

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

Departamento de Producción Vegetal



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

PROYECTO FIN DE CARRERA



**CONTROL DE LAS PODREDUMBRES DE PIMIENTO
(*Capsicum annuum* var. California) CON ÁCIDO
PEROXIACÉTICO**

Titulación: Ingeniería Agrónoma

Alumna: Laura Alemán Navarro

Directores: Juan Antonio Martínez López

Fulgencio Wadi Aguilar Tarbay

Cartagena, octubre 2015



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

Departamento de Producción Vegetal.
Paseo Alfonso XII, 48. 30203 Cartagena.
Telfs. 968 325440 – 968 325400. Fax: 968 325435

Juan Antonio Martínez López, Profesor Colaborador de la Universidad Politécnica de Cartagena del Área de Patología Vegetal, del Departamento de Producción Vegetal.

CERTIFICA

Que el presente Proyecto Fin de Carrera, titulado “**CONTROL DE LAS PODREDUMBRES DE PIMIENTO (*Capsicum annuum* var. California) CON ÁCIDO PEROXIACÉTICO**”, presentado por Dña. Laura Alemán Navarro, ha sido realizado bajo mi dirección y la del Dr. Fulgencio Wadi Aguilar Tarbay de la SAT 9821 Grupo CFM.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Cartagena a 9 de octubre del dos mil quince.

Fdo. Juan Antonio Martínez López

Fdo.: Fulgencio Wadi Aguilar Tarbay

Resumen

Para asegurar la calidad e inocuidad de las frutas y hortalizas es necesario minimizar la microbiota natural de los frutos, especialmente los microorganismos patógenos que puedan afectar la salud del consumidor. A su vez, es de gran importancia reducir al máximo el inóculo de patógenos vegetales que puedan afectar a la calidad del producto durante el almacenamiento poscosecha. Para ello, en este trabajo se evalúa el efecto que tiene el ácido peroxiacético o peracético sobre los patógenos aislados de pimiento *Capsicum annuum* L. var. California y sobre el desarrollo de las podredumbres que provocan en este fruto durante su almacenamiento. Se midió el crecimiento de los distintos patógenos bajo la aplicación del ácido a distintas dosis *in vivo* e *in vivo* sobre frutos de pimiento inoculados y tratados con las dosis que mejor habían controlado el crecimiento de los aislados de los distintos hongos *in vitro*. Se observó que la aplicación de 300 y 450 ppm controlaron el crecimiento de los distintos hongos e inhibieron la germinación de sus conidios. La dosis comercial de 300 ppm arrojó mejores resultados sobre el control de podredumbres, por encima de la dosis de 450 ppm.

Palabras clave: *Botrytis*; *Alternaria*; *Cladosporium*; *Penicillium*; ácido peracético; índice de desarrollo de podredumbres; desinfectante

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a Juan Antonio Martínez, mi director de proyecto, su paciencia y disposición, haciendo más fácil el trabajo de todos estos meses.

También agradecer a la empresa S.A.T 9821 Grupo GFM, por ceder el material vegetal y de otros materiales adicionales, sin los cuales, no se podría haber realizado este trabajo. A Fulgencio Wadi por prestarse a colaborar y codirigir este proyecto y al personal de calidad de la empresa por su entera disposición.

Por último, pero no menos importante, a Vicente Díaz por su ayuda y tiempo cuando éste faltaba, y como no, a mis padres.

ÍNDICE

1. Introducción.....	13
1.1 Cultivo del pimiento en la Región de Murcia.....	13
1.1.1 Superficie de cultivo y producción.....	13
1.1.2 Ciclo de cultivo.....	14
1.1.3 Variedades de pimiento cultivadas en la Región.....	14
1.1.4 Técnicas de cultivo.....	17
1.1.4.1 Cultivo en suelo bajo invernadero.....	17
1.1.4.2 Preparación del suelo.....	18
1.1.4.3 Marco de plantación.....	19
1.1.4.4 Riego.....	19
1.1.4.5 Poda y entutorado.....	20
1.1.4.6 Recolección.....	20
1.1.5 Comercialización y exportación.....	21
1.2 Condiciones óptimas de almacenamiento del pimiento.....	22
1.3 Enfermedades y fisiopatías del pimiento durante su almacenamiento.....	23
1.3.1 Fisiopatías y desórdenes físicos.....	23
1.3.2 Enfermedades.....	24
1.3.3 Otros desórdenes comunes en poscosecha.....	32

1.4	Métodos de prevención y control de las podredumbres del pimiento.....	33
1.4.1	Métodos de prevención.....	34
1.4.1.1	Cultivo.....	34
1.4.1.2	Manipulación.....	35
1.4.1.3	Poscosecha.....	35
1.4.2	Procedimientos físicos, químicos y microbiano para reducir las podredumbres.....	36
1.4.2.1	Métodos físicos	36
1.4.2.2	Métodos químicos.....	37
1.4.2.2.1	Desinfectantes.....	37
1.4.2.2.2	Fungicidas.....	39
1.4.2.3	Sustancias naturales de acción fúngica.....	40
1.4.2.4	Control biológico.....	40
1.4.2.5	Potenciadores de las defensas naturales de los frutos.....	41
1.5	Potencial del ácido peracético en el control de las podredumbres.....	42
2.	Materiales y métodos.....	44
2.1	Material vegetal.....	45
2.2	Determinación de las podredumbres del pimiento y agentes causales.....	45
2.3	Efecto del ácido peracético en el desarrollo de los patógenos.....	46
2.3.1	Material experimental y tratamientos.....	46
2.3.2	Unidad de observación y número de repeticiones.....	46
2.3.3	Definición, tipo y clasificación de variables.....	47
2.3.4	Establecimiento de la hipótesis.....	49
2.3.5	Análisis estadístico.....	50

2.3.6	Protocolo de las mediciones.....	51
2.4	Efecto del ácido peracético en el desarrollo de las podredumbres.....	53
2.4.1	Material experimental y tratamientos.....	53
2.4.2	Unidad de observación y número de repeticiones.....	54
2.4.3	Definición, tipo y clasificación de variables.....	55
2.4.4	Establecimiento de la hipótesis.....	56
2.4.5	Análisis estadístico.....	56
2.4.6	Protocolo de las mediciones.....	57
3.	Resultados y discusión.....	60
3.1	Influencia del ácido peracético en el desarrollo de los patógenos.....	61
3.2	Influencia del ácido peracético en el desarrollo de las podredumbres.....	70
4.	Conclusiones.....	80
5.	Bibliografía.....	83

Introducción

1. Introducción.

1.1 Cultivo del pimiento en la Región de Murcia.

El cultivo de pimiento en invernadero en la Región de Murcia experimentó un gran desarrollo en la década de los 80 y principios de los 90 del pasado siglo, tanto en la superficie cultivada, como en los rendimientos unitarios obtenidos. Pero lo más espectacular ha sido el aumento de las producciones, debido a mejoras en las estructuras de los invernaderos, en las técnicas culturales así como en el empleo de variedades más productivas.

1.1.1 Superficie de cultivo y producción,

De las 1.172 ha que se cultivaron de pimiento en la Región de Murcia en 2014, el 88% se encuentra en la comarca del Campo de Cartagena, que comprende los términos municipales de Cartagena, el Mirador, Los Alcázares, San Cayetano, San Pedro del Pinatar, San Javier y Torre Pacheco, seguida en menor medida, por el Valle del Guadalentín y Vega del Segura. Las superficies se muestran en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1 Superficie ocupada por el cultivo del pimiento en las áreas de cultivo de la Región de Murcia (ha). Estadística Agraria Región de Murcia 2014.

Zona de Cultivo	Torre Pacheco	San Javier	San Pedro del Pinatar	Cartagena	Valle del Guadalentín	Vega del Segura
Superficie (ha)	535	357	105	70	11	78

En conjunto, las hortalizas generaron en la Región de Murcia, en 2014, una producción de más de 1.701.556 de toneladas de las cuales 126.529 fueron de pimiento (7,44%), segundo origen de producción a nivel nacional según las estadísticas agrarias de la Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente. Región de Murcia.

1.1.2 Ciclo de cultivo.

Desde su instauración como cultivo protegido en el Campo de Cartagena, el pimiento ha sido monocultivo en la mayor parte de los invernaderos, dado que el ciclo habitual anual mantiene el suelo ocupado durante 8 a 10 meses, dependiendo del tamaño de la explotación y de la orientación comercial, necesitando otros meses para retirar los restos de cultivo y para las labores preparatorias del siguiente.

Según las fechas que el cultivo (Tabla 1.2) permanece en el invernadero, pueden distinguirse en la actualidad, tres tipos de ciclos, evitando solapes con las producciones en los sistemas protegidos de Almería (Martínez et al 2009).

Tabla 1.2. Ciclos de cultivo del pimiento. Trasplante, inicio de la recolección y lugar de cultivo.

Ciclo	Trasplante	Inicio recolección	Lugar de cultivo
Extra- temprano	15 noviembre a 22 diciembre	15 marzo a 15 de abril	Invernadero
Temprano	25 diciembre a 20 enero	20 abril a 15 de mayo	Invernadero
Tardío	25 de enero a 28 de febrero	20 de mayo a 15 de junio	Invernadero
Extratardío	10 de marzo a 10 de mayo	20 junio a 10 julio	Invernadero

1.1.3 Variedades de pimientos cultivados en la Región de Murcia.

El principal tipo de pimiento cultivado en la Región de Murcia, concretamente en el Campo de Cartagena, es en la actualidad el California (cuadrados cortos), cuya utilización ha ido en aumento, pues hasta hace escaso tiempo existía una proporción aproximada del 50% (Gonzalez 2002), con respecto a la producción total, y cuyo resto lo ocupaban los tipos largos y semilargos (tipo Lamuyo), pero actualmente el tipo California es cultivado en el 90% de los casos (Martínez 2005).

Los más utilizados son:

- Tipo California: De sección longitudinal cuadrangular y maduración en rojo y amarillo, entre los primeros, los cultivares empleados han sido Orlando, el más empleado por su precocidad, y junto con él, Habana, Barbadillo y Marqués, y los resistentes al virus del bronceado del tomate (TSWV), como Ribera, Requena, Cornago, Quito o Cabezo que ofrecen mejor comportamiento fitopatológico. Entre los cultivares cuyos frutos maduran en amarillo se encuentran Capino, Fiesta o Tercio y algo menos, Zafra y los resistentes a TSWV como Vélez, Cierva, Limona, etc. El destino principal de esta producción son los mercados del norte de Europa.



Fig. 1.1 Pimiento tipo California. Imagen de www.unicagroup.es

- Tipo Lamuyo: De sección longitudinal rectangular y maduración en rojo y en amarillo. Entre los de maduración en rojo, las plantas son vigorosas, de crecimiento indeterminado y los frutos tienen un tamaño aproximado que resulta ser el doble de largo que de ancho (Nuez et al., 1998). De color verde en estado inmaduro, se tornan rojos en la madurez. Entre los cultivares largos de este tipo, están Mariner, Dallas, Herminio, El Pilar, Lido y los resistentes a TSWV (Galileo, Almudén) para verde y maduración en rojo. Maribel, Spiro y Paraíso son los cultivares empleados para maduración en amarillo, que suponen

alrededor de un 20%. El destino de este tipo semilargo son los mercados italianos, portugueses, sur francés y el mercado interior.



Fig. 1.2 Pimiento tipo Lamuyo. Imagen de TomatedeAlmería.

- Tipo Dulce Italiano: De sección longitudinal triangular, la principal variedad de pimiento cultivada en España es la Dulce Italiano, que es un pimiento verde de maduración en verde, siendo su principal uso para freír. En Murcia, la superficie dedicada a este cultivo es muy reducida y representa una minoría.



Fig. 1.3 Pimiento Dulce Italiano. Imagen www.semillaencasa.es.

- Otros tipos: Los conocidos como especialidades son cada vez más frecuentes, ante la demanda de los mercados europeos. Se trata de variedades con formas, colores y usos diversos: pimiento de Padrón, pimientos blancos, morados anaranjados, cónicos rectos y curvados, mini-California, picantes (guindillas y cayenas), etc. para mercados singulares de consumo en fresco.



Fig 1.4 Distintos tipos de pimientos. Imagen de www.interempresas.net.

1.1.4 Técnicas de cultivo.

1.1.4.1 Cultivo en suelo bajo invernadero.

En la Región de Murcia y en el sur de la provincia de Alicante, el pimiento se cultiva en invernadero mayoritariamente en suelo desnudo, siendo un monocultivo en más del 95% de la superficie (Lacasa y Guirao 1997). En la actualidad, en casi un 6% de la superficie se realizan cultivos en sustratos, como sustitución del suelo, debido a las dificultades en el control de los patógenos del suelo y a los efectos de la reiteración del monocultivo de forma ininterrumpida en el mismo suelo.

Las estructuras de los invernaderos han variado sensiblemente con el tiempo, coexistiendo en la actualidad invernaderos antiguos con invernaderos de alta tecnología. Los invernaderos antiguos son generalmente de pequeñas dimensiones de 1.000 a 2.000 m², de tipo “parral” o “capilla”, de poca altura, soportes de madera de eucalipto o de

tubo de hierro galvanizado por lo que han sido sustituidos. Presentan sistemas deficitarios de ventilación y dificultades para la mecanización de labores.

Los invernaderos actuales son de mayores dimensiones, de tubos de hierro galvanizado con alturas en el borde de 2 a 2,5 m y 4 y 5 m en la cumbre, de tipo capilla, con capillas sencillas o multicapilla. La superficie del invernadero oscila entre 2.500 a 6000 m², para los de capilla simple, y entre 10.000 y 30.000 m² multicapilla. Dotados de zonas de ventilación lateral, y adaptados o construidos con ventilación cenital.

Las cubiertas utilizadas en la actualidad son de plástico tricapa de tres años de duración para aumentar la temperatura y reducir la humedad relativa a la altura de las plantas (Gonzalez *et al.*, 1998) . Los sistemas de calefacción están en desuso por el coste energético que suponen. Los sistemas de ventilación, necesarios para regular las condiciones ambientales, tienen una componente de manejo para evitar las inmigraciones de plagas (mosca blanca, lepidopteros noctuidos o pirálidos) en particular de los insectos transmisores de virosis como los trips o pulgones. Por ello, las mallas en las aperturas de ventilación son de 16x0 hilos/cm² en las laterales y de 10x6 hilos en las cenitales.

La mayor parte de la producción de pimiento en invernadero en la Región de Murcia se obtiene bajo criterios de control integrado de plagas o de producción integrada, habiendo más de 100 ha calificadas como ecológicas.

1.1.4.2 Preparación de suelo.

Terminado el cultivo, se retiran las mangueras de riego, los hilos, las perchas del entutorado y se retiran las plantas. Sin embargo en una parte importante de la superficie los restos de cultivo precedente se entierran utilizando una fresadora. A continuación se extiende el abonado orgánico de fondo y los correctores, se da un paseo o dos de subsolador y se entierra la enmienda orgánica con una labor de fresadora.

La desinfección del suelo es un método relativamente caro y sofisticado de controlar los patógenos. Se emplea, normalmente en cultivos protegidos de gran valor

añadido (Katan 2005) y algunas veces al aire libre. Si la desinfección del suelo se realiza mediante biosolarización, inmediatamente después de haber enterrado las plantas y la enmienda, se cubre el suelo con plástico de polietileno de 160 o 200 galgas, permaneciendo sellado un mínimo de seis semanas durante los meses de verano (Fernández et al 2014).

Hasta los primeros años del siglo XXI, la desinfección química de los suelos era utilizada corrientemente en más del 60% de los invernaderos. La mezcla 1,3-dicloropropeno y cloropicrina se aplicaba después de enterrar la enmienda orgánica, de extender las mangueras de riego y de colocar el plástico de polietileno de 140, 160 o 200 galgas, humedeciendo posteriormente el suelo durante 3-4 horas en dos días consecutivos o alternos. Tras un plazo de seguridad de 21 días se levantaban los plásticos, esperando 10-15 días más antes de plantar. Sin embargo, el 1,3-dicloropropeno ha sido retirado en el 2008 y la cloropicrina en el 2012.

1.1.4.3 Marco de plantación.

Lo tradicional en la comarca del Campo de Cartagena es realizar la plantación en líneas simples con orientación norte-sur, separadas 1 m y con una separación entre plantas de 0,4 m, lo que supone una densidad de 2,5 plantas/m².

1.1.4.4 Riego

Para el establecimiento de la plantación se suele dar un primer riego, llamado de postura, copioso, de varias horas, procurando humedecer una buena zona alrededor de la planta. Para mejorar la eficiencia del humedecimiento, la manguera, de 12 a 16 mm de diámetro, con goteros de 0,4 m, se suele poner en el fondo de un pequeño surco, disponiendo las plantas a la altura de cada emisor, en el borde del surco.

Tras un buen abonado de fondo con el que se cubren las necesidades de nitrógeno de las primeras fases del desarrollo de las plantas, no se suele forzar el cultivo hasta que se forman los primeros frutos y éstos tienen un tamaño aproximado de unos 3 cm de diámetro, evitando de este modo que la planta tire las flores y los frutos recién cuajados.

Al cabo de unos días del trasplante, se le da otro riego, llamado de enjuague, mucho menos copioso que el primero, y a partir de ese momento es cuando se suele forzar a la planta manteniéndola casi un mes sin riego para provocar el crecimiento del sistema radicular. Justo antes de reiniciar los riegos, se suele labrar en las proximidades de las filas de plantas y hacer un surco de nuevo, separado unos 10 cm de la planta en la zona donde se instalará la manguera portagoteros, de forma que, a lo largo del cultivo, el agua del emisor no moje el cuello de las plantas; así se evita el engrosamiento de la base del tallo (pié de elefante) típica de la asfixia de cuello (Tello et al., 1987)

Con el cuajado de los primeros frutos, se inicia la regularización de los riegos a intervalos de tiempo cada vez más cortos. Estos períodos se determinan en base al estado de humectación del suelo, mediante tensiómetros o sondas de neutrones, ya contempladas en los sistemas automatizados de fertirrigación (Rincón et al., 2005).

1.1.4.5 Poda y entutorado.

En los invernaderos del Campo de Cartagena no es una práctica habitual entre los agricultores realizar algún tipo de poda. En ocasiones se eliminan los brotes que salen en las axilas de las hojas situadas por debajo de la cruz.

El entutorado que tradicionalmente se viene realizando es el de tipo vertical u holandés. Consiste en colocar hilos pareados horizontales a distintas alturas, que sujetan las plantas entre ellos y que se tensan mediante hilos transversales colocados cada 3-4 plantas. El primer piso se pone por debajo de la cruz y el resto a 25-30 cm. Dicho entutorado horizontal se apoya en hilos verticales que cuelgan de alambres o del techo, a una distancia de 1,5-2 m. En los extremos de la línea de cultivo suelen haber arquillos metálicos o clavillas a los que se atan los hilos horizontales.

1.1.4.6. Recolección.

La recolección se realiza según el estado y comportamiento del cultivo, dando cortes al principio cada quince o veinte días e intensificándose éstos en las épocas más calurosas. Se realiza de forma cuidadosa, con tijera, cortando por encima del fruto para

dejar un poco de pedúnculo y manipularse con cuidado evitando todo tipo de roces y heridas.

Últimamente, existe una tendencia de recolectar el fruto con la totalidad del pedúnculo, especialmente algunas variedades de tipo California, o cumpliendo los requisitos de los almacenes procesadores o los comerciantes.

Dependiendo de las orientaciones del mercado, se recolectan frutos en verde o rojo y de las variedades de maduración en rojo y en amarillo las variedades de maduración en amarillo. Las especialidades se recolectan en el estado de aceptación comercial de cada variedad.

Según el peso podemos diferenciar cuatro categorías:

- Categoría extra: > 251 g.
- Categoría I: 250-201 g.
- Categoría II: 200-80 g.
- Destrío: 80 g.

Según en tamaño tenemos las siguientes categorías:

- Calibre GG: tamaño 90-100 mm.
- Calibre G: tamaño 70-90 mm.
- Calibre M: 50-70 mm.

1.1.5 Comercialización y exportación.

Los principales mercados de comercialización de pimiento cultivado en la Región son Alemania, Francia e Italia (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente).

Los tres sistemas principales de comercialización que tiene el pimiento son:

- Las Entidades Asociativas Agrarias, calificadas como Organización de Productores que exportan directamente su producto.
- Las subastas a las que acuden agricultores no agrupados vendiendo a exportadores privados.
- Los exportadores privados que suelen ser empresas familiares con sus propios canales de comercialización.

El valor de las exportaciones de pimiento en la Región de Murcia durante el 2013 aumentó un 41% con respecto al año 2012, suponiendo un 15% del total de España (www.magrama.gob.es)

1.2 Condiciones óptimas de almacenamiento del pimiento.

Los frutos de pimiento tienen un ritmo de respiración y de producción de etileno relativamente bajo, son frutos no climatéricos.

Según artículos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente las condiciones óptimas de almacenamiento son las siguientes:

En términos generales una adecuada conservación requiere temperaturas de 7 a 10°C con óptimos de 8 a 9°C. A estas temperaturas, los frutos de pimiento pueden ser mantenidos durante 2-3 semanas, dependiendo de la variedad, estado de madurez al momento de cosecha y tratamiento poscosecha utilizado.

Si los frutos se mantienen a una temperatura superior a los 12°C, puede acelerarse la madurez si se almacenan por más de una semana. Sin embargo para períodos de transporte de 5 días o menos se pueden usar temperaturas de 3 a 5°C, pero si el lapso de tiempo excede los 6 días puede haber daño por enfriamiento.

Los pimientos inmaduros (verdes) son más sensibles que los maduros al daño por enfriamiento. Pimientos completamente rojos se pueden mantener una semana entre 4 a 7°C sin ningún tipo de daño por frío. Los frutos de esta especie son particularmente susceptibles a pérdidas de agua de tal forma que deben ser mantenidos a alta humedad relativa (90-95%).

Los frutos se pueden almacenar en atmósferas controladas, siendo las condiciones más adecuadas una temperatura de 8-12°C, 3 a 5 % de oxígeno y 0% de dióxido de carbono. Sin embargo, el potencial de beneficio de esta tecnología en pimiento es escaso (Reche 2010).

1.3 Enfermedades y fisiopatías del pimiento durante su almacenamiento.

1.3.1 Fisiopatías y desórdenes físicos.

- Rajado del fruto: se produce por aportes irregulares de agua y/o altos niveles de humedad relativa en frutos maduros cuando se hincha el mesocarpio por un exceso de agua y rompe la epidermis. La sensibilidad es variable entre cultivares.
- Moteado: este mal se manifiesta como heridas pecosas que penetran la pared del fruto. Se desconoce la causa. Algunas variedades son más susceptibles que otras.
- Daños por frío. entre los síntomas del daño por frío están el picado en la superficie de la fruta, zonas acuosas, pudrición (especialmente por *Alternaria*) y una coloración anormal de la cavidad interna (Fig. 1.5).



Fig. 1.5. Pimiento con daños por frío. Imagen: J.A. Martínez.

1.3.2 Enfermedades.

- *Botrytis* o Moho Gris. Se trata de una podredumbre habitual en el pimiento. *B. cinerea* es hongo es generalmente considerado como el principal patógeno en pimientos de invernadero. *Botrytis* puede persistir en el suelo o sobre restos vegetales como lo hace también *Sclerotinia*. Bajo condiciones de bajas temperatura y humedad, produce una gran cantidad de esporas asexuales (conidios) que se dispersan por las corrientes de aire. El patógeno puede penetrar frutos jóvenes a través de partes senescentes de la flor, a través de grietas y heridas de crecimiento o a través del extremo del tallo, antes o durante la cosecha. Sin embargo, si los frutos se debilitan por enfriamiento en el campo o durante el almacenamiento, se vuelven susceptibles a la penetración directa y las lesiones se pueden desarrollar en cualquier parte de su superficie (Fig. 1.6). Además de penetrar al fruto lesionado, el hongo puede penetrar directamente la cutícula del fruto inmaduro. En condiciones húmedas, una gran cantidad de conidios, en masa color gris-marrón, a veces acompañado de esclerocios negros, se forman y sirven como inóculo para nuevas infecciones. La mayor parte de podredumbres se producen durante el almacenamiento al propagarse de unos frutos a otros.



Figura 1.6 Pimiento afectado por *Botrytis* sp. Imagen: Laura Alemán.

- Podredumbre por *Alternaria*: este es un patógeno muy común que puede limitar la vida comercial después de la cosecha. El hongo sobrevive con restos vegetales y sus conidios son habituales en el aire. Se trata de un patógeno débil que requiere el tejido lesionado o debilitado para la penetración y el desarrollo. Cuando se forma agua libre sobre la superficie de la maduración del fruto de la lluvia, las esporas germinan. El hongo puede entrar a través de las grietas de crecimiento, lesiones de insectos o daños mecánicos, pero la infección es a menudo iniciada en la cicatriz cáliz. Infecciones incipientes, que pueden aparecer en el margen de la cicatriz del tallo, permanecen en reposo a menos que los frutos sean sometidos a condiciones de debilitamiento, incluyendo quemaduras de sol, daño por frío o sobre-maduración. Los efectos potenciadores de tratamientos de alta temperatura de refrigeración y el almacenamiento prolongado también puede aumentar la susceptibilidad de la fruta. Aunque la temperatura óptima de crecimiento del hongo es 28°C, puede seguir creciendo durante el almacenamiento, gracias a las temperaturas relativamente altas recomendadas para estas frutas sensibles al frío. Las infecciones provocan lesiones en firme, ligeramente hundida y cubierto de densa, verde oliva a las masas negras de conidios (Fig. 1.7).



Fig 1.7 Pimiento afectado por *Alternaria* sp. Imagen: Laura Alemán.

- Podredumbre azul por *Penicillium*: El podrido producido por *Penicillium*, lo producen mayoritariamente las especies *P. cyclopium*, *P. expansum* y *P. italicum*. Ninguna especie de *Penicillium* puede atacar a los frutos si no tiene heridas en su superficie y difícilmente se propagan por contacto, si los frutos no

presentan lesiones en su corteza. Las esporas procedentes del suelo, los envases, el aire, la línea de tratamiento, etc. Estas especies pueden permanecer durante meses sobre la piel y desarrollarse posteriormente, en cuanto entran en contacto con los líquidos liberados por las heridas de la corteza. Una vez asentados en los frutos, sus hifas blanquecinas excretan enzimas capaces de degradar la corteza de los frutos reblandeciendo los tejidos. La contaminación de los frutos, se produce siempre por esporas, que se instalan en las heridas de la piel. Las lesiones sobre el fruto constan de una zona blanda humedecida que se extiende progresivamente. Dicha zona se cubre de un moho blanco, que es la parte vegetativa del hongo y aparecen las esporas de color verde o azuladas características.



Fig. 1.8 Pimiento afectado por *Penicillium* sp. Imagen Laura Alemán.

- Podredumbre por *Cladosporium* sp.: este patógeno se encuentra generalmente en el suelo y son muy comunes en la atmósfera. Sin embargo, la pudrición de tomates y pimientos toma importancia sólo en condiciones de almacenamiento prolongado. Generalmente la podredumbre se debe a *C. herbarum*. *Cladosporium* es un patógeno débil, infectando frutos a través de daños mecánicos o daños por frío. Las lesiones son claramente circulares y con borde definido. En una etapa avanzada y bajo condiciones húmedas, aparece abundante micelio verde oscuro (Fig 1.9).



Fig. 1.9 Pimiento afectado por *Cladosporium* sp. Imagen Laura Alemán.

- Podredumbre por *Rhizopus stolonifer* o *R. oryzae*: se encuentra ampliamente distribuido en el suelo y aunque puede producir esporas sexuales (zigosporas) normalmente se encuentra el estado asexual como esporangios y esporangiosporas. La germinación de las esporas se produce en un ambiente cálido, húmedo y la penetración tiene lugar a través de heridas o tejidos dañados. En el área infectada aparece una pudrición blanda, que a menudo se rompe y libera una gran cantidad de líquido (fig. 1.10). La esporulación se produce en la superficie del fruto infectado y la enfermedad se transmite al fruto adyacente, lo que resulta en una amplia anidación durante el almacenamiento. Sin embargo, la enfermedad se desarrolla lentamente en frutos almacenados a las temperaturas recomendadas.



Fig. 1.10 Pimiento afectado por *Rhizopus stolonifer*. Imagen: J.A. Martínez.

- Podredumbre por *Fusarium* sp: no pocas especies de *Fusarium* puede causar la pudrición de los pimientos. Se encuentran comúnmente en el suelo. Los conidios se dispersan por el viento o el agua, y los frutos que llegan al almacén pueden estar contaminados. Los hongos son patógenos débiles que infectan solamente a frutos heridos o aquellos que han sido debilitados por las temperaturas bajas. Por lo tanto, los frutos almacenados durante un largo periodo de tiempo son susceptibles de dicha infección. La zona afectada tiene un aspecto acuoso y se cubre por un micelio que puede ser blanco, amarillo o rosado, de acuerdo con la especie de *Fusarium*. La podredumbre se extiende por el centro de la fruta y el tejido infectado que aparece de color marrón pálido.



Fig.1.11 Pimiento afectado por *Fusarium* sp. Imagen: Laura Alemán.

- Podredumbre por *Phytophthora* sp.: estas especies son frecuentes en el suelo y pueden sobrevivir en las semillas como esporas o clamidosporas de pared gruesa. La infección tiene lugar en el campo en condiciones cálidas y húmedas, que favorecen la producción de esporangios de paredes delgadas, en el estado asexual dando lugar a numerosas zoosporas que necesitan de agua libre para poder desplazarse y causar la infección del fruto. Son capaces de penetrar tanto en frutos sanos maduros como inmaduros. La infección se limita generalmente a los frutos que crecen en las zonas bajas de la planta, cerca o en contacto con el suelo. En el almacenamiento de frutos se puede contagiar a otros frutos sanos. En pimientos, la infección se origina frecuentemente en el extremo del tallo y se caracteriza por la formación de anillos concéntricos, marrones alrededor del punto de inicio de la enfermedad. En condiciones húmedas, aparece micelio blanquecino, dando lugar a numerosos esporangios que se desarrollan en la superficie de la zona infectada.



Fig. 1.12 Podredumbre por *Phytophthora* sp. Imagen: A.L. Snowdon (1991).

- Antracnosis: Es la enfermedad ocasionada por hongos del género *Colletotrichum*. Además del estado asexual (acérvulos con conidios), algunas de sus especies exhiben el estado sexual. El hongo puede sobrevivir de estación a estación de restos vegetales. La infección se produce durante el clima cálido y húmedo cuando los conidios se dispersan a frutos inmaduros por la lluvia impulsada por el viento, y germinan formando apresorios que se adhieren a la cera o la cutícula de los frutos. Los haustorios que forman a partir de los apresorios se instalan en las células superficiales y el hongo permanece en reposo hasta que la fruta madura. La infección de reposo de los pimientos se asocia con la producción de fitoalexinas en el tejido joven infectado. La antracnosis es principalmente una enfermedad de los frutos maduros y, por tanto, se convierte en un problema principalmente en tomates y pimientos cultivados para la industria conservera. Con el progreso de la enfermedad, las lesiones se vuelven oscuras, que se caracterizan por masas de color salmón de conidios en el centro. En algunos casos también se forman esclerocios negros.



Fig. 1.13 Pimiento afectado por antracnosis. Imagen: www.agromatica.es.

- Podredumbre por *Stemphylium botryosum*: podemos encontrar el estado asexual y el estado sexual. La infección se produce en condiciones de humedad, iniciándose en grietas de crecimiento, el borde de la cicatriz del tallo o en cualquier lesión en la superficie del fruto. Las lesiones son similares a las producidas por *A. alternata*, pero *Stemphylium* es mucho menos común. Cuando el hongo exhibe el estado sexual, el desarrollo de peritecios sirve para distinguirlos a simple vista.



Fig. 1.14 Pedúnculo de pimiento afectado por *Stemphyllum* sp. (el micelio verde corresponde a *Cladosporium*). Imagen: Laura Alemán.

- Pudredumbre blanda bacteriana. Hay varias bacterias que atacan tejidos dañados que pueden causar zonas de pudrición blanda. Las pudriciones blandas también pueden encontrarse comúnmente en pimientos lavados o enfriados con agua, cuando el agua utilizada no ha sido tratada.

Erwinia carotovora spp. *carotovora*: produce podredumbre blanda y es muy común en el cultivo del pimiento. Se encuentran en el suelo y en los restos de plantas. Se propagan por salpicaduras de tierra contaminada, por el viento, los insectos y por lavado poscosecha. Requiere de humedad y altas temperaturas para iniciar la infección, a través de heridas en la piel, el tallo cortado o cualquier lesión que se incurra por cosecha y embalaje. El crecimiento y la multiplicación se ve favorecida en condiciones de humedad y temperaturas de 24 - 30°C. Bajo estas condiciones, los frutos pueden pudrirse en unos pocos días. El tejido infectado aparece blando y húmedo, avanzada la enfermedad libera un líquido infeccioso.



Fig. 1.15. Podredumbre blanda bacteriana en pimiento. Imagen: J.A. Martínez.

1.3.3 Otros defectos comunes en poscosecha.

El daño mecánico (el aplastamiento, perforaciones causadas por ramillas, grietas, etc.) es muy común en el pimiento; el daño físico no sólo afecta la calidad visual de los pimientos sino que también lleva a una mayor pérdida de peso y pudriciones.

1.4 Métodos de prevención y control de podredumbres.

Para el control de las enfermedades se pueden utilizar bien compuestos letales sobre patógenos (fungicidas y bactericidas) o compuestos que retardan o inhiben su crecimiento (fungistáticos y bacteriostáticos). Por otra parte, los tratamientos se pueden hacer previamente al cosechado o ya en poscosecha como parte de los tratamientos de lavado, confección y conservación.

Para controlar los patógenos de herida, los tratamientos en el campo son generalmente menos efectivos que los tratamientos poscosecha. Sin embargo, los tratamientos precosecha son un buen medio de control cuando se producen daños considerables durante la recogida y los tratamientos poscosecha no se pueden realizar pronto.

Los tratamientos con fungicidas sintéticos se caracterizan por ser, en general, de persistencia elevada y ejercer en mayor o menor medida una acción preventiva que protege al fruto de futuras infecciones. Aunque su efectividad es elevada, dependiendo de la dosis y el modo de aplicación. Este factor, junto a su facilidad de aplicación y su precio razonable, han contribuido a perpetuar el uso de estos productos químicos desde su introducción inicial hacia la década de los años 1950. A pesar de sus ventajas, la utilización masiva, continuada y en ocasiones poco controlada de los fungicidas sintéticos ha generado graves problemas como son la aparición de cepas de los patógenos resistentes a los fungicidas, el incremento de la producción de residuos químicos y el aumento de la incidencia de ciertas enfermedades no controladas por estos productos.

En este sentido, se ha investigado nuevos sistemas de control de las podredumbres en poscosecha basados en procedimientos físicos, medidas de prevención en campo y almacén, métodos biológicos y métodos químicos basados en sustancias naturales o inocuas con el fin de reducir la presencia de residuos en los frutos, la liberación de residuos al medio ambiente, la proliferación de aislados patógenos resistentes y ampliar el abanico de comercialización de los productos en los sistemas de Producción Integrada, Residuo Cero o Producción Ecológica (Palou, 2007).

1.4.1 Métodos de prevención.

La calidad global de los frutos viene predeterminada por muchos factores, tales como el estándar morfológico y comercial de la variedad, su poder nutritivo, valor dietético, apreciación sensorial, estado fitosanitario, condiciones higiénico-sanitarias, etc. Sin embargo, es necesario seleccionar y aplicar una metodología para mantener, en la medida de lo posible, esa calidad alcanzada en el momento de la cosecha a lo largo de toda la comercialización del producto. Las pérdidas por podredumbres constituyen el mayor problema de la comercialización cuando los frutos se almacenan en condiciones adecuadas, por lo que los métodos de prevención y control deben de comenzar desde el principio de la producción hasta el consumo.

1.4.1.1. Cultivo.

La influencia medioambiental (clima y suelo) sobre el rendimiento y la calidad del fruto, y más concretamente sobre su comportamiento después de cosechada, está comprobada en muchos casos. El fruto de un mismo cultivo producido bajo climas distintos puede reaccionar de forma diferente ante las temperaturas de frigoconservación. La distinta composición de los lípidos de la membrana parece marcar la diferencia entre unas y otras.

La mejora varietal puede estar dirigida a conseguir cultivos más resistentes a las patologías y fisiopatías que afectan al fruto después de cosechada. Los mecanismos de tolerancia y resistencia a estas alteraciones son de origen genético y pueden reforzarse por medio de las técnicas tradicionales de cruzamiento-selección o por las más modernas de la ingeniería genética.

En cuanto a las técnicas de cultivo, el abonado y el aporte consiguiente de elementos minerales a disposición de la planta pueden influir sobre la resistencia o la susceptibilidad del fruto a determinadas alteraciones después de cosechada. El calcio aumenta la resistencia frente a un buen número de daños, sobre todo de origen fisiológico.

Por otro lado, un exceso de nitrógeno hace al fruto más susceptible a los ataques por microorganismos y, al mismo tiempo, incrementa el metabolismo respiratorio, anticipando así los fenómenos de senescencia.

Un exceso de riego vuelve las cutículas más susceptibles a una serie de lesiones o microheridas en los frutos que pueden aparecer después de cosechados. Estas alteraciones se convierten con frecuencia en vías de acceso a patógenos que pueden terminar de arruinar la calidad y presencia del fruto. Cuando el agua de riego moja la base del tallo se facilitan las pudriciones de almacén de origen fúngico.

1.4.1.2. Manipulación.

Las medidas previas a la entrada en cámara de la fruta son todas aquellas que tiendan a evitar heridas y contaminación del fruto, antes, durante y después de la recolección, lo que se suele denominar como daños mecánicos. En este sentido, deben extremarse las medidas de higiene y limpieza en las operaciones manuales, los útiles, los embalajes y las máquinas de recolección, clasificación y transporte de la fruta.

1.4.1.3. Poscosecha.

El elevado contenido acuoso de los frutos recién cosechados los hace altamente vulnerables a los ataques por microorganismos. Sus consecuencias pueden ir desde un deterioro aceptable y una pérdida de valor comercial asumible, hasta perjuicios irreparables que inutilizan el producto para su consumo.

Los daños producidos en los frutos después de cosechada pueden ser de varios tipos:

- a) Enfermedades infecciosas producidas principalmente por hongos de pequeño tamaño (micromicetos).
- b) Fisiopatías.
- c) Procesos naturales de senescencia.

Las causas inmediatas o lejanas de que se presenten estos procesos tienden hoy a ser vistas bajo una perspectiva global e interrelacionada, donde se estudian desde la influencia del medio (suelo y clima) y de la variedad cultivada, hasta las técnicas de cultivo (labores, abonado, riego, podas...), tratamientos contra plagas y enfermedades, estado de la fruta en el momento de su recogida, forma de llevar a cabo la cosecha, posibles daños físicos por una mala manipulación durante y después de cosechada, el estado y características de las cámaras y los transportes, así como los regímenes de frío a que se someten en esta fase final previa a su puesta en los mercados.

El estudio de las interacciones de estas variables y sus efectos sobre el resultado de la cosecha permiten actuar de forma coordinada, mediante la planificación como un todo en el proceso productivo. Este tipo de estrategia acude a los recursos naturales de los que son depositarias las plantas y la naturaleza, y los combina equilibradamente con las tecnologías, reduciendo al mínimo (compatible con el fin económico de la producción) los tratamientos con productos químicos. Se conoce como "estrategia de producción integrada" (PI).

1.4.2. Aplicación de procedimientos físicos, químicos y microbianos para reducir las podredumbres.

El control directo contra los hongos de la post-recolección se puede realizar mediante lucha física, química (sustancias con acción fungicida o fungistática) o biológica.

1.4.2.1. Métodos físicos.

La lucha física se refiere a la adecuación de tratamientos térmicos u otros tratamientos físicos con el fin de reducir o impedir el desarrollo fúngico.

Dentro de la lucha física destacan los tratamientos por calor (agua caliente) que no suelen realizarse en pimiento debido a la baja tolerancia a las altas temperaturas que deprecian su calidad organoléptica, irradiaciones (radiaciones ionizantes y luz ultravioleta) y otros tratamientos físicos complementarios a la conservación frigorífica, como son las atmósferas controladas (convencionales, hipobáricas y ozonizadas) y las atmósferas modificadas.

La conservación por frío disminuye la transpiración, retrasa la germinación de esporas y el crecimiento de hongos, y ralentiza los cambios bioquímicos que conducen a la senescencia. Todo ello contribuye a una reducción de las pérdidas poscosecha y a una mejora de la presentación y la calidad intrínseca de la fruta. La dilatación de los periodos de conservación poscosecha convierte a la frigoconservación en una actividad económica que permite diferir la oferta y concentrarla en los momentos más favorables.

Otros sistemas físicos complementarios a la conservación frigorífica es la utilización de las atmósferas controladas convencionales, hipobáricas y ozonizadas. El

almacenamiento en estas condiciones no ejerce por sí mismo una actividad fungicida, pero sí una acción fungistática de retraso del crecimiento de los patógenos. Por otro lado, el frío ralentiza la actividad metabólica del fruto y retrasa su entrada en senescencia, ayudando así a mantener la resistencia natural del fruto a la infección.

Las atmósferas controladas hipobáricas o de baja presión (75-175 mm Hg) no ofrecen ventajas sustanciales respecto a las atmósferas controladas convencionales (Spalding y Reeder, 1976). Esta es una tecnología especialmente adecuada para alargar la vida útil de productos hortofrutícolas cortados en fresco, pero presenta el inconveniente principal del coste elevadísimo que supone su utilización y uso.

1.4.2.2 Métodos químicos.

1.4.2.2.3 Desinfectantes.

La contaminación superficial de las frutas y hortalizas varía en número y tipo, dependiendo del fruto y del manejo previo y posterior a la cosecha que haya recibido. Muchos de estos microorganismos están asociados a partículas de tierra u otro tipo de suciedad adherida en la superficie del fruto, en cuyo caso la eliminación es relativamente sencilla. Sin embargo existe microbiota asociada cuya eliminación es difícil ya que se encuentran formando biopelículas superficiales o están ocupando lugares poco accesibles como lenticelas o heridas.

Para asegurar la calidad e inocuidad de las frutas y hortalizas es necesario minimizar la contaminación de los frutos con microorganismos patógenos que puedan afectar la salud del consumidor. A su vez, es de gran importancia, reducir al máximo el inóculo de patógenos vegetales que puedan afectar a la calidad del producto durante el almacenamiento poscosecha.

La aplicación de productos desinfectantes se realiza en solución acuosa por inmersión o aspersion. El alcance del tratamiento depende del compuesto desinfectante y de los microorganismos que se quiera eliminar. Su eficacia varía con la concentración del agente, y en mayor o menor medida con la temperatura, el pH, el tiempo de contacto y el contenido de materia orgánica.

Dentro de los agentes desinfectantes utilizados para tratar frutas y hortalizas se encuentran, compuestos halogenados, ácidos, amonio y compuestos de oxígeno activo.

Compuestos clorados.

Los compuestos clorados son el cloro, sales de hipoclorito y dióxido de cloro. El cloro es el desinfectante más utilizado en la industria alimentaria en la desinfección de superficies de contacto y en la reducción de la carga microbiana del agua utilizada en diferentes operaciones. El modo de acción se basa en su capacidad oxidante. Es altamente reactivo en presencia de materia orgánica. Su capacidad antimicrobiana depende del ácido hipocloroso (subproducto de reacción). Normalmente se utiliza en concentraciones entre 50 y 200 ppm durante 1 o 2 min.

Otros desinfectantes son los ácidos orgánicos, muy utilizados para prevenir el desarrollo microbiano en alimentos. Su eficacia se basa en lograr un bajo pH que impide la proliferación de microorganismos no deseados. En alimentos puede tener efectos negativos sobre el aroma y el sabor de los frutos tratados (Sapers 2001).

Compuestos de oxígeno activo.

Peróxido de hidrógeno y ácido peracético (ác. peroxiacético): los productos de reacción del peróxido de hidrógeno son el oxígeno y el agua, los cuales son inocuos, mientras que los subproductos de reacción del ácido peracético son el oxígeno y el ácido acético (Kramer 1997). En ambos casos la actividad microbiana está basada en el poder oxidante, de esta forma reacciona con los grupos sulfhídrico y dobles enlaces de proteínas y lípidos y, por lo tanto, afecta a la membrana citoplasmática.

La utilización del peróxido de hidrógeno está limitada en algunas frutas y hortalizas, es el caso de la aplicación en el tratamiento desinfectante de fresas y frambuesas, debido al blanqueamiento de los pigmentos.

Ozono: Es un gas a temperatura ambiente, con una elevada capacidad oxidativa, superior al del hipoclorito sódico y el dióxido de cloro. Es muy poco soluble en agua, siendo insoluble por encima de 10 µg/mL. Se descompone en oxígeno sin dejar otro tipo de residuo (Smilanick et al., 1999). Hay estudios que demuestran que su utilización no sólo era eficaz contra *Rhizopus stolonifer*, sino que además en los frutos de uva de mesa tratados induce la formación de fitoalexinas (Sarig, 1996).

1.4.2.2.4 Fungicidas.

El cultivo del pimiento en la Región de Murcia se rige por las normas técnicas de producción integrada publicadas por la Consejería de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Estas se van modificando cada cierto tiempo, exponiendo las materias activas permitidas.

Se entiende por producción integrada “los sistemas agrícolas de obtención de vegetales que utilizan al máximo los recursos y los mecanismos de producción naturales y aseguran a largo plazo una agricultura sostenible, introduciendo en ella métodos biológicos y químicos de control, y otras técnicas que compatibilicen las exigencias de la sociedad, la protección del medio ambiente y la productividad agrícola, así como las operaciones realizadas para la manipulación, envasado, transformación y etiquetado de productos vegetales acogidos al sistema” (Magrama).

El objetivo por tanto es minimizar el uso de fungicidas y productos químicos, permitiendo una serie de materias activas cuando no sea viable otro método de control.

Estas materias son las siguientes según la última actualización (Boletín Oficial de la Región de Murcia Orden 5 de mayo del 2015 por la que se modifica la orden 4 de agosto del 2014, de la Consejería de Agricultura y Agua por la que se regulan las normas técnicas de producción integrada del cultivo de pimiento en invernadero):

- *Botrytis*: iprodiona, ciprodinil+fludioxinil, pirimetanil, clortalonil, fenhexamida, fenpirazamina, boscalida + piraclostrobin , *Bacillus subtilis* y fenhexamida+tebuconazol.
- *Sclerotinia*: ciprodinil+fludioxinil, boscalida + piraclostrobin, tebuconazol, *Trichoderma*, *Bacillus subtilis*, fenhexamida+tebuconazo, metil-tolclofos, fenpirazamina.
- *Phytphtora* y otros hongos del suelo: etridiazol ,metalaxil-M ,propamocarb, propamocarb+fosetail-Al , *Trichoderma* spp
- Oidio: azufre, azoxistrobin, bupirimato, ciproconazol, flutriafol, miclobutanil, triadimenol, kresoxidin metil, ampelomices quisqualis,

tebuconazol, boscalida + piraclostrobin, penconazol, trifloxistrobin, azoxistrobin+difenoconazol, metrafenona y ciflufenamida.

- Bacteriosis: compuestos cúpricos.

No se debe utilizar más de dos veces consecutivas la misma materia activa o de la misma familia química (a excepción del azufre)

1.4.2.3. Sustancias naturales de acción fungicida.

Los aceites esenciales son un grupo de sustancias naturales que se están probando en experimentos científicos planeados desde la década de 1940 y están ofreciendo resultados prometedores para que puedan ser utilizados en el futuro en el marco de una Producción Integrada. Estos aceites son compuestos, de tipo lipofílico, altamente volátiles y con fuertes propiedades aromáticas que son sintetizados y almacenados en determinados compartimentos de estructuras celulares. Presentan un importante papel en la protección de las plantas, ya que tienen propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas e insecticidas. Los aceites de clavo y tomillo inhibieron totalmente el crecimiento de *P. expansum* (Yahyazadeh *et al* 2008)

1.4.2.4. Control biológico.

El empleo de agentes microbianos antagonistas (bacterias y hongos) es una prometedora alternativa al uso de los fungicidas. Este tipo de control pretende reducir el inóculo fúngico depositado en los frutos mediante la actividad biológica (por competencia, producción de antibióticos o lisis enzimática e inducción de defensas) desarrollada por el agente antagonista en las inmediaciones del hongo patógeno. Las ventajas del uso de antagonistas sobre otros métodos y sustancias de control se basan en que son (Tuset, 1999):

- Más seguros (en el sentido de fiabilidad) al no acumularse en los alimentos.
- Más persistentes que los fungicidas.
- Más suaves en la rotura del balance ecológico, al no incidir en los enemigos naturales.
- Comparables en eficiencia con los fungicidas.

Los antagonistas han sido empleados en pequeños ensayos semi-comerciales con resultados positivos en el control de *Penicillium* sp., diferentes especies bacterianas de los géneros *Pseudomonas* (*P. cepacia*, *P. fluorescens* y *P. syringae*) y *Bacillus* (*B. subtilis*) y de las levaduras *Pichia guilliermondii* y *Candida oleophila* (Aspire), entre otras. También, *C. oleophila*, en almacenes en plena campaña.

Es conveniente saber que un microorganismo que va a ser empleado como antagonista en poscosecha, debe tener como mínimo las siguientes características (Tuset, 1999):

- Ser genéticamente estable.
- Efectivo a bajas concentraciones y contra un amplio número de patógenos.
- No ser perjudicial para el ser humano, ni sus metabolitos.
- Compatible con los procesos comerciales (encerado, espumado, etc.).
- No patógeno de los frutos.

1.4.2.5. Potenciación de las defensas naturales de los frutos.

En general, las plantas se defienden de los patógenos por la combinación de dos tipos de defensa: una defensa estructural, que actúa como barrera física e inhibe la entrada y proliferación del patógeno, y una defensa bioquímica, que produce sustancias que son directamente tóxicas para el patógeno o crean condiciones para inhibir su crecimiento.

La actuación conjunta de los mecanismos de respuesta de las plantas a patógenos requiere de una precisa regulación mediada por la presencia de diferentes moléculas señalizadoras de las plantas. El ácido jasmónico y el ácido abscísico son compuestos reguladores de las plantas que participan en numerosas respuestas de defensa.

El ácido salicílico (SA) (ácido 2-hidroxibenzoico) es un regulador del crecimiento natural que tiene un papel importante en la activación de respuestas de la planta frente al ataque de patógenos. Los mecanismos por los cuales el SA actúa en las plantas son variados y pueden suponer alteraciones en la síntesis y actividad de algunas enzimas, aumento en la expresión de genes de defensa, potenciación de varias respuestas de defensa y/o generación de radicales libres. Mediante el empleo de plantas

mutantes ha sido posible el aislamiento de genes implicados en las rutas de defensa mediadas por SA (Dempsey et al., 1999).

1.5 Potencial del ácido peracético en el control de las podredumbres.

El ácido peracético es un fuerte agente oxidante. Comercialmente se consigue como una mezcla de ácido peracético, ácido acético y peróxido de hidrogeno. Los productos de reacción con materia orgánica son ácido acético y oxígeno, los cuales no son tóxicos. Su actividad depende del pH, siendo más activo a pH más bajos (Baldry 1983). Sin embargo, su actividad se mantiene en un amplio rango de pH, disminuyendo de forma importante por encima de 9. Su acción antimicrobiana se basa en su capacidad oxidante. Oxida los grupos sulfhidrilo en proteínas, enzimas, y otros metabolitos. De esta forma se pierde la funcionalidad de muchas de estas macromoléculas, lo cual trae como consecuencia la ruptura celular por pérdida de funcionalidad de la membrana citoplasmática.

El ácido peracético es un desinfectante efectivo con un amplio espectro de actividad antimicrobiana. Debido a su efectividad como bactericida (Falsanisi et al., 2006), viricida (Rutala et al., 1999) y fungicida (Baldry et al., 1989), es cada vez más común su utilización en diversas industrias.

Rodgers y colaboradores (2004) determinaron la eficacia *in vitro* de ácido peracético (80 ppm) sobre *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*. En las condiciones del ensayo, ambos patógenos fueron disminuidos en aproximadamente 5 órdenes. La microbiota de las naranjas se redujo un 85% después del cepillado en agua seguido con un baño de 15 segundos en ácido peracético 200 ppm. También hay ensayos que demuestran la eficacia del ácido peracético en la desinfección de suelos freseros de la zona de Huelva contra *Phytophthora* y *Botrytis* (Cuervo et al., 2014). Aislados de *Botrytis cinérea* y *Alternaria* de uva de mesa Red Globe fueron sometidos a 25 antimicrobianos de los cuales el ácido peracético fue el más efectivo contra *Botrytis* y en menor medida frente a *Alternaria* (Jin-quiang et al 2004). El tratamiento higienizante en brócoli Bimi con peracético en combinación con UV antes del envasado también dio resultados satisfactorios (Martinez-Hernández et al., 2011). Frente a *Penicillium expansum* y *Mucor piriformis* aislados de peras se ha podido constatar también el efecto fungicida del peracético (Mari et al 2003). La inhibición de la

germinación de conidios de *Monilinia laxa* se consiguió con una concentración de 500g/ml de ácido peracético y 5 min de contacto con los conidios (Mari et al. 1999). Su utilización se extiende a la industria de IV Gama, tratando hortalizas (pimiento, pepino y tomate) para ensalada. Estos estudios demuestran que además de una buena desinfección, la conservación de las características organolépticas es óptima (Álvaro 2009).

Algunas de las ventajas de la utilización de ác. peracético como desinfectante son: la fácil aplicación, el bajo coste económico, es capaz de actuar en presencia de materia orgánica (Rossi et al., 2007), también tiene baja dependencia del pH, breve periodo de aplicación, además de ser respetuoso con el medio ambiente ya que no genera subproductos de descomposición tóxicos(Kyanco et al 2010) .

A pesar de su baja persistencia y toxicidad en el medio ambiente, no se encuentra dentro de los aditivos alimentarios y las sustancias catalogadas como “Generally Recognized as Safe” (GRAS) en América, aunque sí se aparece en el “Codex Alimentarius” de la UE como compuestos permitidos sin restricciones por las distintas legislaciones para muchas y variadas aplicaciones en el campo agroalimentario.

Material y métodos

2. Materiales y métodos.

2.1 Material vegetal.

Para el ensayo se han utilizado pimientos rojos de la variedad California cosechados el 16 de noviembre del 2014, cedidos por la empresa SAT 9821 Grupo CFM, de sus invernaderos propios en la localidad de Balsapintada, ctra. Fuente Álamo km 6. Los pimientos fueron entregados recién recolectados sin pasar por ningún tratamiento de limpieza ni desinfección y transportados en vehículo propio desde la empresa hasta el laboratorio de la Universidad.

2.2 Determinación de las podredumbres del pimiento y agentes causales.

Para la determinación de podredumbres, almacenamos los pimientos en cámara húmeda. La cámara húmeda se compone de una bandeja donde se depositan los pimientos en grupos de 5 o 6 y un recipiente con agua, todo ello dentro de una bolsa de plástico abierta a temperatura ambiente (22-25°C) y una HR cercana al 100%. Lo que se consigue con este método es una elevada humedad que favorece la germinación y por lo tanto acelerar el proceso natural de podredumbre del fruto.

Una vez que empezaron a aparecer los primeros signos de colonización, aislamos micelio en una placa Petri con medio de cultivo sintético de agar de patata y dextrosa (PDA. Scdharlab®. Barcelona) y lo dejamos en la incubadora a 26-28°C durante 5-7 días hasta el desarrollo completo del micelio. Seguidamente se purificaron los aislados para separarlos de levaduras u otros posibles hongos asociados. El proceso se realizó de forma aséptica obteniendo una pequeña porción cuadrada (1 cm² aproximadamente) del margen de la colonia del micelio desarrollado y colocándolo sobre otra placa de PDA.

Con el micelio desarrollado ya pudimos determinar al microscopio el tipo de hongo del que se trataba. Encontramos *Botrytis*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Alternaria*, típicos agentes causales descritos en pimiento (Barkai-Golan 2001).

2.3 Efecto del ácido peracético en el desarrollo de los patógenos.

2.3.1 Material experimental y tratamientos.

Para la determinación del efecto del ácido peracético o peroxiacético en los patógenos, realizamos dos ensayos; uno basado en el desarrollo del micelio y otro en su influencia sobre la germinación de conidios.

El ácido peracético fue suministrado por la empresa Grupo CFM, en las distintas concentraciones. El porcentaje del ácido peracético del producto utilizado es del 5%, pero como se descompone en equilibrio químico en ácido acético y peróxido de hidrógeno, los porcentajes del producto utilizado son: ác. peracético (5%), ác. acético (8%) y peróxido de hidrógeno (25%).

Hemos probado las siguientes concentraciones para la prueba *in vitro*:

- **Testigo**: contiene medio de cultivo PDA en placa Petri sin ningún inhibidor (0 ppm).
- **T1**: medio de cultivo PDA en placa Petri y 0.8 mL de ác. peracético a distintas concentraciones 150, 300 y 450 ppm.

Se escogió la dosis comercial de 300 ppm de producto por ser la dosis utilizada por la empresa.

A lo largo del escrito se encontrará el nombre del ácido peracético como peracético simplemente o con las siglas APA.

2.3.2 Unidad de observación y número de repeticiones.

El procedimiento para la realización del ensayo fue la siguiente:

El ensayo comenzó el día 19 de agosto del 2014, y se extendió hasta el día 1 de septiembre, cuando las colonias alcanzaron el borde de la placa de crecimiento. El tratamiento testigo tuvo ausencia de cualquier sustancia inhibidora. Para el tratamiento con ácido peracético las concentraciones empleadas fueron de 150, 300 y 450 ppm. Las dosis correspondientes fueron 2,4; 4,8; y 7,2 μL / placa Petri respectivamente.

Para el tratamiento testigo se utilizaron 16 placas, 4 por patógeno (*Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Penicillium*). Del mismo modo, para el tratamiento con peracético se utilizaron 16 placas Petri por dosis, es decir, 4 repeticiones por aislado y dosis.

La unidad de observación o unidad experimental en este caso correspondía a una placa Petri, es decir, el lugar o recinto donde crece cada colonia individual de cada aislado bajo los efectos de los tratamientos. Cada una de ellas es independiente, pero las variables relacionadas con el crecimiento y tasa de crecimiento se miden sobre las mismas unidades de observación en función del tiempo.

Para el ensayo de la influencia del peracético sobre la germinación de conidios, se siguió el mismo patrón de distribución de placas Petri que el ensayo anterior.

Aunque se obtuvieron 4 repeticiones de las variables medidas extraídas de 4 unidades experimentales por tratamiento constituidas por cuatro placas de Petri independientes, en sentido estricto, estas repeticiones deben considerarse submuestras, más que réplicas, de acuerdo con Hammer (1981) porque no se maximiza el error experimental. Este error está minimizado, ya que todas las placas de cultivo se llenaron a partir del mismo medio de cultivo, se sembraron a partir de la misma colonia de cada uno de los aislados y se incubaron en la misma incubadora.

2.3.3 Definición, tipo y clasificación de las variables.

Las variables a considerar para valorar el efecto del ác. peracético en sus distintas concentraciones sobre cada uno de los aislados se definen a continuación:

Área de crecimiento de la colonia (cm²). Representa el área de la colonia desarrollada medida a intervalos diarios sobre la misma colonia (medidas repetidas). Esta medida se realiza generalmente como el diámetro de la colonia, pero consideramos que el diámetro de una colonia no caracteriza totalmente el crecimiento en los casos en los que la colonia no tiene un hábito de crecimiento totalmente circular. Si bien, *Penicillium* y *Cladosporium* crece casi como un círculo perfecto, *Botrytis* y *Alternaria* presentan figuras irregulares en su crecimiento, probablemente porque mientras la colonia está creciendo se dispersan conidios formados que germinan y los nuevos micelios se unen al micelio principal. En algunos casos no es fácil distinguir este proceso. La medición del área de la colonia se realizó, previa calibración con el

diámetro de la placa Petri, con fotografía digital de ésta y posterior análisis en el software Image Tool for Windows, versión 3.0 (Texas, EE.UU.). Esta variable es de tipo cuantitativa continua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

Tasa de crecimiento (cm²/día). Es el grado (velocidad) de crecimiento del hongo medido en su fase lineal de crecimiento cuando se desarrolla en un medio de cultivo sólido. La fase lineal de crecimiento es la fase en la que el hongo crece a pleno rendimiento una vez ha pasado la fase exponencial que suele durar solamente unas pocas horas y antes de entrar en la fase estacionaria donde la velocidad de crecimiento disminuye.

Esta variable se mide como la pendiente de la recta (fase lineal) obtenida cuando se representa en unos ejes cartesianos el tiempo (eje X) y el área o diámetro de la colonia (eje Y), obviando la fases de crecimiento que no corresponden a la fase lineal. También se obtiene aplicando la siguiente ecuación:

$$\mu \left(\text{cm}^2 / \text{día} \right) = \frac{A_{(t+1)} - A_t}{(t + 1) - t}$$

donde,

μ : Tasa de crecimiento (cm²/día),

$A_{(t+1)}$: Área de la colonia un día determinado (cm²),

A_t : Área de la colonia el día anterior o días anteriores considerados a t + 1 (cm²),

t + 1 : Un día determinado (días)

t : El día anterior considerado a t + 1 (días).

En el presente trabajo, se ha calculado la tasa de crecimiento aplicando la ecuación anterior, para el día 2, cuando de acuerdo con los gráficos obtenidos, no había duda de que el hongo se encontraba en la fase lineal de crecimiento.

Esta variable es cuantitativa continua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

Duración de la fase lineal (días). Esta variable representa los días transcurridos entre el final de la fase exponencial (generalmente la fase de latencia, ya que la fase exponencial suele pasar desapercibida, debido a que dura muy pocas horas) y el inicio de la fase estacionaria o de deceleración. Se obtiene a partir de los gráficos tiempo – área, detectando la zona lineal visualmente en el gráfico. Es una variable de tipo cuantitativa discontinua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

Inhibición del crecimiento (%). Representa el efecto del tratamiento retardador del crecimiento del desarrollo del hongo en función del crecimiento de éste cuando las sustancias retardadoras no están presentes. Se obtiene aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición del crecimiento (\%)} = \frac{A_{control} - A}{A_{control}}$$

$A_{control}$: Área de la media de la colonia del tratamiento testigo (cm²).

A: Área media de la colonia del tratamiento con una concentración determinada de ác. peracético (cm²).

Es una variable de tipo cuantitativa continua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del producto.

2.3.4 Establecimiento de las hipótesis.

Una hipótesis es una idea basada en un conjunto de conocimientos plausibles acerca de un problema o pregunta, por su naturaleza se trata de una conjetura o idea acerca de la posible relación entre dos o más fenómenos observables o variables. Una hipótesis estadística es una presunción acerca de parámetros de una población y el test estadístico de la hipótesis es la utilización de datos procedentes de una muestra para asumir o rechazar una presunción acerca de la población. Las hipótesis definen las características del plan de trabajo a desarrollar y el tipo de test estadístico que ha de ser utilizado para su aceptación o rechazo.

Los ensayos que se van a desarrollar a continuación están planteados para poner de manifiesto el efecto o control que tiene el ácido peracético sobre el crecimiento *in vitro* de los distintos patógenos aislados de pimiento de la empresa Grupo CFM.

Por lo anteriormente dicho, las hipótesis que se pretenden contrastar fueron las siguientes:

1. El ácido peracético ejerce influencia o controla el crecimiento *in vitro* de *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Penicillium*.
2. El ácido peracético ejerce influencia o controla la germinación de conidios de *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Penicillium*.

El análisis de estas hipótesis va a ser fundamental para establecer la eficacia de estos compuestos en su aplicación a los frutos. Evidentemente, el hecho de tener un efecto beneficioso *in vitro* no quiere decir que sea extrapolable a obtenerlo *in vivo*, lo que sí es evidente es que tras este experimento se podrá evaluar el efecto fungicida o fungistático como tal de los compuestos ensayados.

2.3.5 Análisis estadístico.

Se ha optado a realizar un análisis básico de los datos utilizando para ellos los estadísticos de la media aritmética como medida de centralización y la desviación estándar como medida de la dispersión. La utilización del ANOVA o análisis de la varianza se ha evitado fundamentalmente porque el tamaño de la muestra no es elevado ($n=4$) y la falta del concepto réplica como tal que permitiría poner de manifiesto diferencias significativas cuando no las hay. El error se minimiza también, dado que las medidas de las áreas se tomaron de las mismas colonias en función del tiempo, es decir, es un caso de diseño de medidas repetidas. En este caso se requeriría otro tipo de análisis ANOVA, el denominado ANOVA de medidas repetidas.

2.3.6 Protocolo de las mediciones.

Efecto del ácido peracético en el crecimiento *in vitro* de *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Penicillium*.

Primeramente se preparó el medio de cultivo de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Después de su esterilización en autoclave, se dejó reposar en un baño termostático a 48°C. Las placas Petri se rotularon y dispusieron para agregar el PDA.

Las placas se dejaron reposar no menos de 15 horas dentro de la cabina de flujo para proceder a la inoculación del hongo anteriormente purificado y aislado. Para ello se partió de cultivos de los diferentes hongos realizados a partir de los aislados iniciales de los frutos. Entonces se depositó una pequeña porción de cultivo del hongo cortada asépticamente del borde de la colonia crecida de cinco días a 26°C con un bisturí en el centro de la placa nueva (subcultivo) y a continuación realizaron 4 pulverizaciones por placa (equivalente a 0.8 mL aproximadamente) con el producto, aplicando una dosis de 2,4; 4,8 y 7,2 µL por placa Petri el tratamiento. Todo este procedimiento se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar, para asegurar la máxima asepsia en el trabajo, y después se depositaron las placas en la incubadora a 26°C durante los días necesarios hasta que el tratamiento testigo creció cerca del borde de la placa. Las placas se sacaban de la incubadora por pocos minutos para apuntar las observaciones y medir el tamaño de la colonia (proceso rápido porque se hizo con un montaje fotográfico). Para llevar a cabo la toma de medidas, se midió el tamaño de cada colonia, los días dos y siete del experimento, tomando fotos para luego medir el área con el programa informático Image Tool 3.0.

Para la representación de los gráficos de evolución de crecimiento se tomó el valor medio por día de las 4 repeticiones (submuestras en este caso) y se representó la desviación estándar de la medición por medio de una barra vertical pasando por el valor medio. Para el resto de las variables consideradas, como son la tasa de crecimiento, la duración de la fase lineal y la inhibición del crecimiento, definidas en el apartado, se elaboraron tablas con cada uno de los valores medios y su desviación estándar.

Efecto del ácido peracético sobre la germinación de *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Penicillium*.

Para el segundo ensayo, hemos realizado un subcultivo de la zona periférica del área del micelio de los aislados purificados anteriormente, dos placas por patógeno. Tras 6 días en la incubadora a 26°C, se realizó una suspensión de conidios de dichas placas. La suspensión de conidios consistió en añadir 2 mL de agua destilada esterilizada, moviendo cuidadosamente en cruz. En el caso de *Botrytis* y *Alternaria*, fue necesario dar una pasada cuidadosamente con el asa de siembra por la superficie para ayudar a desprender los conidios del micelio. Transcurridos unos minutos, se recogió el agua con la pipeta y se depositó en una duquesita previamente rotulada, todo ello en la cámara de flujo laminar para evitar posibles contaminaciones.

Previa utilización de la suspensión de conidios se procedió al recuento en la cámara de Thoma para saber si la concentración que íbamos a utilizar era suficiente.

Una vez ajustada la concentración, se procedió a la siembra de las placas y se pipeteó 0,1 mL de suspensión de conidios por placa y posteriormente se realizaron 4 pulverizaciones por placa (equivalente a 0,8 mL aproximadamente) con el producto, aplicando una dosis de 2,4; 4,8 y 7,2 μL por placa Petri, del mismo modo que en el ensayo anterior sobre el crecimiento de micelio.

Tras dos días en la incubadora para *Alternaria*, *Penicillium* y *Cladosporium* y cuatro en el caso de *Botrytis*, se realizó el recuento con la ayuda de la cámara de recuento y en el programa Image Tool 3.0 citado anteriormente.

Para la visualización del aspecto de las hifas y la realización del recuento de conidios, se utilizó el microscopio de contraste de fases y una cámara de recuento Thoma con un ocular micrométrico adaptado a uno de los oculares.

2.4 Efecto del ácido peroxiacético en el desarrollo de las podredumbres.

2.4.1 Material experimental y tratamientos.

Para la realización del ensayo, se utilizaron los aislados purificados de los distintos patógenos objeto de estudio; *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Penicillium* de frutos de pimiento del mes de noviembre.

La experiencia comenzó el 16 de abril del 2015, realizándose las inoculaciones el mismo día, y se dio por finalizada el 5 de junio del mismo año. Los frutos inoculados con el hongo permanecieron almacenados en el laboratorio (Fig. 2.4) en condiciones ambientales propias de esos meses.



Fig. 2.4. Cajas con pimientos tratados en el laboratorio de la UPCT. Imagen de Laura Alemán.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- Testigo: agua de la red urbana (T^a del agua del tratamiento 18,5°C y pH 7,62). Los frutos se sumergieron durante 1 minuto.
- Tratamiento de ácido peracético a distintas dosis:
 - agua de la red urbana + 6 mL/L de ácido peracético (300 ppm) (T^a del agua del tratamiento 19°C y pH 3,60). Los frutos se sumergieron un minuto.

- Agua de la red urbana + 9 mL/L de ácido peracético (450 ppm) (T^a del agua del tratamiento 19,3°C y pH 3,41). Los frutos se sumergieron 1 minuto.

2.4.2 Unidad de observación y número de repeticiones.

Para el ensayo se recogieron esa misma mañana de la empresa Grupo CFM, 240 pimientos var. California dispuestos en cajas de cartón en grupos de 10 (24 cajas en total).

La distribución fue la siguiente: para el tratamiento testigo 8 cajas (10 frutos/caja), 2 cajas (20 frutos) por hongo (*Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Penicillium*). Para el tratamiento con peracético se necesitaron 16 cajas, 8 para cada dosis (300 y 450 ppm) es decir, 2 cajas por hongo (*Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Penicillium*).

Como técnica de infección se utilizó la inyección, ya que muestra las siguientes ventajas según Vélez (2006):

1. La identificación precisa del tipo de propágulo y concentración de éste.
2. El lugar exacto donde se encuentra el inóculo infeccioso en el material vegetal, en caso de que se realice una inoculación localizada.
3. La utilización de dosis infecciosas del propágulo que en condiciones favorables darán lugar a la enfermedad.

Los experimentos de inoculación ponen de manifiesto la capacidad del crecimiento del patógeno sobre el vegetal. Este sistema trata de asemejarse lo más posible a las condiciones reales que se va a encontrar el propágulo del patógeno cuando se encuentre sobre el vegetal, teniendo en cuenta que éste, en la mayoría de los casos tratará de defenderse del posible crecimiento del propágulo. En un experimento *in vitro* no hay resistencia alguna por parte del medio de cultivo y condiciones de crecimiento, ya que éstas se hacen propicias para permitir el crecimiento del propágulo depositado. No es de extrañar pues, que un determinado antifúngico a probar presente alta efectividad *in vitro*, pero una efectividad muy diferente *in vivo* una vez inoculada.

Las defensas contra la infección que se encuentran en los tejidos vegetales son muy variadas. Las principales son las de tipo físico, principalmente la cutícula y

epidermis intacta. De este modo sólo los patógenos muy especializados son capaces de penetrar al tejido vegetal intacto (como es el caso de *Botrytis*). Por otro lado se encuentran las defensas de tipo químico que inhiben el desarrollo del hongo. Hay compuestos variados, entre ellos los compuestos fenólicos y los aceites esenciales. También hay otros compuestos que son de síntesis inducida cuando se produce la infección, los principales son las fitoalexinas. Estas defensas se pueden ver comprometidas en poscosecha, especialmente cuando el vegetal se encuentra en estado senescente (Vélez, 2006).

Se inocularon 60 pimientos por hongo (20 para el testigo, 20 para el baño con peracético a 300 ppm y 20 para el de 450 ppm). Todos los pimientos fueron inoculados con una suspensión de conidios en agua destilada esterilizada de los aislados correspondientes y no se almacenaron en una misma caja pimientos de distintos tratamientos.

La concentración de conidios se ajustó a una concentración de:

- *Botrytis*: $1,8 \cdot 10^5$ conidios/mL.
- *Alternaria*: $4 \cdot 10^4$ conidios/mL.
- *Cladosporium*: $5 \cdot 10^5$ conidios/mL.
- *Penicillium*: $2,57 \cdot 10^6$ conidios/mL.

Cada caja correspondía a una repetición y cada pimiento era una unidad experimental que se agrupaba en grupos de 10. Cada repetición recibió el lavado por separado aun perteneciendo al mismo grupo de tratamiento.

2.4.3 Definición, tipo y clasificación de variables.

Las variables consideradas para valorar el efecto del ácido peracético sobre el control de las podredumbres de tomates son las siguientes:

- a) Incidencia de la podredumbre medida como el número de pimientos afectados por podredumbres causadas por *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* o *Penicillium*.
- b) Severidad de la podredumbre. En las experiencias de patogenicidad, además de contabilizar el número de pimientos afectados de podredumbre, se cuantificó por medio del Índice de Desarrollo de la Podredumbre (IDP), que

incluye crecimiento y severidad. Para este caso se diferenci3 entre frutos blandos sin micelio, con micelio blando y con micelio esporulado (se distingue por el color de la masa de conidios).

El 3ndice de Desarrollo de la Podredumbre (IDP) se obtuvo aplicando la siguiente ecuaci3n:

$$\text{IDP} = [(P1 \times 0) + (P2 \times 1) + (P3 \times 2) + (P4 \times 3)] / \text{TF}$$

donde: P1 es el n3mero de frutos sin podredumbre; P2 es el n3mero de frutos podridos sin micelio; P3 es el n3mero de frutos con micelio blanco y P4 corresponde al n3mero de frutos podridos con micelio coloreado. TF es el total de frutos. Este 3ndice var3a entre los valores de 0 y 3, siendo 0 (no hay podredumbre) y 3 (todos los frutos est3n afectados y con micelio esporulado).

La evoluci3n de las podredumbres es una variable de tipo cuantitativa discontinua de acuerdo con la escala de medidas e independiente de acuerdo con el dise1o del protocolo, mientras que el IDP es una variable cuantitativa continua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el dise1o del protocolo.

2.4.4 Establecimiento de la hip3tesis.

La hip3tesis a contrastar fue que el 3cido perac3tico como tratamiento antif3ngico influye en el desarrollo de las podredumbres causadas por *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* o *Penicillium* en frutos de pimientos inoculados con dichos pat3genos previamente.

2.4.5 An3lisis estad3stico.

Nos se realiz3 ning3n tratamiento de separaci3n de medias a los resultados. La incidencia de las podredumbres se anot3 contabilizando el n3mero de frutos podridos en el punto de inoculaci3n a intervalos diarios dentro de cada bandeja, mientras que el grado de desarrollo de la podredumbre se calcul3 diferenciando entre frutos blandos sin micelio, con micelio blanco y con micelio esporulado. Cuando los frutos se iban pudriendo generalmente se desecharon el mismo d3a para evitar la contaminaci3n con del resto de frutos, sobre todo si estaban muy afectados.

2.4.6 Protocolo de las mediciones.

El mismo día de su recepción (Fig. 2.5 A), los frutos fueron seleccionados libres de alteraciones y defectos y se lavaron bajo el grifo de agua potable de abastecimiento, se dejaron secar y a continuación se inocularon. La inoculación se realizaron efectuando un pequeño pinchazo con una aguja estéril de jeringuilla hipodérmica (Fig. 2.5 B), no muy profundo, hasta perforar la fina piel, sobre la superficie del fruto (Fig. 2.5 C). De este modo se genera sobre el tejido vegetal una vía artificial donde se depositaron los propágulos de *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* o *Penicillium*, según el caso. De esta manera podemos reproducir los síntomas de dicho patógeno que necesita de heridas en la corteza del fruto para poder ocasionar podredumbre. Por ello, es también factor importante considerar la densidad del inóculo infectivo compuesto a base de conidios suspendidos en agua destilada esterilizada que previamente ha sido cuantificado hasta alcanzar una concentración de conidios superior a la dosis considerada infectiva: *Botrytis* $1,8 \cdot 10^5$; *Alternaria* $4 \cdot 10^4$ *Cladosporium*: $5 \cdot 10^5$ y *Penicillium*: $2,57 \cdot 10^6$ conidios/mL, ajustadas con una cámara de recuento de tipo Thoma y obtenidos de cultivos jóvenes de seis días creciendo a 26°C.

Cada pimiento fue numerado con marcador permanente en grupos del 1 al 10 en la zona inferior del punto de inoculación. Para, por un lado, identificar la aparición de la podredumbre, y por otro, llevar un cierto control en las anotaciones diarias por tratarse de un número elevado de frutos (240).

Tras la inoculación se realizaron los baños de 1 min en grupos de 10 frutos (Fig. 2.5 D), en continua agitación, en los siguientes preparados realizados con agua de abastecimiento: **a**) testigo: agua de la red urbana sin ningún inhibidor (Tª del agua del tratamiento 18,5°C y pH 7,62), **b**) agua de la red urbana + 6 mL/L de ácido peracético a una concentración de 300 ppm (Tª del agua del tratamiento 19°C y pH 3,60) y **c**) agua de la red urbana + 9 mL/L de ácido peracético a una concentración de 450 ppm (Tª del agua del tratamiento 19,3°C y pH 3,41). A continuación los frutos se almacenaron durante 50 días en condiciones ambientales, lo que al suceder entre los meses de abril y junio las temperaturas entre 27-30°C favorecieron el desarrollo de las podredumbres.

Posteriormente se contabilizó el número de frutos podridos en total a intervalos casi diarios dentro de cada bandeja, diferenciando las diversas podredumbres que afectaron a los frutos.



Fig. 2.5. A) transporte de cajas y pimientos. B) suspensión de conidios en duquesitas y jeringuilla hipodérmica. C) inoculación de los pimientos con los distintos patógenos. D) baño con agitación E) grupo de pimientos ya tratados.

Resultados y discusión

3 Resultados.

3.1 Influencia del ácido peracético en el desarrollo de los patógeno.

- Efecto del tratamiento testigo y ácido peracético sobre el crecimiento micelial de *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Penicillium*.

En las Figuras 5.1, 5.2, 5.3, y 5.4 se muestra el crecimiento sobre PDA de los distintos patógenos aislados de pimienta en placas pulverizadas con ácido peroxiacético (600 µL) a distintas concentraciones:

- T1: 150 ppm (mitad de la dosis comercial).
- T2: 300 ppm (dosis comercial).
- T3: 450 ppm (dosis superior a la comercial).

En las Tablas 3.1, 3.3, 3.4 y 3.5 se muestra la tasa de crecimiento del hongo en su fase lineal para cada tratamiento que, como tal tasa, indica la velocidad de crecimiento del hongo. También incluye la duración de la fase lineal de crecimiento, expresada en días, y la inhibición del crecimiento en relación al tratamiento testigo, expresada en porcentaje. Esta última sólo se calculó para aquellos tratamientos en los que se observó inhibición o reducción del crecimiento.

Como se observa en la Fig. 3.1, el crecimiento de las colonias de *Botrytis* a distintas concentraciones fue similar, incrementándose ligeramente el final de la fase lineal en la dosis más baja del tratamiento con ác. peracético. Un aspecto a tener en cuenta fue que la coloración de las colonias de *Botrytis* era mucho más blanquecina en las dosis más elevadas de 300 ppm y 450 ppm, dificultando incluso la delimitación de éstas a la hora de su medición. Esta apreciación pudo indicar un efecto del peracético en el control de la conidiogénesis o sobre la maduración de conidios más que sobre el desarrollo de micelio, como veremos más adelante. Hay que tener en cuenta que el color grisáceo de los aislados de *Botrytis* se debe a la masa de conidios (Fig 3.2), mientras que el color pardo se debe a la proliferación de hifas acintadas (Snowdon 1991). La falta de color de los aislados de especies de este género se puede deber a la escasez o ausencia de conidios e hifas acintadas.

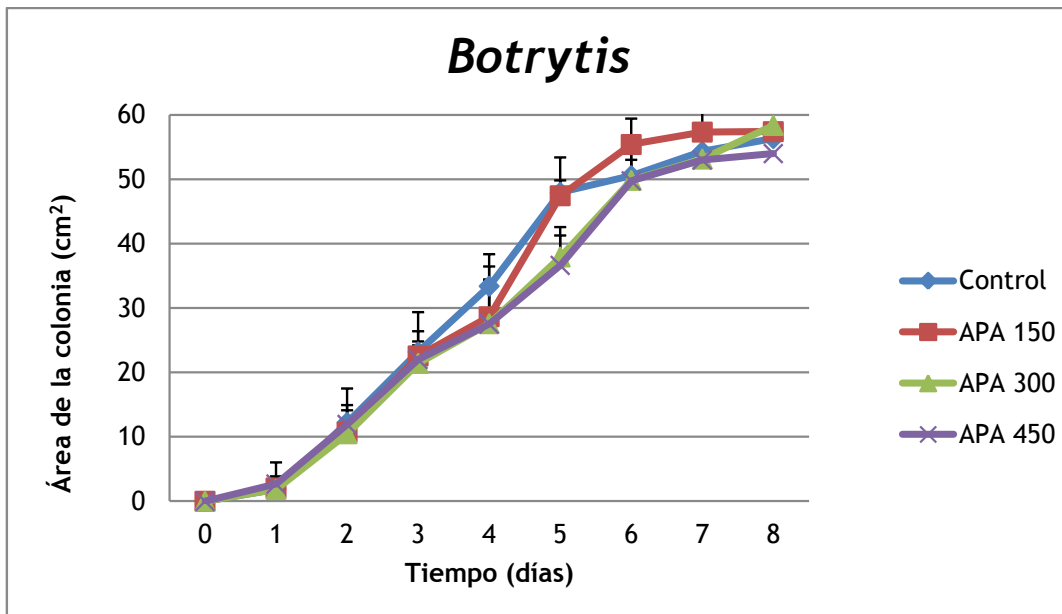


Fig. 3.1. Efecto de diferentes concentraciones de ácido peracético sobre el crecimiento de *Botrytis* sp. aislado de pimiento. Las barras verticales son la desviación estándar.

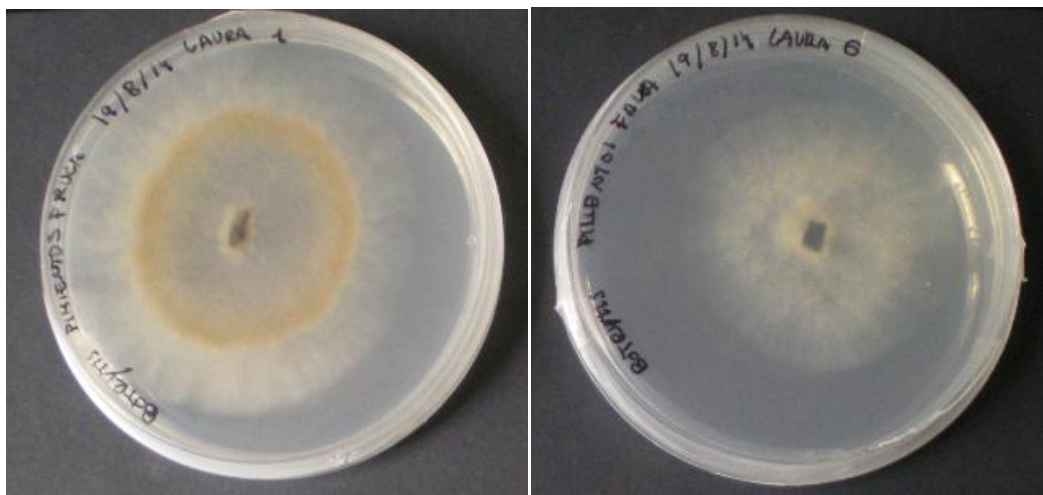


Fig. 3.2. Placas Petri con *Botrytis*. Izquierda tratamiento testigo. Derecha tratamiento ácido peracético 150 ppm.

En las placas cultivadas con *Botrytis*, la fase de latencia duró menos de un día en todos los casos, y la fase del crecimiento lineal entre 4 y 5 días. Como se observa en la Tabla 3.1, la tasa de crecimiento fue ligeramente menor en la dosis 150 y 300 ppm (8,7 y 8,6 cm²/día) respecto al control (10,4 cm²/día) y la inhibición del crecimiento al término del ensayo fue del 8% para la dosis intermedia.

Tabla 3.1. Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de *Botrytis* sp. aislado de pimiento para los tratamientos testigo y ácido peracético a distintas concentraciones 150,300 y450 ppm.

Tratamiento	Tasa de crecimiento (cm ² /día)	Duración fase lineal (días)	Inhibición del crecimiento (%)
Control	10,4 ± 1,4	4	
APA 150	8,7 ± 2,8	4	2,5
APA 300	8,6 ± 2,6	4	7,7
APA 450	9,3 ± 0,8	4	5

En la Figura 3.3 se apreció que el mayor grado de crecimiento de *Alternaria* lo mostró el control, el resto de dosis (150, 300 y 450 ppm) expresaron resultados similares. A partir del tercer día comenzaron a crecer colonias periféricas en las placas con ác. peroxiacético pulverizado, que para el día 5, limitaban el crecimiento de la colonia objeto de estudio. Posiblemente este efecto se debió a la dispersión de conidios que pudo tener lugar cuando se pulverizó el preparado sobre el hongo. Es por ese motivo por el cual, solo las colonias del control llegaron a ocupar la totalidad de la placa de cultivo al término del ensayo. Es por ello por lo que no se obtuvo una curva típica de crecimiento de hongo en una placa de Petri. Lo único evidente fue que el tratamiento con el agente oxidante ralentizó el crecimiento del hongo.

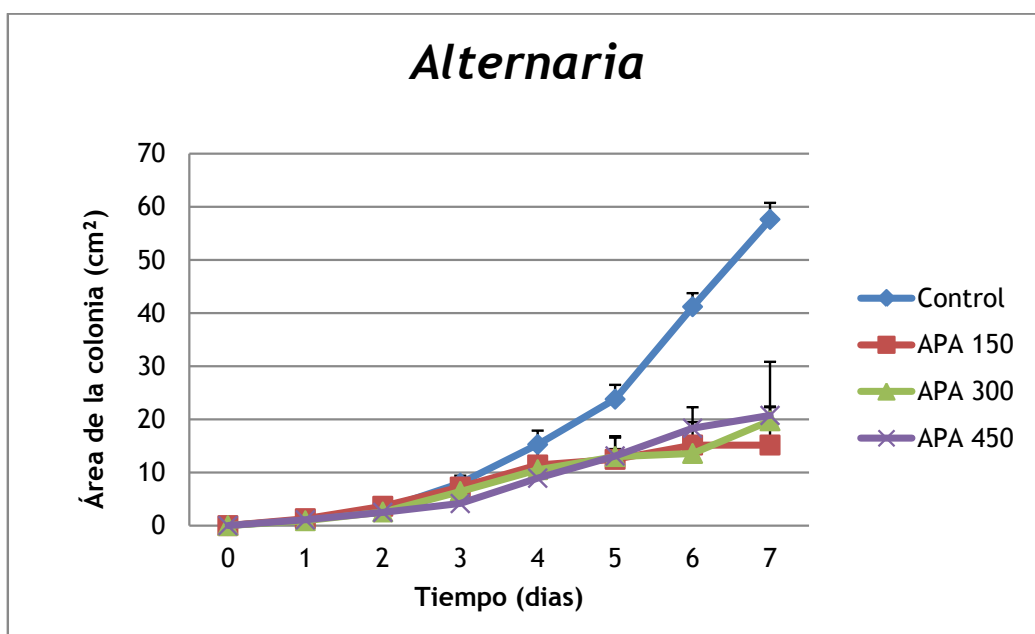


Fig.3.3. Efecto de diferentes concentraciones de ácido peracético sobre el crecimiento de *Alternaria* sp. aislado de pimiento. Las barras verticales son la desviación estándar.

En el caso de *Alternaria*, la fase de latencia duró un día en todos los casos, y la fase lineal todo el tiempo de medición hasta el final de las mediciones, no apreciándose en las gráficas la fase de deceleración del crecimiento. La pendiente de la fase lineal fue muy baja con peroxiacético, lo que denota un fuerte efecto del agente oxidante sobre el hongo. La tasa de crecimiento se midió teniendo en cuenta el crecimiento de las colonias entre los días 2 y 3, intervalo en que el hongo empezó a estar claramente en fase lineal. La velocidad de crecimiento de la dosis más baja fue similar a la del tratamiento testigo (2,3 cm²/día frente 2 cm²/día respectivamente) y el menor crecimiento lo experimentó la dosis 450 ppm, al igual que la inhibición del crecimiento, que alcanzó casi el 50%.

Tabla 3.2 Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de *Alternaria* sp. aislado de pimiento para los tratamientos testigo y ácido peracético a distintas concentraciones 150, 300 y 450 ppm.

Tratamiento	Tasa de crecimiento (cm ² /día)	Duración fase lineal (días)	Inhibición del crecimiento (%)
Control	2 ± 0,3	6	
PAA 150	2,3 ± 0,9	6	
PAA 300	1,6 ± 0,2	6	19
PAA 450	1,4 ± 0,5	6	47

En la siguiente gráfica (Fig. 3.4) se representa crecimiento de las colonias de *Cladosporium*. Es de resaltar que este hongo tuvo un crecimiento más lento que en el resto de patógenos, no superando el 10% del espacio disponible en ninguno de los casos al término del ensayo. Se apreció un retardo del crecimiento de los tratamientos con APA respecto al testigo a partir del día 3, obteniéndose mejores resultados de inhibición del crecimiento micelial para las dosis 150 y 300 ppm. Tan solo se midió hasta el día 8, debido a que la aparición y desarrollo de colonias periféricas era cada vez mayor.

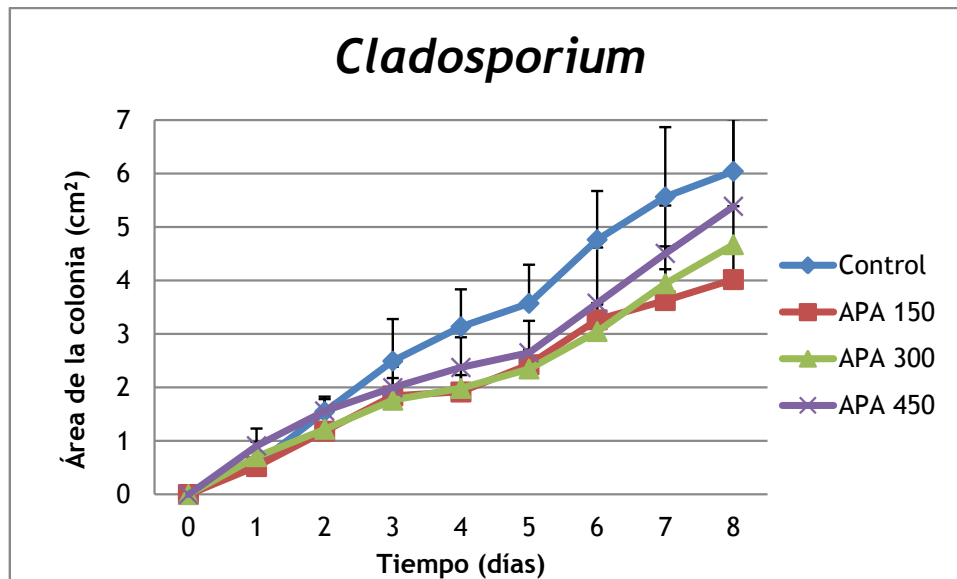


Fig. 3.4. Efecto de diferentes concentraciones de ácido peracético sobre el crecimiento de *Cladosporium* sp. aislado de pimienta. Las barras verticales son la desviación estándar.

Como se observa en la gráfica, el día 1 ya existía crecimiento y la fase lineal duró todo el tiempo de medición (8 días) en todos los casos, debido a su lento crecimiento. El menor crecimiento lo experimentó la dosis comercial (300 ppm) con una inhibición del crecimiento del 23%. Las dosis restantes tuvieron respuestas similares (Tabla 3.3).

Tabla. 3.3 Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de *Cladosporium* sp. aislado de pimienta para los tratamientos testigo y ácido peracético a distintas concentraciones 150, 300 y 450 ppm.

Tratamiento	Tasa de crecimiento (cm ² /día)	Duración fase lineal (días)	Inhibición del crecimiento (%)
Control	1 ± 0,2	8	
APA 150	0,7 ± 0,1	8	33
APA 300	0,5 ± 0,3	8	23
APA 450	0,7 ± 0,3	8	11

En el caso de *Penicillium*, tampoco se apreció la fase de latencia, mostrando un crecimiento lineal durante los días de medición. La dispersión de colonias fue elevada desde el día 1, de tal modo, que fue casi imposible, al cabo del día 4, medir el tamaño de la colonia central, motivo por el cual la pendiente de las líneas de crecimiento fue menor. A pesar de la escasez de datos, en la Fig. 3.5 se puede apreciar dos tendencias; la del control y 150 ppm, y la de las concentraciones de 300 y 450 ppm. Los primeros

mostraron un crecimiento similar hasta el día 2, donde comenzó a ralentizarse el crecimiento de las colonias tratadas con APA 150. Las dosis de 300 y 450 ppm tuvieron efectos muy parecidos en el crecimiento micelial.

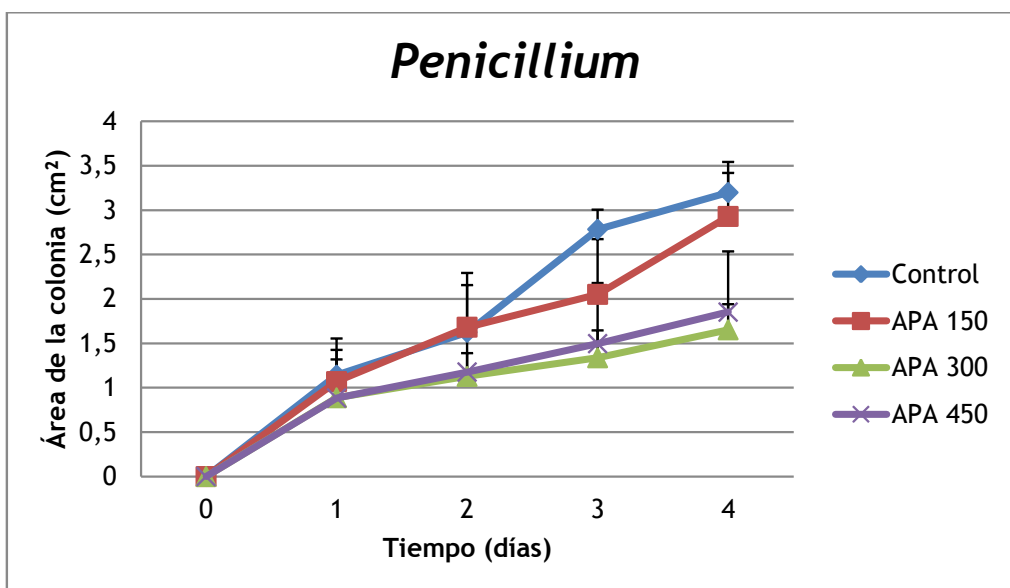


Fig 3.5. Efecto de diferentes concentraciones de ácido peracético sobre el crecimiento de *Penicillium* sp. aislado de pimienta. Las barras verticales son la desviación estándar.

A pesar de tener menor número de mediciones que el resto de patógenos, en la Tabla 3.4 se observa que la dosis más efectiva fue la comercial seguida de la dosis más elevada (450 ppm), tanto en velocidad de crecimiento como en la inhibición de este, rondando el 50% en los dos últimos.

Tabla. 3.4 Tasa de crecimiento, duración de la fase lineal e inhibición del crecimiento de *Penicillium* sp. aislado de pimienta para los tratamientos testigo y ácido peracético a distintas concentraciones 150, 300 y 450 ppm.

Tratamiento	Tasa de crecimiento (cm ² /día)	Duración fase lineal (días)	Inhibición del crecimiento (%)
Control	0,5 ± 0,3	4	
APA 150	0,6 ± 0,3	4	
APA 300	0,2 ± 0,1	4	52
APA 450	0,3 ± 0,1	4	46

- Efecto del ácido peracético sobre la germinación de conidios de *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Penicillium*.

En el caso de *Botrytis* (Fig. 3.6) la respuesta a las dosis 300 y 450 ppm son similares.

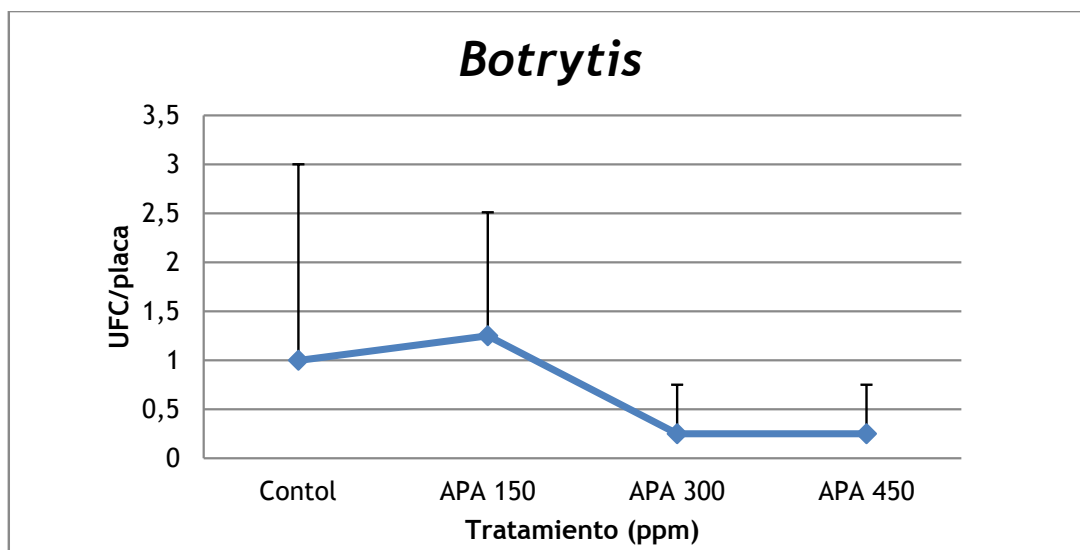


Fig. 3.6 Efecto del ácido peracético (APA) a distintas concentraciones 150, 300, 450 ppm sobre la germinación de conidios de *Botrytis* aislado de pimiento. Las barras verticales son la desviación estándar.

Bajo el microscopio se observaron hifas tortuosas en las placas tratadas con 450 ppm y menor número de hifas acintadas que en el control (Fig. 5.7), lo que explica el color mas blanquecino de de las colonias tratadas con APA.

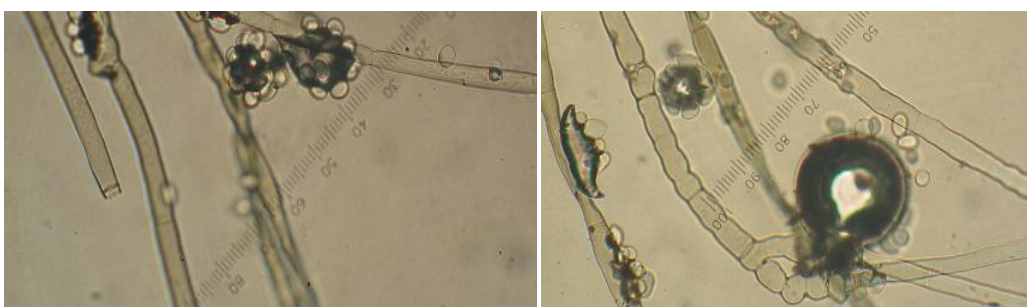


Fig. 3.7. Hifas y conidios de *Botrytis sp.* obtenidos de las placas testigo (izquierda) y de las tratadas con ácido peracético 450 ppm (derecha).

Al cabo de 4 días, la germinación de conidios de las placas tratadas con 150 y 300 ppm fue superior en un 20% respecto al control. Siendo eficaz solamente la dosis

de 450 ppm, obteniéndose un recuento de 13 unidades formadoras de colonias frente a las 17 del tratamiento testigo.

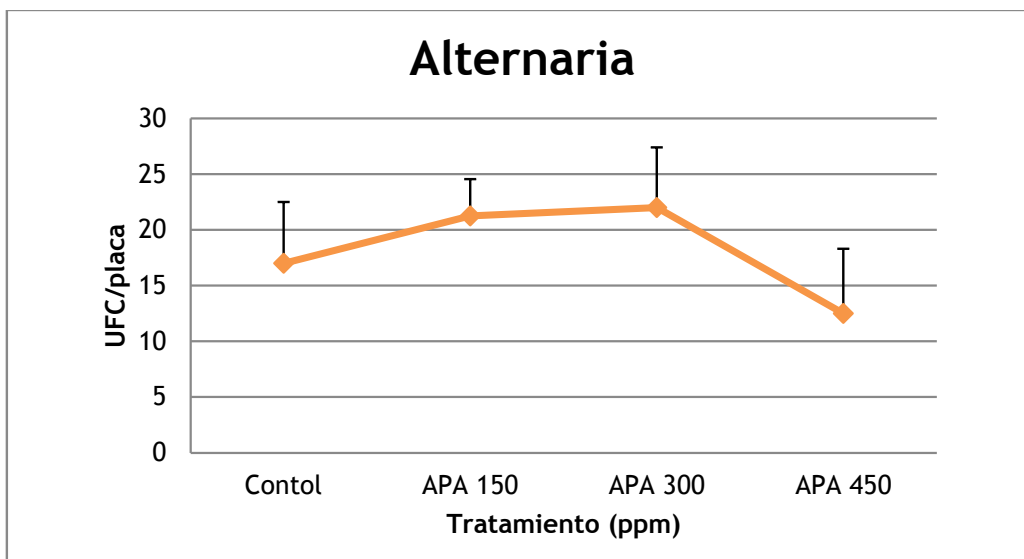


Fig 3.8 Efecto del ácido peracético (APA) a distintas concentraciones 150, 300, 450 ppm sobre la germinación de conidios de *Alternaria* sp. aislado de pimienta. Las barras verticales son la desviación estándar.

Como en el caso de *Botrytis*, el APA también afectó a la morfología de las hifas, resultando estas tortuosas bajo concentraciones de 450 ppm (Fig 3.9). En algunos casos también se apreció ausencia de tabiques en los conidios.

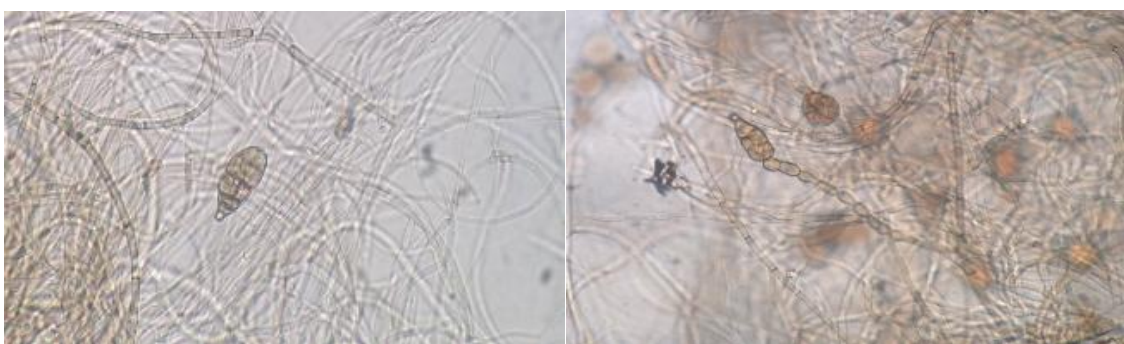


Fig.3.9. Hifas y conidios de *Alternaria* sp obtenidos de las placas testigo (izquierda) y de las tratadas con ácido peracético 450 ppm (derecha).

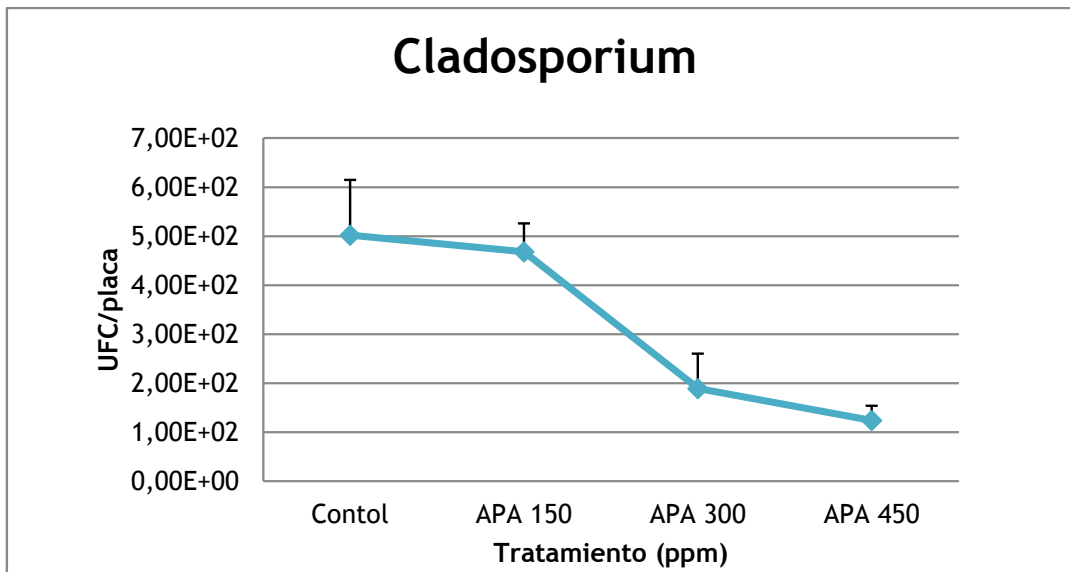


Fig 3.10. Efecto del ácido peracético (APA) a distintas concentraciones 150, 300, 450 ppm sobre la germinación de conidios de *Cladosporium* sp. aislado de pimiento. Las barras verticales son la desviación estándar.

La inhibición de la germinación en el ensayo con conidios de *Cladosporium* dio una respuesta lógica, en tanto en cuanto, cabe esperar de un producto con capacidad fungistática, ya que conforme se aumentó la dosis disminuyó la germinación. Así, las dosis 300 y 450 ppm redujeron la germinación en un 38 y 75% respectivamente, obteniendo recuentos de $1,9 \cdot 10^2$ (300 ppm) y $1,2 \cdot 10^2$ (450 ppm). No se observó cambio alguno en la morfología de las hifas ni el tamaño de los conidios.

Penicillium respondió del mismo modo que *Cladosporium* a las distintas concentraciones, pero el efecto del APA fue superior, del orden del 75 y 96% a las dosis a 300 y 450 ppm respectivamente (Fig. 3.11). La reducción fue de $5,4 \cdot 10^2$ UFC para las placas tratadas con APA 300 ppm y $1 \cdot 10^2$ UFC para 450 ppm. No se apreció diferencias de morfología ni tamaño de los conidios, respecto al control.

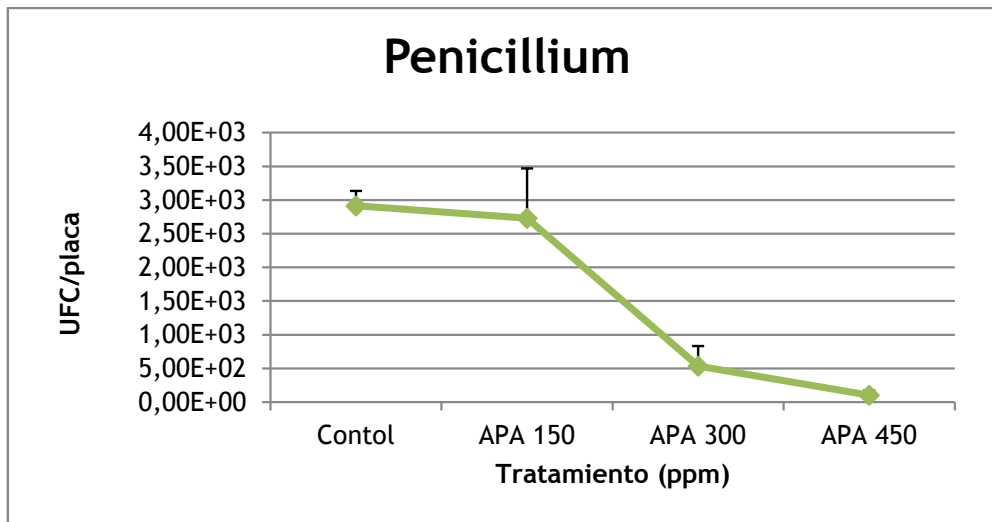


Fig. 3.11. Efecto del ácido peracético (APA) a distintas concentraciones 150, 300, 450 ppm sobre la germinación de conidios de *Penicillium* sp. aislado de pimiento. Las barras verticales son la desviación estándar.

3.2 Efecto del ácido peracético en el desarrollo de podredumbres de pimiento *var. California*.

A rasgos generales se observó que los peores resultados en cuanto a la incidencia de las podredumbres, se dio en los frutos sometidos a la dosis más elevada (450 ppm), incluso por encima de los frutos que se solamente se sumergieron en agua sin ningún inhibidor. Esta tendencia fue expresada por *Botrytis*, *Alternaria* y *Cladosporium*, no dándose en *Penicillium*.

No se ha encontrado bibliografía al respecto, pero es de suponer, que al contrario de lo que se esperaba con el ensayo *in vitro* sobre la germinación de los conidios donde, a mayor concentración de producto mejor respuesta, cuando se sometieron los frutos al baño con el APA a 450 ppm, probablemente, el gran poder oxidativo del oxígeno (subproducto de reacción) eliminaría la microbiota natural que habita en la superficie del fruto, dejando al fruto sin una parte importante de su defensa natural. Por otra parte también se piensa que el otro subproducto resultante de la descomposición del ácido peracético, el ácido acético, podría haber dañado la pared celular del fruto, disminuyendo su permeabilidad. Como consecuencia tendríamos un fruto más susceptible a la infección.

Como se observa en la Tabla 3.10, apenas hubo efecto inhibitor de la podredumbre gris generada por *Botrytis*, alcanzando valores del 85% para los frutos sin tratar y tratados con la dosis comercial (300 ppm). Para los frutos sometidos a la dosis de 450 ppm la podredumbre fu del 95% desde la primera medición (a los 8 días de la inoculación). Y es que *Botrytis* es una especie más agresiva que *Penicillium* o *Alternaria*, es capaz de infectar a frutos sanos y jóvenes penetrando a través de la cutícula (Barkai-Golan 2001).

En el caso de frutos inoculados con *Alternaria*, se apreció, en el primer muestreo, que los frutos no tratados y los sometidos a baños con APA de 450 ppm, ya superaron el 50% de podredumbres, aumentando progresivamente durante los primeros 18 días. A partir de ese momento se ralentizó la progresión en todos los casos y al término del ensayo, se alcanzaron valores de 95% de frutos podridos en el control y tratamiento APA 450 ppm. Los frutos tratados con APA 300 ppm experimentaron un 35% menos de podredumbres que el resto de tratamientos.

La eficacia del ácido peracético sobre el control de las podredumbres en los frutos inoculados con *Cladosporium* fue inexistente, encontrando porcentajes de podredumbres de entre el 75 y el 95% para los distintos tratamientos desde la primera semana.

En el caso de *Penicillium*, los peores resultados se dieron en frutos tratados con APA 300 ppm. Estos frutos ya presentan un 40% de podridos a la semana de almacenamiento, mientras que el control este porcentaje fue tan solo un 10%. Es en el último periodo, al cabo de 50 días, cuando se apreció un aumento exponencial de la incidencia, terminando el ensayo con valores del 90% de frutos podridos para el tratamiento de APA 300 ppm, el doble que para el control.

Tiempo (días)	Tratamiento	% de podredumbres			
		<i>Botrytis</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>
8	Control	85	65	75	10
	APA 300	85	30	85	40
	APA 450	95	55	95	35
11	Control	-	70	-	-
	APA 300	-	-	-	-
	APA 450	-	75	-	-
14	Control	-	-	-	20
	APA 300	-	45	-	-
	APA 450	-	85	-	40
18	Control	-	75	90	-
	APA 300	-	50	-	-
	APA 450	-	90	-	-
22	Control	-	79	-	-
	APA 300	-	-	-	45
	APA 450	-	-	-	-
25	Control	-	-	-	-
	APA 300	-	-	-	-
	APA 450	-	-	-	-
32	Control	-	95	-	30
	APA 300	-	55	-	60
	APA 450	-	-	-	-
36	Control	-	-	-	-
	APA 300	-	60	-	-
	APA 450	-	-	-	-
41	Control	-	-	-	40
	APA 300	-	-	-	75
	APA 450	-	95	-	50
50	Control	-	-	-	45
	APA 300	-	-	-	90
	APA 450	-	-	-	60

Tabla 3.10. Evolución de las podredumbres de pimientos inoculados con *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Penicillium* y tratados con ácido peracético (APA) a distintas concentraciones 300 y 450 ppm y sin tratar, durante 50 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

A continuación se muestran las evoluciones de cada una de las enfermedades (Figs. 3.12 a 3.15).



Fig. 3.12 Pimientos con *Botrytis cinerea* tratados con ácido peracético.



Fig 3.13 Pimientos con *Alternaria* sp. tratados con ácido peracético.



Fig. 3.14 Pimientos con *Cladosporium* sp. tratados con ácido peracético.



Fig. 3.15. Pimientos con *Penicillium* sp. tratados con ácido peracético.

Al analizar conjuntamente la incidencia y severidad a través del IDP (índice de Desarrollo de Pudriciones), se apreció, que en *Botrytis*, *Alternaria* y *Cladosporium*, (Figs. 3.16, 3.17, 3.18) la dosis comercial de 300 ppm fue la mejor opción, ya que los pimientos aguantaron más tiempo y en mejores condiciones. En el caso de *Penicillium* (Fig. 3.19) cualquiera de las dosis de ácido peracético escogidas para el ensayo (300 y 450 ppm) estimularon al patógeno, favoreciendo su crecimiento y por consecuencia el avance de la enfermedad.

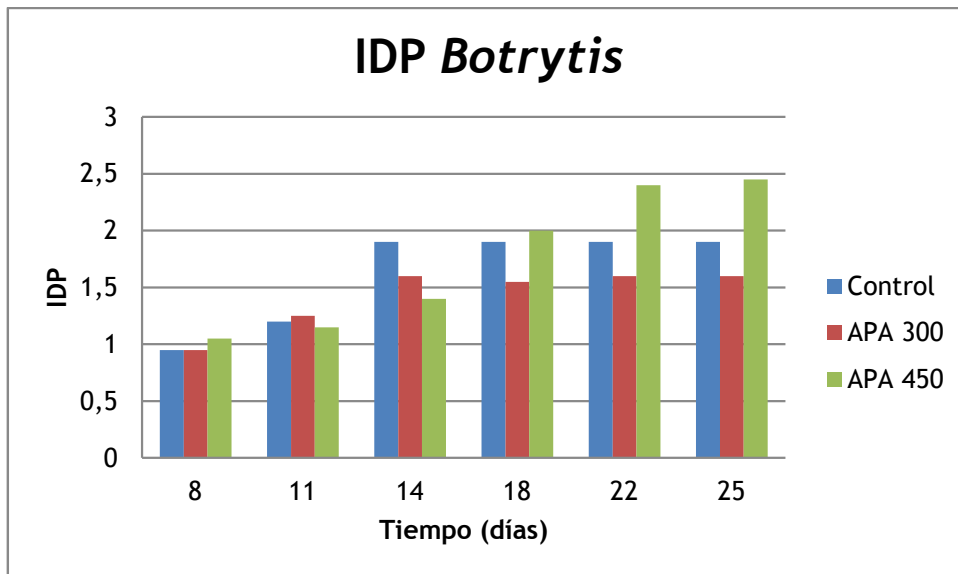


Fig. 3.16 Incidencia y severidad de la podredumbre causada por *Botrytis* expresada como Índice de Desarrollo de la Podredumbre (IDP), en pimientos inoculados con conidios de *Botrytis* y sometidos al tratamiento con ácido peracético (APA) a distintas concentraciones de 300 y 450 ppm. Tras su almacenamiento durante 50 días (del 16 de abril al 5 de junio) en condiciones de T° y HR ambientales. Solo se representa la mitad del tiempo de almacenamiento.*

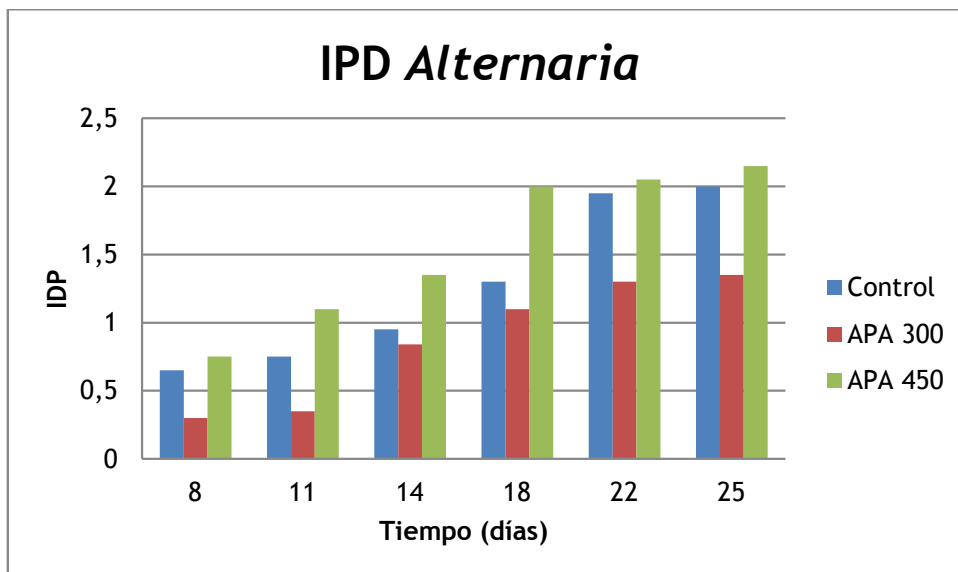


Fig.3.17 Incidencia y severidad de la podredumbre causada por *Alternaria* expresada como Índice de Desarrollo de la Podredumbre (IDP), en pimientos inoculados con conidios de *Alternaria* y sometidos al tratamiento con ácido peracético (APA) a distintas concentraciones de 300 y 450 ppm. Tras su almacenamiento durante 50 días (del 16 de abril al 5 de junio) en condiciones de T° y HR ambientales. Solo se representa la mitad del tiempo de almacenamiento*.

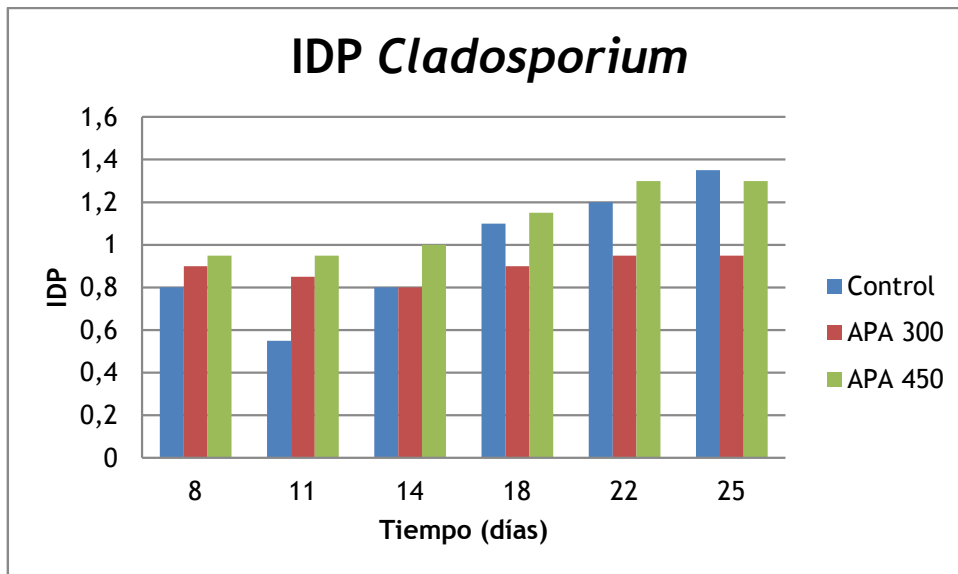


Fig. 3.18 Incidencia y severidad de la podredumbre causada por *Cladosporium* expresada como Índice de Desarrollo de la Podredumbre (IDP), en pimientos inoculados con conidios de *Cladosporium* y sometidos al tratamiento con ácido peracético (APA) a distintas concentraciones de 300 y 450 ppm. Tras su almacenamiento durante 25 días (del 16 de abril al 5 de junio) en condiciones de T° y HR ambientales. Solo se representa la mitad del tiempo de almacenamiento*.

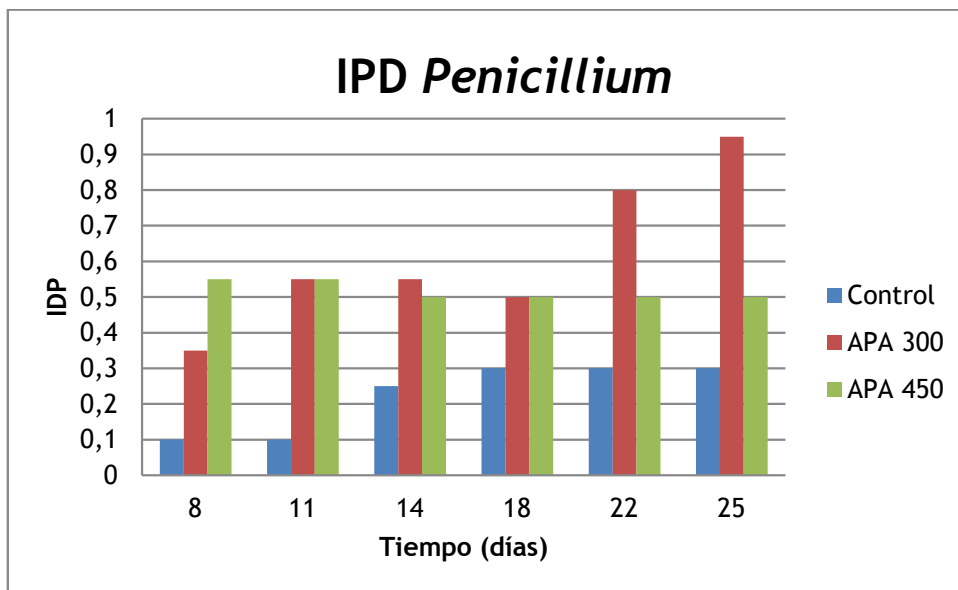


Fig. 3.19 Incidencia y severidad de la podredumbre causada por *Penicillium* expresada como Índice de Desarrollo de la Podredumbre (IDP), en pimientos inoculados con conidios de *Penicillium* y sometidos al tratamiento con ácido peracético (APA) a distintas concentraciones de 300 y 450 ppm. Tras su almacenamiento durante 50 días (del 16 de abril al 5 de junio) en condiciones de T° y HR ambientales. Solo se representa la mitad del tiempo de almacenamiento*.

*En los histogramas solo se ha representado la mitad del tiempo de almacenamiento (hasta el día 25). Esto se debe a que a la hora de tomar los datos y calcular el IDP, los frutos que llegaban a la última fase, que corresponde a “frutos con micelio esporulado”, se desechaban y dejaban de contarse para la siguiente toma de datos. A partir de la mitad del tiempo de almacenamiento la mayoría de los frutos ya habían llegado a dicha fase, por lo que los frutos que quedaban permanecían sanos o en fase de podredumbre inicial sin evolucionar, por lo que el IDP desciende drásticamente. Esto es debido a la existencia de frutos resistentes.

Conclusiones

Estudio de la capacidad fungistática del ácido peracético sobre el desarrollo *in vitro* de *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Penicillium*.

- En el caso de *Botrytis* las distintas concentraciones de ácido peracético (150, 300 y 450 ppm) obtuvieron respuestas similares en cuanto al crecimiento micelial, no observándose retardo en crecimientos de las colonias tratadas con respecto al control.
- *Alternaria* mostró menor velocidad de crecimiento con la concentración 450 ppm de ác. peracético, inhibiéndose el crecimiento casi un 50 %. Sin embargo con la dosis de 150 ppm se favoreció el desarrollo por encima del control. Tampoco se observó retardo en el inicio del crecimiento del tratamiento con ác. peracético con respecto al tratamiento testigo.
- En el caso de *Cladosporium* los mejores resultados se obtuvieron para las concentraciones de 150 y 300 ppm de peracético, consiguiendo una inhibición del crecimiento del 33 y 23 % respectivamente.
- Los mejores resultados para el control de *Penicillium* se dan bajo las concentraciones de 300 y 450 ppm, inhibiendo el crecimiento 50 y 46% respectivamente.
- En la mayor parte de los casos la concentración de 450 ppm demostró ser la más eficaz en cuanto a la inhibición de la germinación de los conidios, alcanzando porcentajes del 25% en *Alternaria*, 75% en el caso de *Cladosporium* y *Botrytis*, 95% en *Penicillium*.
- El tratamiento de 450 ppm afectó a la morfología de las hifas en *Botrytis* y *Alternaria*, mostrándose tortuosas, además se piensa que en el caso de *Botrytis* el tratamiento también disminuyó la cantidad de hifas acintadas, ya que la coloración del micelio ese apreció más blanquecino. En el caso de *Penicillium* y *Cladosporium* no se observaron cambios en tamaño ni morfología.

Efecto del ácido peracético en el desarrollo de podredumbres en pimiento var California.

- Los pimientos inoculados con *Botrytis* y *Cladosporium* desarrollaron la podredumbre más rápidamente, que *Alternaria* y *Penicillium*. En el caso de *Alternaria*, *Botrytis* y *Cladosporium*, la menor incidencia se obtuvo para la dosis comercial (300 ppm). Mientras que para los frutos inoculados con *Penicillium*, el tratamiento con peracético en las dos concentraciones (300 y 450 ppm) favoreció el desarrollo de la enfermedad.
- La dosis de 450 ppm aumentó la incidencia de podredumbres en *Alternaria*, *Cladosporium* y *Botrytis* por encima que el tratamiento testigo. Se piensa que el elevado poder oxidante de los productos de reacción (oxígeno y ácido acético) pudieron dañar la microbiota natural de la epidermis del fruto y la permeabilidad de las membranas, facilitando de esta forma el desarrollo de la infección.
- Al analizar conjuntamente la incidencia y severidad a través IDP (Índice de Desarrollo de Podredumbres), se apreció que la dosis comercial utilizada por la empresa fue la más efectiva contra el desarrollo de las podredumbres causadas por *Botrytis*, *Alternaria* y *Cladosporium*. Al contrario que ocurre en los frutos inoculados con *Penicillium*, estos se pudrieron más al ser tratados con peracético, sobre todo con la concentración de 300 ppm.

Bibliografía

5. Bibliografía

Álvaro, J.E., Moreno S, Diane, F; Santos, M ; Carrasco, G ; Urrestarazu, M. 2009. Effects of peracetic acid disinfectant on the postharvest of some fresh vegetables. *Journal of Food Engineering*: 11-15.

Baldry M. G. C. 1983 The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *Issue Journal of Applied Bacteriology Journal of Applied Bacteriology* 11 vol: 54 (3) pp: 417-423.

Baldry, M. G. C, French, M. S. 1989. "Disinfection of sewage effluent with peracetic acid". *Water Sci. Technol.* 21(3), 203-206.

Barkai-Golan R. 2001 Postharvest diseases of fruits and vegetables. *Development and control*. Ed. ELSELVIER. 320-329.

Boletín Oficial de la Región de Murcia Orden 4 Agosto del 2014 de la Consejería de Agricultura y Agua por la que se regulan las normas técnicas de producción integrada del cultivo del pimiento en el invernadero.

Boletín Oficial de la Región de Murcia Orden 5 Mayo del 2015, por la que se modifican la orden del 4 de Agosto del 2014, de la Consejería de Agricultura y Agua por las que se regulan las normas técnicas de producción integrada del cultivo del pimiento en el invernadero.

Cuervo-Usán Y., Tornos-Mauri P., Hernández-Domínguez J. C, Orihuela-Calvo D., Domínguez-Hernández M. E. y Moreno-Martínez E. 2014 Eficacia de peróxidos en la desinfección de suelos aptos para el cultivo de fresa en el mediterráneo. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol 37. 393-398.

Dempsey, D.A., Shah, J., Klessing, D.F. 1999. Salicylic acid and disease resistance in plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18: 547-575

Falsanisi D., Gehr R., Santoro D., Dell'Erba A., Notarnicola M., Liberti L. 2006. Kinetics of PAA demand and its implications on disinfection of wastewaters. *Water Qual. Res. J. Canada*, Volume 41, 398-409.

Fernandez P., Pascual J. A., Lacasa A. 2014. Potencial de lixiviación de nitratos de la técnica de biosolarización en suelos de invernaderos de pimiento. V Jornadas de Fertilización SECH. *Actas de Horticultura* 66. 107-115.

González, S., Domingez, P., Rodriguez, A., Gallo, L. 2002. Comportamiento de formulados comerciales de biocontrol frente a *Phytophthora cinnamomi* Rands. En: XI Congreso Nacional de la SEF, Almería, 14-18 octubre. Resúmenes, 271.

Hammer, P.A. 1981. Statistics: A tool for the horticultural scientist. *HortScience*, 16(5): 620-640.

Jin-quiang T., Zi-de Z., Hi-Zhou C. 2004. Inhibition Effect of Preservatives on *Botrytis cinérea* and *Alternaria* spp from Red Global Grape.

Katan, J. 2005. Soil disinfestation: One minute before Methyl Bromide phase out. *Procedures of VI th International Symposium on Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate Disinfestation. Acta Horticulturae*, 698: 19-25v.

Kramer N.1997. Peracetic acid: a new biocide for industrial water applications.

Kyanko M. V., Russo M. L, Fernández M., Pose G. 2010 Efectividad del Ácido peracético sobre la reducción de la carga de Esporas de Mohos. *Información Tecnológica*.Vol. 21(4), 125-130.

Lacasa A., Girao P. 1997. Investigaciones actuales sobre alternativas al uso del bromuro de metilo en pimiento de invernadero. En: A. López, J.A. Mora. (eds.) *Posibilidad de alternativas viables al bromuro de metilo en pimiento de invernadero*.

Publicaciones de la Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Región de Murcia. Jornadas, 11: 21-36.

Mari, M ; Bertolini, P., Pratella, GC . Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases 2003. Journal of applied microbiology. Vol 94, 761-766.

Mari, M., Cembali, T., Baraldi, E., and Casalini, L. 1999. Per acetic acid and chlorine dioxide for postharvest control of *Monilinia laxa* in stone fruits. Plant Dis. 83:773-776.

Martínez-Hernández G. B., Ponce C. E., Navarro-Rico J., Gómez P. A., Artés F., Artés-Hernández F. 2011. Emerging Sanitizing Techniques on Inoculated Bimi™ Broccoli. II ISHS International Conference on Quality Management of Fresh Cut.

Martínez M. A., Guerrero M. M., Martínez M. C., Torres J., Ros C., Lacasa, A. 2005. Variaciones temporales en la micoflora fúngica de los suelos cultivados de pimiento bajo invernadero. En: Actas del IV Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas, Oporto (Portugal) 22-27 mayo. Vol. 7: 126-129.

Martinez Francés M. A., Lacasa Plasencia A., Tello Marquina J. C. 2009 Ecología de la Microbiota fúngica de los suelos de los invernaderos de pimiento y su interés agronómico. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino.

Nuez F., Diez M. J., Ruiz J. J., Fernández de Cordova P., Costa J., Catalá M. S., González J. A., Rodríguez A. 1998. Catálogo de semillas de pimiento. Monografías INIA N1 105. MAPA, Madrid, 108 pp.

Palou, L. 2007. Evaluación de alternativas para el tratamiento antifúngico en poscosecha de cítricos de Producción Integrada. Horticultura, Vol. XXV, núm. 3 junio 2007, pág. 82 - pág. 93.

Recolección y manipulación del pimiento. Plataforma del conocimiento para el medio rural y marino. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

Reche Marmol J. 2010 Cultivo del pimiento en invernadero. Junta de Andalucía.

Rincón L., Pérez A., Abadía A, Sáez J, Pellicer C. 2005. Fertirrigación localizada en un cultivo de pimiento grueso de invernadero en producción integrada II. Lixiviación de nutrientes. *Agrícola Vergel*, 287: 547-551.

Rodges, SL; Cash, NJ, Siddiq, M E T 2004. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O1 57:H7 y *Listeria monocytogenes* in solution and in apple, lettuce, strawberries and cantalupe. *Journal of food Protection* 67(4):721-731.

Rossi S., Antonelli M, Mezzanotte V, Nurizzo C . 2007. Peracetic acid disinfection: a feasible alternative to wastewater chlorination. *Water Environment Research* 79, 341 -350.

Rutala W., Gergen M., Weber D. 1998. Comparative evaluation of the sporicidal activity of new-lowtemperatura sterilization technologies: Ethylene oxide, 2 plasma sterilization systems, and liquid peracetic acid. *Infection control and Epidemiology, Inc.* 17/46/87595.

Sapers G. M. 2001. Efficacy of washing and saniticing methods. *Food technology and Biotechnology.* 39, 305-311.

Sarig, P, Zahui T., Zutkhi Y., Yannai, S., Lisker N., Ben-Arie R. 1996. Ozone for control of postharvest decay of table grapes caused by *Rhizopus stolonifer*. *Physiol Molecular Plant Pathology*. 48. 403-415.

Smilanick J. L., Crisosto C., Mlikota F. 1999. Postharvest use of ozone on fresh fruit. *Perishables Handling Quarterly Issue* . 99. 10-14.

Snowdon A. L. 1991 *Atlats of pos-harvest diseases and disorders of fruit and vegetables..* Ed Wolfe.Vol. 2. 68-69.

Spalding, D.H., Reeder, W.F. 1976. Low pressure (hypobaric) storage of limes. *J. Amer. Hort. Soc.* 101, 367-370.

Tello, J. C., Lacasa, A., Vares, F., Mijares, A. 1987. Alteraciones radiculares en pimiento y habas de origen no parasitario. *Cuadernos de Fitopatología*, 10: 38-41.

Tuset, J.J. 1999. Perspectivas del control de las podredumbres en la postcosecha de cítricos. *Levante Agrícola. Especial Postcosecha*, 348. 272-280.

Vélez, M. J. 2006. Evaluación de diversas sustancias como alternativa a los fungicidas tradicionales en el control de podredumbres de limón (*Citrus limon* L., Burm.). Proyecto Fin de Carrera. Universidad Politécnica de Cartagena. Cartagena. Vero, S.; Garmendia, G.; Garat, F.; Alaniz, S.; de Aurrecoechea, I.; Wozniak, A.; Silvera E.. Alternativas al tratamiento convencional en poscosecha de Citrus.

Yahayazadeh M., Omidbaigi R., Zare R. Taheri H., . 2003 Effect of some essential oils on mycelial growth *Penicillium digitatum* Sacc.. World journal of microbiology&biotechnology. Vol 24. 144-1450