo que se están evaluando tratamientos antifúngicos alternativos. Atmósferas enriquecidas en CO<sub>2</sub> han sido reportadas como efectivas para suprimir el desarrollo de patógenos fúngicos en fruta fresca, tanto aplicadas de manera sostenida (Kader, 1986) como aplicadas durante periodos de tiempo cortos (choques). Por ejemplo, la aplicación de 30% o 60% CO<sub>2</sub> durante 24 h redujo el crecimiento de *A. alternata* tanto *in vitro* como *in vivo* en caquis 'Triumph' inoculados artificialmente (Prusky y col., 1997). El curado, que consiste en un tratamiento de calor en el cual se almacena la fruta durante 12-94 h a 30-46°C y 80-90% HR, se ha descrito como un método efectivo para controlar podredumbres en fruta fresca, especialmente en cítricos (Schirra y col., 2000). La exposición a 95% CO<sub>2</sub> o a la mezcla 30% O<sub>2</sub> + 70% CO<sub>2</sub> a 20°C o 35°C redujo la incidencia y la severidad de la podredumbre gris en granadas 'Mollar de Elche' inoculadas artificialmente con *Botrytis cinerea* e incubadas a 20°C o frigoconservadas a 5°C (Palou y col., 2016). La disponibilidad en las plantas empacadoras de caquis de instalaciones para eliminar la astringencia mediante tratamientos con CO<sub>2</sub> abre la posibilidad de aplicación de tratamientos gaseosos antifúngicos.

Así pues, el objetivo de este trabajo fue la evaluación de choques gaseosos, aplicados a temperatura ambiente (20°C) o en combinación con temperaturas de curado, para el control de la mancha negra en caquis 'Rojo Brillante' inoculados artificialmente con *A. alternata*. Adicionalmente se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la calidad de frutos no inoculados.

## Materiales y métodos

**Fruta:** Caquis 'Rojo Brillante', procedentes de CANSO (Cooperativa Agrícola Ntra. Sra. del Oreto

en l'Alcúdia, Valencia) se cosecharon en su madurez comercial y se transportaron al CTP-IVIA, donde se seleccionaron frutos sanos de tamaño medio y se mezclaron aleatoriamente.

**Inóculo fúngico:** La cepa *A. alternata* QAV-6, aislada de un caqui podrido procedente de la zona de Valencia y seleccionada por su patogenicidad, se sembró en patata dextrosa agar (PDA) y se incubó a

25°C durante 7-14 días. Se preparó una suspensión de esporas del patógeno en agua estéril con 0,05% Tween 80, cuya concentración se ajustó a  $10^5$  esporas/ml usando un hematocitómetro. Cada caqui fue inoculado en cuatro puntos equidistantes de la zona ecuatorial efectuando sendas heridas de 1 mm de diámetro y 2 mm de profundidad con un punzón de acero inoxidable previamente sumergido en la suspensión conidial (Foto 2). La fruta inoculada se incubó a 20°C y 90% HR durante 24 h para favorecer la germinación de las esporas.

#### Aplicación de choques gaseosos y condiciones de almacenamiento:

Los tratamientos se aplicaron en cabinas de metacrilato (82x62x87 cm) cerradas herméticamente donde se inyectaban los gases  $CO_2$ ,  $O_2$  y  $N_2$  (Air Liquide SA, España) (Foto 3) mediante un sistema automatizado de mezcla de gases y de control de niveles (Control-Tec®, Tecnidex, SL, Paterna, Valencia) (Foto 4). La fruta se trató durante 48 h a 20°C o 35°C y 90% HR con aire (control), 95%  $CO_2$  o la mezcla 3%  $O_2$  + 70%  $CO_2$ . Tras aplicar los tratamientos, la fruta se dividió en dos lotes: el primero se incubó a 20°C y 90% HR durante 10 días y el segundo se almacenó a 1°C y 90% HR durante 82 días. Por cada atmósfera gaseosa, temperatura de exposición y condición de almacenamiento se utilizaron 4 repeticiones de 5 frutos inoculados artificialmente.

#### Efecto en el desarrollo de la mancha negra:

En la fruta inoculada artificialmente y tratada se determinaron la incidencia (porcentaje de heridas infectadas) y la severidad de la enfermedad (diámetro de las lesiones de las heridas infectadas). Dichas evaluaciones se efectuaron tras 3, 5 y 10 días en la fruta almacenada a 20°C, o cada 2 semanas en la fruta conservada a 1°C.

#### Efecto en la calidad de la fruta frigoconservada:

Un lote de fruta no inoculada se trató durante 48 h a 20°C o 35°C con aire (control), 95%  $CO_2$  o la mezcla 30%  $O_2$  + 70%  $CO_2$  y se almacenó a 1°C y 90% HR durante 12 semanas. En el momento de cosecha (calidad inicial) y tras las 12 semanas de almacenamiento en frío se evaluaron los siguientes parámetros físico-químicos de calidad: pérdida de peso, firmeza (Instron Universal Machine, Modelo 3343, Instron), color externo (Minolta CR-400 chroma meter, Konica Minolta Sensing, Inc.), contenido en sólidos solubles (CSS) (Atago Pocket refractometer, Atago Co. Ltd.) y acidez titulable (AT) (Titration Excellence T50, Mettler Toledo). El color externo, expresado como índice de color (IC), se

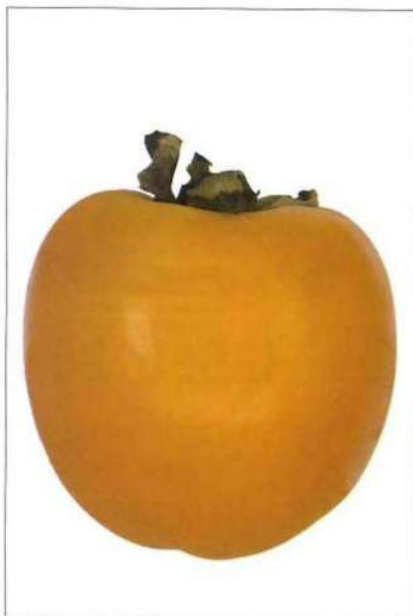


Foto 1. Caqui 'Rojo Brillante' en madurez comercial.



Foto 2. Inoculación de caquis con una suspensión de esporas de *Alternaria alternata*.



Foto 3. Cabinas de atmósfera controlada utilizadas para la aplicación de choques gaseosos.



Foto 4. Sistema de mezcla de gases para la aplicación de choques gaseosos.

calculó usando los parámetros de Hunter  $L$ ,  $a$ ,  $b$ , y la firmeza se determinó como la máxima fuerza en newtons (N) requerida para penetrar en la pulpa del fruto tras pelar la piel de la zona ecuatorial. El índice de madurez (IM) se calculó como CSS/AT.

**Análisis estadístico:** Se realizó con el paquete informático Statgraphics v. 5.1 (Statpoint Technologies Inc.). Para cada parámetro y día de evaluación se determinaron las diferencias entre medias me-

diantes la prueba de la mínima diferencia significativa (MDS) ( $P \leq 0,05$ ) aplicada tras un análisis de la varianza (ANOVA). Para la incidencia, los datos se sometieron a la transformación arcoseno.

## Resultados y discusión

### 1. Efecto de la aplicación de choques gaseosos en el desarrollo de la mancha negra



La exposición de la fruta a 30% O<sub>2</sub> + 70% CO<sub>2</sub> a 20°C durante 48 h redujo la incidencia de la mancha negra en un 33% respecto al control, tras 3 días de incubación a 20°C. Sin embargo, tras 10 días de incubación ninguno de los tratamientos fue efectivo, independientemente de la temperatura de exposición (Figura 1A, 1C).

Choques gaseosos con 95% CO<sub>2</sub>, aplicados a 20°C o 35°C durante 48 h, redujeron significativamente la incidencia de la mancha negra durante 54 días en caquis almacenados a 1°C (Foto 5). Por ejemplo, en fruta tratada a 20°C las reducciones fueron del 100, 88, 32 y 10% tras 12, 26, 40 y 54 días de conservación, respectivamente. Sin embargo, dichos tratamientos no fueron persistentes y no mostraron efectividad en evaluaciones posteriores (Figura 2A, 2C). Este hecho puso de manifiesto que el efecto del CO<sub>2</sub> sobre el hongo fue más fungistático que fungicida, puesto que la incidencia de la enfermedad aumentó con el tiempo de almacenamiento. Dicha apreciación también se observó en mandarinas inoculadas con *Penicillium* spp. (Montesinos-Herrero y col., 2012) o granadas inoculadas con *B. cinerea* (Palou y col., 2016) y tratadas con choques gaseosos de CO<sub>2</sub>.

Los tratamientos gaseosos, independientemente de la temperatura de exposición y condiciones de almacenamiento, incrementaron significativamente la severidad de la mancha negra respecto al control (aire a 20°C), especialmente la aplicación de 30% O<sub>2</sub> + 70% CO<sub>2</sub> en caquis frigoconservados (Figura 1B, 1D, 2B, 2D). En contraposición, la aplicación de choques gaseosos con 95% CO<sub>2</sub> o 30% O<sub>2</sub> + 70% CO<sub>2</sub> a 20°C o 35°C durante 48 h, redujo significativamente la severidad de la podredumbre gris en granadas 'Mollar de Elche' inoculadas artificialmente con *B. cinerea* e incubadas a 20°C o conservadas a 5°C (Palou y col., 2016).

## 2. Efecto de la aplicación de choques gaseosos en la calidad de la fruta

La Tabla 1 muestra el efecto de los tratamientos gaseosos en los atributos calidad interna y externa de caquis 'Rojo Brillante' tras 12 semanas de conservación a 1°C.

En general, el índice de color externo incrementó con el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, independientemente de la temperatura de exposición, la fruta tratada con 95% CO<sub>2</sub> presentó un IC más bajo que el resto de tratamientos, con valores similares a los registrados en cosecha.

Similarmente, la firmeza de los frutos descendió durante el periodo de conservación, pero la fruta tratada con 95% CO<sub>2</sub> a 20°C ó 35°C presentó valo-

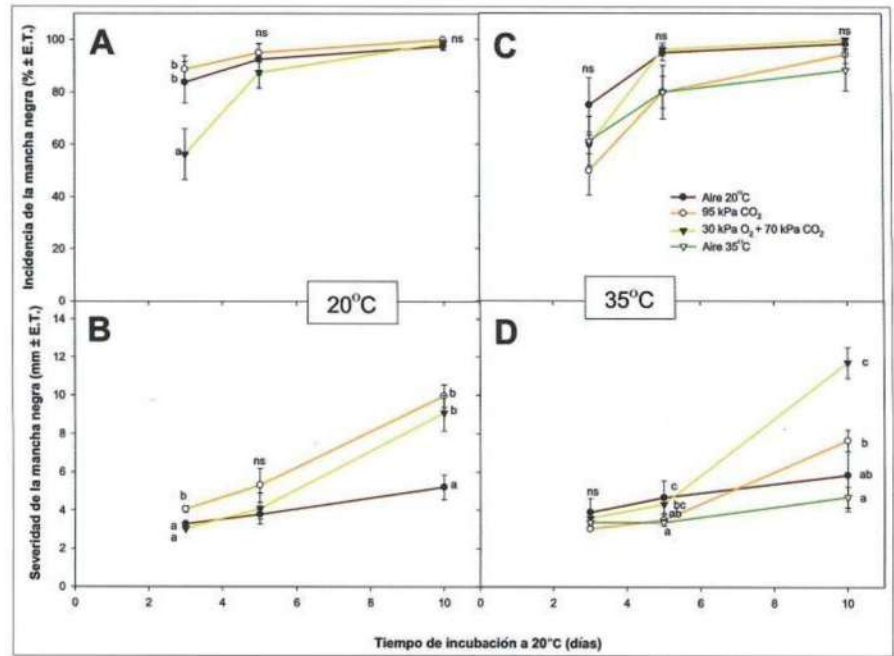


Figura 1. Incidencia y severidad de la mancha negra en caquis 'Rojo Brillante' inoculados artificialmente con *Alternaria alternata*, tratados 24 h después con aire (control), 95% CO<sub>2</sub> o la mezcla 30% O<sub>2</sub> + 70% CO<sub>2</sub> a 20°C (A, B) o 35°C (C, D) durante 48 h e incubados a 20°C durante 10 días. C y D incluyen un tratamiento control adicional de aire a 35°C. Para cada evaluación, letras diferentes y 'ns' indican diferencias significativas y no significativas, respectivamente, según la prueba de la MDS aplicada tras un ANOVA (P < 0,05). Para la incidencia, los datos se sometieron a la transformación arcoseno. Se muestran las medias no transformadas.

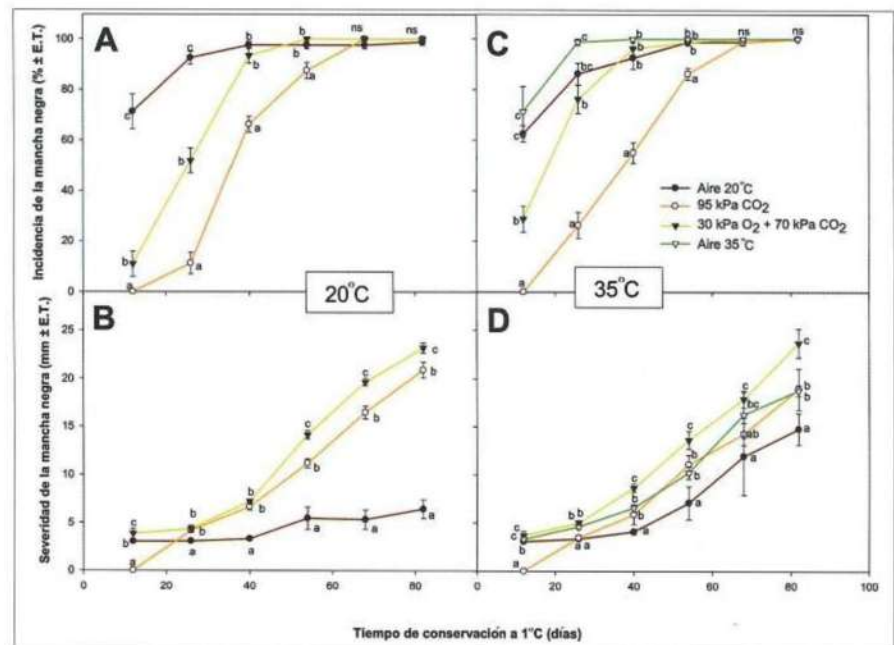


Figura 2. Incidencia y severidad de la mancha negra en caquis 'Rojo Brillante' inoculados artificialmente con *Alternaria alternata*, tratados 24 h después con aire (control), 95% CO<sub>2</sub> o la mezcla 30% O<sub>2</sub> + 70% CO<sub>2</sub> a 20°C (A, B) o 35°C (C, D) durante 48 h y conservados a 1°C durante 12 semanas. C y D incluyen un tratamiento control adicional de aire a 35°C. Para cada evaluación, letras diferentes y 'ns' indican diferencias significativas y no significativas, respectivamente, según la prueba de la MDS aplicada tras un ANOVA (P < 0,05). Para la incidencia, los datos se sometieron a la transformación arcoseno. Se muestran las medias no transformadas.

res de firmeza más altos. La reducción de firmeza en caqui durante el almacenamiento se ha relacionado con cambios en el color externo (Salvador y col.,

2006). La firmeza de los caquis tratados a 35°C con 30% O<sub>2</sub> + 70% CO<sub>2</sub> disminuyó drásticamente tras 82 días a 1°C.

En general, la fruta tratada con 95% CO<sub>2</sub> presentó menor acidez y mayor IM que la fruta control. Del mismo modo, se ha observado una baja acidez en fruta tratada con elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> (Kader, 1986).

## Conclusiones

La aplicación de 95% CO<sub>2</sub> o la mezcla 30% O<sub>2</sub> + 70% CO<sub>2</sub> a 20°C o 35°C durante 48 h no redujo satisfactoriamente la incidencia ni la severidad de la mancha negra en caquis 'Rojo Brillante' inoculados artificialmente, tratados y almacenados tanto a 20°C como a 1°C. En general, estos choques gaseosos carecieron de persistencia y su efecto fue más fungistático que fungicida. La aplicación de temperaturas de curado (35°C) combinada con la exposición gaseosa no mejoró la efectividad respecto a los choques a 20°C. Por tanto, debido a estos resultados y a los costes de implementación y mantenimiento asociados a la aplicación de choques gaseosos, no puede aconsejarse una estrategia de control comercial de la mancha negra basada en esta tecnología.

**Agradecimientos:** Se agradece a CANSO y a Mario Vendrell por suministrar fruta para los ensayos. Este trabajo fue financiado por el MEC (Proyecto AGL2004-05271/AGR) y la Unión Europea (Programa FEDER).

**ABSTRACT:** 'Rojo Brillante' persimmons were artificially inoculated with *Alternaria alternata* and exposed 24 h later for 48 h at 20 or 35°C and 90% HR to: air (control), 95% CO<sub>2</sub> or 30% O<sub>2</sub> + 70% CO<sub>2</sub>. Treated fruit were either incubated at 20°C and 90% RH for 10 days or cold-stored at 1°C and 90% RH for 82 days, and black spot development was periodically determined. The effect of gaseous



Foto 5. Ejemplo del efecto de choques gaseosos en el desarrollo de la mancha negra en caquis inoculados artificialmente.

T* (°C)	Choque gaseoso	Atributos de calidad <sup>a</sup>					
		PP (%)	Firmeza (N)	CSS (%)	AT (%)	IM	IC
20	Cosecha		21,3	14,0	0,13	104,8	17,5
	Aire (control)	4,7a	4,9a	15,7a	0,11b	147,8a	27,4c
	95% CO <sub>2</sub>	4,5a	10,5b	15,5a	0,06a	264,2b	21,3a
	30% O <sub>2</sub> + 70% CO <sub>2</sub>	5,2b	4,6a	16,1a	0,06a	289,9b	23,7b
35	Cosecha		26,9	12,8	0,14	91,3	16,7
	Aire 20°C (control)	4,6ab	3,8b	14,5a	0,07b	200,5b	24,2c
	Aire 35°C	4,5a	3,1b	14,3a	0,10c	138,7a	21,7b
	95% CO <sub>2</sub>	5,3bc	9,3c	13,6a	0,05a	251,8c	15,4a
	30% O <sub>2</sub> + 70 % CO <sub>2</sub>	5,4c	0,8a	14,0a	0,07b	204,3b	21,5b

<sup>a</sup>Abreviaciones: PP = pérdida de peso; CSS = contenido en sólidos solubles; AT = acidez titulable (g ácido málico/100 g); IM = índice de madurez (CSS/AT); IC = índice de color (1000a/Lb; parámetros Hunter). Para cada temperatura y atributo de calidad, medias en columnas con letras distintas son estadísticamente diferentes según la prueba de la MDS aplicada tras un ANOVA (P<0,05).

Tabla 1. Efecto de los choques gaseosos aplicados a 20°C o 35°C en los atributos de calidad interna y externa de caquis 'Rojo Brillante' tras 12 semanas de almacenamiento a 1°C.

shocks on quality of non-inoculated and cold-stored fruit was also assessed. In general, these treatments lacked effectiveness and/or persistence. Therefore,

their commercial implementation to control black spot caused by *Alternaria* cannot be recommended.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arnal, L. y Del Río, M.A. 2003. Removing astringency by carbon dioxide and nitrogen enriched atmospheres in persimmon fruit cv. 'Rojo brillante'. J. Food Sci., 68: 1516-1518.
- Kader, A.A. 1986. Biochemical and physiological basis for effect of controlled atmospheres on fruits of vegetables. Food Technol., 40 (5): 99-104.
- Montesinos-Herrero, C., del Río, M.A., Rojas-Argudo, C. y Palou, L. 2012. Short exposure to high CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> at curing temperature to control postharvest diseases of citrus fruit. Plant Dis., 96 (3): 423-430.
- Palou, L., Rosales, R., Montesinos-Herrero, C. y Taberner, V. 2016. Short-term exposure to high CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> atmospheres to inhibit postharvest gray mold of pomegranate fruit. Plant Dis., 100 (2): 424-430.
- Palou, L., Taberner, V., Guardado, A., y Montesinos-Herrero, C. 2012. First report of *Alternaria alternata* causing postharvest black spot of persimmon in Spain. Australasian Plant Dis. Notes, 7 (1): 41-42.
- Prusky, D., Perez, A., Zulkhi, Y., y Ben-Aire, R. 1997. Effect of modified atmosphere for control of black spot, caused by *Alternaria alternata*, on stored persimmon fruits. Phytopathology, 87 (2): 203-208.
- Salvador, A., Arnal, L., Carot, J.M., Carvalho, C.P. y Jabaloyes, J.M. 2006. Influence of different factors of firmness and color evolution during the storage of persimmon cv. 'Rojo Brillante'. J. Food Sci., 71 (2): 169-175.
- Schirra, M., D'hallewin, G., Ben-Yehoshua, S. y Falik, E. 2000. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. Postharvest Biol. Technol., 21 (1): 71-85.