

Eficacia *in vitro* del peróxido de hidrógeno sobre especies fúngicas componentes del complejo de la pudrición de corona del plátano.

Mayo 2012

CABILDO DE TENERIFE
ASPROCAN
COPLACA
Gobierno de Canarias
Instituto Canario de Investigaciones Agrarias
PROGRAMA MAC 2007 - 2013
Cooperación Transnacional
Bimusa

EFICACIA *in vitro* DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO SOBRE ESPECIES FÚNGICAS COMPONENTES DEL COMPLEJO DE LA PUDRICIÓN DE CORONA (*crown rot*) DEL PLÁTANO

Perera González, Santiago D. (1); Hernández Hernández, Julio M. (2); Piedra Buena Díaz, Ana (3); Duque Yanes, Manuel (4).

(1) Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural. Cabildo Insular de Tenerife.
(2) Departamento de Protección Vegetal del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA).
(3) Asociación de Productores de Plátanos de Canarias (Asprocan).
(4) Departamento de Calidad de la Cooperativa Platanera de Canarias (Coplaca).

Mayo 2012.

1.- INTRODUCCIÓN

La pudrición de corona (*crown rot*) del plátano causada por un complejo de especies fúngicas se considera el problema más importante de la postcosecha de esta fruta en todo el mundo (Reyes *et al*., 1998; Krauss y Johanson, 2000), llegando a causar, aún con el uso de fungicidas postcosecha, pérdidas de hasta el 20% de la fruta (Anthony *et al*., 2004). Por ello, numerosas investigaciones se han orientado a buscar alternativas, tanto químicas como no químicas, para su control. Aunque los fungicidas postcosecha son aún los métodos de control más eficientes, las alternativas no químicas han cobrado mayor importancia en los últimos años (Lassois *et al*., 2010).

Dentro de las alternativas no químicas de control del *crown rot*, el uso de organismos antagonistas como bacterias, hongos o levaduras es una de las opciones que ha despertado mayor interés en los últimos años (Postmaster *et al*., 1997; De Costa, 1998, 2005; East and Kenyon, 1998; Krauss *et al*., 1998; Gunasinghe *et al*., 2004; Lassois *et al*., 2008; Williamson *et al*., 2008; Alvindia y Natsuaki, 2009), aunque debido a su eficacia limitada y variable, así como a su coste, no se ha implantado en forma comercial (Lassois *et al*., 2008).

También se han ensayado tratamientos físicos, como el uso de agua caliente o de radiaciones. Aunque el uso de agua caliente puede destruir patógenos (Burden, 1968; López-Cabrera y Marrero-Domínguez, 1998) y activar compuestos antimicrobianos de la piel del plátano (De Costa y Erabadupitiya, 2005), si se superan los 50ºC durante 3 minutos la piel se vuelve pálida, y si esta temperatura se mantiene pero el tratamiento se prolonga durante más de 5 minutos, se reducen los grados Brix (De Costa y Erabadupitiya, 2005) y se daña la piel (Win *et al.,* 2007). En cuanto a las radiaciones, aunque para otras frutas tanto la luz ultravioleta como los rayos gamma han mostrado un cierto potencial frente a algunos patógenos, no se plantean como alternativas en el caso del plátano debido a que su piel es demasiado sensible a este tipo de radiaciones (Marriot y Palmer, 1980; Joas, 1997).

En cuanto a productos ensayados como alternativa a los fungicidas químicos tradicionales se encuentran diversos compuestos, conocidos genéricamente como sustancias GRAS (*generally regarded as safe,* consideradas generalmente seguras). Este tipo de compuestos, de nula o muy baja toxicidad, incluye extractos de plantas, ácidos orgánicos, preparaciones de calcio, peróxido de hidrógeno, bicarbonato de sodio y sorbato potásico.

Con el uso de extractos vegetales se puede alcanzar un buen control de patógenos postcosecha. Demerutis *et al.* (2008) lograron un nivel de control de *crown rot* en el plátano similar al obtenido con imazalil, tiabendazol y sulfato de amonio al aplicar extracto de semillas de cítricos junto con una cera como coadyuvante. Por su parte, el extracto de tomillo rojo, el extracto de semillas de cítricos y el aceite de canela también han ejercido control frente a esta enfermedad (Perera, 2004; Win *et al*., 2007; Dorta, 2010; Cartaya *et al*., 2011). El bicarbonato de sodio ha mostrado ser tan eficaz como el uso de tiabendazol o el uso de agua caliente para controlar la podredumbre en postcosecha causada por los hongos *Penicillium digitatum* y *P. italicum* (Fatemi *et al*., 2011).

2.- COMPUESTOS CON OXIGENO ACTIVO: PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y ÁCIDO PERACÉTICO

El peróxido de hidrógeno es un fuerte oxidante, dando lugar a hidrógeno y oxígeno como productos de su reacción con la materia orgánica, los cuales son totalmente inocuos desde el punto de vista toxicológico. Su actividad antimicrobiana está basada en su potente poder oxidante, que le permite reaccionar con grupos sulfhidrilo y dobles enlaces en proteínas y lípidos, afectando por lo tanto a la membrana citoplasmática. Puede además inducir la formación de radicales libres que actúan contra el ADN, lípidos y otros componentes celulares esenciales (Block, 1991). La descomposición del peróxido en productos inocuos para el medio ambiente y las personas es una de las ventajas de la utilización de este producto con respecto al hipoclorito sódico o lejía comercial, el cual genera vapores de cloro y trihalometanos (estos últimos considerados agentes cancerígenos). Por ello, se considera un producto adecuado e idóneo para garantizar la higiene y desinfección de frutas y hortalizas en los procesos de lavado de las centrales hortofrutícolas, eliminando o destruyendo los microorganismos, presente en las superficies (CEBE Agricultura, 2011).

Sin embargo, el uso del peróxido de hidrógeno como agente desinfectante está limitado a algunas frutas y hortalizas. Por ejemplo, no es aconsejable su uso sobre fresas y frambuesas, ni sobre hongos comestibles, debido a que ocasiona pérdida de color (Sapers, 2001).

En cuanto a otras frutas y hortalizas, numerosos trabajos han evaluado la acción del peróxido de hidrógeno en postcosecha, en particular su efecto sobre diversas especies de bacterias. Sapers (2001) demostró que en manzanas inoculadas con *Escherichia coli* y tratadas con peróxido de hidrógeno se obtenían reducciones similares a las obtenidas con 200 ppm de hipoclorito sódico. Asimismo, Ukuku (2004) demostró que en melones inoculados artificialmente y tratados con peróxido de hidrógeno al 5% durante 2 minutos se podían obtener reducciones importantes en la carga de *Salmonella* sp.

También ha sido estudiada su acción sobre el crecimiento miceliar y la germinación de esporas de diversas especies fúngicas, patógenos comunes de la postcosecha de frutas y hortalizas. Aharoni *et al.*(1994) probaron que la combinación de peróxido de hidrógeno al 48% y sales de plata podía inhibir *in vitro* el crecimiento de dos patógenos postcosecha del melón, *Alternaria alternata* y *Fusarium solani* a concentraciones de 5.000 y 10.000 µl, y que en ensayos *in vivo* con 5.000 µl reducía claramente la podredumbre sin producir efectos fitotóxicos. Por ello, lo consideraron una alternativa al imazalil, que aunque era más efectivo, generaba problemas por los residuos que deja sobre la fruta y a concentraciones de 10.000 µl resultaba tóxico. En estudios de postcosecha de berenjena realizados por Fallik *et al.* (1994) se comprobó que con la misma formulación usada por Aharoni *et al.* (1994), al 48% de peróxido y sales de plata al 0,05%, la ED50 para la inhibición de la germinación de esporas *in vitro* de *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* fue 0,09 % y 0,18% respectivamente. La germinación de esporas se inhibió completamente a 0,5% y 0,7% para esas mismas especies. Los valores de la ED50 para la inhibición miceliar fueron de 0,6% y 0,7% para las mismas especies respectivamente. Sin embargo, la inhibición completa sólo se obtuvo con valores de 1,5% y 2,0%. En estos ensayos también se comprobó que el tiempo de exposición estaba en relación inversa a la concentración usada.

La acción del peróxido ha sido muy estudiada sobre especies del genero *Penicillium*, especialmente de *P. expansum*, *P. digitatum* y *P. italicum*. Así, Venturini *et al.* (2002) estudiaron la acción del peróxido sobre *P. expansum* mediante diversas técnicas: difusión en agar, dilución en agar, dilución en caldo y métodos volátiles, y comprobaron que el peróxido de hidrógeno al 5% producía la inhibición total de este patógeno con la técnica de la difusión en agar. También comprobaron que la concentración mínima inhibitoria fue menor del 0,025% con las técnicas de dilución en agar y dilución en caldo.

En estudios realizados sobre el moho verde de los cítricos, grave problema postcosecha de este cultivo, producido por *P. digitatum*, Kanetis *et al.* (2008), evaluaron la eficacia de diversos fungicidas y agentes para prevenir la contaminación del agua del lavado. Estos investigadores comprobaron que la inhibición de la germinación de esporas del patógeno dependía del pH de la solución y del tiempo de exposición. Para el ácido peracético, a pH 7 se necesitaba una concentración de 2.700 mg/l y 240 segundos. También comprobaron que todos los fungicidas ensayados eran compatibles con el acido peracético. Concluyeron que con la recirculación del agua de lavado, la aplicación por el sistema de ducha y la combinación de fungicidas

con agentes como el ácido peracético se obtenían los mejores resultados. En los trabajos de Cerioni *et al.* (2009) sobre *P. italicum*, el moho azul de los cítricos, se evaluó una combinación de tratamientos aplicados de manera secuencial a fin de obtener una mayor efectividad utilizando dosis menores de cada uno de los productos ensayados. Estos autores comprobaron que la combinación de hipoclorito cálcico y peróxido de hidrógeno en presencia de sulfato de cobre producía un efecto sinérgico. La aplicación secuencial de estos productos a las 24 horas de inocular la fruta con conidias producía un retraso en la aparición de la infección, inhibiendo el crecimiento miceliar del hongo en un 90%.

Más recientemente, Kyanko *et al.* (2010) evaluaron *in vitro* tres concentraciones de ácido peracético: 0,05%, 0,1% y 0,3%, frente a *A. alternata*, *F. graminearum*, *Aspergillus ochraceous*, *A. niger*, *A. flavus*, *P. roquefortii* y *P. expansum*. Comprobaron una reducción de la carga de esporas aún a la dosis más baja ensayada, efecto que aumentaba según se incrementaba la dosis. A una concentración del 0,3 % se conseguía una reducción mucho mayor de la carga de esporas de *A. alternata*, *F. graminearum*, y *A. ochraceous*. Según estos resultados los autores consideraron que el ácido peracético podía resultar una alternativa de tratamiento no contaminante para el control postcosecha de la pudrición fúngica. No obstante, Palou *et al.* (2008) consideran que, al menos para el moho azul de los cítricos, ninguno de los tratamientos con agentes oxidantes se está utilizando comercialmente debido a su falta de efectividad o a problemas derivados de su aplicación.

En el caso de la postcosecha de plátanos no se han encontrado trabajos que hayan estudiado el uso del peróxido de hidrógeno. No obstante, los datos expuestos para otras frutas y hortalizas sugieren que este producto podría ser utilizado para la desinfección del agua que se reutiliza en el lavado de la fruta durante su procesado en el empaquetado y así disminuir la carga de inóculo de los agentes causantes de la pudrición de corona. De esta forma se podría establecer una estrategia de control coordinada en la postcosecha que incluiría: a) buen manejo de la fruta; b) reducción de inóculo presente en el agua de lavado reutilizada; c) uso de sustancias naturales como aceites esenciales o extractos vegetales de eficacia contrastada y d) empleo de bolsas perforadas en el envasado, lo que permitiría obtener un control eficaz de la pudrición del plátano, evitando el empleo de sustancias químicas de síntesis.

Se debe tener en cuenta que el peróxido de hidrógeno empleado en los procesos de lavado de frutas y hortalizas debe contar con autorización, según Norma UNE-EN 902:2000, en cumplimiento del R.D. 140/2003, por el que se establece los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, y de la orden SAS-1915-2009, sobre sustancias para el tratamiento del agua destinada a la producción de agua de consumo humano. (CEBE Agricultura, 2011).

Por todo ello, se ha considerado de interés realizar un estudio preliminar de la acción del peróxido de hidrógeno sobre las principales especies fúngicas componentes del complejo de la podredumbre de corona presentes en Canarias.

3.- OBJETIVO

Determinar la acción *in vitro* de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno sobre el **crecimiento lineal radial** y sobre la **germinación de esporas** de especies fúngicas componentes comunes del complejo de la pudrición de corona (*crown rot*) del plátano en Canarias.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- Técnicas y colección de aislados.

La eficacia *in vitro* sobre el crecimiento lineal radial se valoró utilizando dos técnicas;

a) Inmersión de explantes de micelio en patata dextrosa agar (PDA) en tres concentraciones de peróxido (0,5, 1,0 y 1,5%) y posterior siembra en PDA (ensayo 1).
b) Inmersión de masa miceliar obtenida de cultivos en caldo de patata en una concentración de peróxido (1,5%) y posterior siembra en PDA (ensayo 2).

La eficacia *in vitro* sobre la germinación de esporas se valoró preparando suspensiones calibradas de esporas en las tres concentraciones de peróxido y posterior siembra en PDA (ensayo 3).

En el ensayo 1 se trabajó con una colección de 7 aislados fúngicos procedentes de una colección del Dpto. de Protección Vegetal del ICIA, conservada en glicerol a -80 ºC, que había sido obtenida de muestras de corona de plátanos de la zona norte de Tenerife y de aguas de lavado de dicha fruta a partir de aislamientos realizados durante el verano del año 2009. Los siete aislados seleccionados pertenecían a las siguientes especies: *Alternaria alternata, Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium proliferatum, Fusarium oxysporum, Geotrichum* sp. y *Penicillium* sp.

En el ensayo 2 se trabajó con 10 especies fúngicas, añadiendo a las empleadas en el ensayo 1 *Fusarium solani*, *Verticillium theobromae* y *Phoma* sp, mientras que en el ensayo 3 se utilizaron 6 aislados fúngicos: los citados para el ensayo 1, a excepción de *A. alternata*.

En todos los ensayos se prepararon siembras de la colección de hongos en PDA, las cuales se incubaron a 25 ºC durante 7 días. Los sucesivos cultivos también se realizaron en PDA.

Las concentraciones de peróxido ensayadas fueron 0,5%, 1,0% y 1,5% (v/v) que se prepararon utilizando agua destilada estéril. El tiempo de acción fue de 30 segundos para los ensayos de eficacia a partir de explantes de micelio y de masas miceliares, y de 1 minuto para el ensayo de germinación de esporas.

El nombre del producto comercial que se empleó es Fruitcare-pH de la empresa Fomesa Fruitech, S.L. en cuya ficha técnica se indica como utilidad la desinfección del agua que se encuentra en contacto con la fruta en las centrales hortofrutícolas. Su composición es Peróxido de hidrógeno al 50% p/p, su aspecto es incoloro y posee un pH aproximado de 2,5. La dosis recomendada es del 1% v/v en agua y no debe mezclarse con ningún otro producto químico. Este producto esta inscrito como Medio de Defensa Fitosanitario con el nº 292.

4.2.- Ensayos realizados

4.2.1.- Ensayo 1. Eficacia de tres concentraciones de peróxido sobre el crecimiento lineal radial de explantes de micelio.

Las soluciones con cada una de las concentraciones de peróxido se distribuyeron en 7 tubos con 10 ml de la solución. De cada una de las especies fúngicas se tomaron 15 explantes calibrados de 0,5 cm del borde de las colonias, zona de mayor crecimiento activo, en cultivos de 7-10 días y se distribuyeron 5 explantes por tubo de cada una de las concentraciones de peróxido. Por cada aislado fúngico se incluyó un tubo control que contenía 10 ml de agua destilada estéril.

Pasados 30 segundos, los explantes se sacaron de los tubos, se dejaron secar sobre papel de filtro esterilizado y finalmente se depositaron en el centro de placas de Petri con PDA y se incubaron a 25ºC en oscuridad. El ensayo se realizó según un diseño factorial de dos factores: factor 'aislado' (especie), con 7 niveles (especies) y factor 'concentración', con 3 niveles (concentraciones 0,5%, 1,0% y 1,5%). Por cada aislado fúngico y concentración de peróxido se incluyeron tres repeticiones (placas Petri) y tres repeticiones control. Aproximadamente a los 7 días, tiempo en el que las placas control de la mayoría de las especies fúngicas presentó un crecimiento máximo, se midieron los diámetros de las colonias. Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción del crecimiento radial lineal frente al control de cada una de las especies fúngicas.

4.2.2.- Ensayo 2. Eficacia de una concentración de peróxido (1,5% v/v) sobre el crecimiento lineal radial de masas miceliares obtenidas a partir de cultivos líquidos en caldo de patata.

En este ensayo se utilizó sólo la dosis máxima de peróxido: 1,5% (v/v) la cual se distribuyó en placas de Petri de vidrio a razón de 20 ml/placa. El tratamiento control contenía agua destilada estéril.

El inóculo se obtuvo a partir de cultivos de 7 días en PDA, de los cuales se tomaron 5 explantes calibrados de 0,5 cm, que se depositaron en erlenmeyers de 500 ml que contenían caldo de patata glucosado. Los erlenmeyers se incubaron a 25 ºC y en agitación a 120 rpm durante 7 días en oscuridad.

El micelio obtenido a partir de los cultivos líquidos se filtró y escurrió en doble capa de gasa estéril. De cada aislado se tomó una pequeña parte de micelio, que se envolvió en una doble capa de gasa estéril y se sumergió durante 30 segundos en las placas que contenían el peróxido al 1,5%. Pasado este tiempo, se volvió a escurrir y se dejó secar sobre papel de filtro esterilizado.



Foto 1.- Filtrado en doble capa de gasa estéril de los cultivos líquidos de los diez aislados fúngicos.

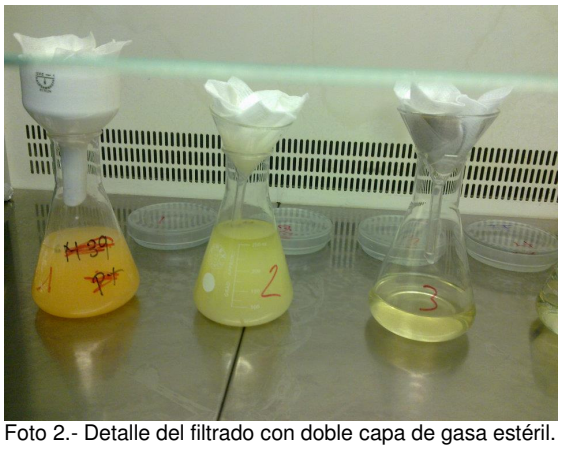


Foto 2.- Detalle del filtrado con doble capa de gasa estéril.



Foto 3.- Vista del proceso de inmersión del micelio en peróxido y posterior secado.



Foto 4.- Detalle del escurrido del micelio y secado de una pequeña porción.

Una vez seco el micelio, se tomaron pequeñas porciones, similares a explantes de 0,5 cm, que se depositaron en las placas de Petri conteniendo PDA. Se incubaron a 25 ºC en oscuridad. Por cada aislado se utilizó una única placa de Petri con 5 puntos de siembra, equivalentes a 5 repeticiones por aislado. Para el control no tratado, se utilizó una placa por cada dos aislados, incluyéndose 3 puntos de siembra (repeticiones) por cada aislado.

Aproximadamente a los 7 días, tiempo en el que las placas control de la mayoría de las especies fúngicas presentó un crecimiento máximo, se valoró cualitativamente si se había producido o no crecimiento radial.

4.2.3.- Ensayo 3. Efecto de tres concentraciones de peróxido de hidrógeno sobre la germinación de esporas de seis especies fúngicas componentes del complejo de la podredumbre de corona (*crown rot*) del plátano.

A cada placa de cultivo de cada una de las especies fúngicas se le añadieron 15-20 ml de agua destilada estéril. Con la ayuda de un asa-bastón se raspó la superficie del cultivo y la suspensión de esporas obtenida

se filtró a través de doble capa de gasa estéril y se recogió en un erlenmeyer. Estas suspensiones se diluyeron para conseguir diluciones de 10^4 esporas/ml, para obtener concentraciones de 10^3 esporas/ml al añadir 1 ml de suspensión a los 9 ml de peróxido de cada una de las concentraciones. Para obtener mayor homogeneidad en la suspensión de esporas se añadió Tween 80 al 0,05 %.

Se utilizaron las dosis 0,5%, 1,0% y 1,5% (v/v) de peróxido, que se prepararon usando agua destilada estéril, teniendo en cuenta el efecto de dilución que se produciría al añadir 1 ml de la suspensión de esporas. El volumen de cada concentración se distribuyó en tubos de ensayo (3 tubos por aislado y concentración), a razón de 9 ml por tubo. El ensayo se realizó según un diseño factorial de 2 factores: 'aislado', con 6 niveles (especies) y 'concentración', con 3 niveles (concentraciones 0,5%, 1,0% y 1,5%). Por cada aislado fúngico se incluyó un tubo control que contenía 10 ml de agua destilada estéril. Se trabajó con 3 repeticiones (placas) por cada aislado fúngico y concentración (3), incluyéndose 3 repeticiones control (placas) por cada aislado fúngico.

La suspensión de esporas se mantuvo en los tubos de peróxido durante aproximadamente 1 minuto, tras lo cual de cada concentración y especie se tomaron 100 µl y se depositaron en el centro de placas de Petri con PDA. Con la ayuda de un asa-bastón las esporas se sembraron por extensión sobre la superficie del medio. Este volumen de siembra permitiría obtener una media de 100 unidades formadoras de colonias (ufc) por especie.

Los cultivos se incubaron a 25ºC en oscuridad y a las 48 y a las 72 horas se contó el número de ufc por repetición. Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción del número de ufc por especie y concentración frente al control no tratado.

4.3.- Tratamiento estadístico

Los datos del porcentaje de reducción del crecimiento radial lineal y del número de ufc con respeto al tratamiento control se estudiaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Todos estos datos son valores porcentuales que tienen una distribución binomial caracterizada por presentar varianzas pequeñas en los extremos y mayores en el centro. Para aproximar esta distribución a una distribución normal, se realizó la transformación arcsen$\sqrt{x}$.

Los datos obtenidos se trataron con hoja de cálculo y gráficos de Microsoft Excel 2003 para Windows y el análisis estadístico se realizó con el programa Statistix 9.0.

5.- RESULTADOS y DISCUSIÓN.

5.1.- Ensayo 1. Eficacia de tres concentraciones de peróxido de hidrógeno sobre el crecimiento lineal radial de explantes de micelio.

En la siguiente tabla se muestran los resultados del ANOVA para el porcentaje de reducción del crecimiento radial con respecto al tratamiento control de los factores especie fúngica, dosis de peróxido y la interacción especie x dosis.

Tabla 1.- Resultados del ANOVA para el porcentaje de reducción del crecimiento radial con respecto al control.

	p
Especie	0,0217*
Dosis	0,7592ns
Especie x Dosis	0,9168ns

Los datos han sido sometidos para su análisis estadístico a una transformación de arcsen $\sqrt{(x)}$.
*, **, *** y ns indican diferencias al 95% ($p < 0,05$, significativamente diferentes), al 99% ($p \leq 0,01$, altamente significativas), al 99,9% ($p \leq 0,001$, extremadamente significativas), y diferencias no significativas ($p \geq 0,05$), respectivamente.

Como se observa en la tabla, se detectaron diferencias significativas para el factor especie, mientras que el factor dosis y la interacción especie por dosis no fueron significativas.

5.1.1.- Factor especie

En el siguiente gráfico se muestran los resultados de los valores medios obtenidos para el porcentaje real de reducción del crecimiento radial frente al control para los distintos aislados.

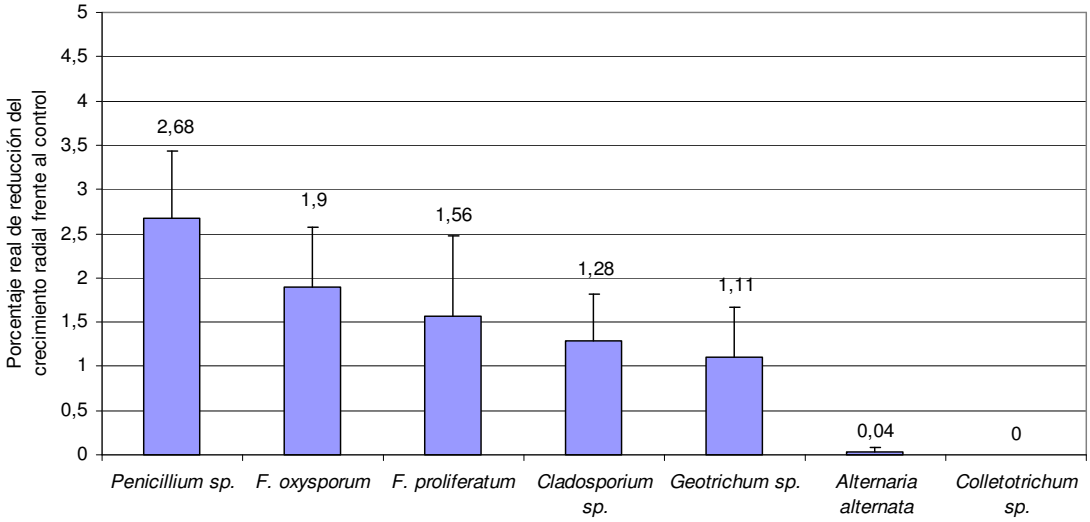


Gráfico 1.- Porcentaje real de reducción del crecimiento radial lineal frente al control para cada uno de los aislados de las siete especies fúngicas evaluadas.

En la siguiente tabla se muestra el análisis estadístico para el porcentaje de reducción del crecimiento radial frente al control para cada uno de los aislados.

Tabla 2.- Análisis estadístico y separación de medias del porcentaje de reducción del crecimiento radial frente al control de los aislados de las siete especies fúngicas estudiadas.

Especie	Porcentaje de reducción del crecimiento radial lineal frente al control
Penicillium sp	7,97±1,8a
F. oxysporum	5,80±1,9ab
Cladosporium sp	4,60±1,64ab
F. proliferatum	4,31±2,0ab
Geotrichum sp	3,51±1,7ab
Alternaria alternata	0,39±0,39b
Colletotrichum sp	0,00b
p	0,0073**

Valores medios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0,05$).
Los datos han sido sometidos para su análisis estadístico a una transformación de arcsen $\sqrt{(x)}$.
*, **, *** y ns indican diferencias al 95% ($p < 0,05$, significativamente diferentes), al 99% ($p \leq 0,01$, altamente significativas), al 99,9% ($p \leq 0,001$, extremadamente significativas), y diferencias no significativas ($p \geq 0,05$), respectivamente.

Según se observa en la tabla 2, en el ANOVA por especies se detectaron diferencias significativas entre *Penicillium* sp. y el grupo de especies formado por *A. alternata* y *Colletotrichum* sp., siendo estas últimas las menos afectadas por los tratamientos. El resto de las especies evaluadas mostró mayor sensibilidad, pero con porcentajes de reducción muy bajos.

Asimismo se observan dos grupos claros de significación; uno formado por *Penicillium* sp., *F. oxysporum*, *Cladosporium sp.*, *F. proliferatum* y *Geotrichum* sp. y otro formado por *F. oxysporum*, *Cladosporium* sp., *F. proliferatum*, *Geotrichum* sp., *Alternaria alternata* y *Colletotrichum* sp. Esto indica que en las condiciones de este ensayo hubo solapamiento en la respuesta: *Penicillium* sp. y las demás especies, presentaron una respuesta significativamente diferente a la de *Colletotrichum* sp., y su complementaria, que *Colletotrichum* sp. y las demás especies presentaron una respuesta significativamente diferente de la de *Penicillium* sp. En términos prácticos estos resultados indican la existencia de sólo dos niveles de susceptibilidad: el de

Colletotrichum sp., con sensibilidad nula, y el de *Penicillium* sp. con una susceptibilidad muy baja, sólo del 7% de reducción del crecimiento lineal frente al control no tratado.

5.1.2.- Factor dosis

En la siguiente tabla se muestra el análisis estadístico del porcentaje de reducción del crecimiento radial frente al control para cada una de las tres dosis de peróxido de hidrógeno.

Tabla 3.- Análisis estadístico y separación de medias del porcentaje de reducción del crecimiento radial frente al control para cada una de las tres dosis.

Dosis	Porcentaje de reducción del crecimiento radial lineal frente al control
1,0%	3,26±1,09a
1,5%	4,42±1,15a
0,5%	3,72±1,18a
p	0,7727ns

Valores medios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0,05$).
Los datos han sido sometidos para su análisis estadístico a una transformación de arcsen $\sqrt{(x)}$.
*, **, *** y ns indican diferencias al 95% ($p < 0,05$, significativamente diferentes), al 99% ($p \leq 0,01$, altamente significativas), al 99,9% ($p \leq 0,001$, extremadamente significativas, y diferencias no significativas ($p \geq 0,05$), respectivamente.

Los resultados que se muestran en la tabla 3 indican que no existen diferencias significativas entre las tres dosis evaluadas (0,5%, 1,0% y 1,5%).

En las siguientes fotografías se presenta el crecimiento lineal radial a los 7 días del tratamiento de dos de los siete aislados fúngicos evaluados. Se observa el escaso porcentaje de reducción del crecimiento de las colonias con las tres dosis de peróxido con respecto al control.



Foto 5.- Crecimiento de la colonia de *Geotrichum* sp. en el tratamiento control.

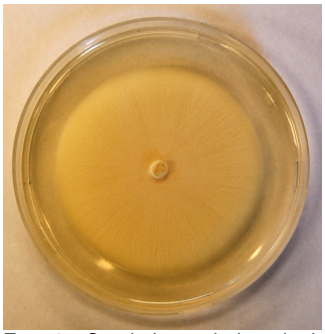


Foto 6.- Crecimiento de la colonia de *Geotrichum* sp. en el tratamiento peróxido al 0,5%.



Foto 7.- Crecimiento de la colonia de *Geotrichum* sp. en el tratamiento peróxido al 1,0%.



Foto 8.- Crecimiento de la colonia de *Geotrichum* sp. en el tratamiento peróxido al 1,5%.



Foto 9.- Crecimiento de la colonia de *Colletotrichum* sp. en el tratamiento control.

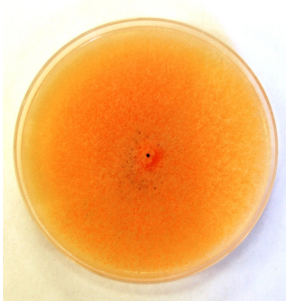


Foto 10.- Crecimiento de la colonia de *Colletotrichum* sp. en el tratamiento peróxido al 0,5%.

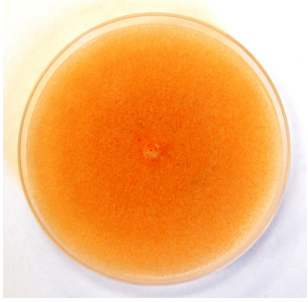


Foto 11.- Crecimiento de la colonia de *Colletotrichum* sp. en el tratamiento peróxido al 1,0%.

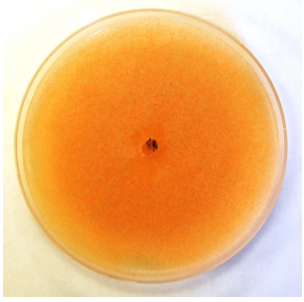


Foto 12.- Crecimiento de la colonia de *Colletotrichum* sp. en el tratamiento peróxido al 1,5%.

La casi nula efectividad del peróxido para reducir el crecimiento miceliar en este ensayo podría explicarse por la técnica utilizada. La aplicación de los tratamientos a explantes de cultivos podría dar lugar a que el peróxido no hubiera podido penetrar en el interior del explante, y en consecuencia no hubiera podido inactivar el micelio que crecía internamente. Por el contrario, las técnicas utilizadas por Venturini *et al*. (2002), difusión y la dilución en agar, implican un contacto directo entre el micelio y el medio que contiene el peróxido, y obtuvieron reducción del crecimiento miceliar de tres especies de *Penicillium: P. expansum*, *P. digitatum* y *P. italicum*. En este sentido, Palou (com. pers.) considera que el peróxido es poco eficaz para micelio ya establecido en lesiones, que sería equivalente al micelio inmerso en los explantes que se probaron en este trabajo. Otra explicación podría ser que la dosis ensayada por Venturini *et al*. (2002) fue del 5%, casi el doble de la más alta utilizada en nuestros ensayos, y que es la recomendada por la empresa comercializadora. Finalmente, el tiempo de acción (30 segundos), podría no haber sido suficiente para que el peróxido hubiera podido penetrar en el interior de los explantes, pues según Aharoni *et al.* (1994) el tiempo de exposición y la dosis están en relación inversa a la eficacia de acción, Los resultados obtenidos hacen necesario repetir los ensayos utilizando otras técnicas y posiblemente también aumentando la dosis y el tiempo de aplicación del peróxido.

Este ensayo se repitió empleando únicamente la dosis más elevada (1,5%), para verificar de manera cualitativa la respuesta de los aislados (especies), obteniéndose crecimiento, en todos los aislados, aparentemente muy similar al obtenido en el ensayo 1(datos no presentados).

5.2.- Ensayo 2. Eficacia de una concentración de peróxido de hidrógeno (1,5% v/v) sobre el crecimiento lineal radial de masas miceliares obtenidas a partir de cultivos líquidos en caldo de patata.

En este ensayo se observó crecimiento de todas las especies evaluadas. Los resultados obtenidos indican que el peróxido al 1,5% con tiempo de aplicación de 30 segundos no inhibe ni parece reducir el crecimiento lineal de las colonias formadas a partir de pequeñas masas de micelio.



Foto 13.- Crecimiento de las porciones de micelio tratadas con peróxido (2 filas superiores) y crecimiento de las porciones de micelio sin tratar (fila inferior).

Estos resultados son similares a los obtenidos para micelio contenido en explantes de medio. Dado que en estos ensayos el micelio sí estuvo en contacto directo (inmersión) durante 30 segundos con peróxido, la explicación a su falta de actividad, (al menos frente a especies de *Penicillium,* en las que Venturini *et al.* (2002) como ya se ha citado sí que obtuvieron reducciones del crecimiento miceliar), podría ser debido a que se necesitarían dosis más altas y tiempos más largos para poder reducir o inhibir dicho crecimiento. Estos resultados, al igual que los anteriores obtenidos por inmersión de explantes en peróxido, hacen necesario realizar nuevos ensayos en los que se prueben otras técnicas, dosis mas altas y tiempos más largos, para poder demostrar si esta ineficacia no está ligada ni a la técnica, ni a las dosis ni al tiempo de actuación, sino que el micelio de los aislados probados presenta una sensibilidad diferente a la de las esporas frente al peróxido, ya que situaciones similares de diferencias de sensibilidad ante un mismo compuesto entre esporas y micelio están documentadas en la bibliografía (Riding, 1970; Plumridge *et al.* 2004; Levinskaité, 2012).

5.3.- Ensayo 3. Efecto de tres concentraciones de peróxido de hidrógeno sobre la germinación de esporas de especies fúngicas componentes del complejo de la pudrición de corona (*crown rot*) del plátano.

En este ensayo se produjo un 100% de reducción del número de ufc con respeto al tratamiento control para todos los aislados fúngicos evaluados y para las tres dosis de peróxido de hidrógeno ensayadas. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Aharoni *et al.* (1994), en los que se observó inhibición *in vitro* de *A. alternata* y *F. solani* empleando peróxido de hidrógeno al 48% a concentraciones de 5.000 y 10.000 µl. Asimismo, Venturini *et al.* (2002) comprobaron que se producía la inhibición total de *P. expansum*.

6.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que en ensayos *in vitro* el peróxido de hidrógeno empleado a las dosis 0,5, 1,0 y 1,5% no redujo el crecimiento miceliar pero sí inhibió la germinación de esporas de las principales especies fúngicas componentes del *crown rot* del plátano. Por ello, se considera una opción válida para el tratamiento del agua que se reutiliza para el lavado de la fruta en los empaquetados. No obstante, para validar estos resultados es imprescindible la realización de ensayos de simulación *in vivo* que demuestren la reducción de inóculo y descarten las posibles fitotoxicidades.

El uso del peróxido para la reducción del inóculo del agua de lavado reutilizada se considera una posibilidad dentro de una estrategia integrada de control de la pudrición de corona, que incluiría además el buen manejo de la fruta, el uso de sustancias naturales como aceites esenciales o extractos vegetales de eficacia contrastada, y el empleo de bolsas perforadas en el envasado.

7.- BIBLIOGRAFÍA

Aharoni, Y.; Copel, A.; Fallik, E. 1994. The use of hydrogen peroxide to control postharvest decay on Galia melons. Annals of Applied Biology 125:189-193.

Alvindia, D.G.; Natsuaki, K.T. 2009. Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. Crop Protection 28:236-242.

Anthony, S.; Abeywickrama, K.; Dayananda, R.; Wijeratnam Shanthi, W.; Arambewela, L. 2004. Fungal pathogens associated with banana fruit in Sri Lanka, and their treatment with essential oils. Mycopathologia 157:91-97.

Block, S.S. 1991. Peroxygen compunds. En: Block SS (ed.) Disinfection, Sterilization and Preservation. 4th ed Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 167-181.

Burden, O. J. 1968. Reduction of banana anthracnose following hot treatment of the green fruit. Queensland Journal of Agricultural and Animal Science 25:135-144.

Cartaya Díaz, N.; Domínguez Palarea, E.; Piedra Buena Díaz, A.; Duque Yanes, M.; Torres Sánchez, J.M.; Oramas González-Moro, J.J.; Pereyra León, J.; Lobo Rodrigo, G.; Hernández Hernández, J.; Perera González, S. 2011. Evaluación de eficacia de productos naturales para el control de la pudrición de corona (*crown rot*) en plátano. Cabildo de Tenerife, 21 p.

CEBE Agricultura. 2011. http:www.cebe.es/agricultura.html [Consultado el 24 de marzo de 2012]

Cerioni, L.; Rapisarda, V.A.; Hilal, M.; Prado, F.E.; Rodríguez-Montelongo, L. 2009. Synergistic antifungal activity of sodium hypochlorite, hydrogen peroxide, and cuprid sulfate against *Penicillium digitatum*. Journal of Food Protection 72:1660-1665.

De Costa, D. M.; Erabadupitiya, H. R. U. T. 2005. An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. Postharvest Biology and Technology 36:31-39.

De Costa, D. M.; Subasinghe, S. S. N. S. 1998. Antagonistic bacteria associated with the fruit skin of banana in controlling its post-harvest diseases. Tropical Science 38:206-212.

Demerutis, C.; Quiros, L.; Martinuz, A.; Alvarado, E.; Williams, R.N.; Ellis, M.A. 2008. Evaluation of an organic treatment for post-harvest control of crown rot of banana. Ecological Engineering 34:324-327.

Dorta, E. 2010. Evaluación de cuatro extractos de plantas, una sal inorgánica y un fungicida para el control de la podredumbre de corona del plátano. Trabajo fin de carrera. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria. Universidad de La Laguna.

East, L.; Kenyon, L. 1998. Development of biological control methods for post-harvest rots of banana. En: Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference: Pests Diseases. B. C. P. Council, Ed. Farnham, Brighton, Reino Unido, pp. 549-554.

Fallik, E., Aharoni, Y., Grinberg, S., Copel, A., Klein, J.D. 1994. Postharvest hydrogen peroxide treatment inhibits decay in eggplant and sweet red pepper. Crop Protection 13: 451-454.

Fatemi; S.; Jafarpour, M.; Borji, H. 2011. Postharvest application of heat treatments and thibendazole, sodium bicarbonate fungicides on decay control and characteristics quality and quantity in the “Valencia” orange. African Journal of Agricultural Research 6:2420-2424.

Gunasinghe, R. N.; Ikiriwatte, C. J.; Karunaratne, A. M. 2004. The use of *Pantoea agglomerans* and *Flavobacterium* sp. to control banana pathogens. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 79:1002-1006.

Joas, J. 1997. Programme qualité de la banane d'exportation. Rapport d'essai sur l'emploi des UV en post récolte. In: Rapport interne. Cirad-Flhor, Fort de France, p. 2.

Kanetis, L., Förster, H., and Adaskaveg, J. E. 2008. Optimizing efficacy of new postharvest fungicides and evaluation of sanitizing agents for managing citrus green mold. Plant Disease 92:261-269.

Krauss, U.; Bidwell, R.; Ince, J. 1998. Isolation and preliminary evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of crown rot of banana. Biological Control 13:111-119.

Krauss, U.; Johanson, A. 2000. Recent advances in the control of crown rot of banana in the Windward Islands. Crop Protection 19:151-160.

Kyanko, M.V.; Russo, M.L.; Fernandez, M.; Pose, G. 2010. Información Tecnológica. Vol. 21(4), 125-130.

Lassois, L.; Jijakli, M. H.; Chillet, M.; de Lapeyre de Bellaire, L. 2010. Crown rot of bananas. Preharvest factors involved in postharvest disease development and integrated control methods. Plant Disease 94:648-658.

Lassois, L.; de Lapeyre de Bellaire, L.; Jijakli, M. H. 2008. Biological control of crown rot of bananas with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain O. Biological Control 45:410-418.

Levinskaitė L. 2012. Susceptibility of food-contaminating Penicillium genus fungi to some preservatives and disinfectants. Annals of Agricultural and Environmental Medicine 19:85-89.

López-Cabrera, J. J; Marrero-Dominguez, A. 1998. Use of hot water dips to control the incidente of banana crown rot. Acta Horticulturae 490:563-569.

Marriott, J.; Palmer, J. K. 1980. Bananas - Physiology and biochemistry of storage and ripening for optimum quality. Critical Reviews of Food Science and Nutrition 13:41-88.

Palou, L.; Smilanick, J.L.; Droby, S. 2008. Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. Stewart Postharvest Review 2:2.

Perera, S. 2004. Evaluación de la eficacia de seis fungicidas sobre la pudrición de corona del plátano. Trabajo fin de carrera. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria. Universidad de La Laguna.

Postmaster, A.; Kuo, J.; Sivasithamparam, K.; Turner, D. W. 1997. Interaction between *Colletotrichum musae* and antagonistic microorganisms on the surface of banana leaf discs. Scientia Horticulturae 71:113-125.

Plumridge, A.; Hesse, S.J.A.; Watson, A.J.; Lowe, K.C.; Stratford, M.; Archer, D.B. 2004. Applied and Environmental Microbiology, June 2004, p. 3506-3511.

Reyes, M. E. Q.; Nishijima, W.; Paull, R. E. 1998. Control of crown rot in 'Santa Catarina Prata' and 'Williams' banana with hot water treatments. Postharvest Biology and Technology 14: 71-75.

Riding, W.H. 1970. *Melanconium fuligineum* and the Bitter Rot Disease of Grape. Phytopathology 60:1203-1211.

Sapers, G.M. 2001. Efficacy of washing and sanitizing methods for desinfection of fresh fruit and vegetable products. Food Technology and Biotechnology 39:305-311.

Ukuku, D.O. 2004. Effect of hydrogen peroxide treatment on microbial quality and appearance of whole and fresh-cut melons contaminated with *Salmonella* spp. International Journal of Food Microbiology 95:137-146.

Venturini, M.E.; Blanco, D.; Oria, R. 2002. In vitro antifungal actrivity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*. Journal of Food Protection 65:834-839.

Williamson, S. M.; Guzmán, M.; Marin, D. H.; Anas, O.; Jin, X.; Sutton, T. B. 2008. Evaluation of *Pseudomonas syringae* strain ESC-11 for biocontrol of crown rot and anthracnose of banana. Biological Control 46:279-286.

Win, N.; Jitareerat, P.; Kanlayanarat, S.; Sangchote, S. 2007. Effects of cinnamon extract, chitosan coating, hot water treatment and their combinations on crown rot disease and quality of banana fruit. Postharvest Biology and Technology 45:333-340.