

Efectividad del Dióxido de Cloro, en Función de la Concentración, pH y Tiempo de Exposición, en el Control de *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Rhizopus stolonifer*

J.P. Zoffoli¹, B.A. Latorre, N. Daire y S. Viertel

Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal,
Departamento de Fruticultura y Enología,
Pontificia Universidad Católica de Chile,
Casilla 306-22, Santiago, Chile

Abstract

J.P. Zoffoli, B.A. Latorre, N. Daire, and S. Viertel. Effectiveness of chlorine dioxide as influenced by concentration, pH, and exposure time on spore germination of *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Rhizopus stolonifer*. Chlorine dioxide (ClO₂) is an alternative to hypochlorites (NaOCl, Ca(OCl)₂) for fruit and vegetable sanitization to reduce postharvest decays caused, among other fungi, by *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Rhizopus stolonifer*. Due to economical reasons and because of its explosiveness, the use of chlorine dioxide has been relatively limited. However, the development of stabilized commercial formulations has allowed to reintroduce it. In this study, the efficacy of a new stabilized chlorine dioxide formulation (Tecsca®Clor, Protecsa S.A., Santiago, Chile) to inhibit conidial germination of *B. cinerea* and *P. expansum*, and sporangiospore germination of *R. stolonifer* was demonstrated. The efficacy was dependent primarily on concentration and exposure time but it was also affected by pH. Conidia germination of *B. cinerea* was inhibited over 98% at concentrations higher than 75 or at 25 µg·mL⁻¹ after 1 or 30 min of contact, respectively. Similarly, over 90% inhibition of conidial germination of *P. expansum* was achieved with 100 and 25 µ·mL⁻¹ after 1 and 30 min, respectively. Sporangiospores of *R. stolonifer* were inhibited by 90% at 100 µg·mL⁻¹ for 30 min. The pH of the solution increased as chlorine dioxide concentration increased, and the biological activity decreased considerably at pH higher than 8, after 5 and 15 min of contact. No phytotoxic effects were obtained on pear cv. Packham's Triumph even at 1000 µg·mL⁻¹ after 20-day-exposure at 20 °C. Therefore the stabilized commercial formulation of chlorine dioxide is an alternative to chlorinate water to treat fruits by immersion in order to control *B. cinerea*, *P. expansum* and *R. stolonifer* during postharvest. For a complete control, concentrations higher than 75 µg·mL⁻¹ should be used at pH between 7 and 8.

Key words: Apple, citrus, peach, pear, postharvest diseases, sweet cherry.

Cien. Inv. Agr. 32(3): 181-188. 2005

INTRODUCCION

Las enfermedades de poscosecha tienen gran importancia para el éxito de la

comercialización de la fruta de Chile en los mercados internacionales. El prolongado transporte a los puertos de destino, como asimismo la necesidad de conservar la fruta

por el más largo tiempo que sea posible, favorecen el desarrollo de las enfermedades, permitiendo la expresión de pudriciones blandas y acuosas, las que en pomáceas, drupáceas y otras frutas, son causadas principalmente por *Botrytis cinerea* Pers., *Penicillium expansum* Link y *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. (Latorre, 2004; Ogawa and English, 1991).

Las fuentes de inóculo se encuentran comúnmente en el huerto de modo que la fruta infectada eventualmente lo dispersa, contaminando el agua empleada en el hidrofriador, lavado, en pozos de vaciado o en transporte de la fruta en la línea de embalaje, motivo por el cual la sanitización es una importante estrategia de control. Con este propósito, el tratamiento de la fruta por inmersión en solución clorinada con hipocloritos (NaOCl , $\text{Ca}(\text{OCl})_2$) ha sido ampliamente utilizada (Segall, 1968, Spotts y Peters, 1980, Zoffoli *et al.*, 1996). Los hipocloritos de sodio y calcio se disocian en agua y dependiendo del pH de la solución forman ácido hipocloroso (HOCl), ácido hipocloroso (HCl) y cloro gaseoso (Cl_2), siendo el ácido hipocloroso la forma biológicamente más activa. Adicionalmente, se ha propuesto el uso de dióxido de cloro (ClO_2) (EPA, 1999); este gas aunque soluble y estable en agua es altamente explosivo bajo presión lo que obliga a su generación *in-situ* a través de la mezcla controlada a base de hipoclorito sodio y ácido clorhídrico (HCl) o ácido sulfúrico (H_2SO_4). Esto, sumado al costo de producción, ha dificultado su comercialización y ha limitado el uso de dióxido de cloro para el tratamiento de agua, frutas y hortalizas. Sin embargo, el desarrollo de formulaciones estabilizadas ha permitido reintroducir el dióxido de cloro con estos propósitos (EPA, 1999).

El dióxido de cloro tiene una amplia acción biocida, siendo especialmente útil como fungicida y bactericida (Benarde, *et al.*, 1965;

Du *et al.*, 2003; EPA, 1999; Spotts y Peters, 1980). Actúa por contacto directo, como desinfectante superficial, pero carece de residualidad que permita proteger el fruto durante el transporte y almacenamiento. Es un oxidante, biológicamente muy efectivo en concentraciones relativamente bajas a pH entre 5 y 10. Presenta múltiples sitios de acción bioquímica sobre los microorganismos, interfiriendo la acción de algunas proteínas, del ácido ribonucleico y altera la funcionalidad de las membranas celulares. En solución acuosa, es más estable que otros compuestos clorinados, levemente fijado por la materia orgánica, poco corrosivo y libre de olor. Este trabajo tuvo como objetivos estudiar la efectividad de una nueva formulación estabilizada de dióxido de cloro sobre la germinación de esporas de *B. cinerea*, *P. expansum* y *R. stolonifer*, hongos comúnmente encontrados como contaminantes de los pozos de vaciado de la fruta en poscosecha.

MATERIALES Y METODOS

Inóculo. Conidias de *B. cinerea* y *P. expansum* y esporangiosporas de *R. stolonifer*, desarrolladas en cultivos de 7 a 15 días de edad, incubados a 20 °C en agar papa dextrosa acidulado con 0,5 mL·L⁻¹ (APDA), se extrajeron con agua desionizada estéril y se filtraron en lana de vidrio. El filtrado obtenido se agitó por 3 min antes de ajustar la concentración final de la suspensión de esporas a 10⁶·mL⁻¹.

Dióxido de cloro. En este trabajo se utilizó dióxido de cloro (ClO_2) formulado como Tecca@Clor (Proteca S.A., Santiago, Chile) que contiene 5% (p/p) de ClO_2 , estabilizado, sin cloro libre u otros cloritos y carente de efecto residual. Las diferentes concentraciones de ClO_2 se obtuvieron diluyendo el producto formulado con agua destilada, libre de fuentes de cloro, en el mismo día de uso. La concentración exacta

de ClO_2 en la solución se determinó utilizando el método, propuesto por EPA (Environmental Protection Agency, USA) y descrita por la APHA (1998), el cual considera la titulación con sulfato de amonio ferroso 0,1% utilizando N,N-dietil-p-fenilendiamina (DPD) como indicador.

Efecto de la concentración y del tiempo de exposición. La germinación de las esporas se estudió en función del tiempo de exposición y de la concentración a 10 °C empleando para estos efectos 0, 10, 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ClO_2 . Luego de exponer las esporas a cada concentración por 1, 5, 10, 15 o 30 min se tomó 100 μL de la respectiva suspensión y se sembró en agar agua al 2% por 18 h a 20°C. La germinación de las esporas se determinó en 100 esporas por cada una de cuatro repeticiones. Sólo se consideró como germinadas las esporas que presentaron un tubo germinativo igual o superior al diámetro de la espora. Los resultados se expresaron como porcentaje de esporas germinadas en relación al número total de esporas de cada repetición. Este trabajo se repitió una vez.

Efecto del pH. Se estudió la efectividad del dióxido de cloro (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en solución tampón de fosfato de sodio a pH 7, 8 y 10, a 10 °C. El pH de la solución se ajustó combinando diferentes proporciones de las soluciones 0,1 M Na_2HPO_4 y 0,1 M NaH_2PO_4 . Las esporas se trataron por 5 y 15 min de exposición para luego determinar la germinación siguiendo el procedimiento antes descrito.

Fitotoxicidad. El efecto colateral del dióxido de cloro sobre la piel de frutos sensibles se estudió en peras cv. Packham's Triumph, (firmeza: 16,2 lb, sólidos solubles: 13,8% y acidez titulable: 0,21%) empleando 50, 150, 300, 500, 800 y 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de dióxido de cloro. La fruta a 0°C se expuso por 10 min a cada concentración y luego se

conservó por 7 días a 20°C antes de evaluar los posibles daños externos. Las situaciones dudosas se conservaron en iguales condiciones por 20 días.

Diseño y análisis estadísticos. El estudio sobre el efecto de la concentración y el tiempo de exposición se diseñó en forma completamente al azar y se analizó para varianza según un modelo factorial de SigmaStat (Systat Software Inc., Richmond, California, EUA), 3x5x6, en que el factor principal fue el patógeno y los subfactores fueron el tiempo de exposición y la concentración. Todos los experimentos adicionales se diseñaron en forma completamente al azar con cuatro repeticiones y los promedios se separaron de acuerdo con Duncan-Waller k ratio t test. Los valores porcentuales se transformaron en $\arcsen\sqrt{x}$, antes de los análisis.

RESULTADOS

Efecto de la concentración y del tiempo de exposición. La germinación de las esporas de *B. cinerea*, *R. stolonifer* y *P. expansum* varió entre un 0 y 100 % en función del patógeno, de la concentración y del tiempo de exposición (Cuadro 1). Hubo un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,001$) para el factor patógeno (P), tiempo de exposición (T_e) y concentración (C) y del mismo modo fueron muy significativas ($p < 0,001$) las interacciones $P \times T_e$, $P \times C$, $T_e \times C$ y $P \times T_e \times C$ (Cuadro 2). En las condiciones de este experimento el aumento de la concentración de dióxido de cloro determinó un considerable cambio del pH, variando desde 8 a 10 aproximadamente al aumentar la concentración de dióxido de cloro de 10 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 1). En estas condiciones, concentraciones iguales o superiores a 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ inhibieron totalmente la germinación de las conidias de *B. cinerea*, pero aun 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de dióxido de cloro fue insuficiente para

conseguir igual efecto en la germinación de las conidias de *P. expansum* y de las esporangiosporas de *R. stolonifer*,

obteniéndose, respectivamente, 9 y 2,4% de germinación luego de 30 min de exposición (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de la concentración y tiempo de incubación de soluciones de dióxido de cloro en germinabilidad de las conidias de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* y esporangiosporas de *Rhizopus stolonifer*.

Table 1. Effect of concentration and exposure time on conidial germination of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* and sporangiospores of *Rhizopus stolonifer*

| Dióxido de cloro ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) | Germinación (%) luego del tiempo de exposición indicado (min) ¹ | | | | |
|--|--|-------|-------|------|------|
| | 1 | 5 | 10 | 15 | 30 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | | | | | |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 10 | 100,0 | 98,0 | 91,0 | 98,6 | 99,5 |
| 25 | 100,0 | 100,0 | 90,4 | 87,8 | 0,9 |
| 50 | 79,1 | 55,5 | 47,7 | 55,1 | 0,9 |
| 75 | 2,0 | 0,9 | 1,4 | nd | 0,0 |
| 100 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Penicillium expansum</i> | | | | | |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 10 | nd | 90,2 | 68,5 | 36,0 | 19,2 |
| 25 | 24,4 | nd | 24,0 | 8,2 | 3,1 |
| 50 | 37,9 | 45,9 | 10,7 | 15,1 | 7,1 |
| 75 | 43,7 | 45,4 | 18,8 | 6,8 | 0,5 |
| 100 | 6,9 | 12,3 | 5,1 | 7,8 | 9,0 |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> | | | | | |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 10 | 100,0 | 100,0 | 99,4 | 98,1 | nd |
| 25 | 100,0 | 96,3 | 100,0 | 96,3 | 72,6 |
| 50 | 100,0 | 80,9 | 100,0 | 92,1 | 87,2 |
| 75 | 91,0 | 91,5 | 83,8 | 38,7 | 17,6 |
| 100 | 100,0 | 87,3 | 65,8 | 20,9 | 2,4 |

¹Porcentaje de germinación calculado del testigo sin dióxido de cloro. La germinación de las esporas en el testigo fue superior a 90, 85 y 65% para *B. cinerea*, *R. stolonifer* y *P. expansum* respectivamente. nd = no determinado. Percentage of spore germination relative to untreated control. Spore germination without chlorine dioxide was 90.85 and 65% for *B. cinerea*, *R. stolonifer* and *P. expansum* respectively. nd = not determined.

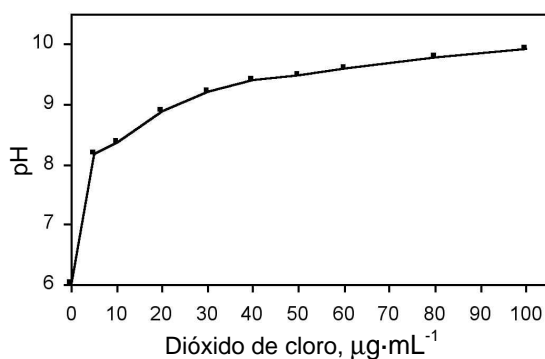


Figura 1. Variación del pH de la solución acuosa de dióxido de cloro (Tecsá®Clor) en función de la concentración.

Figure 1. The effect concentration on pH of an aqueous solution of chlorine dioxide (Tecsá®Clor).

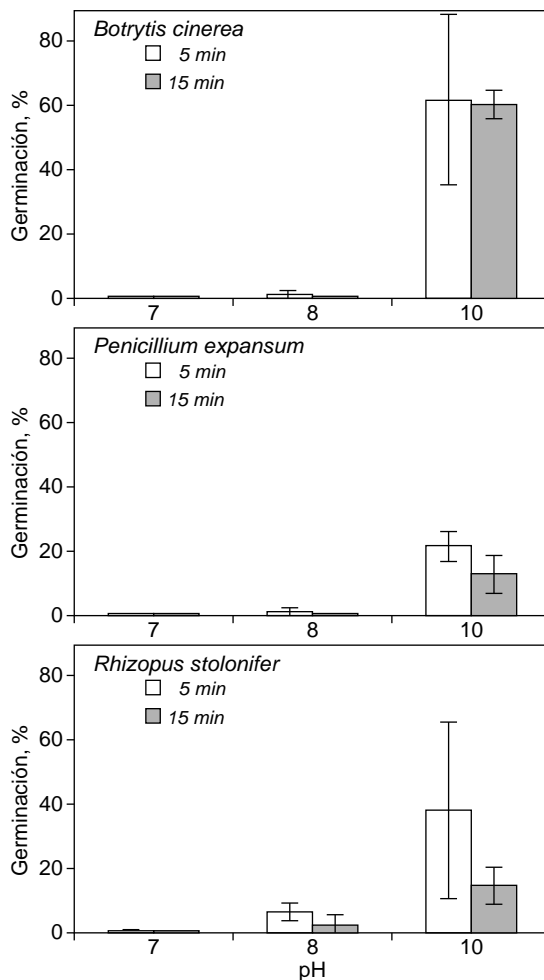


Figura 2. Efecto del pH sobre la actividad biológica de una solución acuosa de dióxido de cloro ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) determinada por la germinabilidad de conidias de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* y esporangiosporas de *Rhizopus stolonifer*, determinada después de 5 y 15 min de exposición a 10°C . Promedios de cuatro repeticiones, barras = desviación estándar.

Figure 2. Effect of pH on the biological activity of an aqueous solution of chlorine dioxide ($50 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) determined at 10°C by the conidial germination of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*, sporangiospores of *Rhizopus stolonifer*, after 5 and 15 min of contact. Means of four replicates of 100 spores, bars = standard deviation.

Efecto del pH. La efectividad del dióxido de cloro dependió del pH final de la solución, disminuyendo considerablemente en la medida que el pH aumentó entre 7 y 10, manteniendo constante la concentración en $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 2). Por ejemplo, en 5 min de exposición a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de dióxido de cloro a pH 7 y 8 hubo un 100% del inhibición de la germinación de las conidias

de *B. cinerea* mientras que en iguales condiciones a pH 10 sólo se obtuvo un 38 % de inhibición. En forma similar la inhibición de las esporangiosporas de *R. stolonifer* y conidias de *P. expansum* fue total a pH 7 y sólo parcial a pH 10, con 62,1 y 78,3 % de inhibición de la germinación respectivamente en 5 min de exposición (Figura 2).

Cuadro 2. Análisis de varianza indicando los efectos de la especie patógena, del tiempo de exposición y de la concentración sobre la efectividad del dióxido de cloro para inhibir la germinación de las conidias de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* y esporangiosporas de *Rhizopus stolonifer*.

Table 2. Analysis of variance for the effect of pathogen, incubation and concentration on the effectiveness of chlorine dioxide to inhibit conidial germination of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* and sporangiospores of *Rhizopus stolonifer*.

| Causa de variación | g.l. | CM | F | p |
|---------------------------|------|---------|-----------|--------|
| Patógeno (P) | 2 | 8.360 | 1.485.402 | <0,001 |
| Tiempo de exposición (Te) | 4 | 1.990 | 353.654 | <0,001 |
| Concentración (C) | 5 | 11.166 | 1.083.993 | <0,001 |
| P x Te | 8 | 0,238 | 42.212 | <0,001 |
| P x C | 10 | 1.175 | 208.778 | <0,001 |
| Te x C | 20 | 0,156 | 27.806 | <0,001 |
| P x Te x C | 40 | 0,191 | 33.930 | <0,001 |
| Residual | 245 | 0,00563 | | |
| Total | | | | |

¹Previo al análisis, los valores porcentuales fueron transformados en $\arcsen\sqrt{x}$.

Data were transformed to $\arcsin\sqrt{x}$ before analysis.

Fitotoxicidad. No hubo signos de fitotoxicidad asociados a los tratamientos con dióxido de cloro cuando este se aplicó entre 50 y 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. No obstante, hubo acumulación de sales sobre la superficie de la fruta pero estos no dañaron el fruto aun después de 20 días de exposición a 20°C.

DISCUSION

Los productos que se disocian en ácido hipocloroso en agua, como son hipoclorito de sodio y calcio han sido ampliamente utilizados en la sanitización de frutas y hortalizas en poscosecha. La recomendación establece una concentración mínima de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cloro libre a pH 7 (Roberts y Reymond, 1994; Spotts y Peters, 1980; Zoffoli *et al.* 1996). Sin embargo, su uso está limitado por el efecto irritante, acción corrosiva, pérdida de cloro por volatilización

y fijación con la materia orgánica, además de la baja actividad a pH superior a 7. En función de los aspectos anteriores, son numerosos los esfuerzos por buscar alternativas como el dióxido de cloro (EPA, 1999; Robert y Reymond, 1994; Spotts y Peters, 1980).

La principal propiedad del dióxido de cloro es su poder oxidante cuando es reducido a ión clorito (ClO_2^-) con un pka de 1,8; considerado relativamente bajo, lo que permite mantener su actividad biológica en un amplio rango de pH. No obstante, la eficacia del dióxido de cloro, formulado y estabilizado, en el control de la germinación de conidias de *B. cinerea* y *P. expansum* y esporangiosporas de *R. stolonifer* dependió de la concentración, tiempo de exposición y del pH de la solución.

La combinación óptima entre tiempo y concentración para la inhibición total de la germinación de conidias de *B. cinerea* y *P. expansum* se consiguió con 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 1 min y 30 min de exposición respectivamente. En forma similar, las esporangiosporas de *R. stolonifer* requirieron de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 30 min para una total inhibición de la germinación. Estos valores son diferentes a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 1 min reportado en el control de conidias de *Monilia laxa* en nectarines (Mari *et al.*, 1999), o 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 0,5 min en la germinación de esporas de *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Mucor piriformis* (Spotts y Peters, 1980). Robert y Reymond (1994) en estos mismos patógenos, encontraron 99% de mortalidad en soluciones de 3-5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 1 min de exposición.

La menor eficacia de la formulación de dióxido de cloro, evaluada en este trabajo, en relación a lo reportado en la literatura (Robert y Reymond, 1994, Spotts y Peters, 1980) para dióxido de cloro producido *in situ* (NaOCl y HCl), se atribuye

principalmente al pH alcalino que se generó en la solución preparada con $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de dióxido de cloro de la formulación comercial empleada en este trabajo. En efecto, el pH subió al aumentar la concentración de dióxido de cloro mientras que la efectividad biocida disminuyó (Figuras 1 y 2), requiriéndose mayor tiempo de exposición o incremento de la concentración para lograr un efecto similar. Por lo tanto, la recomendación de uso de dióxido de cloro formulado requiere verificar o modificar el pH para optimizar la capacidad de sanitización de este producto.

De acuerdo con los resultados de este trabajo el dióxido de cloro es una alternativa al uso de hipocloritos para la sanitización de peras y posiblemente también de otros frutos, permitiendo una reducción del potencial de inóculo al reducir la germinación de esporas de los principales hongos fitopatógenos asociados a pudriciones de poscosecha.

RESUMEN

El dióxido de cloro (ClO_2) es una alternativa al uso de hipocloritos (NaOCl , $\text{Ca}(\text{OCl})_2$) útil para la sanitización de la fruta en poscosecha y reducir el riesgo de pudriciones causadas entre otros por *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* o *Rhizopus stolonifer*. Razones económicas y la explosividad de este gas al mantenerlo bajo presión han limitado su uso. Sin embargo, el desarrollo de formulaciones comerciales, estabilizadas, ha permitido reintroducir el dióxido de cloro con estos propósitos. En este trabajo se demostró la eficacia de este compuesto, formulado y estabilizado (Tecs@Clor, Protecsa S.A., Santiago, Chile), en el control de la germinación de conidias de *B. cinerea* y *P. expansum* y esporangiosporas de *R. stolonifer*. Sin embargo, la efectividad de este producto dependió primeramente de la concentración y del tiempo de exposición, pero también tuvo importancia en la mortalidad de las esporas el pH de la

solución. Una concentración de dióxido de cloro > 75 o $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 1 o 30 min de exposición, respectivamente, inhibió en más de 98% la germinación de conidias de *B. cinerea*. En forma similar, se obtuvo sobre un 90% de inhibición de la germinación de conidias de *P. expansum* con 100 y $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 1 y 30 min, respectivamente. La germinación de esporangiosporas de *R. stolonifer* se inhibió por sobre un 90% únicamente con $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 30 min. El pH de la solución acuosa de dióxido de cloro aumentó considerablemente con la concentración, disminuyendo la efectividad con pH superior a 8, tanto luego de 5 como 15 min de exposición. No hubo efectos fitotóxicos en peras cv. Packham's Triumph aun expuestas a concentración de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, luego de 20 días a 20°C . Por lo tanto, el dióxido de cloro formulado comercialmente es una alternativa para el control de *B. cinerea*, *P. expansum* y *R. stolonifer* en poscosecha. Sin embargo, se recomienda corregir la dosis en función de los patógenos predominantes y verificar el pH de la solución de modo que esta permanezca entre 7 y 8.

Palabras clave: Cerezo, cítricos, duraznero, enfermedades de poscosecha, manzano, peral.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento recibido de Protecsa S.A., Santiago, Chile que permitió realizar esta investigación.

LITERATURA CITADA

- APHA. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Benarde, M.A., B.M. Israel, V.P. Olivieri, and M.L. Granstrom. 1965. Efficiency of chlorine dioxide as bactericide.

- Applied Microbiology 13:776-780.
- Du, J., Y. Han, R.H. Linton. 2003. Efficacy of chlorine dioxide gas in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on apple surfaces. Food Microbiology 20:583-591.
- EPA. 1999. Chlorine dioxide. p. 4.1-4.41 In: EPA Guidance Manual. Alternative Disinfectants and Oxidants. Environmental Protection Agency, USA. www.epa.gov/safewater/mdbp/pdf
- Latorre, 2004. Enfermedades de las Plantas Cultivadas. Sexta Ed. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile 638 p.
- Mari, M., T. Cembali and L. Casalini. 1999. Paracetic Acid and Chlorine Dioxide for Postharvest Control of *Monilia laxa* in stone fruits. Plant Disease 83: 773-776.
- Ogawa, J.M. and H. English. 1991. Diseases of Temperate Zone Tree Fruit and Nut Crops. Publication 3345. Div. of Agric. And Nat. Res. University of California. Oakland, California, USA. 461 p.
- Roberts, R.G. and S.T. Reymond. 1994. Chlorine dioxide for reduction of postharvest pathogen inoculum during handling of tree fruits. Applied and Environmental Microbiology 60:2864-2868.
- Segall, R.H. 1968. Fungicidal effectiveness of chlorine as influenced by concentration, temperature, pH, and spore exposure time. Phytopathology 68:1412-1413.
- Spotts, R.A. and B.B. Peters. 1980. Chlorine and chlorine dioxide for control of d'Anjou pear decay. Plant Disease 64:1095-1097.
- Zoffoli, J.P., B.A.Latorre, y S. Bariggi. 1996. Sistemas de sanitización de aguas en centrales frutícolas. ACONEX 51:10-15.