



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Título:

**“Biomarcadores de la interacción *Fragaria x ananassa*-*Botrytis cinerea*
durante el desarrollo de la infección”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA:

Q.F.B. RICARDO SANDOVAL PÉREZ

ASESOR D.C. LOURDES IVETH MACÍAS RODRÍGUEZ

SINODALES

D.C. EDUARDO VALENCIA CANTERO

D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

D.C. JOSÉ LÓPEZ BUCIO

D.C. ÁNGEL GABRIEL ALPUCHE SOLÍS

Morelia, Michoacán Junio de 2008

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LOS LABORATORIOS DE BIOQUÍMICA
ECOLOGICA Y ECOLOGÍA MICROBIANA DEL INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD
MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO BAJO LA DIRECCIÓN DE
D.C. LOURDES I. MACÍAS RODRÍGUEZ Y D.C. EDUARDO VALENCIA
CANTERO.

DEDICATORIA

A mi familia

“Mis hijos, mi esposa y mi mamá, son la base de mi vida y sin su apoyo esto no hubiera sido posible”.

AGRADECIMIENTOS.

Al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, por permitirme la entrada al programa de maestría.

A CONACYT, por el financiamiento con la beca otorgada para desarrollar este estudio de postgrado.

A COECYT, por el apoyo económico con la beca otorgada para concluir con el presente trabajo.

A mi asesores de tesis. A la **D.C. Lourdes I. Macías Rodríguez**, porque me apoyó y asesoro no solo en el aspecto académico, gracias por ser mi guía y porque siempre confío en mí para la realización de este proyecto. También muchas gracias al **D.C. Eduardo Valencia Cantero** por permitirme trabajar en su laboratorio, por su apoyo en cuanto a disposición de equipo, materiales, reactivos y porque con sus consejos durante el desarrollo de este trabajo.

A mi comité de sinodales. Por sus comentarios y experiencia para enriquecer este trabajo. Gracias al **D.C. José López Bucio** por permitir el empleo de su microscopio para la observación y adquisición de fotografías. También se agradece al **D.C. Rafael Salgado Garciglia** el haber facilitado la disposición de su laboratorio, reactivo, equipo y material vegetal sobre todo para la micropropagación de plantas. Finalmente se agradece al **D.C. Ángel G. Alpuche Solís** por su instrucción y experiencia compartida en el campo de biología molecular.

A mis hijos, **Miguel y Diego** son mi orgullo, mi motivo para seguir adelante y mi vida es dichosa gracias a ustedes.

A mi esposa, **M.C. Mayra Millán Godínez**. Por siempre compartir su vida, por apoyarme y no dejarme caer cuando todo fue adverso, también por no dejarme solo, soportarme y confiar en mí. Sin ti no hubiera superado muchas cosas y tampoco habría logrado esto.

A mi mamá, **Q.F.B. María Guadalupe Pérez Chávez**. Por siempre apoyarme tanto económicamente como emocionalmente, porque siempre estás ahí cuando te necesito y nunca dejarme solo. Gracias por creer en mí. Nunca te defraudare y este logro nunca se hubiera logrado sin tu impulso. Gracias por siempre salvarme en momentos de adversidad.

A mi hermano, **Pasante de Medicina Alonso Sandoval Pérez**. Porque siempre está dispuesto a apoyarme cuando hay dificultades y en todo lo que realice. Gracias por ser mi hermano.

A mi papá, **Lic. Jaime Sandoval Arzate**. Porque sé que siente orgullo por mi trabajo y el lugar hasta donde he llegado. Gracias por poner como ejemplo el trabajo duro.

Al **Prof. Carlos Armenta**, por el apoyo brindado en cualquier momento durante el desarrollo de este trabajo y porque su amistad es muy valiosa. Gracias por su ayuda y sus consejos tan atinados.

A la **M.C Andrea Farías Escalera**. Por su constante ayuda durante los experimentos desarrollados en el laboratorio, porque gracias a sus enseñanzas y experiencia se obtuvieron realizaron procedimientos complicados en la parte molecular de este trabajo.

A la **M.C. Idolina Flores Cortez**. Gracias a su apoyo en el trabajo de laboratorio, ya que sin su ayuda algunos experimentos no hubieran sido posibles. Su experiencia en el área analítica y manejo de plantas fueron de gran ayuda en este proyecto.

Este trabajo también está dedicado a mis abuelos, tíos, primos y amigos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
RESUMEN.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. La Fresa.....	2
2.1.1. Importancia económica de la fresa en México.....	2
2.1.2. Características botánicas de la fresa.....	3
2.1.3. Características de la fresa cv Aromas.....	3
2.2. <i>Botrytis Cinerea</i>	5
2.2.1. Ciclo biológico.....	5
2.2.2. Ciclo de infección.....	6
2.3. Métodos para el control de <i>B. Cinerea</i>	8
2.3.1. Métodos preventivos y prácticas culturales.....	8
2.3.2. Control biológico.....	8
2.3.3. Control químico.....	9
2.4. Mecanismos involucrados en las interacciones planta-patógeno.....	9
2.4.1. Volátiles como un mecanismo de defensa en las plantas.....	10
2.5. Métodos para el estudio de la interacción planta-patógeno.....	11
2.5.1. Análisis de compuestos volátiles durante la interacción planta-patógeno.....	12
2.5.1.1. Técnicas de extracción de compuestos volátiles.....	15
2.5.1.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	17
2.5.2. Técnicas moleculares.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVO GENERAL.....	25
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26

8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
8.1. Material biológico.....	27
8.1.1. Micropropagación de plantas de fresa cv Aromas.....	27
8.1.1.1. Selección del medio de soporte para el análisis de compuestos volátiles.....	29
8.1.2. Mantenimiento de <i>B. Cinerea</i>	31
8.1.2.1. Hongo patógeno <i>B. Cinerea</i>	31
8.1.2.2. Siembra de <i>B. Cinerea</i> en medio PDA.....	32
8.1.2.3. Preparación de suspensiones de esporas de <i>B. Cinerea</i>	32
8.2. Infección de plantas de fresa cv Aromas con <i>B. Cinerea</i>	32
8.2.1. Forma de infección.....	33
8.2.2. Muestras.....	33
8.3. Análisis de compuestos volátiles.....	34
8.4. Análisis molecular por PCR y PCR en tiempo real.....	35
8.5. Análisis de datos.....	37
9. RESULTADOS.....	38
9.1. Sistema <i>in vitro</i>	38
9.1.1. Análisis de compuestos volátiles de las plantas infectadas.....	41
9.2. Sistema invernadero.....	46
9.2.1. Análisis de compuestos volátiles de las plantas infectadas.....	50
9.3. Análisis molecular.....	52
9.3.1. Amplificación de DNA de <i>B. Cinerea</i> por PCR y PCR en tiempo real con distintos oligonucleótidos.....	52
9.3.2. Amplificación por PCR y PCR en tiempo real de distintas combinaciones de DNA de <i>B. Cinerea</i> combinado con DNA de fresa cv Aromas.....	61
9.3.3. Amplificaciones por PCR de muestras que contienen distintas combinaciones de micelio de <i>B. Cinerea</i> y tejido de fresa cv Aromas.....	63
10. DISCUSIÓN.....	65
11. CONCLUSIÓN.....	72
12. LITERATURA CITADA.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Ciclo de infección de <i>B. Cinerea</i>	7
Figura 2. Compuestos volátiles identificados en las manzanas cv McIntosh infectadas exclusivamente con cada patógenos y los volátiles identificados en el control (manzana sin infectar).....	13
Figura 3. Diferencias en el perfil cromatográfico de los compuestos volátiles identificados en <i>B. Cinerea</i> (control) y la planta sana de fresa (control) en comparación con los volátiles identificados en la planta de fresa infectada.....	14
Figura 4. Diferencias en el perfil cromatográfico de los compuestos volátiles identificados en <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Penicillium chrysosenum</i> y <i>Stachybotrys chartarum</i>	15
Figura 5. Dispositivo para Microextracción en fase sólida (SPME).....	17
Figura 6. Estructura de un cromatógrafo de gases.....	18
Figura 7. Imagen de un cromatograma.....	19
Figura 8. Ejemplo de un espectro de masas que corresponde al 1-octen-3-ol.....	19
Figura 9. Análisis por PCR en tiempo real.....	22
Figura 10. Estrategia experimental.....	26
Figura 11. Planta de fresa cv Aromas en medio de brotación después de 4 semanas en la cámara de crecimiento.....	28
Figura 12. Planta de fresa cv Aromas en medio de enraizamiento después de 3 semanas en la cámara de crecimiento	28
Figura 13. Fotografía del medio agar-agua en el frasco para el sistema <i>in vitro</i> y perfil cromatográfico del medio de soporte agar-agua.....	29
Figura 14. Obtención de plantas de invernadero.....	32
Figura 15. Micelio de <i>B. Cinerea</i> en medio agar papa dextosa (PDA).....	32
Figura 16. Cámara de Neubauer y esporas de <i>B. Cinerea</i>	32
Figura 17. Forma de infección.....	33
Figura 18. Dispositivo de microextracción en fase sólida (SPME).....	34
Figura 19. Sintomatología de las plantas de fresa infectadas con diferentes suspensiones de esporas a diferentes tiempo en el sistema <i>in vitro</i>	39

Figura 20. Lesiones necróticas en las plantas de fresa <i>in vitro</i> a diferentes tiempos post-infección.....	40
Figura 21. Longitud de las lesiones necróticas en plantas de fresa <i>in vitro</i> a diferentes tiempos post-infección.....	41
Figura 22. Porcentaje de los compuestos volátiles identificados en los controles del sistema <i>in vitro</i>	42
Figura 23. Compuestos volátiles de interacción planta-patógeno en el sistema <i>in vitro</i>	45
Figura 24. Sintomatología de las plantas de fresa infectadas con diferentes suspensiones de esporas a diferentes tiempos en el sistema invernadero.....	47
Figura 25. Lesiones necróticas en las plantas de fresa invernadero a diferentes tiempos post-infección.....	48
Figura 26. Longitud de las lesiones necróticas en plantas de fresa invernadero a diferentes tiempos post-infección.....	48
Figura 27. Porcentaje de los compuestos volátiles identificados en los controles del sistema invernadero.....	49
Figura 28. Compuestos volátiles de interacción planta-patógeno en el sistema invernadero.....	51
Figura 29. Amplificación de <i>B. Cinerea</i> por PCR con los oligos AFP24 y AFP25.....	53
Figura 30. Curvas de amplificación de <i>B. Cinerea</i> por PCR en tiempo real con los oligos AFP24 y AFP25.....	53
Figura 31. Amplificación de <i>B. Cinerea</i> por PCR con los oligos C729+ y C729-.....	54
Figura 32. Curvas de amplificación de <i>B. Cinerea</i> por PCR en tiempo real con los oligos C729+ y C729-.....	55
Figura 33. Apareamiento de los oligos C729+ y C729-, BCN1F y BCN1R, BCN2F y BCN2R en la secuencia intergénica de <i>B. Cinerea</i>	55
Figura 34. Gradiente de temperatura de 53°C a 65°C con oligos BCN1F y BCN1R.....	56
Figura 35. Gradiente de temperatura de 65°C a 75°C para oligos BCN1F y BCN1R.....	57
Figura 36. Curvas de amplificación de <i>B. Cinerea</i> con oligos BCN1 por PCR en tiempo real.....	58
Figura 37. Gradiente de temperatura con oligos BCN2F y BN2R.....	58

Figura 38. Curvas de amplificación con oligos BCN2F y BCN2R por PCR en tiempo real.....	59
Figura 39. Curvas de amplificación con oligos BCN2F y BCN2R por PCR en tiempo real.....	59
Figura 40. Curva de melt con oligos BCN2F y BCN2R.....	60
Figura 41. Amplificación con oligos BCN2F y BCN2R por PCR combinando el DNA de <i>B. Cinerea</i> con el DNA de la fresa.....	61
Figura 42. Amplificación de con oligos BCN2F y BCN2R por PCR en tiempo real combinando el DNA de <i>B. Cinerea</i> con el DNA de la fresa.....	62
Figura 43. Amplificación de <i>B. Cinerea</i> con oligos BCN2F y BCN2R por PCR en muestras de micelio del hongo con tejido de fresa.....	64
Figura 44. Modelo en el cual se muestran los compuestos volátiles identificados a los distintos tiempos post-infección en las plantas de fresa infectadas por <i>B. Cinerea</i> en sistema <i>in vitro</i> durante el desarrollo de la infección.....	67
Figura 45. Modelo en el cual se muestran los compuestos volátiles identificados a los distintos tiempos post-infección en las plantas de fresa infectadas por <i>B. Cinerea</i> en sistema invernadero durante el desarrollo de la infección.....	70

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Posición taxonómica de la fresa.....	3
Tabla 2. Posición taxonómica de <i>B. Cinerea</i>	5
Tabla 3. Contenido de las soluciones stocks.....	27
Tabla 4. Volúmenes de las soluciones stock empleadas para la preparación del medio MS.....	27
Tabla 5. Solución nutritiva.....	31
Tabla 6. Solución con microelementos.....	31
Tabla 7. Compuestos volátiles identificados en muestras de <i>B. Cinerea</i>	43
Tabla 8. Compuestos volátiles de <i>B. Cinerea</i> identificados en plantas infectadas en el sistema <i>in vitro</i>	44
Tabla 9. Compuestos volátiles de <i>B. Cinerea</i> identificados en plantas infectadas en el sistema invernadero.....	50
Tabla 10. Compuestos volátiles como biomarcadores detectados en ambos sistemas (<i>in vitro</i> e invernadero).....	51
Tabla 11. Secuencia de los oligos AFP24 y AFP25.....	52
Tabla 12. Secuencia de los oligos C729+ y C729-.....	54
Tabla 13. Secuencia de los oligos BCN1F y BCN1R.....	55
Tabla 14. Secuencia de los oligos BCN2F y BCN2R.....	56
Tabla 15. Resumen de los resultados obtenidos por PCR en tiempo real.....	60
Tabla 16. Resultados obtenidos por PCR en tiempo real con los oligos BCN2F y BCN2R en muestras donde se combina el DNA de <i>B. Cinerea</i> con el DNA de la fresa.....	63

RESUMEN

El cultivo de la fresa es uno de los más importantes no solo en nuestro estado, también en el país. A lo largo de nuestra historia, el cultivo de la fresa se ha visto afectado por diversos factores entre ellos, los cambios climáticos, la falta de nuevas y mejores tecnologías y el padecimiento de enfermedades. La enfermedad más frecuente en la fresa es el moho gris, en la cual se daña seriamente a la producción de fresa en las etapas de pre-cosecha y post-cosecha por lo que de esta forma se originan pérdidas millonarias. Durante la enfermedad se generan lesiones necróticas, el hongo causa estragos en la planta debido a que su diseminación es veloz, se pudren los frutos y se genera un micelio algodonoso que va de una tonalidad blanca hasta una gris (Utkhede et al., 2001).

El agente causal del moho gris es el fitopatógeno necrotrófico *B. Cinerea* que se encuentra distribuido por todo el mundo. Este hongo tiene un ciclo de infección que consta de las fases de germinación, penetración, crecimiento y esporulación, además es muy difícil de erradicar porque puede sobrevivir en condiciones climáticas adversas y ha adquirido resistencia a la mayoría de los fungicidas. Por lo tanto el moho gris es un problema muy grave que puede presentarse durante cualquier etapa del desarrollo de la planta de fresa (Benito et al., 2000).

Para reducir este problema es sumamente importante implementar un método de diagnóstico que permita la detección de *B. Cinerea* en fresa en las etapas iniciales de la infección y en cualquier estado de desarrollo de la planta. Se han empleado diversos métodos para la detección de *B. Cinerea* en plantas, entre ellos bioquímicos, analíticos y moleculares, sin embargo la gran mayoría tienen sus limitaciones y no se han llevado a condiciones de campo.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue desarrollar un método de detección de *B. Cinerea* en plantas de fresa en las etapas de infección tempranas, mediante la búsqueda de compuestos volátiles como biomarcadores químicos de la presencia del hongo y mediante la amplificación del patógeno por PCR y PCR en tiempo real, empleando diversos oligonucleótidos.

Para llevar a cabo el estudio, se emplearon plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* cv *Aromas*) en un sistema *in vitro* e invernadero. Estas plantas fueron infectadas con 100 esporas/ml y mantenidas a una elevada humedad, para que desarrollaran la enfermedad. Posteriormente, para realizar la búsqueda de biomarcadores químicos se realizó la determinación de los compuestos volátiles de las plantas infectadas en ambos sistemas con la intención de identificar los compuestos volátiles del hongo y aquellos que resultaron de la interacción planta-patógeno a diferentes tiempos post-infección. De tal forma que para absorber los compuestos volátiles se empleó la técnica de Microextracción en Fase Sólida (SPME) y el método de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) para la separación e identificación de dichos compuestos.

Para la búsqueda de algún biomarcador molecular se realizaron experimentos de amplificación de *B. Cinerea*, para esto se probaron diversos oligos con los métodos de PCR y PCR en tiempo real aplicados a muestras del hongo, muestras de DNA de planta combinado con DNA del hongo y muestras de hoja de fresa combinada con micelio del hongo. También se tuvieron que estandarizar las condiciones de reacción del PCR en tiempo real, ya que es una herramienta de reciente adquisición y aunado a esto también se diseñaron dos pares de oligos nuevos (BCN1 y BCN2).

De esta forma los resultados mostraron que durante el análisis de compuestos volátiles, se identificaron compuestos que pueden ser utilizados como biomarcadores químicos de la presencia del hongo en la planta de fresa, tal es el caso de los compuestos volátiles 3-octanona, el derivado del ácido propanoico, el *p*-xileno y *o*-cimeno. Estos compuestos fueron detectados tanto en el sistema *in vitro* como en el sistema invernadero.

Por otra parte, los oligos BCN2 que fueron diseñados para este trabajo mostraron los mejores resultados de amplificación de *B. Cinerea* por medio de PCR y PCR en tiempo real, incluso se pudo cuantificar la carga fúngica de *B. Cinerea* en muestras de micelio solo y en extracciones de DNA del hongo combinado con DNA de la planta en una proporción tan baja como 40% (hongo) y 60% (planta).

De acuerdo a los resultados obtenidos fue posible detectar e identificar biomarcadores químicos y moleculares durante la interacción *Fragaria x ananassa-Botrytis cinerea* y durante el desarrollo de la infección

1. INTRODUCCIÓN.

La fresa es una de las frutas más importantes en el mundo y su demanda en el mercado es considerable. Se considera a México como un país productor de fresa importante, ya que este cultivo ha formado parte de la tradición agrícola por más de 40 años en Ciudades como Zamora e Irapuato. Actualmente México ha perdido terreno paulatinamente, ya que de ser el segundo productor mundial en 1966, fue desplazado al octavo lugar en 1981 (Dávalos, 1992). Este comportamiento se debe a la conjunción de varios factores, pero principalmente al padecimiento de enfermedades, particularmente las originadas por hongos.

La enfermedad más frecuente en el cultivo de la fresa es el moho gris o podredumbre gris, el cual es un problema muy serio en México, ya que origina pérdidas millonarias que finalmente afectan a la producción de fresa. Esta enfermedad se propaga muy rápido y es difícil de erradicarla (Utkhede et al, 2001).

Generalmente el moho gris se identifica cuando se observan lesiones necróticas en la planta y micelio sobre los frutos y el tratamiento con fungicidas a parte de ser caro no resuelve el problema. Por lo tanto el primer paso para detectar la presencia del hongo en la planta es desarrollar un método de diagnóstico que permita detectar al patógeno que causa la enfermedad de manera oportuna.

El enfoque de este trabajo fue realizar la búsqueda de biomarcadores de la interacción *Fragaria x ananassa-Botrytis cinerea* con la finalidad de detectar a este hongo en etapas iniciales de la infección.

2. ANTECEDENTES.

2.1. La Fresa.

2.1.1 Importancia económica de la fresa en México.

La fresa es una de las frutas más populares a nivel mundial y su demanda en el mercado aumenta día con día. Los países que ocupan los primeros lugares en la producción mundial de fresa son: Estados Unidos, España, Polonia, Japón e Italia. La superficie cultivada y la producción mundial de fresa, se han mantenido más o menos constantes en los últimos años; sin embargo, el rendimiento aumentó en promedio, ya que en el 2001 era de 20,401 Kg/Ha, y en 1995 era de 18,441 Kg/Ha. México ha aportado aproximadamente el 3% y el 5% de la superficie y producción mundial de fresa respectivamente, valores que también se han mantenido constantes desde 1995.

La fresa se cultiva en 11 entidades del país, de las cuales tres son las que en los últimos años han concentrado la superficie cultivada y la producción: Michoacán, Guanajuato y Baja California. De estos tres Estados, Michoacán participa con el 69% de la producción nacional, representando el 54% del valor de la producción, que corresponde a 66, 437 toneladas con un valor de 397, 999, 187 pesos (SAGARPA, 2002).

En la actualidad México ha perdido terreno paulatinamente, ya que de ser el segundo productor mundial en 1966, fue desplazado al octavo lugar en 1981 (Dávalos, 1992) y se ha mantenido en la misma posición desde entonces (FAO, 2004). Este hecho se debe a la conjunción de varios factores como son las condiciones climáticas, el desconocimiento o el mal uso de nuevas y mejores tecnologías, a la baja calidad en la fresa de exportación y al padecimiento de plagas y enfermedades, entre otras (Macías-Rodríguez et al., 2001).

Las plantas de fresa son susceptibles al ataque de insectos como la *Tetranychus urticae Koch* que origina la enfermedad conocida como araña roja. También son susceptibles al ataque de bacterias, un ejemplo es *Xanthomas fragariae*. Algunos hongos que pueden infectar a las fresas son *Oidium fragariae* que causa oidio o cenicilla, *Mycosphaerella fragariae* que causa la mancha púrpura y *Botrytis cinerea* que origina la podredumbre gris o moho gris (INFROAGRO, 2002).

Se destaca al hongo *B. Cinerea* porque provoca los daños más graves durante la pre-cosecha y post-cosecha (Ten et al., 2001), llegando a destruir hasta el 60-70% de los frutos.

El fitopatógeno *B. Cinerea* causa la podredumbre en la base de los tallos, en los brotes, en hojas, en flores, pero los mayores daños se producen en los frutos, es una enfermedad conocida como moho gris o podredumbre gris porque recubre el tejido podrido o descompuesto con conidióforos (Utkhede y Koch, 2004). Las lesiones en hojas y tallos se caracterizan por ser irregulares, largas, de color café y pueden llegar a tener una textura vellosa de color gris (Utkhede et al., 2001).

Los periodos de mayor susceptibilidad de las plantas son el comienzo de la apertura de los botones florales y una vez acabada la floración. Pero el hongo también ataca la corona, pudriéndola, destruyendo los ápices vegetativos y los esbozos de las yemas. Los frutos son atacados aún estando verdes, en la fase de maduración, en los almacenes y hasta el momento de su consumo (Viret et al., 2004).

El moho gris es difícil de controlar con fungicidas porque es genéticamente variable y desarrolla (Staples y Mayer, 1995).

2.1.2. Características botánicas de la fresa.

En la Tabla 1 se cita la posición taxonómica de la planta de fresa.

Tabla 1. Posición taxonómica de la fresa (Frairé-Cordero et al., 2003).

REINO	<i>PLANTAE</i>
Phylum	<i>Spermatophyta</i>
Subphylum	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Dicotyledonae</i>
Orden	<i>Rosales</i>
Familia	<i>Rosaceae</i>
Género	<i>Fragaria</i>
Especie	<i>F. ananassa</i>

Las plantas del género *Fragaria*, son herbáceas de comportamiento perenne, que producen raíces, hojas, estolones, flores y un tallo muy reducido llamado corona. Las

plantas de fresa pueden tener entre 25 y 100 raíces primarias, con cientos de raíces laterales pequeñas alrededor de las raíces primarias.

Las raíces secundarias tienen una vida corta, mientras que las primarias pueden ser funcionales por un año. Nuevas raíces primarias nacen arriba de las raíces viejas sobre la corona.

Las hojas de fresa son trifoliadas, consisten de tres folíolos con cortos tallos que se unen al pecíolo principal de la hoja. Las hojas individuales pueden vivir de 1 a 3 meses y varían en tamaño, forma, densidad estomatal y características fisiológicas (Frairé-Cordero et al., 2003).

Los estolones son rastreros, se originan de las yemas auxiliares sobre la corona. Una planta vigorosa puede producir de 10 a 15 estolones y cada estolón produce su propia raíz, la cual le ayuda a establecerse al lado de la planta madre. Las plantas producidas por los estolones son genéticamente iguales a la planta madre (Frairé-Cordero et al., 2003).

Las inflorescencias se producen siempre en la parte terminal o apical de las coronas. Las inflorescencias normales generalmente cuentan con una flor primaria, dos secundarias, cuatro terciarias y ocho cuaternarias.

Las flores de la fresa son hermafroditas. Contienen un receptáculo compuesto de cientos de ovarios. El receptáculo está rodeado por un anillo de estambres, seguido por un anillo de cinco pétalos blancos, después cinco sépalos. Las plantas de fresa son auto-fértiles y la polinización ocurre a través del viento, la gravedad e insectos. La maduración del fruto toma cerca de 30 días después de la polinización.

El receptáculo es la parte comestible de la fresa, mientras las semillas (aquenios) son los frutos verdaderos sobre la superficie (Frairé-Cordero et al., 2003).

2.1.3. Características de la fresa cv Aromas.

Las plantas de fresa que se utilizaron en el estudio fueron del cultivar Aromas, esta planta es de día neutro y se caracteriza porque es más erecta que los cultivares Selva y Seascape y por las características de sus frutos. Por ejemplo el fruto de la fresa cv Aromas posee una excepcional calidad (con buen sabor), es grande porque pesa en el orden de 24 a 26g, tiene una buena firmeza, es de color rojo oscuro y adaptable al comercio de productos frescos o procesados.

El empleo de este cultivar tiene mejores ventajas cuando no se requieren características especiales como las de los cultivares Diamante (excelente sabor para fruto fresco) y Pacífico (excelentes cualidades post-cultivo).

La fresa cv Aromas tiene la más alta productividad entre los cultivares de días neutro. Es relativamente resistente a antracosis y es tolerante a virus. Su tolerancia se compara a la de Selva y Seascape. También es moderadamente susceptible a la antracosis y verticilosis (Pelayo-Zaldivar et al., 2005).

2.2. *Botrytis cinerea*.

Botrytis cinerea es un ascomyceto y un fitopatógeno necrotrófico que causa la enfermedad del moho gris o podredumbre gris. Puede infectar a cerca de 200 especies de plantas causando considerables pérdidas económicas (Mathur y Utkhede, 2002). En la Tabla 2 se cita la posición taxonómica de *B. Cinerea* (Frairé-Cordero et al., 2003).

Tabla 2. Posición taxonómica de *B. Cinerea* (Frairé-Cordero et al., 2003).

DOMINIO	<i>EUCARIOTA</i>
Reino	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Pezizomycotina</i>
Subclase	<i>Leotiomycetidae</i>
Orden	<i>Helotiales</i>
Familia	<i>Sclerotiniceae</i>
Género	<i>Botrytis</i>
Especie	<i>Cinerea</i>

2.2.1. Ciclo biológico.

El hongo *B. Cinerea* puede permanecer latente como micelio, el cual vive en plantas senescentes. También se presenta como forma de esclerocio, una masa dura y compacta

de micelio que está separado del hongo y que puede germinar cuando el invierno ha pasado. Con el nuevo crecimiento del hongo se producen conidióforos, estructuras ramificadas como árboles, que pueden derivar en conidias o esporas. Las conidias maduras se desprenden y en las condiciones adecuadas, pueden encontrar y atacar a un nuevo hospedero.

La espora genera micelio fresco que invade el tejido causando colapso y desintegración de las células. El patógeno usualmente se establece en partes moribundas o muertas del hospedero y se dispersa a tejidos sanos (Staples y Mayer, 1995).

2.2.2. Ciclo de infección.

Las esporas de *B. Cinerea* pueden ser producidas sobre cualquier material vegetal y transportadas a grandes distancias por corrientes de aire (Benito et al., 2000). Una vez que la espora ha alcanzado la superficie del hospedero se inicia el ciclo de infección que está dividido en fases.

La primera fase es la de adhesión y germinación de las esporas sobre la superficie del hospedero (Figura 1). La segunda fase es la de penetración en el tejido vegetal y que puede ser a través de heridas o de aberturas naturales (insectos, el granizo o las rozaduras), directamente a través de la participación de distintas actividades enzimáticas o mediante procesos mecánicos, como la diferenciación de estructuras de penetración que son los apresorios o los tubos germinales (Cooper et al., 2000) (Figura 1). La tercera fase es el establecimiento del patógeno en la zona de penetración, determinando la muerte de las células adyacentes al punto de penetración y dando lugar a la formación de una lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta (Benito et al., 2000) (Figura 1).

En muchos casos se inicia la cuarta fase que consiste en la latencia, durante la cual los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en el área de necrosis correspondientes a las lesiones primarias. Transcurrido un tiempo, se puede presentar la quinta fase caracterizada porque en algunas lesiones primarias, el patógeno es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta e inicia su diseminación en el tejido vegetal circundante, determinando la colonización y la

maceración del tejido infectado en un breve período de tiempo. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección (Benito et al., 2000).

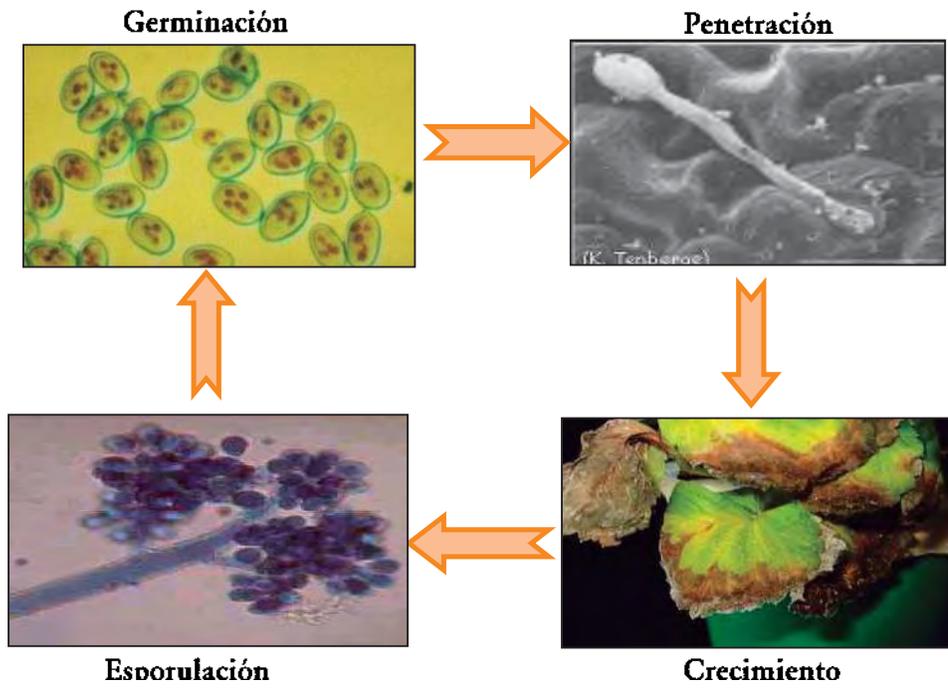


Figura 1. Ciclo de infección de *B. Cinerea*.

La penetración del hongo se ve facilitada por la presencia de una elevada humedad y temperaturas superiores a los 5-10°C e inferiores a los 40°C, así como lesiones de la epidermis de los frutos en contacto con partes infectadas (Molina et al., 2004).

Durante el proceso de infección se consideran varios factores de patogenicidad que están implicados en alguna de las fases del proceso de patogénesis. Los factores en los cuales se han puesto un mayor interés son: enzimas como la cutinasa, presumiblemente necesaria para la penetración a través de la cutícula, enzimas hidrolíticas extracelulares tales como endo- y exo-poligalacturonasas (Benito et al., 2000), pectin metil esterases, pectin liasas (Rha et al., 2001).

Por otra parte la planta manifiesta diversos mecanismos de defensa contra el patógeno como la producción de fitoalexinas (Kuzniak y Sklodowska, 1999) y se generan especies

reactivas de oxígeno, pero *B. Cinerea* produce enzimas responsables de la detoxificación, incluyendo glucosa oxidasa, xilosa oxidasa, galactosa oxidasa y ascorbato oxidasa, enzimas que liberan peróxido de hidrógeno (Staples y Mayer, 1995). Se ha observado que existe una correlación positiva entre la patogenicidad y la intensidad de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno, el ion superóxido y el radical oxígeno libre, lo cual sugiere que los radicales de oxígeno funcionan como factores de virulencia.

Entre los principales cultivos que ataca *B. Cinerea* se encuentran el tomate, la uva, la pera, la manzana, la berenjena, la frambuesa, la zarzamora y la fresa.

2.3. Métodos para el control de *B. Cinerea*.

Los procedimientos de control de *Botrytis* son complejos e inciertos en sus resultados, al menos en condiciones muy favorables para el patógeno, pero se pueden clasificar en:

2.3.1 Métodos preventivos y prácticas culturales.

Es uno de los aspectos más importantes para el control de *B. Cinerea* e incluye una serie de medidas para evitar este tipo de infecciones, entre las cuales destacan:

1. Evitar las siembras demasiado densas en condiciones de baja luminosidad.
2. La solarización es efectiva para el control de esclerocios.
3. Manejar la aireación, calefacción y el riego en invernadero con el fin de reducir la duración de los periodos diarios que combinan humedad a saturación y condensaciones y temperaturas de entre 15 y 17^a C.
4. Hacer podas y deshojados a ras del tallo para no dejar tocones que sirvan para el desarrollo del patógeno. Con la consecuente aplicación de una pasta fúngica en las heridas.
5. Es fundamental la retirada de restos de cultivo y plantas afectadas por la enfermedad tanto del exterior del invernadero como alrededores.
6. Aplicación de cubiertas plásticas de invernadero con absorción de luz ultravioleta ya que reducen la esporulación y la tasa de colonización epidermal.

2.3.2 Control biológico.

Se han descrito diversos hongos (*Trichoderma spp.*, *Coniothyrium spp.*, *Gliocladium p.*, *Mucor spp.*, *Penicillium spp.*, *Verticillium spp.*), bacterias y nematodos como antagonistas de *B. Cinerea*, citando a los primeros como los más importantes en los cultivos hortícolas. Para el control biológico del moho gris de las manzanas se ha descrito el hongo antagónico *Trichoderma harzianum*. Estos agentes de control todavía no se aplican de forma comercial en estos cultivos (Berto et al., 2001).

2.3.3. Control químico.

Este método se basa en el empleo de fungicidas. El control de *Botrytis* en los terrenos de cultivo mediante aspersiones químicas aún no ha tenido el éxito deseado, especialmente en los climas húmedos y fríos. En el caso de la pudrición de la lechuga por *Botrytis*, se recomienda llevar a cabo aspersiones con diclorán o zineb. Otros fungicidas como el difolatán, dyrene, maneb-zinc, maneb o el clorotalonilo, parecen ser más adecuados en cultivos como la cebolla y el tomate. Para el control de las pudriciones del fruto, como es el caso del moho gris de la fresa, se recomiendan las aspersiones o espolvoreaciones con captán, thiram o benomyl (Martley et al., 2001). Sin embargo se han descrito regiones donde la resistencia de *Botrytis cinerea* a fungicidas es un hecho, por lo que se recomienda:

1. Tratar la parte aérea de las plantas con pulverizaciones a base de iprodiona, vinclozolina o procimidona en alternancia o mezcla con fungicidas de amplio espectro, especialmente con los que tienen una acción anti-*Botrytis* (tiram, diclofluanida o clorotalonil).
2. Tratamientos preventivos durante la floración, o cuando las condiciones ambientales sean favorables para el desarrollo de la enfermedad.
3. Sobre los tallos donde se inicie una lesión aplicar pastas fúngicas a base de tiram + iprodiona + éter de petróleo.

El tratamiento químico debe ir acompañado de las medidas culturales mencionadas anteriormente, ya que se ha comprobado la resistencia de *B. Cinerea* a la mayoría de los fungicidas porque este hongo tiene una alta variabilidad genética.

2.4. Mecanismos involucrados en las interacciones planta-patógeno.

Cuando una planta es infectada por un patógeno, pueden ocurrir varios eventos. La planta puede ser incapaz de controlar el crecimiento o dispersión del patógeno, originando la enfermedad y necrosis. Alternativamente la planta puede ser capaz de resistir la invasión del patógeno. En algunos casos la resistencia es pasiva y en otros casos la resistencia es un proceso activo en el cual la planta produce una cascada de respuestas de defensa (González et al., 2006).

Estudios genéticos de interacción planta-patógeno han mostrado que la resistencia activa es condicionada por una resistencia a nivel genético, cuyos productos directa o indirectamente reconocen un determinante específico avirulento producido por el patógeno.

Una de las señales visibles más frecuentes que indican que la planta está resistiendo el ataque del patógeno es el desarrollo de una respuesta hipersensible (HR) en el tejido. Esta respuesta es caracterizada por pequeñas lesiones necróticas que se forman alrededor del sitio de infección. Dichas lesiones ayudan a restringir el crecimiento y dispersión del patógeno. En adición, compuestos antimicrobianos (fitoalexinas) son frecuentemente producidas, y un reforzamiento de la pared celular como resultado de la lignificación y acción de proteínas de la pared celular. Con estas acciones la porción de planta no infectada desarrolla una resistencia a una segunda infección por el mismo patógeno o por patógenos relacionados. Esta resistencia no específica es conocida como resistencia sistémica adquirida (SAR). SAR está asociada con la expresión sistémica de genes, la cual incluye genes de la familia PR así como un incremento endógeno de ácido salicílico y la producción de metabolitos secundarios (González et al., 2006).

2.4.1 Volátiles como un mecanismo de defensa en las plantas.

Las plantas poseen un sistema muy organizado en cuanto a la distribución de sus recursos para crecer, reproducirse y defenderse. Debido a esto no sorprende que gran parte de la defensa se refleje en una gran diversidad bioquímica y de gran complejidad. En 1941 Müller y Börger nombraron fitoalexinas a aquellos compuestos químicos sintetizados por una planta en respuesta a una invasión microbiana (Vivanco et al., 2005). Sin embargo existen metabolitos secundarios presentes en todos los tejidos vegetales, cuya función primordial parece ser la defensa contra patógenos, a diferencia de

las fitoalexinas, estos compuestos se caracterizan por su estado permanente. Sirven como barrera inicial a la propagación de bacterias u hongos dentro de la planta. Algunos inhiben la germinación de las esporas y su localización en los tejidos varía. Los compuestos antipatógenos se alojan principalmente en el exterior de los tejidos y órganos o en el interior de las vacuolas (Vivanco et al., 2005). Cuando un patógeno infecta a una planta el primer nivel de respuesta es local e implica la síntesis de fitoalexinas y puede o no incorporar a la respuesta hipersensible. La respuesta secundaria prepara a tejidos y órganos para defenderse de un proceso infectivo que involucra a la señalización sistémica secundaria, donde intervienen el metabolismo secundario y el patrón bioquímico. Todas las vías de señalización identificadas contienen elementos volátiles, al parecer cumplen la función de transmitir la información dentro de la planta y entre distintas plantas. Los tres elementos principales son el etileno, ácido salicílico y el ácido jasmónico. Tal vez la vía de señalización más compleja conocida entre las plantas corresponde a la tendida por lipasas y lipooxigenasas en membranas celulares. En conjunto con lo anterior, existen vías metabólicas encargadas de la defensa de las plantas contra patógenos debido a la síntesis de metabolitos secundarios, por ejemplo la vía del mevalonato, la vía del ácido shikimico y vías que emplean a aminoácidos como precursores (Vivanco et al., 2005).

2.5. Métodos para el estudio de la interacción planta-patógeno.

Durante mucho tiempo la forma de evaluar la resistencia a enfermedades se basaba en los síntomas que pudieran ser visibles. Para patógenos que matan a las plantas se pueden determinar las tasas de supervivencia para evaluar la resistencia a la enfermedad. Para patógenos que causan necrosis sin matar al hospedero, el grado de necrosis puede ser usado para monitorear la resistencia, por ejemplo medir el diámetro de lesión o formación de conidia (Gachon y Saindrenan, 2004), pero tales pruebas no indican fases tempranas del desarrollo del hongo. Estos métodos son limitados porque solo evalúan síntomas visibles o macroscópicos y no es posible la cuantificación, por eso se han aplicado otras técnicas basadas en componentes del patógeno como ergosterol (Martin et al., 1990) y quitina (Plassard et al., 1982).

En el 2000 Copper et al., reportaron que algunas especies de hongos fitopatógenos se unen a la superficie del hospedero por interacciones hidrofóbicas, para posteriormente secretar una capa denominada matriz extracelular. Se cree que esta matriz puede estar involucrada con la adhesión del micelio en la planta. La previa caracterización de la matriz extracelular de *B. Cinerea* ha mostrado estar compuesta de carbohidratos (20%), proteínas (28%) y lípidos (6%). En la fracción de lípidos de la matriz extracelular analizada por TLC, se encontraron ácidos grasos libres, mono- y tri-acilglicerol, ceras ésteres, alcoholes grasos y componentes no identificados. La fracción de lípidos puede servir para identificar la presencia del patógeno, ya que esta fracción es variable entre patógenos.

Las técnicas basadas en la identificación del ergosterol, quitina y de la matriz extracelular no son muy específicas y solo pueden evaluar la colonización por patógenos que posean estos constituyentes (Copper et al., 2000).

Por lo anterior se buscan otras alternativas, una buena opción es el análisis de compuestos volátiles, empleando técnicas rápidas, sensibles y reproducibles. Esto ha permitido realizar estudios relacionados con la interacción planta-patógeno para identificar al microorganismo que causa la enfermedad, así como evaluar la severidad de la infección (Matich et al., 1996; Miller et al., 1996; Mookherjee et al., 2001).

2.5.1. Análisis de compuestos volátiles durante la interacción planta-patógeno.

El análisis de compuestos volátiles resulta ser una herramienta viable para la identificación de patógenos en plantas.

Los compuestos volátiles son de bajo peso molecular (menores de 300 daltones) y de gran diversidad estructural como aldehídos, alcoholes y ésteres, entre otros, cuya presión parcial es lo suficientemente alta para permitirles estar en estado gaseoso bajo condiciones ambientales (Barcarolo et al., 1996).

En análisis de este tipo se ha observado que durante las infecciones por hongos, se desprenden compuestos volátiles característicos como el 1-octen-3-ol y el n-bornene

(López y Macías-Rodríguez, 2001). Se ha reportado en la literatura la caracterización de cepas de *Fusarium oxysporum* por el perfil de volátiles producido durante la infección en plátano (Moore et al., 1991).

Se ha estudiado la producción de volátiles de *F. verticilloides*, responsable de la pudrición del maíz, y se demostró que volátiles como 1-propanol, acetato de etilo y acetaldehído, atraen a vectores de infección (Bartlet y Wicklow, 1999).

Mediante el estudio de volátiles de tubérculos de papa sanos e infectados por *Erwinia carotovora*, se han desarrollado sensores que identifican al agente causal a tiempo para prevenir enfermedades durante el almacenamiento (De Lacy Costello et al., 1999).

Existe un estudio de discriminación de enfermedades en manzanas McIntosh inoculadas con patógenos fúngicos (*Monilinia sp*, *Mucor piriformis*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*) en base al perfil de compuestos volátiles detectados. En este reporte inicialmente se detectaron 35 compuestos volátiles, los cuales fueron agrupados de acuerdo a su naturaleza química (alcohol, éster o aldehído), su frecuencia y abundancia.

La lista de compuestos fue sometida a un análisis mediante el método del componente principal, de esta forma se obtuvieron compuestos volátiles específicos de cada patógeno (Vikram et al., 2004).

Como se puede apreciar en la Figura 2 se muestran los compuestos volátiles obtenidos a partir del análisis por el método del componente principal, lo cual permitió separar marcadamente a los compuestos volátiles producidos por *B. Cinerea* de los otros patógenos (Vikram et al., 2004).

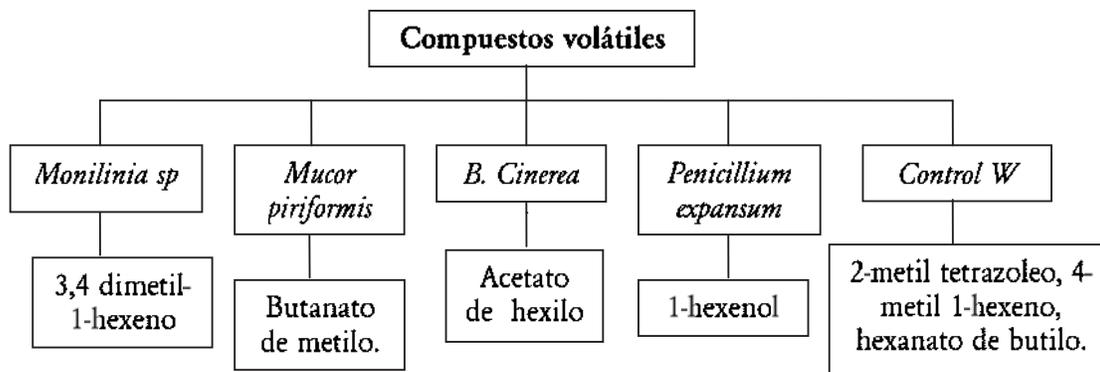


Figura 2. Compuestos volátiles identificados en las manzanas cv McIntosh infectadas exclusivamente con cada patógenos y los volátiles identificados en el control (manzana sin infectar) (Vikram et al., 2004).

En el caso específico de fresa, en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, se infectaron plantas de fresa de la variedad Aromas con *B. Cinerea* y se analizaron los compuestos volátiles por cromatografía de gases. Al comparar los compuestos producidos por el hongo, la planta sana y la infectada, se encontraron grandes diferencias dentro del perfil cromatográfico de volátiles, lo cual se muestra en la Figura 3 (Copp-Mendoza et al., 2004). Con este estudio se detectaron volátiles del hongo y de la interacción planta-patógeno en la planta infectada, lo cual indicó que *B. Cinerea* se encontraba en la planta infectada y se confirmó que el análisis de compuestos volátiles podría ser una herramienta eficaz para detectar la presencia del hongo durante la interacción planta-patógeno.

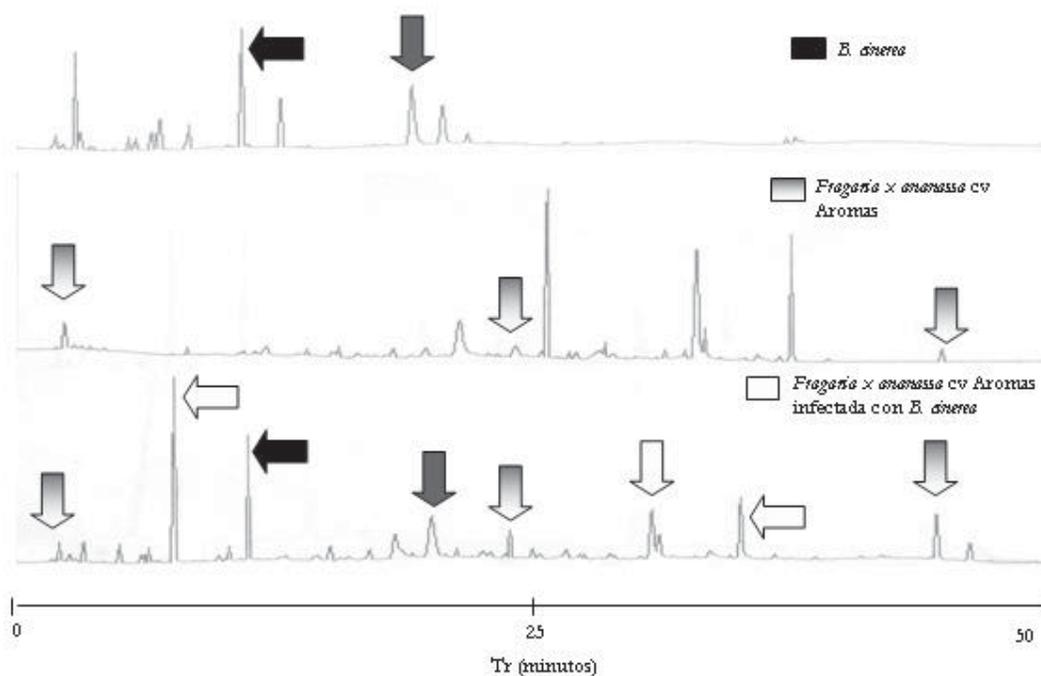


Figura 3. Diferencias en el perfil cromatográfico de los compuestos volátiles identificados en *B. Cinerea* (control) y la planta sana de fresa (control) en comparación con los volátiles identificados en la planta de fresa infectada. Se puede observar que algunos compuestos volátiles generados por el hongo y la planta sana se detectan en la planta infectada tal y como lo indican las flechas, así como también se observan volátiles debidos a la interacción planta-patógeno (Copp-Mendoza et al., 2004).

En la literatura existe un reporte (Griffith et al, 2007) que se realizó con la finalidad de identificar y distinguir a tres tipos de hongos (*Aspergillus versicolor*, *Penicillium chrysogenum* y *Stachybotrys chartarum*) que causan el moho (indoor mold) mediante el análisis de los compuestos volátiles empleando headspace y SPME-GC/MS. En este estudio se obtuvieron diferencias y similitudes en el perfil cromatográfico de los compuestos volátiles generados por estos hongos (Figura 4), algunos compuestos como el hexanol y el ácido benzoico se identificaron en los tres hongos, el oxirano se identificó en *Penicillium chrysogenum* y *Stachybotrys chartarum*, el 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-(1-oxipropil) fenol solo se identificó en *Aspergillus versicolor*. Por lo tanto, con estos compuestos volátiles se puede detectar y diferenciar a estos hongos en muestras de campo.

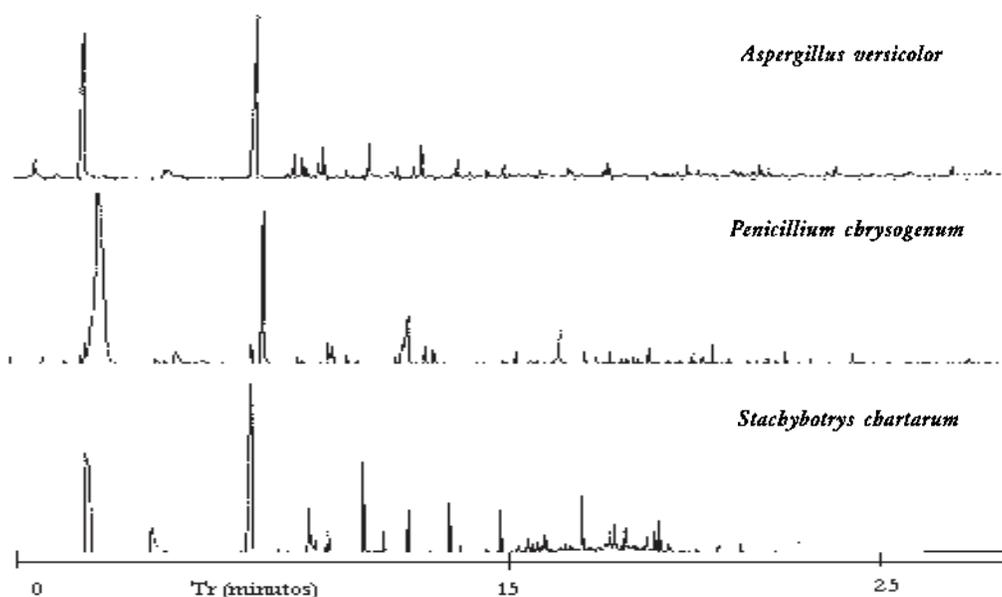


Figura 4. Diferencias en el perfil cromatográfico de los compuestos volátiles identificados en *Aspergillus versicolor*, *Penicillium chrysogenum* y *Stachybotrys chartarum* (Griffith et al, 2007).

El análisis de compuestos volátiles también se ha empleado para diferenciar entre hongos patógenos a nivel de especie, por ejemplo en un estudio (Raymon et al., 2005) se logró diferenciar entre los hongos *T. aestivum*, *T. brumale*, *T. melanosporum*, *T. miesentericum*, *T. rufum*, and *T. simonea* en base al perfil de compuestos volátiles empleando el headspace y SPME-GC/MS. De tal forma que el dimetil sulfido solo se identificó en *T. brumale* y las seis especies de hongos se pueden diferenciar en base a la incidencia y variación de ésteres.

2.5.1.1. Técnicas de extracción de compuestos volátiles.

En la actualidad se han desarrollado diversas técnicas de extracción de compuestos volátiles, así como distintas herramientas analíticas cuantitativas y descriptivas que realizan caracterizaciones biológicas de los compuestos. Algunas técnicas más comúnmente empleadas en el análisis de compuestos volátiles en fresa son aquellas que se basan en la solubilidad de los compuestos como la extracción directa sólido-líquido y las que se basan en la volatilidad como la microextracción en fase sólida (SPME), el espacio de cabeza o head-space (HS) y la destilación al alto vacío (Larsen y Poll, 1990).

La extracción sólido-líquido con éter-pentano (2:1) es una técnica rápida y simple para extraer y analizar los compuestos volátiles en la fresa. Además es la técnica que más se recomienda para obtener extractos concentrados para posteriores caracterizaciones biológicas (Larsen y Poll, 1990).

Por la técnica de HS es posible analizar compuestos volátiles que poseen una presión de vapor lo suficientemente elevada para acumularse en el espacio de cabeza de un recipiente hermético. Una vez acumulados los compuestos son retirados del espacio de cabeza empleando una jeringa para gases y son inyectados en un GC (Gas Chromatography) (Klein et al., 1990).

Para obtener extractos más concentrados se han realizado modificaciones a la técnica, ya que los compuestos volátiles pueden ser arrastrados continuamente por medio de un flujo de gas inerte hacia adsorbentes como carbón activado o tenax (polímero óxido-2,6-difenileno), que son empacados en una columna de vidrio; debido a esto la técnica se le denominó HS dinámico. Los compuestos adsorbidos pueden ser recuperados por desorción térmica o por elución con algún solvente.

La técnica de destilación al alto vacío es adecuada para evitar la formación de artefactos debido a degradaciones térmicas o hidrólisis. La muestra se coloca en un recipiente, el cual está unido a una serie de trampas en línea que son mantenidas a bajas temperaturas y con presiones reducidas, los compuestos volátiles se van depositando en cada trampa y

posteriormente son recolectadas con solventes orgánicos y analizadas en un GC (Engel et al., 1999)

La técnica de SPME desarrollada por Arthur y Pawliszyn en 1990, tiene una amplia gama de aplicaciones en el análisis de compuestos volátiles y actualmente se encuentra disponible comercialmente (Yang y Peppar, 1994). El dispositivo utilizado en esta técnica simula una jeringa en cuya punta se encuentra una fibra de sílice fundido (tiene aproximadamente 1cm de longitud), recubierta con un adsorbente como el polidimetilsiloxano (PMDS) y el divenilbenceno (DVB).

La muestra se coloca en un vial de tapa con septa, y la punta de la jeringa se introduce al vial hasta atravesar la muestra o bien se deja únicamente el espacio de cabeza para que los compuestos sean atrapados por el adsorbente (Figura 5).



Figura 5. Dispositivo para Microextracción en Fase Sólida (SPME).

El tiempo de adsorción varía según el tipo de muestra que se esté analizando, sin embargo, la toma de muestra no excede los 30 minutos. Posteriormente, los compuestos son desorbidos térmicamente en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases (GC) donde son separados e identificados. El SPME tiene la ventaja de no emplear solventes y no requerir un manejo previo de la muestra, lo cual es altamente deseable (Holt, 2001). Además puede ser empleado para el estudio de compuestos volátiles in vivo que son aquellos que forman parte integral de la planta cuando aún no ha sido

cosechada resaltando el aroma vivo de la planta como el hexil butirato y octil butirato reportados en fresa (Mookherjee et al., 1986).

2.5.1.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en el análisis de compuestos volátiles.

La cromatografía es un método físico que consiste en la separación de los componentes de una mezcla en una fase estacionaria y en una fase móvil, esto es en base a la afinidad del compuesto con la fase estacionaria. Este tipo de métodos permite la cuantificación e identificación de los componentes presentes en cualquier muestra.

Para la cromatografía de gases los compuestos deben ser volátiles y térmicamente estables (10-20%), sin embargo algunos compuestos se pueden derivatizar para eliminar los puentes de hidrógeno y así disminuir su punto de ebullición para que sean fácilmente volatilizados en el puerto de inyección de un GC. Este tipo de análisis requiere poca muestra y tiene aplicaciones en diversos campos.

Como se observa en la Figura 6 el cromatógrafo de gases consta de los siguientes componentes:

- 1) Sistema de la fase móvil: Gas acarreador.
- 2) Sistema de introducción de muestra: Inyector.
- 3) Sistema de la fase estacionaria: Columna y horno termostatzado.
- 4) Detector.
- 5) Registrador (adquisición de datos).

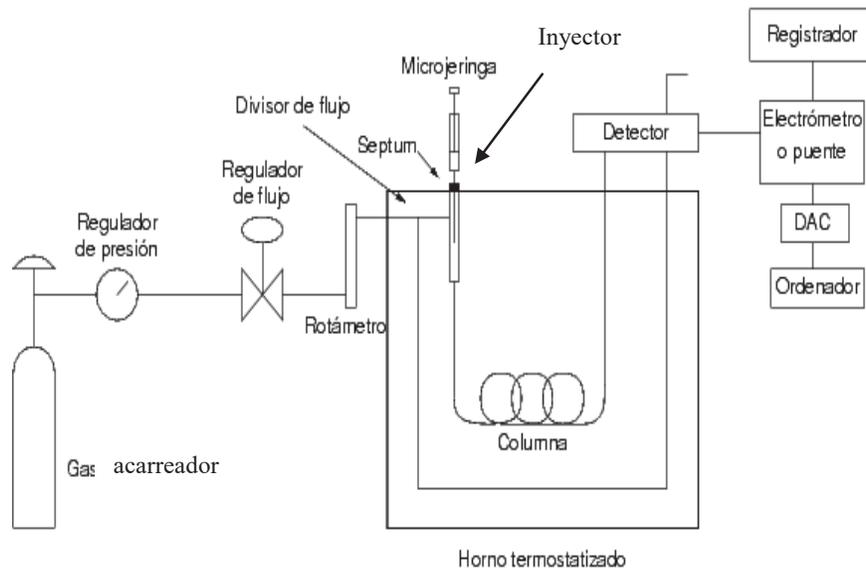


Figura 6. Esquema general de los principales componentes de un cromatógrafo de gases.

Para detectar e identificar los compuestos de una muestra después de haber empleado la cromatografía de gases, se requiere de un detector. El detector es un dispositivo que detecta la presencia de un componente diferente al gas acarreador y la convierte en una señal eléctrica (García, 2007). Existen varios tipos de detectores: De conductividad térmica (TCD), ionización de flama (FID), captura electrónica (ECD), nitrógeno-fósforo (NPD), fotométrico de llama (FPD), selectivo de masa (MS), infrarrojo (IRD), emisión atómica (AED) y conductividad electrolítica (ELCD, HALL).

Con el detector selectivo de masas por impacto con electrones consiste en bombardear el analito con electrones y como resultado se fragmentan las moléculas en un patrón característico para cada especie química. Estos iones son separados magnéticamente de acuerdo a sus masas moleculares. Finalmente una válvula fotomultiplicadora genera una señal eléctrica proporcional al número de iones del elemento (García, 2007).

Las señales del detector se convierten en un cromatograma como se muestra en la Figura 7, el cual es una gráfica que relaciona la señal del detector con el tiempo de separación de los componentes.

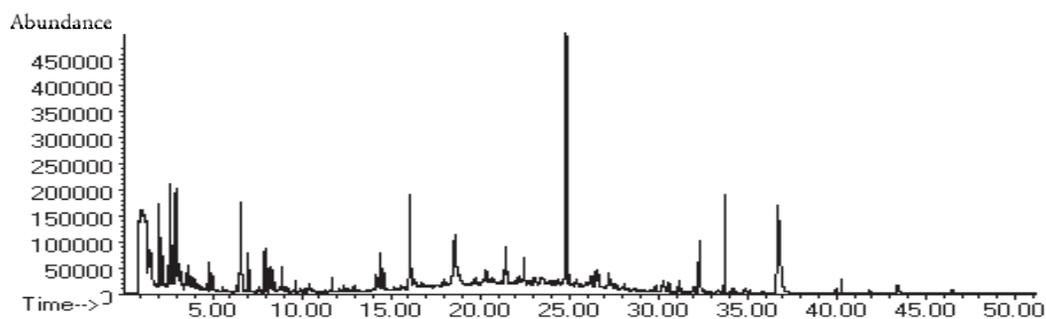


Figura 7. Imagen de un cromatograma.

Cada componente identificado en la muestra origina un espectro. Como se muestra en la Figura 8 el espectro de masas está constituido por el número de iones formados en relación con su masa/carga. El detector selectivo MS permite la revisión e interpretación automática o manual de los espectros mediante la comparación con los espectros de una librería comercial como es la de NIST (National Institute of Standards and Technology) (García, 2007).

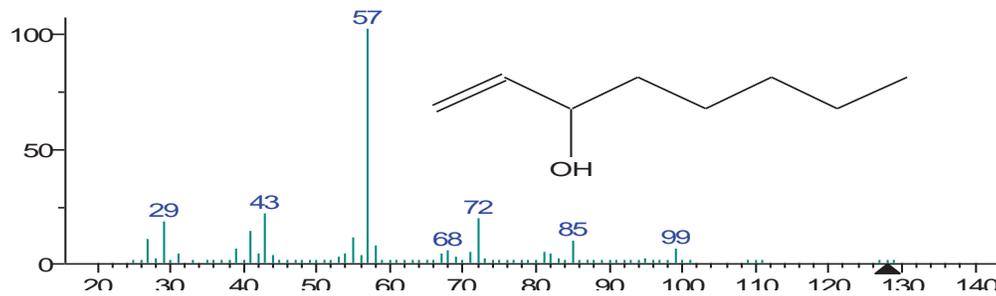


Figura 8. Ejemplo de un espectro de masas que corresponde al compuesto 1-octen-3-ol.

2.5.2. Técnicas moleculares en el estudio de interacciones planta-patógeno.

El análisis de compuestos volátiles es muy útil pero no proporciona una estimación de la colonización del patógeno, por lo cual se han utilizado procedimientos moleculares para detectar fitopatógenos en plantas. Por ejemplo, empleando una técnica dot blot se han distinguido aislados de *B. Cinerea* de otros hongos encontrados en cultivos de invernadero. Un ensayo basado en la identificación de ITS en la región ribosomal se desarrolló para detectar *B. Cinerea* en tomate (Mathur y Utkhede, 2002).

Se ha monitoreado la expresión del gen *uidA* (GUS) en cepas de hongo transgénico que lleva este gen bajo el control de un promotor fuerte y constitutivo (Brouwer et al., 2003), pero en plantas inoculadas con *B. Cinerea*, el desarrollo de la lesión es altamente variable.

Otro método de detección de patógenos en plantas utilizado ampliamente, se basa en el análisis de DNA mediante PCR (Polymerase Chain Reaction). El PCR consiste en la amplificación de DNA genómico con un par de oligonucleótidos, por ejemplo el análisis de RADP (random amplified polymorphic) permite encontrar diferencias genéticas (polimorfismos) entre organismos procedentes de cultivos puros, lo cual puede funcionar como marcadores moleculares. Secuenciando tales marcadores de DNA permite el diseño de oligonucleótidos grandes y más específicos para la detección directa de patógenos de plantas en cultivos no puros usando PCR (Rigotti et al., 2002).

En base a esto, Rigotti et al., en el 2002 diseñaron un par de oligonucleótidos específicos C729+ y C729-, que permiten diferenciar por la PCR a *B. Cinerea* de otras especies del

mismo género. Estos oligonucleótidos fueron empleados para la cuantificación del hongo en la planta.

Técnicas basadas en ácidos nucleicos como hibridaciones de RNA y PCR cuantitativo (Brouwer et al., 2003) también se pueden emplear para la detección de patógenos.

Arabidopsis thaliana ha sido el organismo modelo para estudiar las respuestas a enfermedades en las plantas. Se ha cuantificado la presencia de distintos patógenos entre ellos *B. Cinerea* en tejido infectado de *Arabidopsis thaliana* con una concentración de 500,000 esporas/ml, empleando la PCR fluorescente en tiempo real (Brouwer et al., 2003). Estos autores emplearon para ello oligonucleótidos dirigidos contra secuencias de actina y tubulina, que no son específicos sino que reconocen secuencias de diversos hongos de la clase *Pezizomycotina*.

El PCR en tiempo real ha sido aplicado para el diagnóstico y cuantificación de enfermedades de plantas. Desde la primera aplicación del PCR en tiempo real para detectar *Phytophthora* en plantas ha probado ser una forma muy sensible, rápida, real y específica para cuantificar la progresión de numerosos patógenos comparados con métodos clásicos. Su especificidad se basa en la secuencia de oligonucleótidos (Gachon y Saindrenan, 2004).

La cuantificación de microorganismos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, es un método reciente. Relaciona la cantidad de secuencias específicas de DNA presentes en una muestra, con la cantidad de biomasa microbiana que las generó. Cada amplificación (amplicón) de DNA de muestra es monitoreada por cada ciclo basado en la emisión de fluorescencia (Figura 9A). El amplicón puede detectarse usando diferentes químicos, específicos y no específicos (Brouwer et al., 2003).

El amplicón específico tiene alta especificidad por la señal fluorescente, la desventaja es que la detección de diferentes amplicones requiere de diferentes pruebas. Esta desventaja no se presenta en los químicos no específicos que están basados en fluoróforos. El más

utilizado es un fluoróforo como el SYBER Green que solo fluoresce al unirse al DNA de doble cadena (Figura 9B).

Al producirse un número suficiente de dobles cadenas durante la fase de elongación de la PCR, la fluorescencia es detectada por el sistema óptico del aparato que conduce la reacción. El número de ciclos de la PCR necesarios para que se detecte la fluorescencia (ciclo de cruce) está en función de la cantidad de distintas concentraciones conocidas de DNA inicial contra sus respectivos ciclos de cruce, por lo que es posible interpolar la cantidad de DNA inicial en una muestra problema (Figura 9C). Con el análisis de melting o curvas de disociación del DNA (Figura 9D) al final del PCR, la exactitud de la amplificación puede ser evaluada para descartar productos de amplificación inespecíficos (Costa, 2004).

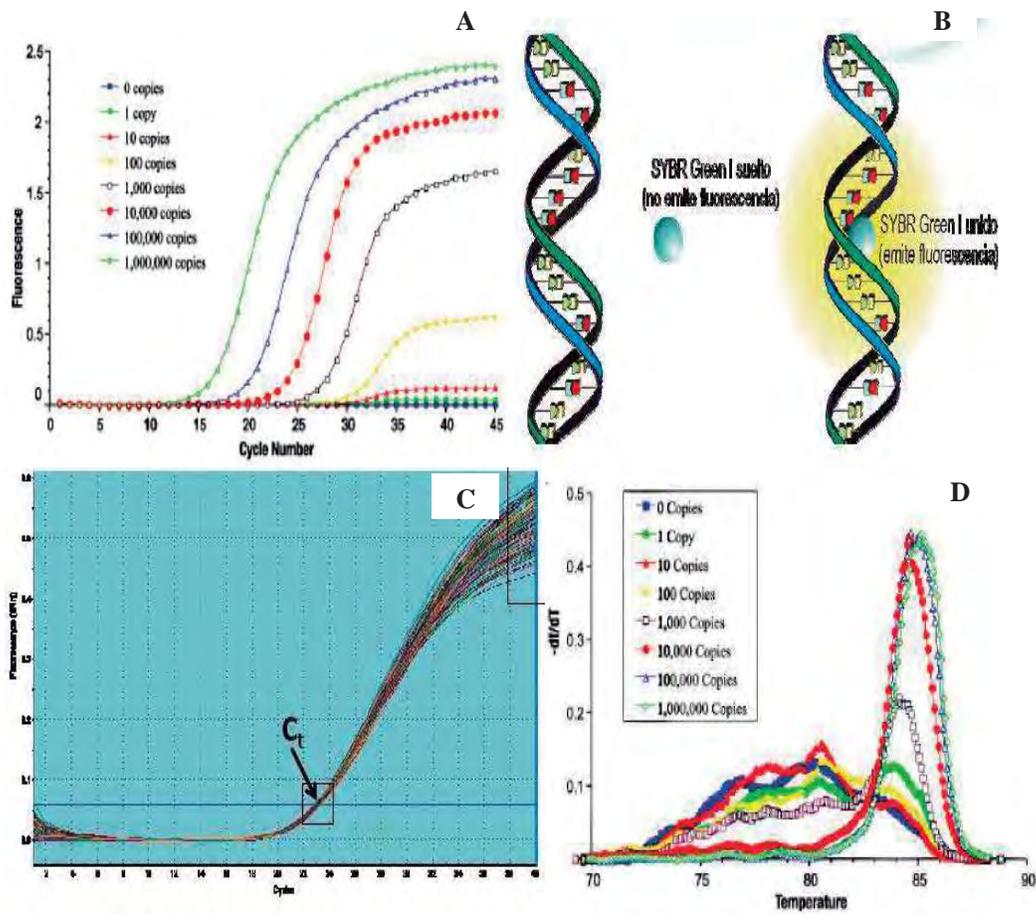


Figura 9. Análisis por PCR en tiempo real. Curvas de amplificación en tiempo real, donde se gráfica fluorescencia contra ciclo en función del número de copias iniciales de DNA en la PCR (A). Fluorescencia emitida cuando el SYBER Green se une a la doble cadena de DNA (B). Ciclo umbral en curvas de amplificación por PCR en tiempo real (C). Curvas de disociación de DNA o análisis de melting (D) (Brouwer et al., 2003).

3. JUSTIFICACIÓN.

Dada la importancia económica en la producción de fresa en el Estado de Michoacán, es necesario tomar medidas para diagnosticar fitopatógenos, tales como *B. Cinerea*, el cual ocasiona grandes pérdidas en las etapas de pre-cosecha y post-cosecha.

El análisis de compuestos volátiles durante la interacción planta-patógeno ha permitido establecer biomarcadores contra diversos patógenos que atacan cultivos de interés agronómico como es el caso de la manzana. Por otro lado biomarcadores contra *B. Cinerea* pueden servir como diagnóstico temprano de la enfermedad causada por este hongo.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, indicaron que hay una relación proporcional entre la concentración del hongo y la producción de compuestos volátiles del mismo. En este caso, la concentración de inóculo empleado fue de 6 UFC/ml. Por lo tanto, es posible que cantidades de inóculo más bajas nos permitan detectar a *B. Cinerea*.

El análisis de compuestos volátiles permitirá conocer si un cultivo de fresa se encuentra infectado con *B. Cinerea* en fases avanzadas de la infección, pero es incierto cual es su sensibilidad para detectar infecciones tempranas en fase de latencia y con baja biomasa del hongo, que no puede ser cuantificada en base a los volátiles.

Por medio del PCR en tiempo real se puede cuantificar la cantidad del inóculo de *B. Cinerea* en la planta y comparar la sensibilidad del método de detección por volátiles en etapas tempranas de infección.

Brouwer et al., en el 2003 utilizaron una concentración de esporas de 5×10^5 para infectar *Arabidopsis thaliana*, la cual fue detectable por PCR, por lo que en este trabajo se pretende utilizar concentraciones de esporas más bajas con la finalidad de conocer la sensibilidad del PCR en tiempo real para detectar la presencia del hongo en las plantas.

Finalmente es importante mencionar que en nuestro conocimiento, no existen estudios donde se correlacione el análisis de compuestos volátiles con la cuantificación de biomasa del patógeno en respuesta a una infección. Por lo tanto, este proyecto permitirá conocer biomarcadores específicos (compuestos volátiles) de la presencia de *B. Cinerea* en la planta de fresa a diferentes concentraciones del hongo. Lo que llevó a plantear la siguiente hipótesis.

4. HIPÓTESIS.

Durante la interacción *Fragaria x ananassa-Botrytis cinerea* se generan biomarcadores específicos de infección temprana, lo cual permite establecer su relación con el proceso infeccioso.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar biomarcadores de la interacción *Fragaria x ananassa-Botrytis cinerea* durante el desarrollo de la infección.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Evaluar la respuesta de las plantas de fresa a la infección por *Botrytis cinerea*.
- Determinar en que medida los compuestos volátiles son un indicador temprano de la presencia del patógeno en la planta.
- Establecer la carga fúngica del patógeno por métodos moleculares.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Tal como se describe en la Figura 10 se realizó la micropropagación de plantas de fresa; la mitad de ellas se pasaron a maceta y posteriormente fueron colocadas en invernadero. Algunas plantas se infectaron con el hongo *Botrytis cinerea* y otras plantas sanas se emplearon como controles, de igual forma *B. Cinerea* fue empleado como control. El análisis de compuestos volátiles se realizó por microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (SPME-GC-MS) en plantas *in vitro* y en plantas de invernadero. De igual forma se aplicó PCR para detectar a *B. Cinerea* y PCR en tiempo real para cuantificar a *B. Cinerea*.

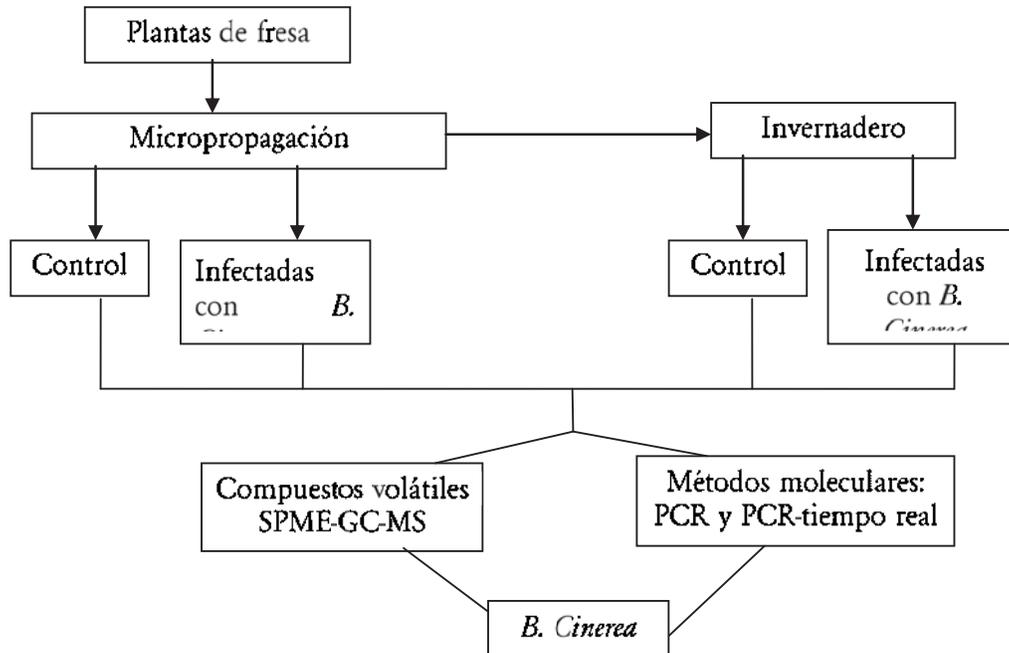


Figura 10. Estrategia experimental.

8. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1. Material biológico.

8.1.1. Micropropagación de plantas de fresa cv Aromas

Las plantas de fresa cv Aromas *in vitro* fueron donadas por la D.C Alba Jofre del CIVESTAV Irapuato. Para tener una cantidad suficiente de plantas fue necesario micropropagarlas en los medios de brotación y enraizamiento, utilizando como base el medio Murashige-Skoog (MS).

Para preparar el medio MS se utilizaron 6 soluciones stock, 30 g/L de sacarosa, 4 g/L de agar y se ajustó el pH a 5.7. En la Tabla 3 se muestran los reactivos empleados para preparar las soluciones stock.

Tabla 3. Contenido de las soluciones stocks.

STOCK 1 (50 ML)	STOCK 2 (250 ML)	STOCK 3 (100 ML)	STOCK 4 (100 ML)	STOCK 5 (250 ML)	STOCK 6 (250 ML)
CaCl ₂ (25g)	MgSO ₄ (9.25 g)	FeSO ₄ (0.5 g)	MnSO ₄ (1.69 g)	Glicina (0.5 g)	NH ₂ NO ₃ (41.25 g)
-	KH ₂ PO ₄ (4.25 g)	NaEDTA (0.7 g)	ZnSO ₄ (1.05 g)	Piridoxina (0.0125 g)	KNO ₃ (47.5 g)
-	-	-	H ₃ BO ₃ (0.62 g)	Ac. Nicotínico (0.025 g)	-
-	-	-	KI (0.83 g)	TiaminaHCl (0.0025g)	-
-	-	-	Na ₂ MoO ₄ (0.025 g)	Mg-inositol (2.5 g)	-
-	-	-	CuSO ₄ (0.0025 g)	-	-
-	-	-	CuCl ₂ (0.0025 g)	-	-

La cantidad de soluciones stock empleadas se indican en la Tabla 4.

Tabla 4. Volúmenes de las soluciones stock empleadas para la preparación del medio MS.

STOCK	1 L	1/2 L	1/4 L
1	1 ml	500 µl	250 µl
2	10 ml	5 ml	2.5 ml
3	5 ml	2.5 ml	1250 µl
4	1 ml	500 µl	250 µl
5	10 ml	5 ml	2.5 ml
6	10 ml	5 ml	2.5 ml

Para inducir la brotación se utilizó el medio MS con 500 μL de benciladenina (1 mg/ml) y 100 μL de ácido naftalenacético (1 mg/ml) con un $\text{pH}=5.7-5.8$. Este medio se esterilizó y se vertieron 50 ml del medio en frascos pequeños de vidrio y con tapa. Posteriormente se colocaron los explantes en este medio y se mantuvieron por 21 días para obtener plántulas (Sutter et al., 1991). En la Figura 11 se muestra a una planta de fresa en el medio de brotación.



Figura 11. Planta de fresa cv Aromas en medio de brotación después de 21 días en la cámara de crecimiento.

Una vez que se obtuvieron las plántulas, éstas se pasaron a un medio de enraizamiento para promover el crecimiento de la raíz. Este medio consistió de medio MS con 300 μL de ácido indolbutírico (0.3 mg/L) con un $\text{pH}=5.7-5.8$. Este medio se esterilizó y se vertieron 50 ml del medio en frascos pequeños de vidrio y con tapa. En el medio de enraizamiento las plantas pueden permanecer hasta que el espacio del frasco ya no es suficiente, pero lo ideal es que las plantas se mantengan hasta 28 días para poder utilizarlas o trasplantarlas a suelo. (Sutter et al., 1991). La Figura 12 muestra algunas plantas de fresa en medio de enraizamiento.



Figura 12. Planta de fresa cv Aromas en medio de enraizamiento después de 28 días en la cámara de crecimiento.

8.1.1.1. Selección del medio de soporte para el análisis de compuestos volátiles.

Un análisis de compuestos volátiles fue aplicado al medio MS y se observó que este medio generaba muchos compuestos, los cuales afectarían nuestra búsqueda de biomarcadores. Por lo tanto se analizó el perfil de compuestos volátiles de dos medios de soporte: fitagel-agua y agar-agua (Figura 13A). De acuerdo al perfil cromatográfico de compuestos volátiles (Figura 13B) se eligió al medio agar-agua porque generó pocos compuestos volátiles y porque es un medio simple que permite a la planta estar fija dentro del frasco de vidrio. El medio fitagel-agua se preparó agregando una cantidad de fitagel de 4 g/L de agua destilada. El medio agar-agua se preparó agregando una cantidad de agar de 2 g/L de agua destilada. En ambos medios, el pH se ajustó a 5.7 y se utilizaron frascos de 500 ml de capacidad para los medios.

Después de que las plantas que se encontraban en el medio de enraizamiento y tenían la edad adecuada, se pasaron a un frasco de vidrio con el medio agar-agua para realizar los análisis de compuestos volátiles en las plantas de fresa del sistema *in vitro*.

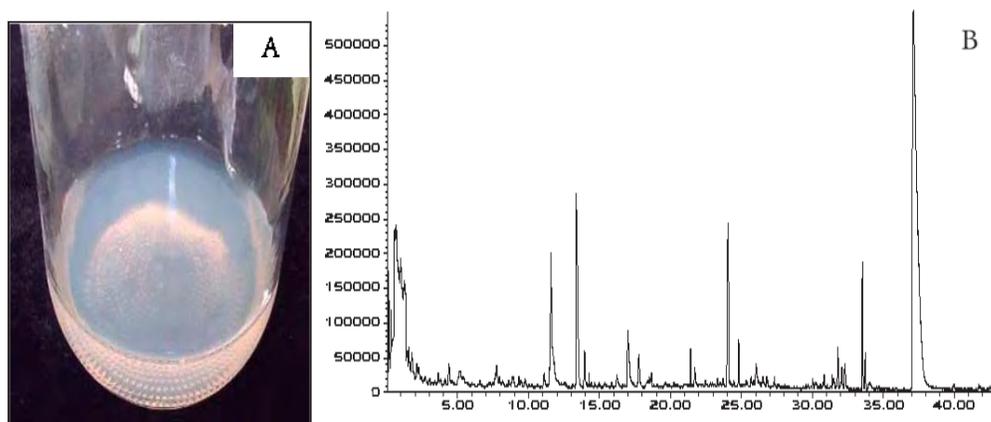


Figura 13. Fotografía del medio agar-agua en el frasco para el sistema *in vitro* (A). Perfil cromatográfico del medio de soporte agar-agua (B).

8.1.1.2. Transplante de plantas de fresa cv Aromas.

Para poder realizar el estudio en las plantas de invernadero se seleccionaron plantas del sistema *in vitro* (Figura 14A) y se colocaron en recipientes de plástico tipo vaso con una perforación en el fondo y con suelo para maceta combinado con agrolita (previamente esterilizada) en una proporción 1:1.

El suelo se humedeció con agua y las plantas fueron cubiertas con una bolsa de plástico (Figura 14B), diariamente la bolsa de plástico se humedecía con agua estéril y en un período de 4 días se realizaron cortes en los bordes de la bolsa. Después de 4 días se cortaron las bolsas a la mitad para permitir que las plantas estuvieran en contacto directo con el ambiente (Figura 14C). Después de 3 días se retiraron las bolsas de plástico (Figura 14D) y se continuó con el riego de las plantas pero ahora con una solución nutritiva (Cárdenas-Navarro et al., 1998). Estas plantas fueron pasadas a macetas (Figura 14E) y posteriormente fueron mantenidas en una cámara de crecimiento con fotoperíodo de 12 h luz y con humedad constante al 80% hasta por 6 semanas con lo cual se obtuvieron plantas maduras y de un gran tamaño (Figura 14F).

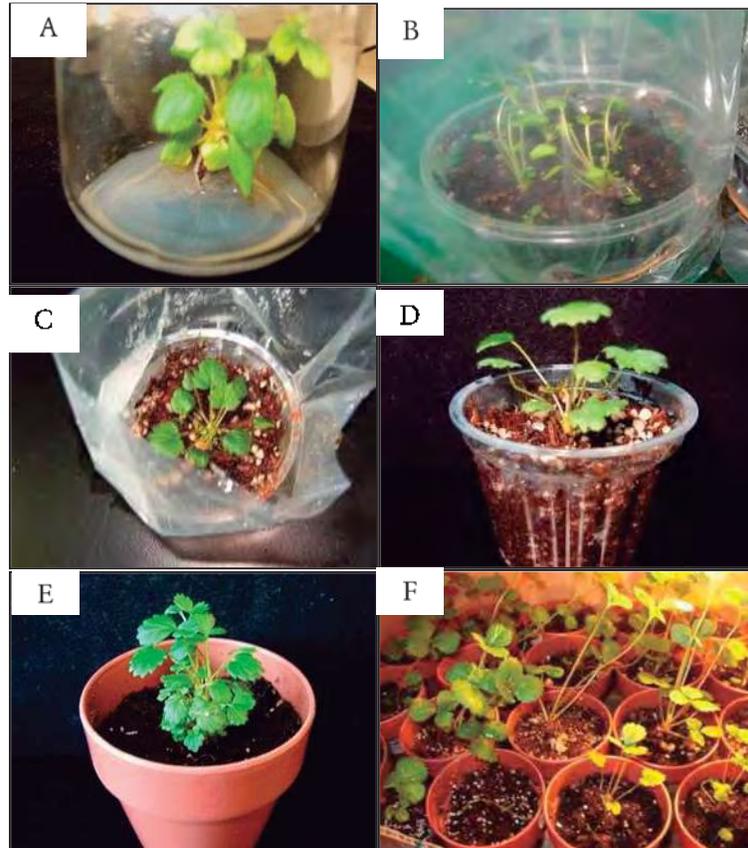


Figura 14. Obtención de plantas de invernadero. Planta *in vitro* (A). Planta transplantada a suelo (B). Planta en período de adaptación (C). Planta adaptada al suelo (D). Planta colocada en maceta (E). Planta en invernadero (F).

Para el riego constante de las plantas de fresa se utilizó una solución nutritiva, la cual consta de los reactivos enlistados en la Tabla 5.

Tabla 5. Solución nutritiva para el riego constante de las plantas *in vitro*.

REACTIVO	CANTIDAD (PARA 19 L)
KH_2PO_4	0.776 g
K_2SO_4	4.469 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	13.461 g
CaSO_4	1.636 g
MgSO_4	7.024 g
EDTA-Fe	0.316 g
Solución con microelementos	19 ml

La solución con microelementos es un componente esencial de la solución nutritiva y consta de los reactivos mostrados en la Tabla 6.

Tabla 6. Solución con microelementos.

REACTIVO	CANTIDAD (PARA 1 L)
H_3BO_3	0.223 g
CuSO_4	0.03 g
EDTA-Fe	0.6 g
MnSO_4	0.64 g
NH_4Mo	0.027 g
ZnSO_4	0.217 g

8.1.2. Mantenimiento de *B. Cinerea*

8.1.2.1. Hongo patógeno *B. Cinerea*.

La cepa de *B. Cinerea* fue aislada de fresa y donada por la D.C Patricia Loyola de la Universidad de Guanajuato, y esta cepa fue utilizada para realizar las infecciones de plantas de las fresa.

El medio que se utilizó para mantener al hongo fue el medio agar papa dextrosa, el cual se preparó de la siguiente manera, se pesaron 19.5 g del medio PDA, se disolvió en agua estéril y se le agregaron 20 g de hoja de fresa, posteriormente se esterilizó en un autoclave a 121 °C por 15 min. Después de haber dejado enfriar, el medio fue vaciado en cajas de petri y se mantuvo en incubación por 24 h a 37 °C para comprobar que no

existe contaminación del medio. Posteriormente, las cajas con medio PDA estuvieron listas para ser utilizadas (Rigotti et al., 2002).

8.1.2.2. Siembra de *B. Cinerea* en medio PDA.

La resiembra consistió en tomar un fragmento de aproximadamente 1 cm del medio PDA con el hongo y se colocó en el centro del medio PDA fresco, esta caja se mantuvo a una temperatura de 25 a 28 °C durante 9 a 14 días para que el hongo pueda crecer adecuadamente (Figura 15).

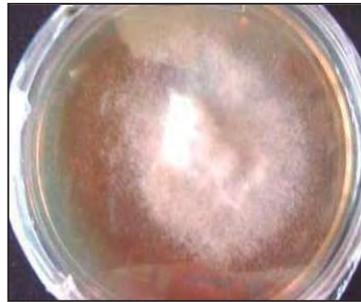


Figura 15. Micelio de *B. Cinerea* en medio agar papa dextrosa (PDA) después de 5 días de crecimiento.

8.1.2.3. Preparación de suspensiones de esporas de *B. Cinerea*.

Después de 9 días de haber mantenido al hongo en incubación, se comprobó por medio de observación al microscopio óptico que *B. Cinerea* generó esporas suficientes para preparar suspensiones de distinta concentración.

El procedimiento utilizado consistió en agregar agua estéril a la caja donde se encontraba sembrado el hongo, al cabo de 5 minutos y se agitó suavemente y se colectaron las esporas un tubo con tapa de rosca (Marthur y Utkhede, 2002). La concentración de esporas se determinó con una cámara de Neubauer (Rigotti et al, 2002) lo cual se puede observar en la Figura 16.

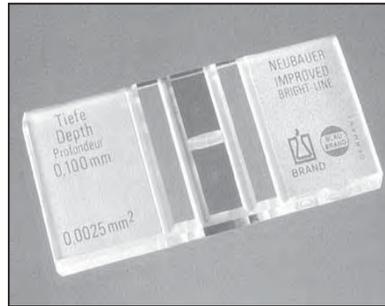


Figura 16. Cámara de Neubauer empleada para la cuantificación de las esporas (A).

8.2. Infección de plantas de fresa cv Aromas con *B. Cinerea*.

8.2.1. Forma de infección.

La infección de las plantas de fresa en el sistema *in vitro* e invernadero fue por aspersión sobre las hojas con la suspensión de esporas de *B. Cinerea*. En el caso del sistema *in vitro* las plantas se colocaron sobre una caja petri y ahí se infectaron (Figura 17A), posteriormente las plantas infectadas se colocaron en un frasco tapado que contenía el medio de soporte agar-agua (Figura 17B). Por otra parte las plantas del sistema invernadero se mantuvieron en condiciones de alta humedad con un humidificador y un fotoperíodo de 12 h de luz (Denby et al., 2004) (Figura 17C). Las plantas fueron infectadas con tres concentraciones de esporas diferentes de 100, 1000 y 10,000 esporas/ml. Es importante indicar que no se conocen reportes en la literatura donde se hayan empleado suspensiones de esporas de 100 y de 1000 esporas/ml, además estas cantidades tan bajas son las que frecuentemente esperaríamos encontrar en condiciones de campo.

Se realizaron 3 repeticiones de la infección y se utilizó una planta sin infectar como control negativo y el hongo como control positivo.

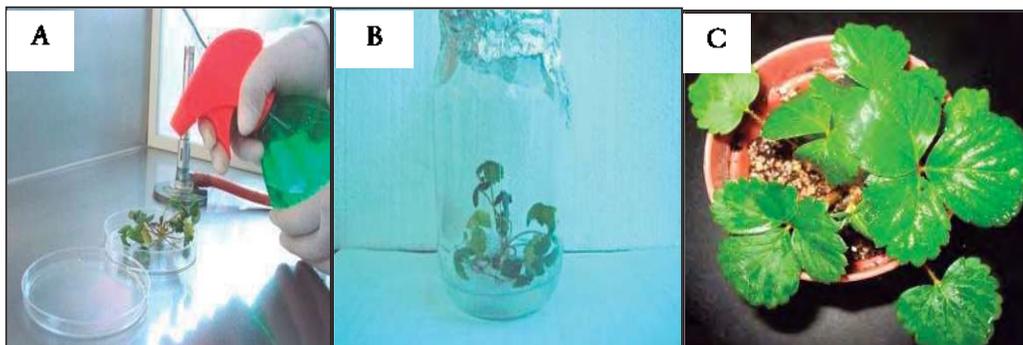


Figura 17. Forma de infección. Infección por aspersión (A). Planta *in vitro* infectada (B). Planta de invernadero infectada (C).

8.2.2. Muestreos.

Para determinar a que tiempo después de la infección se iban a tomar muestras de las plantas de fresa infectadas en los sistemas *in vitro* e invernadero. Para realizar el análisis de compuestos volátiles así como la cuantificación de biomasa del hongo en la planta fue necesario conocer el tiempo de aparición de síntomas de la enfermedad. Para realizar esto, se monitoreó el progreso de la infección, registrando la presencia o ausencia de lesiones y el tiempo post-infección en que fueron visibles.

8.3. Análisis de compuestos volátiles.

La técnica para el análisis de los compuestos volátiles utilizada en este estudio fue la de Microextracción en Fase Sólida o SPME (Solid Phase Microextraction) (Figura 18). Se utilizó la fibra azul con las siguientes características: Es una fibra medianamente polar polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS/DVB)

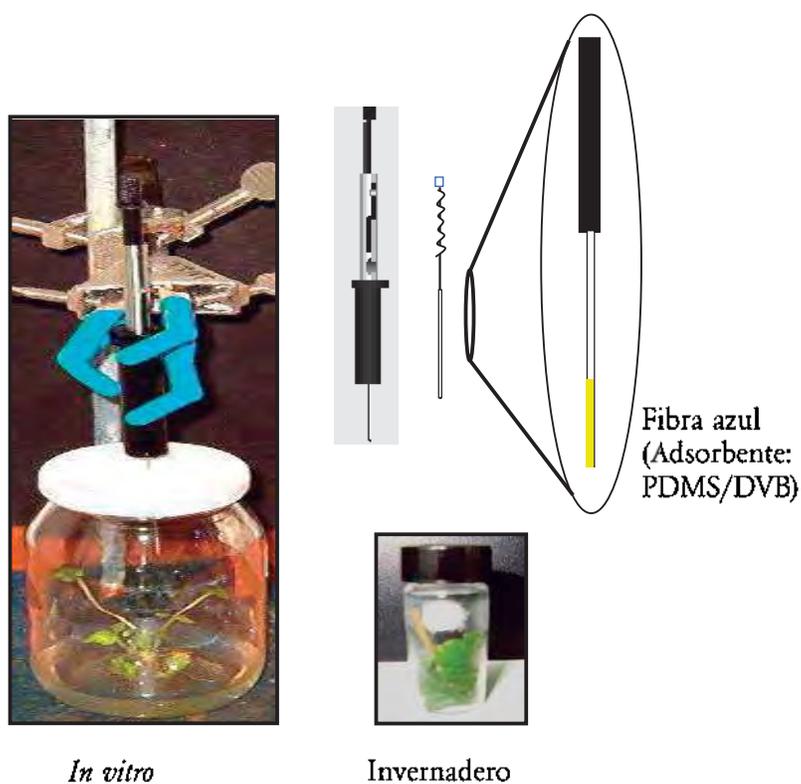


Figura 18. Dispositivo de microextracción en fase sólida (SPME) para la extracción de compuestos volátiles de las plantas *in vitro* e invernadero.

Una vez que los compuestos volátiles fueron atrapados por la fibra, éstos fueron desorbidos térmicamente en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases (GC) acoplado un espectrómetro de masas (MS) con las siguientes condiciones de reacción: La temperatura del puerto de inyección fue de 180 °C por un 1 min en el modo de inyección splitless; la temperatura inicial del horno fue de 50 °C por 3 min y la temperatura post-corrída fue de 230 °C por 3 min; se utilizó una columna HP-FFAP (25 cm x 0.32 mm) (Copp-Mendoza et al., 2004) con un flujo de corrida de 1 ml/min, un flujo de post-corrída de 1.88 ml/min y una presión de 7.6 psi.

La temperatura del detector que se utilizó fue de 250 °C; el tiempo de corrida fue de 51.33 min. Finalmente los compuestos volátiles fueron caracterizados por comparación de los patrones de fragmentación con los de la librería NIST 1998.

Es importante señalar que en el sistema *in vitro* la muestra fue toda la planta de fresa en su frasco sin abrir, y en el sistema invernadero la muestra fue una hoja seleccionada al azar, la cual fue colocada en un vial para realizar el análisis de compuestos volátiles (Figura 18).

Para el análisis de los compuestos volátiles se depositó micelio esporulado y la suspensión de esporas de *B. Cinerea* en viales de SPME, en el caso de la fresa se analizó toda la planta para el sistema *in vitro*, y se empleó una hoja de la planta para el sistema invernadero.

En el análisis de compuestos volátiles se empleó como parámetro a la abundancia relativa en porcentaje del área bajo la curva de cada compuesto volátil. Este valor se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Área} = \frac{\text{Área pico} \times 100}{\sum \text{Área pico}}$$

8.4. Análisis molecular: PCR y PCR en tiempo real.

En este trabajo se utilizaron los siguientes métodos de extracción de DNA:

- ❖ Método de extracción de DNA de Brouwer et al., 2003.
- ❖ Método de extracción de DNA para plantas de Klimyuk et al., 1993.
- ❖ Método de extracción de DNA para plantas de Doyle y Doyle, 1990.
- ❖ Método de extracción de DNA para hongos de Chow y Käfer, 1993.
- ❖ Método de extracción de DNA para plantas (PVP) de Malvick y Grunden, 2005.
- ❖ Método de extracción de DNA de Dellaporte, 1983.
- ❖ Método de extracción DNA para plantas y hongos con el Kit REALPURE.
- ❖ Método de extracción de DNA para plantas de Com.pers.Alpuche-Solis, 2007.
- ❖ Método de extracción de DNA para plantas con el Kit invitrogen.
- ❖ Método de extracción de DNA para hongos o plantas con el Kit Quickgene.

Los mejores resultados para extraer el DNA de las plantas de fresa se obtuvieron con el método de Doyle y Doyle, 1990 y que consiste en lo siguiente:

- 1) 100 mg de material vegetal se congeló en nitrógeno líquido y se homogenizó con el mortero hasta formar un polvo.
- 2) Ese polvo se colocó en tubos de 1.5 ml, se agregó CTAB (buffer de lisis) hasta que el tubo se llenó.
- 3) Este tubo se incubó a 65 °C por 20 min.
- 4) El tubo se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min y el sobrenadante se transfirió a otro tubo.
- 5) Se agregó un volumen de cloroformo:isoamílico (24:1), se mezcló en el vortex y se centrifugó a 10,000 rpm 15 min.
- 6) El sobrenadante se separó y se le agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol, esto se colocó en hielo por 5 min y se centrifugó a 2,500 rpm durante 10 min.
- 7) La pastilla formada se disolvió en 400 µl de CsCl 1 M. Esto se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se le adicionó 80 µl de etanol al 96%.
- 8) El tubo se centrifugó a 7,000 rpm por 10 min.
- 9) El contenido del tubo se lavó con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 14,000 rpm por 2.5 min.
- 10) Se dio tratamiento con RNAasa 36 min a 37 °C.
- 11) El contenido del tubo se lavó con fenol:cloroformo isoamílico.

Los mejores resultados para extraer el DNA del hongo se obtuvieron con el método de Chow y Käfer, 1993 y que consiste en lo siguiente:

- 1) 100 mg de micelio se colocaron en un tubo de 1.5 ml y 0.4 g de perlas de vidrio + 200 µl de buffer de lisis (0.2 M Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.01 M EDTA, 1% de SDS) y 200 µl de fenol:cloroformo:isoamílico.
- 2) El contenido del tubo se mezcló en el vortex 6 min al máximo.
- 3) Al tubo se le agregaron 300 µl de cloroformo:isoamílico y se mezclaron en el vortex por 10 s.
- 4) El tubo se centrifugó a 14,000 rpm por 30 s.
- 5) Se tomó la primera fase y se agregaron 300 µl de cloroformo isoamílico que se mezclaron en el vortex por 10 s.
- 6) El tubo se centrifugó a 14000 rpm por 30 s.
- 7) Se tomó la primera fase y se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto; este tubo fue incubado por 30 min a -20 °C como mínimo.
- 8) Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min.
- 9) Se lavó el contenido del tubo con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó durante 3 min a 14,000 rpm.
- 10) La pastilla obtenida se seco y se resuspendió.

La cuantificación de *B. Cinerea* por la PCR en tiempo real se realizó por comparación con una curva estándar generada por diluciones de DNA de *B. Cinerea* obtenido de una biomasa de hongo conocida. El DNA fue cuantificado con el dispositivo qubit (invitrogen) que permite dicha cuantificación por medio de un fluoróforo.

Graficando los logaritmos de distintas concentraciones conocidas de ADN inicial y la muestra contra sus respectivos ciclos de cruce, se obtiene la cuantificación del hongo en el PCR cuantitativo (Brouwer et al., 2003).

Se probaron 4 pares distintos de oligonucleótidos, los AFP24 y AFP25 que están dirigidos contra una secuencia correspondiente a tubulina (Brouwer et al., 2003), los C729+ y C729- que están reportados como biomarcadores específicos de *B. Cinerea* (Rigotti et al., 2002), y finalmente los BCN1F y BCN1R además de los BCN2F y BCN2R que fueron diseñados como parte de este trabajo.

El PCR en tiempo real se realizó usando el reactivo SYBR®Green I que se encuentra combinado con dNTP's, MgCl₂ y Taq polimerasa, además se utilizó el equipo ICycler™ iQ I (BioRad). Para cada PCR, se prepararon muestras (25 µl) en capilares sellados para el ICycler iQ I conteniendo 2 µl de extracto de DNA, 10 µl Lithos qPCR Mastermix QGS y 0.5 µl de cada primer. Las muestras se programaron para un análisis con 40 ciclos térmicos.

La cuantificación de *B. Cinerea* se hizo en distintas muestras y por medio de PCR en tiempo real.

8.5. Análisis de datos.

Los datos se analizaron con el programa Statistic 6.0, se graficaron las medias de cada muestra con el error estándar y para analizar la validez de los resultados encontrados se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía) seguida por una prueba de LSD con un alfa de 0.05.

9. RESULTADOS.

Una de las metas de este estudio fue la identificación de biomarcadores para la detección oportuna de *B. Cinerea* en plantas infectadas de fresa antes de la aparición de síntomas visibles. Para poder cumplir con esta meta, fue necesario infectar a las plantas con tres concentraciones de esporas diferentes con la finalidad de establecer los tiempos de muestreo para el análisis de volátiles en etapas iniciales de la infección.

A continuación se presentan los resultados obtenidos tanto en el sistema *in vitro* como en el sistema invernadero.

9.1. Sistema *in vitro*.

En la Figura 19 se muestran los síntomas característicos de la enfermedad en función del tiempo post-infección. La aparición de lesiones necróticas y de cuerpos fructíferos del hongo indicaron que en las tres concentraciones de esporas probadas se logró la infección, pero la aparición de los síntomas visibles con la concentración de 100 esporas/ml fue más lenta ya que las lesiones necróticas se presentaron hasta las 48 h post-infección y los cuerpos fructíferos se apreciaron a partir de las 120 h post-infección

(Figura 19A). Las plantas infectadas con 1000 esporas/ml por su parte mostraron lesiones necróticas a las 24 h post-infección y a las 72 h post-infección se detectaron cuerpos fructíferos (Figura 19B). Aquellas plantas infectadas con 10,000 esporas/ml mostraron lesiones necróticas a las 24 h y a las 48 h post-infección los cuerpos fructíferos (Figura 19C) y la planta sin infectar es el control (Figura 19D). De acuerdo a estos resultados, es indudable que las plantas de fresa fueron infectadas y que la enfermedad evoluciona rápidamente conforme pasa el tiempo post-infección y dependiendo de la suspensión de esporas. Sin embargo de todas las suspensiones de esporas empleadas, la suspensión de 100 esporas/ml nos permitió monitorear la enfermedad cuando no hay síntomas en etapas iniciales en un periodo de tiempo mayor con respecto a las otras suspensiones, por lo que los tiempos de muestreo para el análisis de los compuestos volátiles fueron a las 1, 12, 24 y 48 h post-infección.

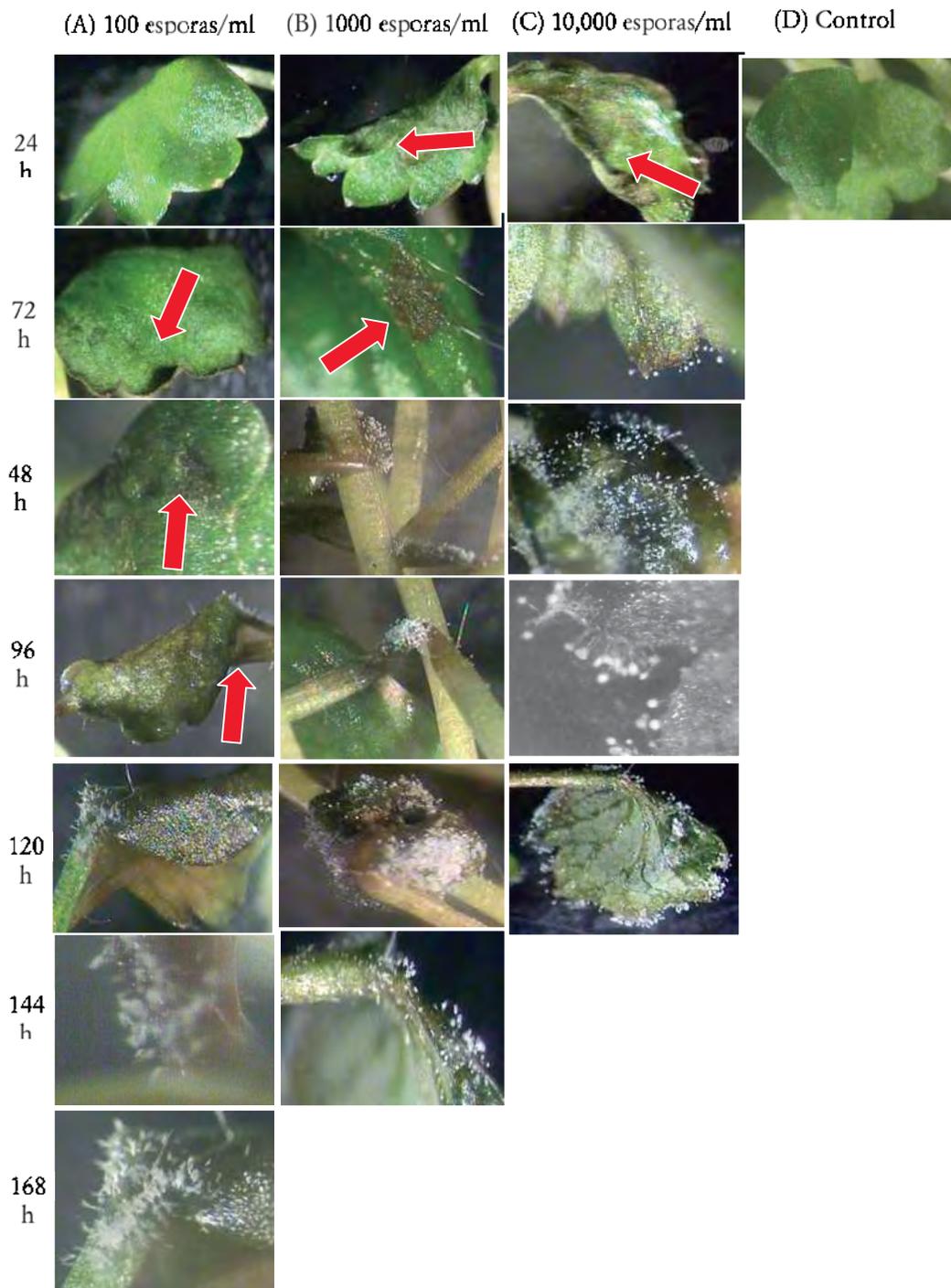


Figura 19. Sintomatología de las plantas de fresa infectadas con diferentes suspensiones de esporas de *B. Cinerea* a diferentes tiempo en el sistema *in vitro*. (A) Plantas infectadas con 100 esporas/ml. (B) Plantas infectadas con 1000 esporas/ml. (C) Plantas infectadas con 10,000 esporas/ml. (D) Planta sana (control). Se emplearon plantas de 42 días de edad. Se utilizó un Microscopio estereoscópico Leica MZ6/L2 (Leica Microsystems, Wetzlar Germany). Cada planta en el frasco representa una unidad experimental. Se utilizaron 3 plantas por tratamiento(n=3). La flecha indica lesiones necróticas causadas por el patógeno.

Después de elegir la concentración de esporas de *B. Cinerea* para la infección y los tiempos de muestreo, se evaluó la progresión de la enfermedad en base al registro del número y longitud de lesiones necróticas de acuerdo al tiempo post-infección en las plantas de fresa infectadas en el sistema *in vitro*.

En la Figura 20 se muestra que el número de lesiones necróticas se incrementó con respecto al tiempo post-infección, de tal manera que a las 168 h se logró observar hasta 30 lesiones diferentes en las plantas.

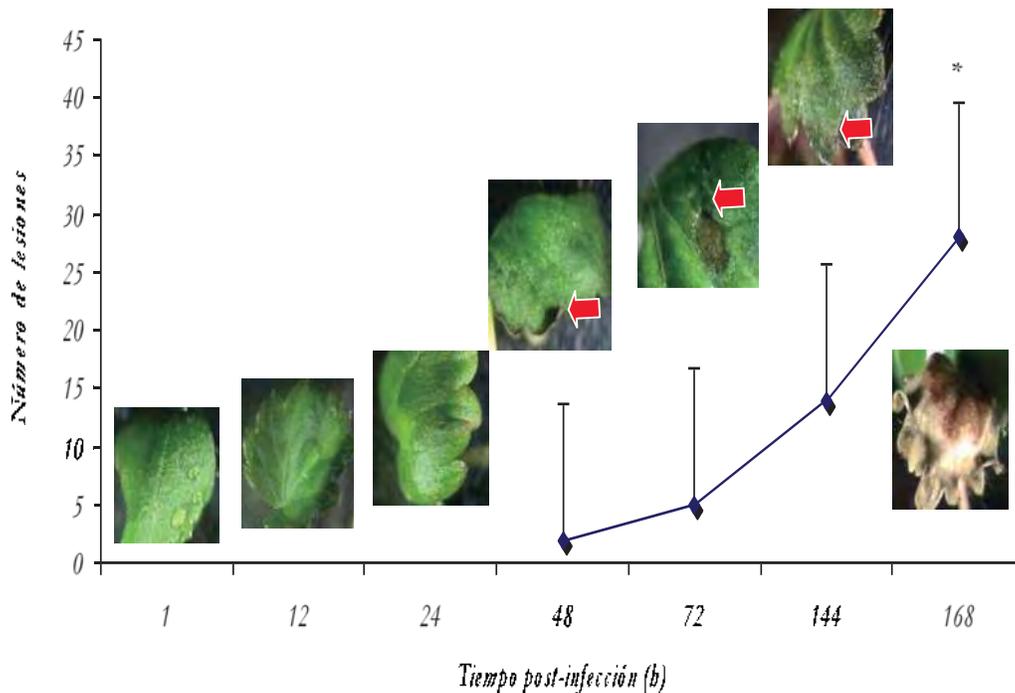


Figura 20. Lesiones necróticas en las plantas de fresa *in vitro* infectadas con *B. Cinerea* a diferentes tiempos post-infección. Se emplearon plantas de 42 días de edad (n=3). Las fotografías se realizaron en un microscopio estereoscópico Leica MZ6/L2 (Leica Microsystems, Wetzlar Germany). Se puede observar una diferencia significativa (*) del número de lesiones a las 168 h post-infección con respecto a los otros tiempos post-infección. Se aplicó un ANOVA con prueba de LSD. La flecha indica lesiones necróticas causadas por el patógeno.

En la Figura 21 se puede observar que existió un incremento de la longitud de las lesiones con respecto al tiempo post-infección. Esto indica que la enfermedad está agravándose ya que las lesiones se están expandiendo a tejido circundante que no se encontraba infectado.

Los síntomas de la enfermedad en las plantas de fresa del sistema *in vitro* se presentaron a partir de las 48 h post-infección y la enfermedad provocó un daño evidente que evolucionó rápidamente en poco tiempo.

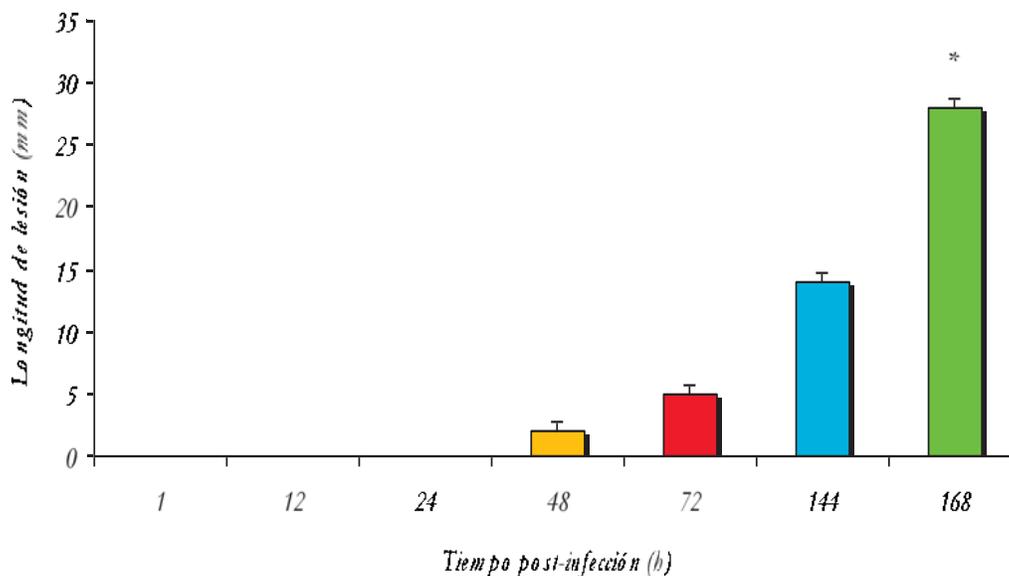


Figura 21. Longitud de las lesiones necróticas en plantas de fresa *in vitro* a diferentes tiempos post-infección. Se emplearon plantas de 42 días de edad (n=3). Se puede observar una diferencia significativa (*) de la longitud de las lesiones a las 168 h post-infección con respecto a los otros tiempos post-infección. Se aplicó un ANOVA con prueba de LSD.

9.1.1. Análisis de compuestos volátiles de las plantas infectadas.

El análisis de los compuestos volátiles de los controles (volátiles del frasco solo, medio agar-agua, planta sana, suspensión de esporas y micelio esporulado) y de la planta infectada indicó que en total se caracterizaron 278 compuestos volátiles diferentes (Figura 22). Debido a la complejidad de datos, se realizó una selección en función de la calidad del patrón de masa del compuesto en comparación al de la librería NIST 1998 y al porcentaje relativo de abundancia (superior a 0.1%). Además el análisis de los controles permitió definir la procedencia de cada compuesto volátil.

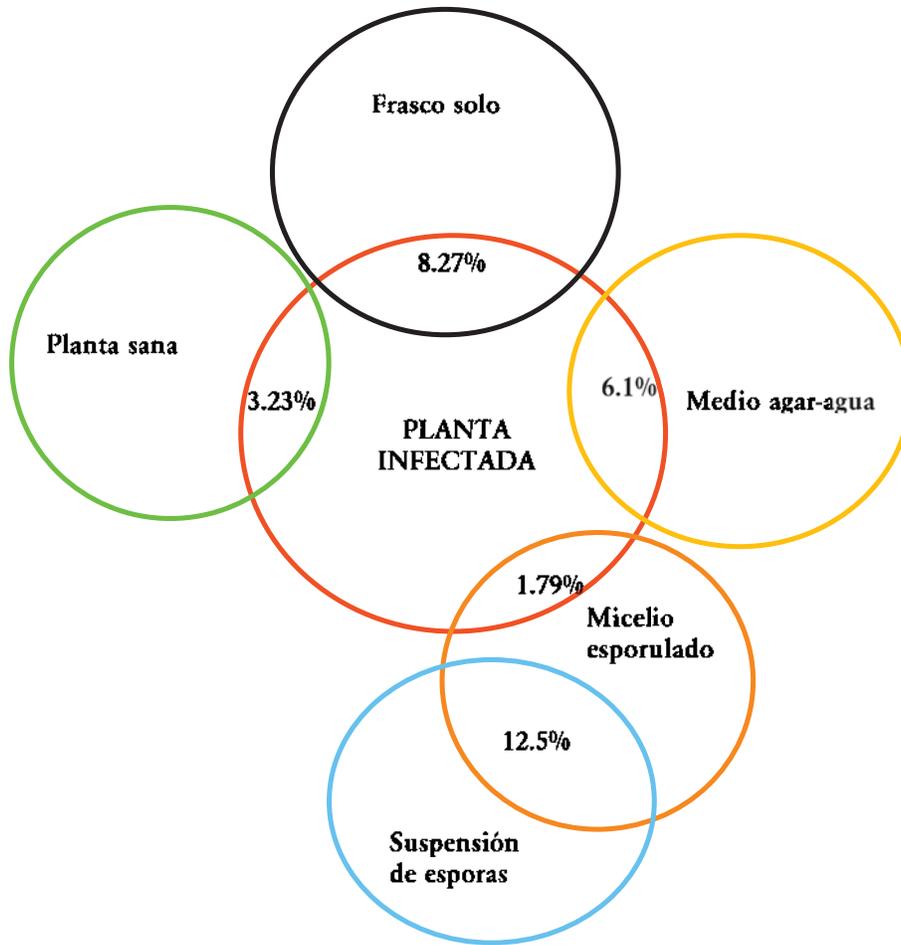


Figura 22. Porcentaje de los compuestos volátiles identificados en los controles del sistema *in vitro* (en cada muestra n=3).

En la Tabla 7, se enlistan algunos compuestos volátiles que fueron identificados en el micelio esporulado y en la suspensión de esporas. Los compuestos volátiles como el fenol, 2,6-bis (dimetiletil)-4-(1-oxopropil), feniletil alcohol y el 4-metil-2-heptanona se detectaron en muestras de micelio esporulado, así como en la suspensión de esporas. De los compuestos volátiles del micelio esporulado el más abundante fue el 1-octen-3-ol y de la suspensión de esporas fue un derivado del ácido pentanoico (2-Metil, 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanodil ester, 2-metil ácido propanoico).

Tabla 7. Compuestos volátiles identificados en muestras de *B. Cinerea* (n=3).

COMPUESTO	SUSPENSIÓN DE ESPORAS (%)	MICELIO ESPORULADO (%)	REFERENCIA
Derivado del ácido pentanoico	60.69	-	Stahl y klug, 1996 (composición celular de algunos hongos).
1-Octen-3-ol	-	44.40	Chitarra et al., 2004 (Germinación).
2-Etil-1-hexanol	32.25	-	Vikram et al., 2004 (algunos hongos).
Fenol, 2,6-bis (dimetiletil)4-(1-oxopropil)	3.58	14.33	Wu et al., 2005 (volatiles de cuerpos fructíferos).
4-Metil-2-heptanona	0.49	0.29	Ruzsanyi et al., 2002 (Antes de los síntomas).
3-Octanona	-	8.06	Chitarra et al., 2004 (Germinación).
Feniletil alcohol	0.23	2.82	Jelen et al., 2005 (Crecimiento).
3-Octanol	-	2.05	Nilssona et al., 1996 (Crecimiento).
Bencenacetaldehído	-	0.94	Kulakiotu et al., 2004 (Crecimiento).
4-Heptanona	-	0.82	Fiedler et al., 2001 (Aroma de los hongos).
Derivado del ácido propanoico	-	0.46	Stinson, et al., 2003 (Presente en infecciones por hongos).
2-Octenal (E)	-	0.29	Spilvallo et al., 2007 (Germinación).

Derivado del ácido pentanoico (Isobutil ester 2, 2, 4-trimetil-3-carboxi isopropil, ácido pentanoico).

Derivado del ácido propanoico (2-Metil, 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanodil ester, 2-metil ácido propanoico).

Diversos reportes en la literatura indican que estos compuestos son producidos por el hongo para su crecimiento y para poder colonizar a su hospedero. Debido a la importancia biológica de estos compuestos para el hongo, se supuso que estarían todos presentes en las plantas infectadas y al analizar el perfil de los compuestos se encontró lo siguiente:

Se puede observar que la mayoría de los compuestos del hongo se identificaron en la primera hora post-infección, de estos compuestos la 3-octanona y el 2-octenal (E) están directamente involucrados en la germinación de las esporas del hongo (Tabla 8).

Tabla 8. Compuestos volátiles de *B.cinerea* identificados en plantas infectadas en el sistema *in vitro*.

COMPUESTO	1 H	12 H	24 H	48 H	REFERENCIA
4-Heptanona	0.64	-	-	-	Fiedler et al., 2001 (Aroma de los hongos).
3-Octanona	0.56	-	-	1.22	Chitarra et al., 2004 (Germinación).
2-Octenal(E)	17.19	-	-	-	Spilvallo et al., 2007 (Germinación).
Derivado del ácido propanoico	-	-	-	4.63	Stinson, et al., 2003 (Presente en infecciones por hongos).

Derivado del ácido propanoico (2-Metil, 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanodil ester, 2-metil ácido propanoico).

Al analizar el perfil de compuestos volátiles producidos por las plantas infectadas se observó la presencia de otros compuestos que no se encontraron ni en la planta sana ni en el hongo (Figura 23). Estos compuestos fueron producidos por la interacción planta-patógeno. En la Figura 23 podemos apreciar que la mayor diversidad y mayor abundancia de estos compuestos se observó a las 24 h post-infección.

De acuerdo a estos resultados los compuestos más abundantes fueron el 1-etil-2,3-dimetil benceno que inhibe el crecimiento de *B. Cinerea* (Peng-Ying, et al., 2008), y el preniteno que es antifúngico (Graham, et al., 1981). Compuestos como el mirtenal (Smith y Boyko, 2007) y el 2-etil-1,3-dimetil benceno (Gramemmos, et al., 2002) aparecen dentro de las primeras 12 h post-infección y tienen propiedades de defensa contra patógenos.

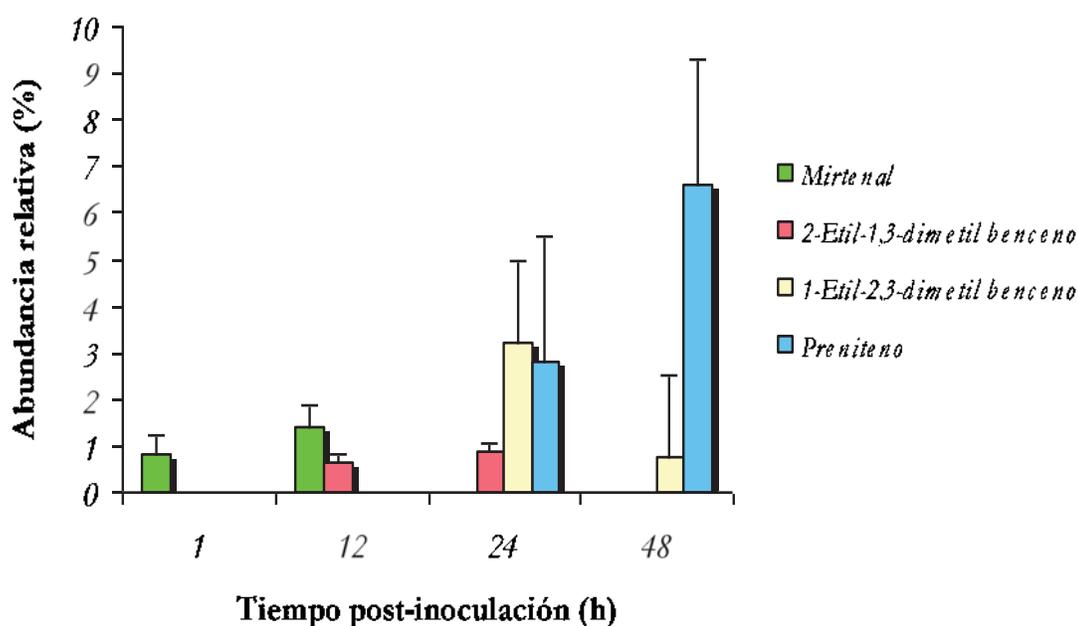


Figura 23. Compuestos volátiles de interacción planta-patógeno de plantas infectadas en el sistema *in vitro*. Se emplearon plantas de 42 días de edad (n=3).

9.2. Sistema invernadero.

En la Figura 24 se muestra la sintomatología observada en las plantas de fresa después de la infección con las distintas concentraciones de esporas probadas. De tal manera que se pudo observar que la evolución de la enfermedad es lenta y solo se observaron lesiones necróticas en las hojas de la planta que se van agravando conforme transcurre el tiempo post-infección. En el caso de las plantas infectadas con la suspensión de 100 esporas/ml, se observaron lesiones necróticas hasta las 72 h post-infección (Figura 24A). Las plantas infectadas con 1000 esporas/ml mostraron lesiones necróticas a las 48 h post-infección (Figura 24B). Aquellas plantas infectadas con 10,000 esporas/ml presentaron lesiones a las 24 h post-infección (Figura 24C) y la planta sin infectar representa al control (Figura 24D). Por lo tanto, las plantas infectadas con la suspensión de 100 esporas/ml nos permiten evaluar la enfermedad en sus etapas iniciales en un periodo más largo con respecto a las otras suspensiones de esporas, tomando muestras a las 1, 12, 24 y 72 h post-infección.

Después de elegir la concentración de esporas de *B. Cinerea* para la infección y los tiempos de muestreo, se evaluó la progresión de la enfermedad registrando el número y longitud de las lesiones necróticas de acuerdo al tiempo post-infección en las plantas de fresa infectadas en el sistema invernadero.

En la Figura 25 se aprecia un incremento de las lesiones necróticas en plantas de fresa infectadas en el sistema invernadero con respecto al tiempo post-infección. También podemos observar que las primeras lesiones se detectaron hasta las 72 h post-infección. A partir de este tiempo las lesiones comenzaron a incrementar sus dimensiones conforme pasa el tiempo, lo cual se puede observar en la Figura 26. Por lo tanto, en este sistema se requiere más tiempo para observar una evolución muy marcada de los síntomas de la enfermedad. Con este experimentos se lograron infectar las plantas del sistema invernadero con todas las suspensiones de esporas y se observó que la enfermedad avanza lentamente.

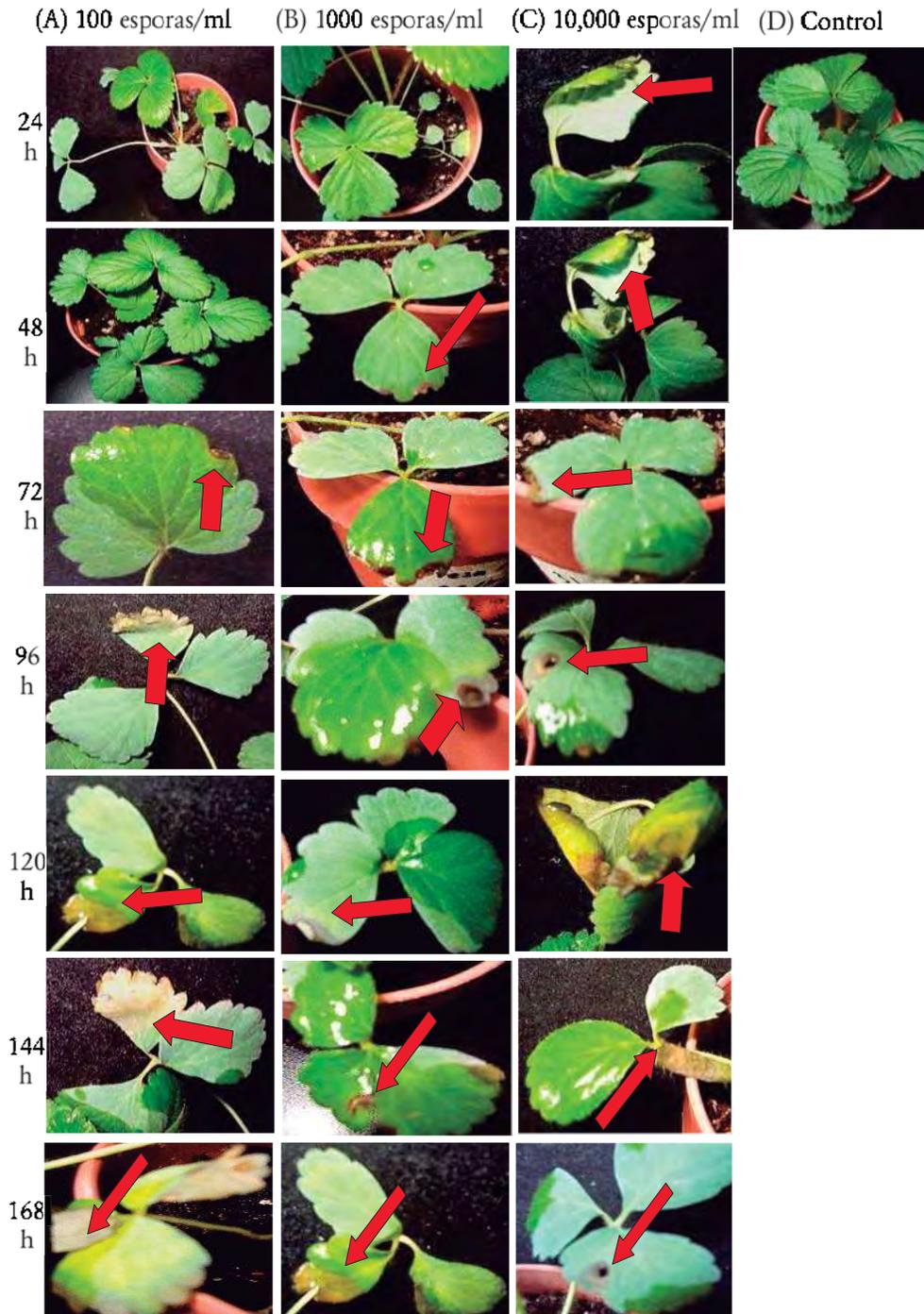


Figura 24. Sintomatología de las plantas de fresa infectadas con diferentes suspensiones de esporas a diferentes tiempos en el sistema invernadero. Se emplearon plantas de 108 días de edad (n=3). (A) Plantas infectadas con 100 esporas/ml. (B) Plantas infectadas con 1000 esporas/ml. (C) Plantas infectadas con 10,000 esporas/ml. (D) Planta sana (control). La flecha indica lesiones necróticas causadas por el patógeno.

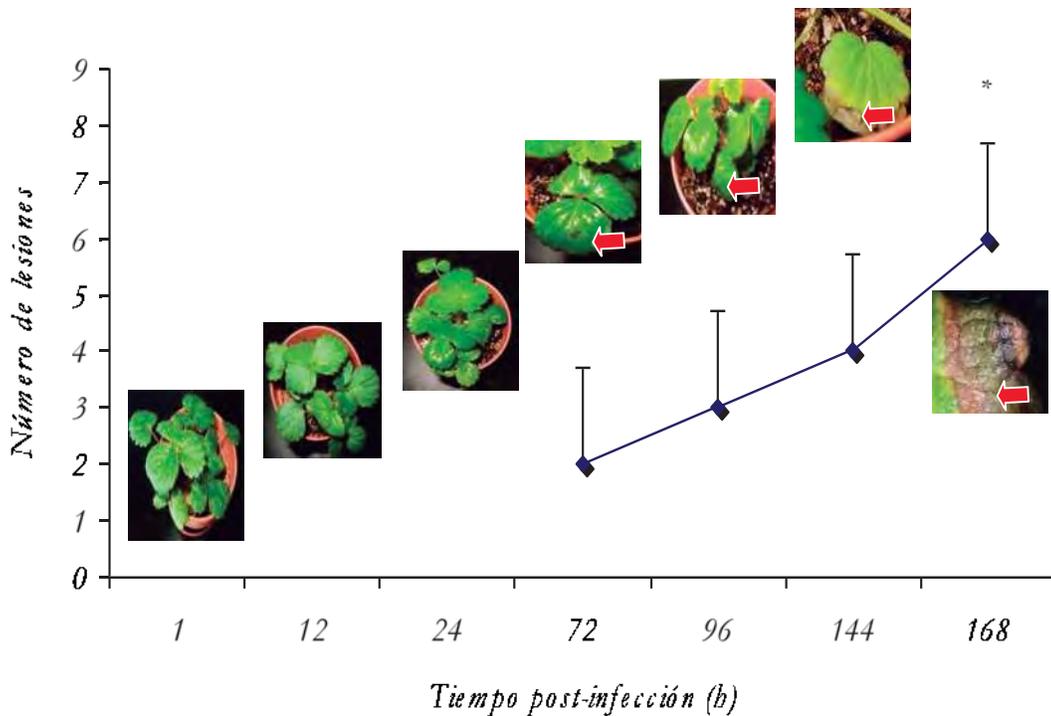


Figura 25. Lesiones necróticas en las plantas de fresa invernadero a diferentes tiempos post-infección. Se emplearon plantas de 108 días de edad. (n=3). Se puede observar una diferencia significativa (*) en el número de las lesiones a las 168 h post-infección con respecto a los otros tiempos post-infección. Se aplicó un ANOVA con prueba de LSD. La flecha indica lesiones necróticas causadas por el patógeno.

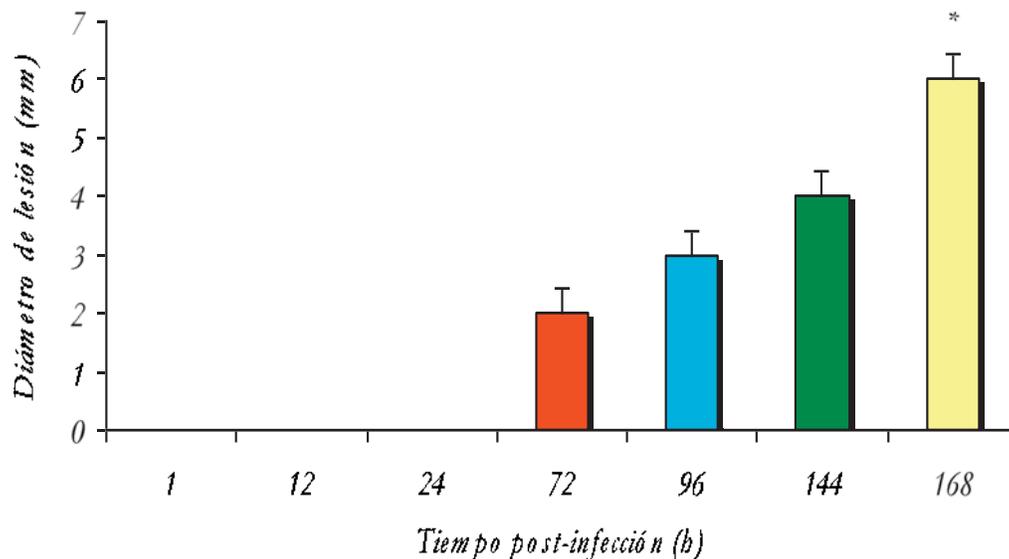


Figura 26. Longitud de las lesiones necróticas en plantas de fresa invernadero a diferentes tiempos post-infección. Se emplearon plantas de 108 días de edad (n=3). Se puede observar una diferencia significativa (*) de la longitud de las lesiones a las 168 h post-infección con respecto a los otros tiempos post-infección. Se aplicó un ANOVA con prueba de LSD.

De igual manera que en el sistema *in vitro*, cuando se realizó el análisis de compuestos volátiles para detectar a *B. Cinerea* en plantas infectadas, se obtuvieron 354 compuestos volátiles distintos, los cuales fueron clasificados, seleccionados y organizados tomando en cuenta como criterios la calidad, porcentaje relativo de abundancia (superior a 0.2%) y el uso de los controles (planta sana, suspensión de esporas y micelio esporulado) de tal forma que pudimos identificar en las muestras la procedencia de cada compuesto volátil. Por lo tanto en la Figura 27 se muestra la cantidad total de compuestos volátiles identificados en cada muestra.

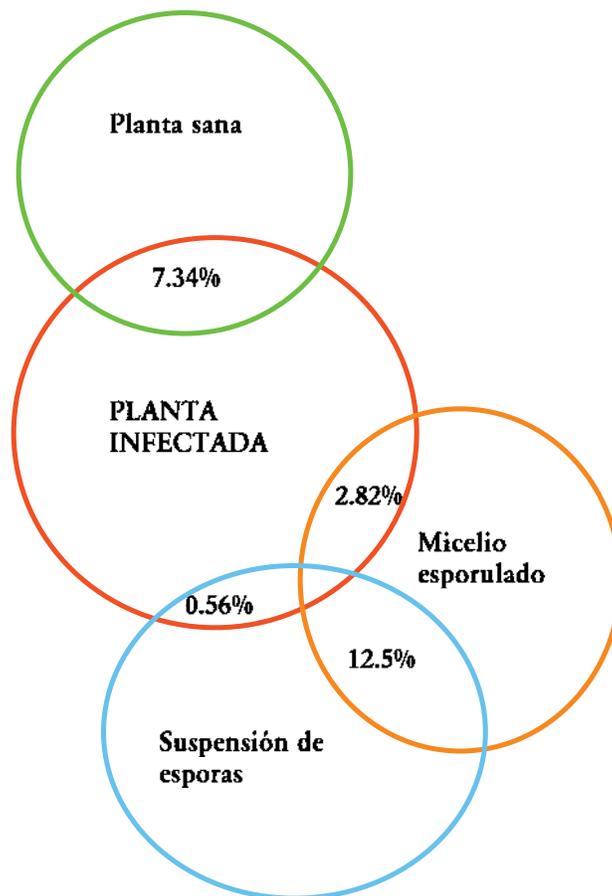


Figura 27. Porcentaje de los compuestos volátiles identificados en los controles del sistema invernadero (en cada muestra n=3).

Los compuestos volátiles que fueron generados por *B. Cinerea* y que se identificaron en las plantas de fresa infectadas en el sistema invernadero se enlistan en la tabla 9. Hay que

destacar que la mayor parte de los compuestos se detectaron a la 12 y 24h post-infección; el 1-octen-3-ol se presenta en todos los muestreos.

9.2.1. Análisis de compuestos volátiles de las plantas infectadas.

Como se puede observar en la Tabla 9 todos los compuestos muestran una tendencia a incrementar su abundancia conforme transcurre el tiempo post-infección

Tabla 9. Compuestos volátiles de *B. Cinerea* identificados en plantas infectadas en el sistema invernadero (n=3).

COMPUESTO	1 H	12 H	24 H	48 H	REFERENCIA
4-Metil-2-heptanona	17.19	-	-		Ruzsanyi et al., 2002 (Antes de los síntomas).
3-Octanona	-	-	-	0.34	Chitarra et al., 2004 (Germinación).
3-Octanol	-	0.31	0.39	2.36	Nilsson et al., 1996 (Crecimiento).
1-Octen-3-ol	0.38	0.41	0.61	0.23	Chitarra et al., 2004 (Germinación).
Bencenacetaldehído		0.16	0.31	-	Kulakiotu et al., 2004 (Crecimiento).
Derivado del ácido propanoico	4.06	-	-	-	Stinson et al., 2003 (Infecciones fúngicas).
Feniletil alcohol	-	0.11	0.39	-	Jelen et al., 2005 (Crecimiento).

Derivado del ácido propanoico (2-metil, 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanodil ester, 2-metil ácido propanoico).

Los compuestos volátiles mostrados en la Figura 28 son producto de la interacción planta-patógeno, es decir no se encontraron ni en la planta sana ni en el hongo. Esta Figura muestra que el mayor número y diversidad de compuestos se identificaron a las 1 y 12h post-infección, por ejemplo 4-metil-2-pentanol (Franciolis et al., 1999), solo la tetralona (Alois et al., 1999) se presentó en todos los muestreos, a las 12h se obtuvieron los compuestos más abundantes como el 3-metil-1-butanol (Stinson et al., 2003), y el 4-

hexen-1-ol acetato (Aboud, 2002). Todos estos compuestos son sintetizados por la planta infectada para defenderse del ataque del patógeno.

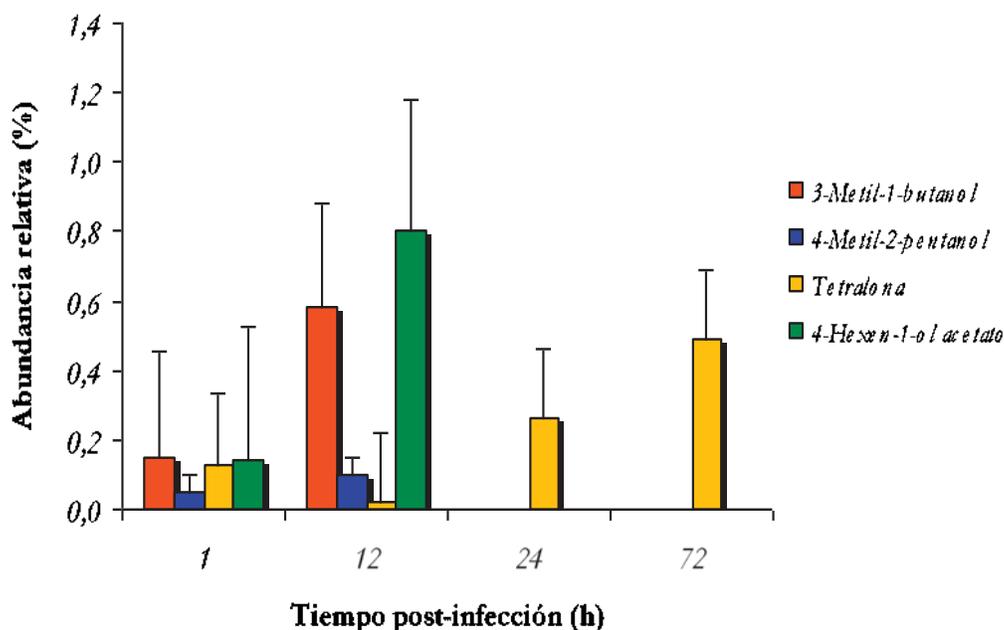


Figura 28. Compuestos volátiles de interacción planta-patógeno en el sistema invernadero. Se emplearon plantas de 108 días de edad (n=3).

En la Tabla 10 se muestran los compuestos volátiles comunes entre los dos sistemas: *In vitro* e invernadero. Este resultado es muy relevante ya que a pesar de las diferencias entre dichos sistemas, se propone que estos compuestos pueden emplearse como biomarcadores para detectar infecciones por *B. Cinerea*.

Tabla 10. Compuestos volátiles como biomarcadores detectados en ambos sistemas (*in vitro* e invernadero).

ORIGEN	IN VITRO	INVERNADERO
<i>B. Cinerea</i>	3-Octanona	3-Octanona
<i>B. Cinerea</i>	Derivado del ácido propanoico	Derivado del ácido propanoico
Interacción planta-patógeno	<i>o</i> -Cimeno	<i>o</i> -Cimeno
Interacción planta-patógeno	<i>o</i> -Xileno	<i>o</i> -Xileno

o-Cimeno: Muller-Ribeau et al., 1995 (antifungico).
o-Xileno: De Lacy Costello, 1999 (fungicida).

9.3. Análisis molecular.

Los resultados del análisis molecular se muestran en tres partes. Primero se describen los resultados de la selección de los oligos, utilizados para la amplificación de *B. Cinerea*, después los resultados obtenidos de la curva estándar a partir del DNA del hongo y finalmente se muestran los resultados de PCR normal y PCR en tiempo real para la cuantificación de la biomasa del hongo en la planta.

9.3.1. Amplificación de DNA *B. Cinerea* por PCR y PCR en tiempo real con distintos oligonucleótidos.

En la Tabla 11 se muestran las secuencias de los oligos AFP24 y AFP25 que fueron descritos en los antecedentes por Brouwer y colaboradores en el 2003 y que se utilizaron en este estudio. Estos oligos están dirigidos contra el gen de β -tubulina de hongos. También puede observarse que este par de oligos amplifican satisfactoriamente a *B. Cinerea* por PCR tal y como muestra la Figura 29 donde se obtuvo una banda de amplificación de aproximadamente 250 pb en el gel de agarosa.

Tabla 11. Secuencia de los oligos AFP24 y AFP25 para la amplificación de *B. Cinerea* (Brouwer et al., 2003).

Organismo	Oligonucleótidos	Secuencia(5'3')
<i>B. Cinerea</i>	AFP24 (F)	CCGTCATGTCCGGTGTIACCAC
<i>B. Cinerea</i>	AFP25 (R)	CGACCGTTACGGAAATCGGAAG

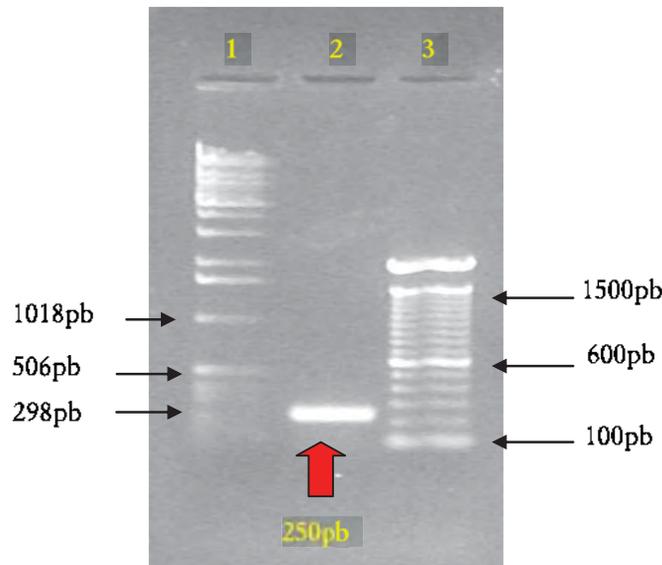


Figura 29. Amplificación de *B. Cinerea* por PCR con los oligos AFP24 y AFP25. Se utilizó como muestra el micelio de *B. Cinerea*. Carriles: (1) MPM 1Kb, (2) producto de PCR de *B. Cinerea*, (3) MPM 100 pb. Condiciones de PCR: 1 ciclo a 94 °C 3 min; 30 ciclos a 94 °C 30 s, a 63 °C 30 s, a 72 °C 30 s; 1 ciclo a 72 °C 3 min; 1 ciclo a 4 °C ∞. El método de extracción de DNA empleado fue el de Kilmyuk, et al., 1993.

Debido a que estos oligos originan un fragmento de amplificación pequeño, se decidió emplearlos para PCR en tiempo real con SYBER Green como se muestra en la Figura 30. Sin embargo, también se obtuvo un coeficiente de correlación bajo (0.811) para la curva estándar por PCR en tiempo real. Por tal motivo se decidió utilizar los oligos C729+ y C729- cuya secuencia se indica en la Tabla 12. Estos oligos están dirigidos contra una secuencia intergénica del ADNr.

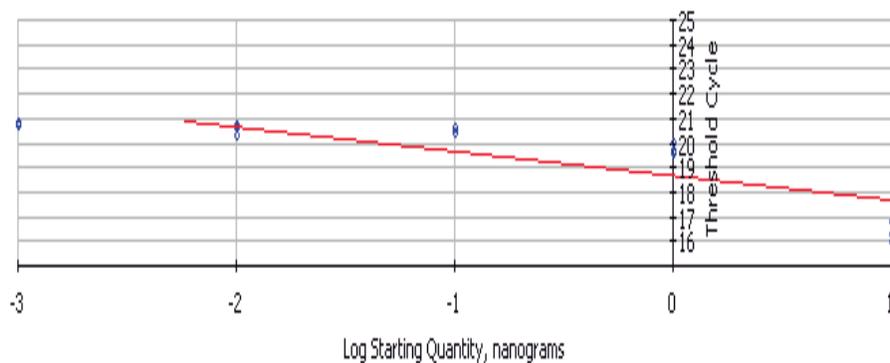


Figura 30. Curvas de amplificación de *B. Cinerea* por PCR en tiempo real con los oligos AFP24 y AFP25. Se utilizó como muestra por duplicado para cada punto de la curva el micelio de *B. Cinerea*. Condiciones de PCR: 40 ciclos a 95 °C 30 s, 63 °C 30 s, 1 ciclo a 4 °C ∞. El método de extracción empleado fue el de Kilmyuk, et al., 1993. Intervalo de detección de 0.038 ng a 0.448 ng.

Tabla 12. Secuencia de los oligos C729+ y C729-. Generan un fragmento de 729 pb (Rigotti et al., 2002).

Organismo	Oligonucleótidos	Secuencia(5'3')
<i>B. Cinerea</i>	C729+ (F)	AGCTCGAGAGAGATCTCTGA
<i>B. Cinerea</i>	C729- (R)	CTGCAATGTTCTGCGTGGA

En la Figura 31 se muestra como los oligos C729+ y C729- amplificaron satisfactoriamente al hongo originando un banda de aproximadamente 729 pb en el gel de agarosa.

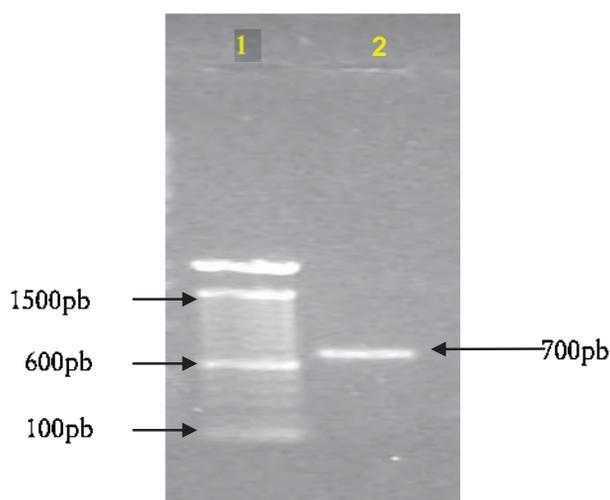


Figura 31. Amplificación de *B. Cinerea* por PCR con los oligos C729+ y C729-. Como muestra se utilizó el micelio de *B. Cinerea*. Carriles: (1) MPM 1Kb, (2) producto de PCR de *B. Cinerea*. Condiciones de PCR: 1 ciclo a 94 °C 3 min; 30 ciclos a 94 °C 30 s, a 63 °C 30 s, a 72 °C 30 s; 1 ciclo a 72 °C 3 min; 1 ciclo a 4 °C ∞. El método de extracción empleado fue el de Kilmyuk, et al., 1993.

Aunque estos oligos son muy grandes para utilizarlos con SYBER Green, se amplificó a *B. Cinerea* por PCR en tiempo real como se muestra en la Figura 32, pero el coeficiente de correlación obtenido para la curva estándar por PCR en tiempo real fue bajo (0.840). Debido a esto diseñamos dos pares de oligos nuevos, basando su diseño en la secuencia intergénica reportada por Rigotti et al., 2002, donde se aparean los oligos C729+ y C729- (Tabla 13 y 14). Esto se indica en la Figura 33.

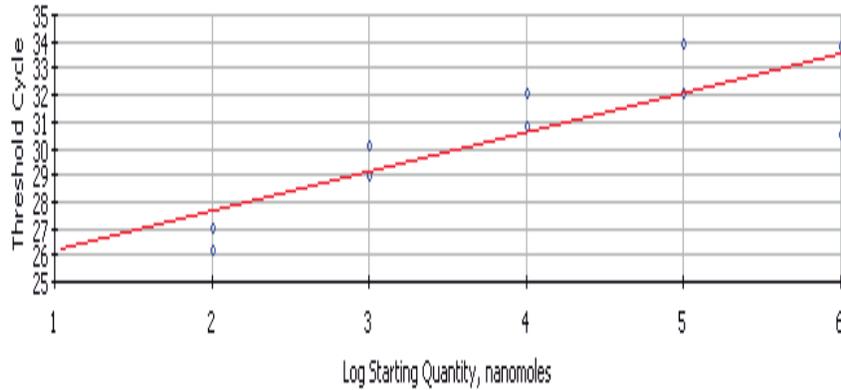


Figura 32. Curvas de amplificación de *B. Cinerea* por PCR en tiempo real con los oligos C729+ y C729-. Se utilizó como muestra por duplicado para cada punto de la curva el micelio de *B. Cinerea*. Condiciones de PCR: 40 ciclos a 95 °C 30 s, 53 °C 30 s, 1 ciclo a 4 °C ∞. El método de extracción empleado fue el de Kilmyuk, et al., 1993. Intervalo de detección de 0.887 ng a 2.31 ng.

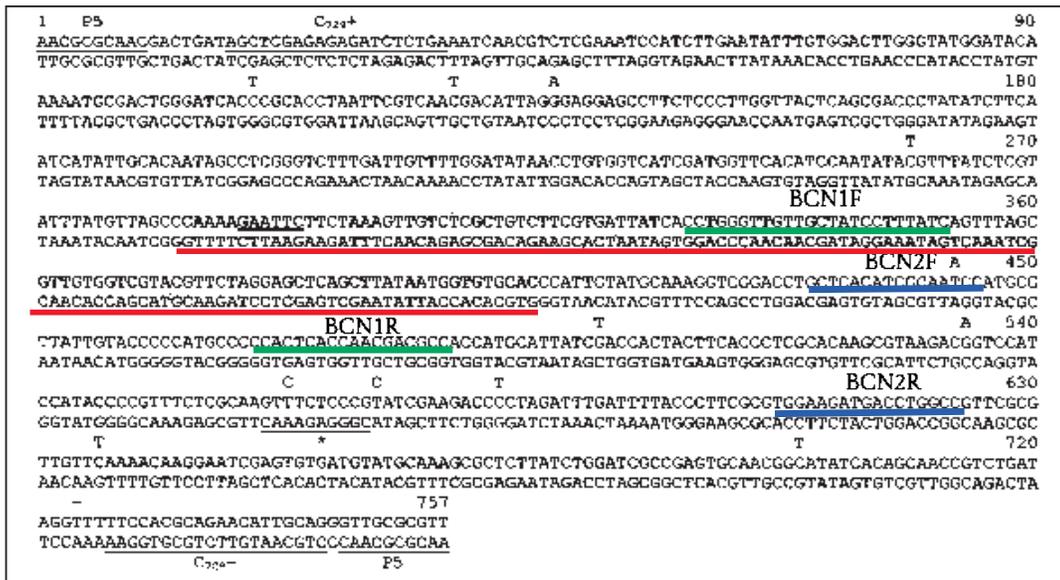


Figura 33. Apareamiento de los oligos C729+ y C729-, BCN1F y BCN1R, BCN2F y BCN2R en la secuencia intergénica de *B. Cinerea* reportada por Rigotti et al., 2002.

Tabla 13. Secuencia de los oligos BCN1F y BCN1R. Generan un fragmento de 193 pb.

Organismo	Oligonucleótidos	Secuencia(5'3')
<i>B. Cinerea</i>	BCN1 (F)	CCTGGGTTGTTGCTATCCITATC
<i>B. Cinerea</i>	BCN1 (R)	GCGTCGTTGGTGAGTGG

Tabla 14. Secuencia de los oligos BCN2F y BCN2R. Generan un fragmento de 153 pb.

Organismo	Oligonucleótidos	Secuencia(5'3')
<i>B. Cinerea</i>	BCN2 (F)	GCTCACATCGCAATC
<i>B. Cinerea</i>	BCN2 (R)	GCCAGGTCATCTCC

Para optimizar las condiciones de amplificación con los 2 pares de oligos diseñados fue necesario realizar gradientes de temperatura tomando en cuenta la temperatura de alineamiento sugerida por el fabricante y por el programa de diseño de los oligos (Beacon Desing AJ422103).

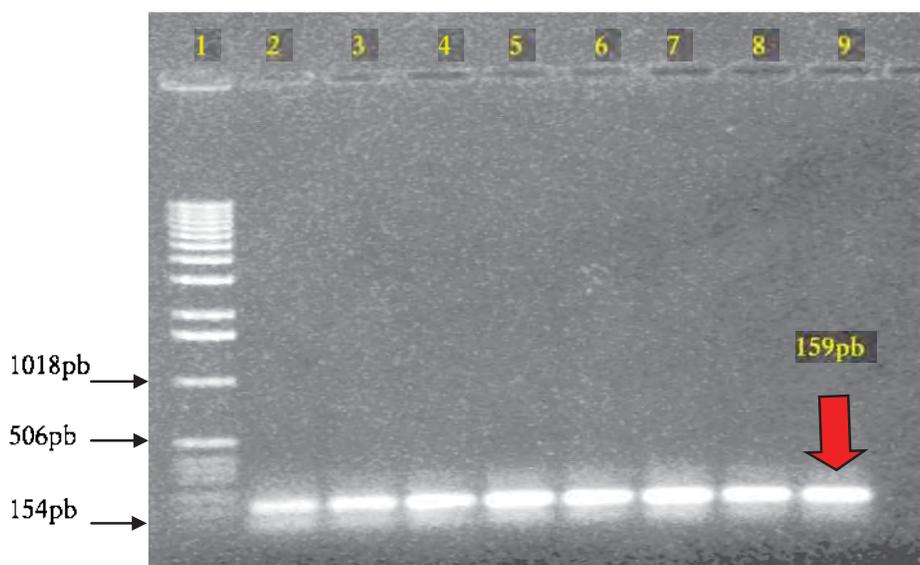


Figura 34. Gradiente de temperatura con oligos BCN1F y BCN1R. Como muestra se utilizó el micelio de *B. Cinerea*. Carriles: (1) MPM 1Kb, (2) producto de PCR de *B. Cinerea* a 53 °C, (3) 54 °C, (4) 55.4 °C, (5) 57.6 °C, (6) 60.7 °C, (7) 62.9 °C, (8) 64.3 °C, (9) 65 °C. Condiciones de PCR: 1 ciclo a 94 °C 3 min; 30 ciclos a 94 °C 30 s, a temp 30 s, a 72 °C 30 s; 1 ciclo a 72 °C 3 min; 1 ciclo a 4 °C ∞. El método de extracción empleado fue el de Chow y Kafer, 1993.



Figura 35. Gradiente de temperatura para oligos BCN1F y BCN1R Como muestra se utilizó el micelio de *B. Cinerea*. Carriles: (1) MPM 1Kb, (2) producto de PCR de *B. Cinerea* a 75 °C, (3) 74.5 °C, (4) 73.3 °C, (5) 71.4 °C, (6) 68.9 °C, (7) 67.1 °C, (8) 65.8 °C, (9) 65 °C. Condiciones de PCR: 1 ciclo a 94 °C 3 min; 30 ciclos a 94 °C 30 s, a temp 30 s, a 72 °C 30 s; 1 ciclo a 72 °C 3 min; 1 ciclo a 4 °C ∞. El método de extracción empleado fue el de Chow y Kafer, 1993.

En las Figuras 34 y 35 se muestran los resultados obtenidos de los gradientes de temperatura para los oligos BCN1F y BCN1R. Por lo tanto, la temperatura de alineamiento seleccionada para estos oligos fue la de 65 °C, ya que con esta temperatura se obtiene una banda definida y porque esta temperatura se encuentra muy cercana a la sugerida por el fabricante y el programa de diseño de los oligos.

Como se muestra en la Figura 36 el coeficiente de correlación obtenido para la curva estándar fue bajo (0.860), aún cuando se estandarizaron las condiciones de reacción de la PCR en tiempo real. Por lo tanto, se utilizaron los oligos BCN2F y BCN2R con el fin de obtener un coeficiente de correlación adecuado que nos proporcionara la confianza requerida para cuantificar la carga fúngica de *B. Cinerea*.

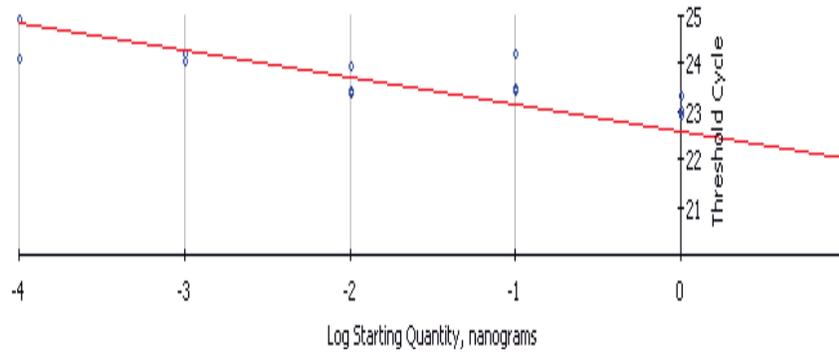


Figura 36. Curvas de amplificación de *B. Cinerea* con oligos BCN1 por PCR en tiempo real. Se empleó como muestra el micelio de *B. Cinerea* y por duplicado para cada punto de la curva. Condiciones de PCR: 40 ciclos a 95 °C 30 s, 65 °C 30 s, 1 ciclo a 4 °C ∞. El método de extracción empleado fue el de Kilmyuk, et al., 1993. Intervalo de detección de 0.0001 ng a 0.1 ng.

En la Figura 37 se muestra un gradiente de temperatura para los oligos BCN2F y BCN2R. De acuerdo a la reacción de PCR se seleccionó como temperatura de alineamiento a 58 °C, ya que generó la banda más definida y se encuentra muy cercana a la temperatura sugerida por el fabricante y por el programa de diseño.



Figura 37. Gradiente de temperatura con oligos BCN2F y BN2R. Como muestra se empleó micelio de *B. Cinerea*. Carriles: (1) MPM 1Kb, (2) producto de PCR de *B. Cinerea* a 49 °C, (3) 49.9 °C, (4) 51.4 °C, (5) 53.4 °C, (6) 56.7 °C, (7) 58.9 °C, (8) 60.3 °C, (9) 61 °C.

Condiciones de PCR: 1 ciclo a 94 °C 3 min; 30 ciclos a 94 °C 30 s, a temp 30 s, a 72 °C 30 s; 1 ciclo a 72 °C 3 min; 1 ciclo a 4 °C ∞. El método de extracción empleado fue el de Chow y Kafer, 1993.

Al utilizar a los oligos BCN2F y BCN2R para amplificar a *B. Cinerea* con el método de PCR en tiempo real, se obtuvo un coeficiente de correlación muy satisfactorio para la curva estándar como se puede observar en la Figura 38.

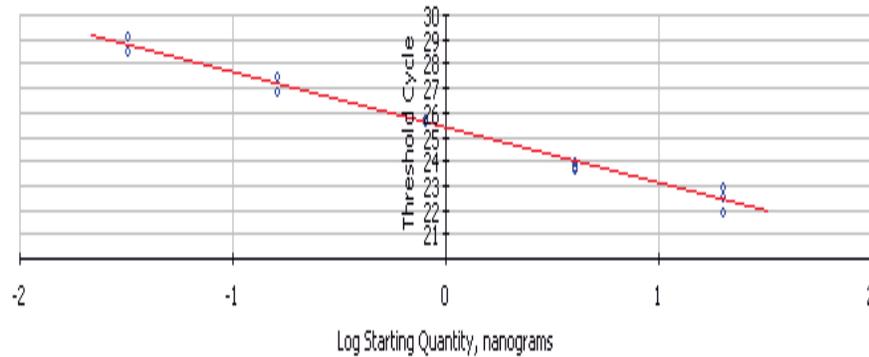


Figura 38. Curvas de amplificación con oligos BCN2F y BCN2R por PCR en tiempo real. Se utilizaron muestras por duplicado para cada punto de la curva y se empleó como muestra el micelio de *B. Cinerea*. Condiciones de PCR: 40 ciclos a 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 1 ciclo a 4 °C ∞. El método de extracción empleado fue el de Chow y Kafer, 1993. Intervalo de detección de 0.032 ng a 20 ng.

Se realizó otro PCR en tiempo real para *B. Cinerea* para asegurar que los oligos BCN2F y BCN2R realmente amplificaran al patógeno como lo muestra la Figura 39, además se realizó el análisis de disociación o melting, que está indicado en la Figura 40 y de acuerdo a estos resultados, dichos oligos no generan dímeros de amplificación ni productos inespecíficos.

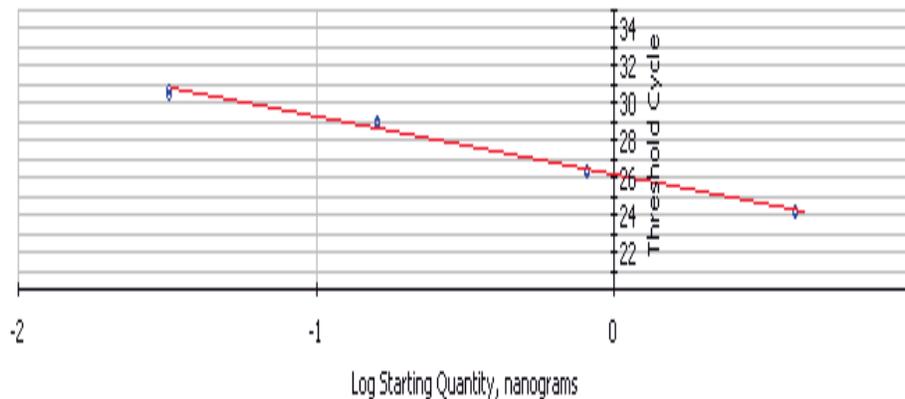


Figura 39. Curvas de amplificación con oligos BCN2F y BCN2R por PCR en tiempo real. Como muestra se utilizó el micelio de *B. Cinerea*. y por duplicado para cada punto de la curva. Condiciones de PCR: 40 ciclos a 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 1 ciclo a 4 °C ∞. El método de extracción empleado fue el de Chow y Kafer, 1993. Intervalo de detección de 0.035 ng a 4 ng.

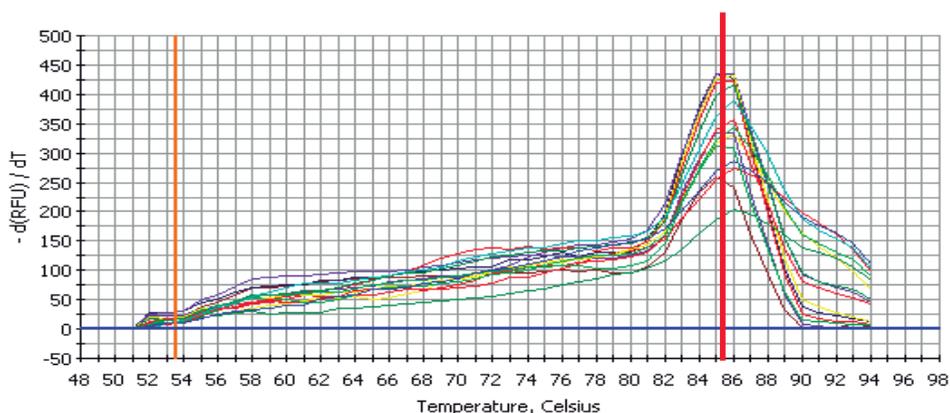


Figura 40. Curva de disociación con oligos BCN2F y BCN2R para amplificadas de *B. Cinerea*. La línea roja indica la temperatura en la cual se disocian los productos de amplificación. Las muestras se colocaron por duplicado. Condiciones de PCR: 1 ciclo a 95 °C 1 min, 2 ciclo a 51 °C 1 min, 45 ciclos a 51 °C 10 s. El método de extracción empleado fue el de Chow y Kafer, 1993; el de Doyle y Doyle, 1990.

En la Tabla 15 se muestran los coeficientes de correlación obtenidos en la curva estándar para PCR en tiempo real al utilizar los distintos pares de oligos, además también mostramos el intervalo de detección. De acuerdo a todas las pruebas de amplificación realizadas con los distintos pares de oligos se llegó a la conclusión de que al emplear los oligos BCN2F y BCN2R se obtienen los mejores resultados para el análisis de PCR en tiempo real en nuestras condiciones.

Tabla 15. Resumen de los resultados obtenidos por PCR en tiempo real.

OLIGOS	CORRELACIÓN (%)	INTERVALO DE DETECCIÓN	REFERENCIA
AFP24 y AFP25	0.811	0.039 a 0.418 ng	Brouwer et al., 2003.
C729+ y C729-	0.840	0.882 a 2.31 ng	Rigotti et al., 2002.
BCN1F y BCN1R	0.860	0.120 a 0.59 ng	Creados para este estudio.
BCN2F y BCN2R	0.992	0.032 a 20 ng	Creados para este estudio.

.3.2 Amplificación por PCR y PCR en tiempo real de distintas combinaciones de DNA de *B. Cinerea* combinado con DNA de fresa cv Aromas.

En los experimentos anteriores solo se emplearon muestras del hongo *B. Cinerea*, pero debido a que la finalidad es cuantificar al patógeno presente en plantas infectadas, se realizaron pruebas de PCR y PCR en tiempo real adicionando DNA de la fresa a la muestra de DNA de hongo en distintas proporciones en cuanto a peso de micelio y hoja. El protocolo para extraer DNA del hongo (Chow y Káfer, 1993) que fue usado difiere del protocolo empleado para obtener DNA de plantas (Doyle y Doyle, 1990).

De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 41 se observa que el DNA de la planta no afecta el proceso de amplificación de *B. Cinerea* por medio de PCR, sin embargo la proporción más baja de estas combinaciones de DNA no se observó en el gel de azarosa teñido con bromuro de etidio. Esto puede deberse a la baja cantidad de amplificado del hongo y al límite de detección de la PCR.



Figura 41. Amplificación con oligos BCN2F y BCN2R por PCR combinando el DNA de *B. Cinerea* con el DNA de la fresa. Carriles: (1) MPM 1Kb, (2) 0% hongo y 100% planta, (3) 20% hongo y 80% planta, (4) 40% hongo y 60% planta, (5) 80% hongo y 20% planta, (6) 60% hongo y 40% planta, (7) 100% hongo y 0% planta. Condiciones de PCR: 1 ciclo a 94 °C 3 min; 30 ciclos a 94 °C 30 s, a 58 °C 30 s, a 72 °C 30 s; 1 ciclo a 72 °C 3 min; 1 ciclo a 4 °C ∞. El método de extracción empleado fue el de Chow y Kafer, 1993, el de Doyle y Doyle, 1990.

El siguiente paso fue realizar el PCR en tiempo real con las mismas proporciones de DNA y los resultados se muestran en la Figura 42.

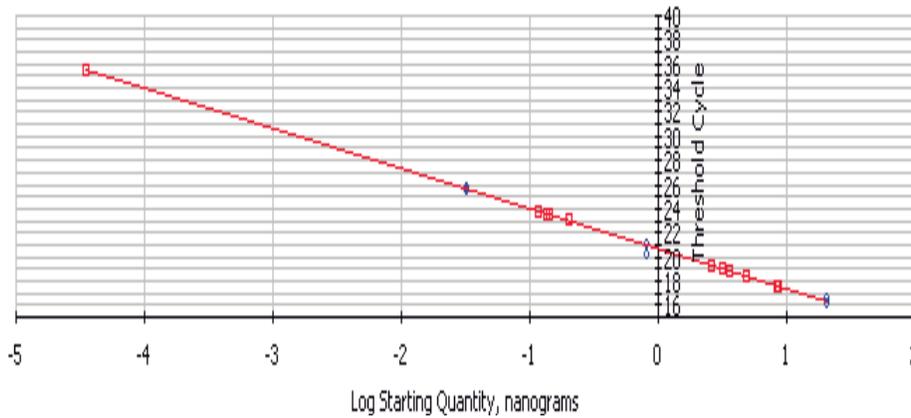


Figura 42. Amplificación con oligos BCN2F y BCN2R por PCR en tiempo real combinando el DNA de *B. Cinerea* con el DNA de la fresa. Se utilizaron muestras por duplicado para cada punto de la curva. Condiciones de PCR: 40 ciclos a 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 1 ciclo a 4 °C ∞. El método de extracción empleado fue el de Chow y Kafer, 1993; el de Doyle y Doyle, 1990. Intervalo de detección de 0.032 ng a 20 ng.

Para realizar ensayos con el PCR en tiempo real se realizaron extracciones de DNA de muestras que contenía distintas combinaciones, partiendo de 20 ng como 100% y todas las combinaciones suman 20 ng; posteriormente estas muestras se utilizaron para realizar su amplificación. Todos los resultados de este proceso de amplificación se muestran en la Tabla 16, en ella se indican la cantidad de muestra colocada inicialmente, el ciclo umbral obtenido y la cantidad de DNA inicial detectada por el equipo de PCR en tiempo real. De tal manera que se logró detectar y cuantificar a *B. Cinerea* hasta la proporción de 40% hongo con 60% de planta.

Tabla 16. Resultados obtenidos por PCR en tiempo real con los oligos BCN2F y BCN2R en muestras donde se combina el DNA de *B. Cinerea* con el DNA de la fresa.

CANTIDAD DE DNA COLOCADA POR MUESTRA	CICLO UMBRAL (CT)	CANTIDAD DE DNA REPORTADA POR ICYCLER (NG)
100%(20 ng) de hongo	17.6	8.49
100%(20 ng) de hongo	17.6	8.55
80%(16 ng) de hongo + 20%(4 ng) de planta	18.4	4.89
80%(16 ng) de hongo + 20%(4 ng) de planta	19.3	2.58
60%(12 ng) de hongo + 40%(8 ng) de planta	19.1	3.15
60%(12 ng) de hongo + 40%(8 ng) de planta	18.9	3.55
40%(8 ng) de hongo + 60%(12 ng) de planta	23.6	1.37E-1
40%(8 ng) de hongo + 60%(12 ng) de planta	35.5	3.5E-5
20%(4 ng) de hongo + 80%(16 ng) de planta	NA	-
20%(4 ng) de hongo + 80%(16 ng) de planta	NA	-
100%(20 ng) de planta	NA	-
100%(20 ng) de planta	NA	-

9.3.3. Amplificaciones por PCR de muestras que contienen distintas combinaciones de micelio de *B. Cinerea* y tejido de fresa cv Aromas.

Posteriormente se realizaron experimentos para amplificar a *B. Cinerea* por PCR utilizando muestras donde se combina micelio del hongo con hoja de fresa. De tal forma que se probaron diversos métodos de extracción de DNA. Esto se efectuó con la finalidad de aplicarlo a muestras de fresa infectada con *B. Cinerea* y si se obtenían resultados satisfactorios con el PCR, el siguiente paso sería la cuantificación del patógeno en esas muestras utilizando el PCR en tiempo real.

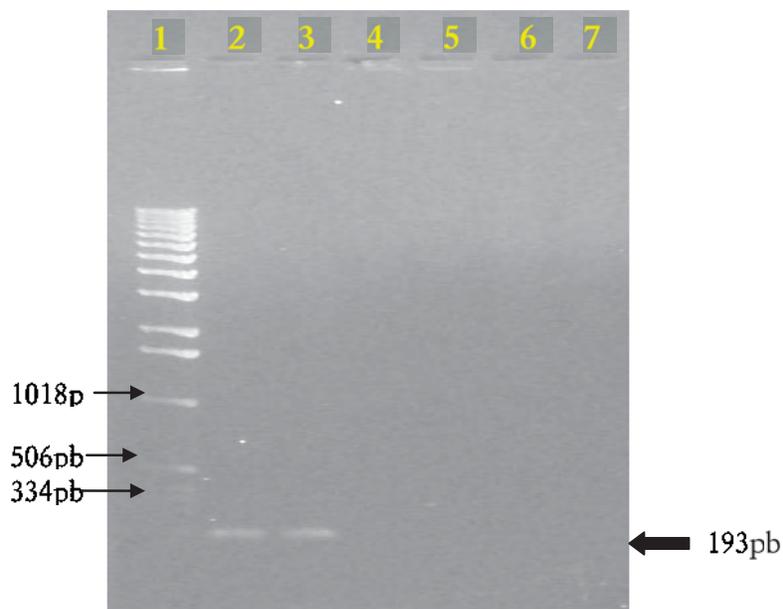


Figura 43. Amplificación de *B. Cinerea* con oligos BCN2F y BCN2R por PCR en muestras de micelio del hongo con tejido de fresa. Carriles: (1) MPM 1Kb, (2) 100% hongo, (3) 100% hongo, (4) 20% hongo y 80% planta, (5) 20% hongo y 80% planta, (6) 20% hongo y 80% planta, (7) 20% hongo y 80% planta. Condiciones de PCR: 1 ciclo a 94 °C 3 min; 30 ciclos a 94 °C 30 s, a 58 °C 30 s, a 72 °C 30 s; 1 ciclo a 72 °C 3 min; 1 ciclo a 4 °C ∞. Se utilizaron los métodos de extracción de DNA del kit REALPURE incubando con liticase 1 h a 30 °C y con el protocolo de Doyle y Doyle, 1990.

Por ejemplo en la Figura 43 se realizó un PCR con muestras que tenían una proporción de 20% hongo y 80% planta, estos resultados nos indicaron que el proceso de amplificación se vió afectado por la presencia del tejido de la planta, es decir existe interferencia que nos impide detectar claramente a *B. Cinerea*, por lo tanto es necesario optimizar el método de extracción de DNA para este tipo de muestras.

10. DISCUSIÓN.

Como se mostró en los resultados, los síntomas de la enfermedad de las plantas de fresa infectadas en el sistema *in vitro* se presentaron en poco tiempo y de acuerdo a la cantidad de esporas con la cual se realizó la infección, además esto se vio favorecido por el gran contenido de humedad dentro del frasco de vidrio. De acuerdo a la tendencia del incremento en el número de lesiones en las hojas de las plantas infectadas y de la longitud de estas lesiones se pudo apreciar un deterioro cada vez mayor en el estado de la planta conforme transcurrió el tiempo post-infección, esto indicó que la enfermedad fue evolucionando.

Después de identificar cada compuesto volátil generado por los controles (frasco solo, frasco con medio agar-agua, planta sana, micelio esporulado y suspensión de esporas) y por la planta infectada en el sistema *in vitro* fue posible realizar la búsqueda de los biomarcadores químicos (compuestos volátiles generados por el hongo en la planta infectada y volátiles producto de la interacción planta-patógeno. Es importante hacer notar que solo algunos y no todos los compuestos volátiles detectados en micelio esporulado y en suspensión de esporas se pudieron detectar en la planta de fresa infectada, esto se podría deber a que la fuente de nutrientes para el hongo son distintas, en el caso del micelio esporulado el hongo crece y se desarrolla en medio PDA, las esporas se encuentran suspendidas en agua en el caso de la suspensión de esporas y en la planta infectada el hongo tiene que obtener nutrientes de su hospedero. Sin embargo a pesar de este resultado en las Figuras 27 y 28 se logró obtener compuestos en común en los diferentes sistemas.

En las plantas de fresa infectadas en el sistema *in vitro* solo se pudieron detectar cuatro compuestos volátiles generados por *B. Cinerea*, dichos compuestos fueron 4-heptanona, 3-octanona, 2-octenal (E) y 2-Metil, 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanodil ester, 2-metil ácido propanoico. El compuesto 3-octanona probablemente no se detectó a las 12 y 24h post-infección debido a la acción de los metabolitos secundarios de la planta producto de la interacción planta-patógeno o debido a que estos compuestos se encuentran en cantidades traza de tal forma que la fibra del SPME no los absorba. Estos compuestos volátiles generados por *B. Cinerea* en la fresa *in vitro* son compuestos de ataque, los cuales

forman parte de una gran variedad de mecanismos de patogenicidad, además de favorecer el crecimiento y desarrollo del patógeno.

En el caso de los compuestos volátiles generados por la planta en respuesta a la interacción planta-patógeno, podemos observar que estos compuestos siguen una tendencia a incrementarse conforme pasa el tiempo, lo cual sugiere que inicialmente la planta reconoce a su agresor y posteriormente trata de eliminarlo con estos metabolitos, por lo tanto son compuestos muy importantes para la defensa de la planta. El compuesto mirtenal es un compuesto de aparición temprana, el 2-etil-1,3-dimetil benceno es un compuesto de aparición intermedia, el 1-etil-2,3-dimetil benceno y el preniteno son compuestos de aparición tardía durante el proceso de infección.

En la Figura 44 se muestra un modelo basado en los resultados obtenidos por GC-MS en las plantas infectadas con *B. Cinerea* en el sistema *in vitro*. Cuando las esporas son asperjadas sobre la planta a la 1 h post-infección, el hongo genera compuestos volátiles que facilitan su fijación al hospedero y su germinación, sin embargo la planta genera un compuesto de alerta como el mirtenal. Durante las 12 y 24 h post-infección la planta sigue produciendo compuestos de defensa con propiedades antifúngicas, pero a las 48 h el hongo ya ha invadido al hospedero y ha causado lesiones necróticas. Por lo tanto estos datos nos indican que el hongo al inicio de la infección genera una buena cantidad de compuestos volátiles de ataque para lograr su colonización pero la planta responde generando compuestos de defensa contra el patógeno que se van incrementado conforme transcurre el tiempo post-infección. De acuerdo a lo anterior, los compuestos volátiles generados por el patógeno y aquellos que son producto de la interacción planta-patógeno (compuestos de defensa de la planta) nos indican que *B. Cinerea* se encuentra en plantas de fresa *in vitro* en etapas iniciales de la infección y que la planta se defiende con sus metabolitos secundarios. Por lo tanto dichos compuestos pueden ser empleados como biomarcadores de la presencia *B. Cinerea* durante la interacción *Fragaria x ananassa-B. Cinerea*.

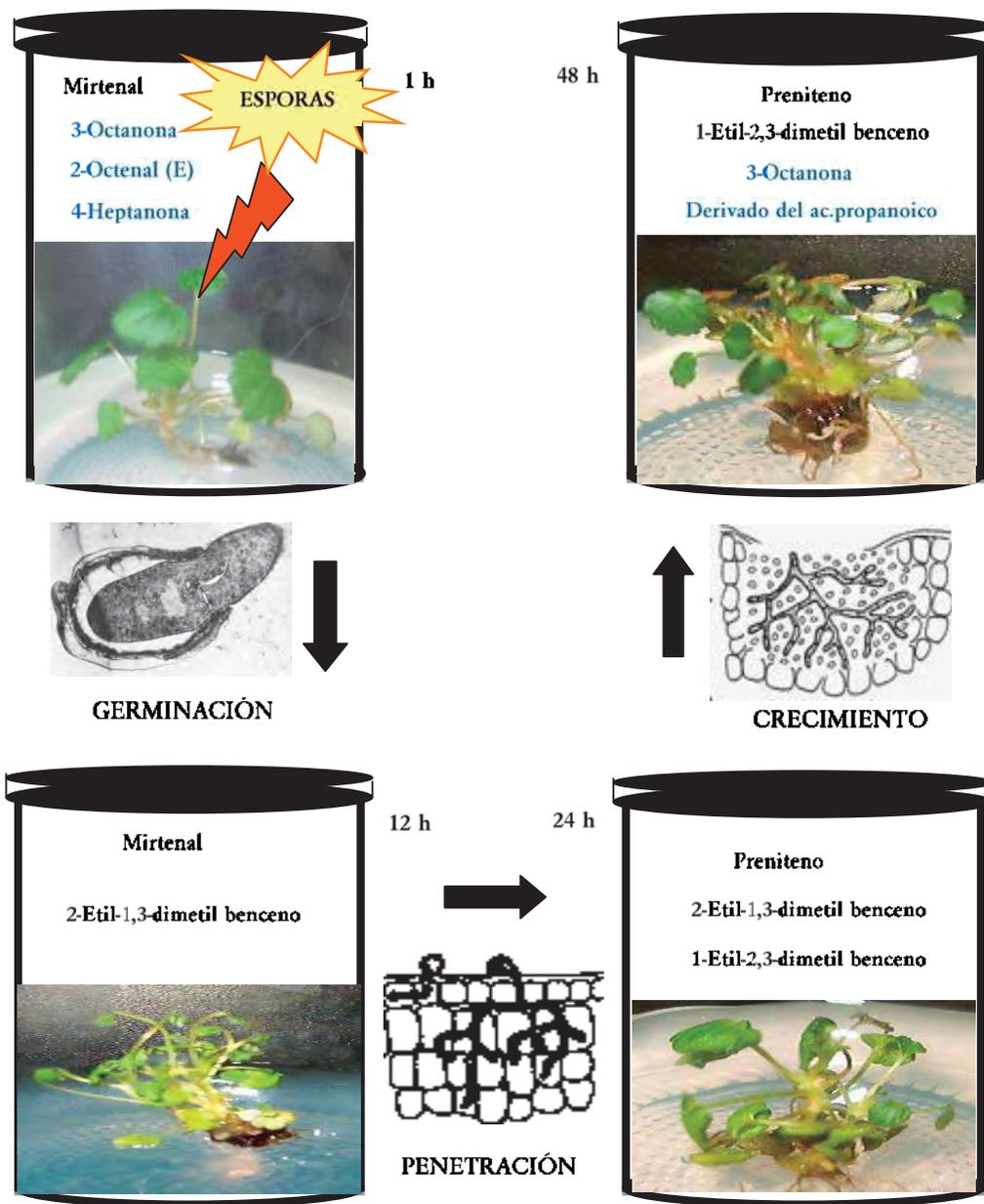


Figura 44. Modelo en el cual se muestran los compuestos volátiles identificados a los distintos tiempos post-infección en las plantas de fresa infectadas por *B. Cinerea* en sistema *in vitro* durante el desarrollo de la infección. Los compuestos en color azul son originados por el hongo en la planta infectada. Los compuestos en color negro se producen por la interacción planta-patógeno en la planta infectada

En el sistema invernadero la aparición de los síntomas de la enfermedad también dependió de la cantidad de esporas con la cual se infectó a la planta de fresa, sin embargo estos síntomas tardaron más tiempo en aparecer que en el caso del sistema *in vitro*. Esto se probablemente se debió a que la planta de invernadero tiene una madurez mayor y sus mecanismos de defensa más desarrollados. De tal forma que solo se pudieron apreciar lesiones necróticas que se fueron deteriorando conforme transcurrió el tiempo post-infección, lo cual nos indicó que la enfermedad fue avanzando. Las plantas de fresa infectadas en este sistema se mantuvieron en condiciones húmedas para favorecer la aparición de síntomas de la enfermedad.

En las plantas del sistema invernadero se encontró al 1-octen-3-ol el cual se presentó en todos los tiempos. Este compuesto es referido en la literatura como el aroma de los hongos, también en plantas infectadas se detectaron compuestos volátiles generados por las esporas como el 4-metil-2-heptanona (el compuesto volátil de *B. Cinerea* más abundante detectado en este sistema) y el feniletíl alcohol. El compuesto 3-octanol se identificó en todos los muestreos excepto a 1h post-infección y se va incrementado conforme pasa el tiempo. Estos compuestos permiten al hongo favorecer la germinación y el crecimiento en algunos medios de cultivo y en el hospedero. Esto quiere decir que son compuestos que continuamente son generados por *B. Cinerea* como uno de tantos factores de patogenicidad para contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta.

Los compuestos volátiles producto de la interacción planta-patógeno y que identificamos en este estudio tienen propiedades de defensa y dentro de las primeras horas post-infección son generados para contrarrestar al patógeno, lo cual se ve reflejado por la lenta progresión de la enfermedad, es decir, aunque se presentan lesiones necróticas en las hojas de fresa no se llegan a visualizar otros síntomas como cuerpos fructíferos o micelio de *B. Cinerea*. Los compuestos 3-metil-1-butanol 4-metil-2-pentanol y 4-hexen-1-ol-acetato son volátiles de aparición temprana y la tetralona es un compuesto sintetizado de forma inducible mientras el patógeno se encuentre presente en la planta infectada.

En la Figura 45 se muestra un modelo basado en los resultados obtenidos por GC-MS en las plantas infectadas con *B. Cinerea* en el sistema invernadero. A la 1 h después de la aspersión de 100 esporas/ml la planta de fresa genera compuestos volátiles como respuesta a la invasión, por su parte *B. Cinerea* produce metabolitos claves para la germinación de sus esporas. A las 12h post-infección los compuestos generados por la planta incrementan sus niveles y *B. Cinerea* genera compuestos como el 3-octanol, bencenacetaldehído y el feniletíl alcohol, los cuales no se encontraron a la 1 h post-infección, hasta aquí todavía no se observan lesiones necróticas. A las 24 h post-infección *B. Cinerea* sigue produciendo los mismos compuestos volátiles que generó a las 12 h post-infección, pero la planta ha cedido a la infección ya que solo genera la tetralona como respuesta. De acuerdo a lo anterior se propone que el hongo ya germinó y penetró en su hospedero. Sin embargo a las 72 h post-infección ya se observan lesiones necróticas, lo cual indica que *B. Cinerea* ya se encuentra en fase de crecimiento, además en este tiempo de muestreo se detectó a la 3-octanona que no se había detectado en los tiempos de muestreo anteriores. Por lo tanto, los compuestos volátiles generados por el patógeno y aquellos que son producto de la interacción planta-patógeno (compuestos de defensa de la planta) nos indican que *B. Cinerea* se encuentra en plantas de fresa de invernadero en etapas iniciales de la infección y que la planta se defiende con sus metabolitos secundarios. Por lo tanto dichos compuestos pueden ser empleados como biomarcadores de la presencia *B. Cinerea* durante la interacción *Fragaria x ananassa-B. Cinerea*.

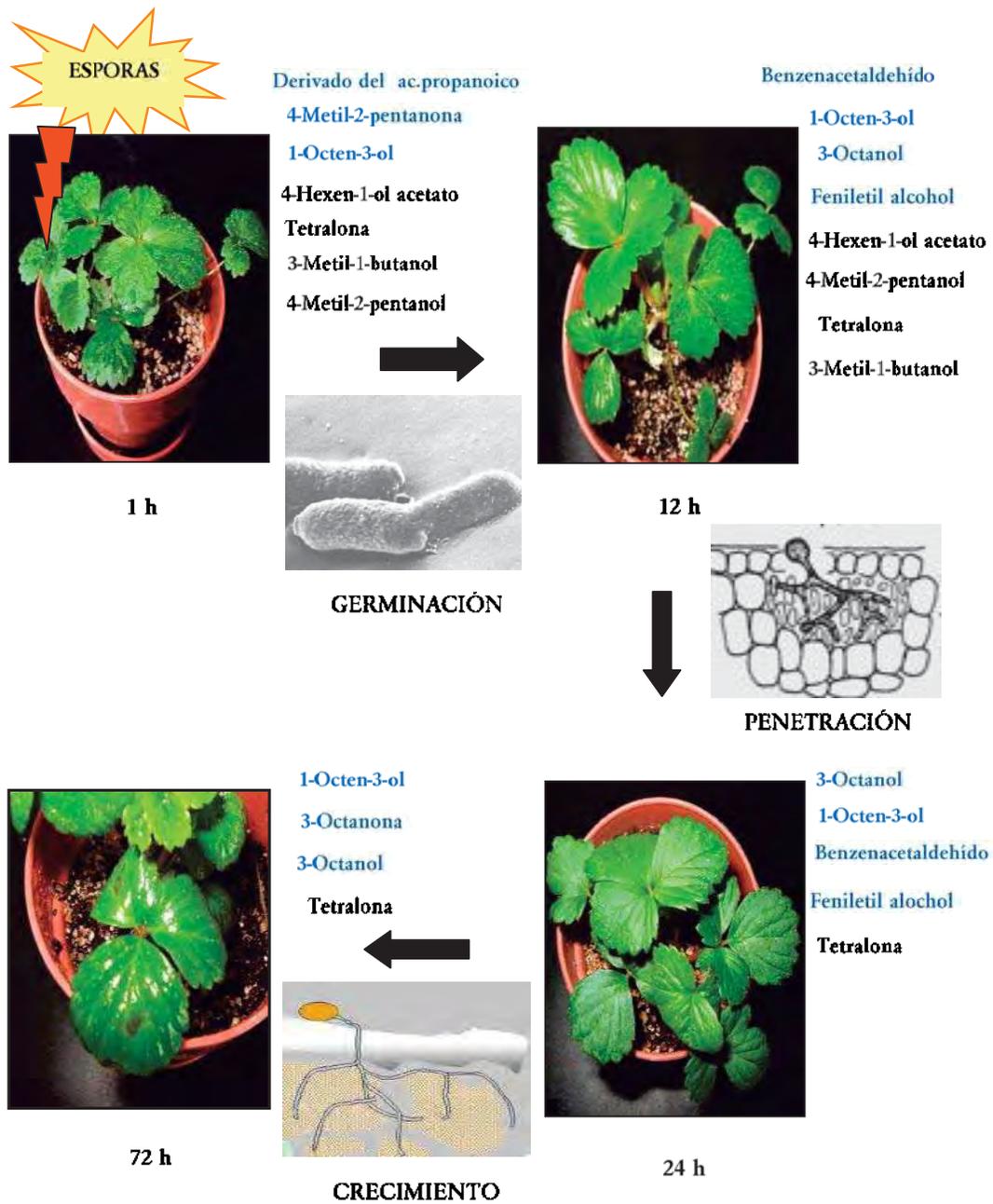


Figura 45. Modelo en el cual se muestran los compuestos volátiles identificados a los distintos tiempos post-infección en las plantas de fresa infectadas por *B. cinerea* en sistema invernadero durante el desarrollo de la infección. Los compuestos en color azul son originados por el hongo en la planta infectada. Los compuestos en color negro se producen por la interacción planta-patógeno en la planta infectada

Finalmente, cabe resaltar que aunque la finalidad de este estudio era identificar un biomarcador químico que indicara la presencia del patógeno en las plantas, lo que nosotros observamos fue que en realidad es un perfil de compuestos lo que podría indicar la presencia del hongo en la planta como si fuera un código de barras donde no solo la presencia del compuesto es importante sino también la abundancia del mismo.

Debido a que las plantas de fresa en nuestro país se generan a partir de la micropropagación de plantas importadas, estas plantas aunque están certificadas pudieran estar infectadas con *B. Cinerea* y para detectar a este patógeno puede buscarse el perfil de compuestos volátiles que se identificaron en el sistema *in vitro*. En cambio aquellos compuestos que nosotros identificamos en el sistema invernadero pueden buscarse en plantas de campo para detectar infecciones por *B. Cinerea*.

En la parte de análisis molecular por medio de la PCR se confirma la capacidad de los oligos AFP24 y AFP25, C729+ y C729- para amplificar el DNA de *B. Cinerea*, a su vez para este estudio se diseñaron y probaron los oligos BCN1F y BCN2R, BCN2F y BCN2R. Después de realizar ensayos con los dos pares de oligos diseñados, se eligieron a los oligos BCN2 porque resultaron ser buenos para amplificar al hongo *B. Cinerea*, estos oligos no originan dímeros de amplificación, lo cual se corroboró con la curva de disociación o análisis de melting.

Debido a que el método de PCR en tiempo real es una metodología reciente, fue necesario estandarizar su funcionamiento y obtener una curva estándar para la cuantificación del patógeno.

Por lo tanto, después de diversos ensayos se obtuvo una curva estándar con un intervalo de detección que va de 0.032 ng a 20 ng de DNA empleando los oligos BCN2. También se establecieron las condiciones de amplificación para el método de PCR en tiempo real (ciclos, temperatura, tiempos).

Se tuvieron que realizar diversos ensayos con PCR y PCR en tiempo real con muestras que simulan a una planta infectada para realizar la cuantificación del patógeno, sin embargo durante los procesos de extracción de DNA se presentaron problemas para obtener resultados satisfactorios con este tipo de muestra y en caso del proceso de amplificación también se presentaron dificultades. Por lo tanto por medio de la PCR en tiempo real se logró detectar a *B. Cinerea* en una proporción de biomasa 60% planta y 40% hongo empleando los oligos BCN2.

Con los resultados de compuestos volátiles generados en este estudio se generaron una serie de interrogantes que sería interesante investigar como:

- ¿Habrá diferencias en el perfil de compuestos volátiles de otros cultivares de fresa?
- ¿Se podrán establecer diferencias entre varias especies de *Botrytis* que infectan a la fresa en base al perfil de compuestos volátiles?
- ¿Se obtendrían buenos resultados al aplicar el estudio de compuestos volátiles a muestras de fresas infectadas en campo?
- ¿Sería posible distinguir entre diversas cepas de *B. Cinerea*, diversas especies de *Botrytis* y otros fitopatógenos al evaluar la capacidad de amplificación de los oligos BCN2?
- ¿La cuantificación de *B. Cinerea* en plantas infectadas por medio de PCR en tiempo real con los oligos BCN2 nos indicaría el grado de infección en la planta?

11. CONCLUSIÓN.

Se identificó un perfil de compuestos volátiles (3-octanona, derivado del ácido propanoico, *o*-cimeno y *o*-xileno) como marcadores químicos que son capaces de detectar a *B. Cinerea* en fases tempranas de infección y un par de oligos como marcadores moleculares (BCN1 y BCN2) capaces de detectar concentraciones de DNA de 32 pg.

12. LITERATURA CITADA.

Aboud Z. (2002). Stress metabolites from *Corchorus olitorius* leaves in response to certain stress agents. *Food Chemistry*. 76(2), 187-195.

Alois, B.; Stipanovic, R.; Zhang, J.; Mace, M. y Reibenspies, J. (1999). Identification and synthesis of trinorcadalene formed by *Hibiscus Cannabinus*. *Phytochemistry*. 49(2), 431-440.

Barcarolo, R.; Tutta, C.; y Casson, P. (1996). Aroma compounds. En: Physical characterization and nutrient analysis. L. Mollet. (ed.). *Handbook of food analysis*. Vol 2. Marchel Dekker Inc.: New Cork. 1867-1887.

Bartlet, R. y Wicklow, D. (1999). Volatiles from *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. And their attractiveness to Nitidulid beetles. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*. 47, 2447-2454.

Benito, E.; Arranz, M. y Eslava, A. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17, 43-46.

Berto, P.; Jijakli, H. y Lepoivre, P.(2001). Possible role of colonization and cell wall degrading enzymes in differential ability of three *Ulocladium atrum* strains to control *B.cinerea* on necrotic strawberry leaves. *Biological control*. 91(11), 1030-1036.

Brouwer, M.; Lievens, B.; Van Hemelrijc, W.; Van den Ackerveken, G.; Bruno, C. y Bart, T. (2003). Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR. *FEMS Microbiology Letters*. 228, 241-248.

Cárdenas-Navarro, R; Adamowicz, S. y Robin, P. (1998). Nitrate acumulation in plants: a rol for water. *Journal of Experimental Botany*. 50(334), 613-624.

Chitarra, G.; Abee, J.; Rombouts, F.; Posthumus, M. y Ksterhuis, J. (2004). Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-octen-3-ol a volatile self-inhibitor. Applied and Environmental Microbiology. 70(5), 2823-2829.

Chow Y.Y.K., Käfer E.(1993) A rapid method for isolation of total nucleic acids from *Aspergillus nidulans*. Fungal Genetic News. 40(25).

Cooper, L.; Oliver, J.; De Vilbiss, D. y Doss, R. (2000). Lipid composition of extracellular matrix of *Botrytis cinerea* germlings. Phytochemistry. 53, 293-298.

Copp-Mendoza, S.; Fernández-Pavía, S.; Farías-Rodríguez, R.; Valencia-Cantero, E.; y Macías Rodríguez, L. (2004) Volatiles and fatty acids of strawberry plants (*Fragaria x ananassa* cv. Aromas) inoculated with *Botrytis cinerea*. 10th International Symposium on Microbial Ecology. Cancún, México del 22-27 de Agosto del 2004.

Costa J. (2004) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica. 22(5), 299-305.

Dávalos, P.; Rodríguez, H. y Arévalo, A. (1992). Guía para cultivar fresa en Irapuato. SARH. Folleto para productores Núm. 1. Talleres gráficos del campo experimental Bajío. Celaya, Guanajuato.

De Lacy Costello, B.; Evans, P.; Ewen, R.; Gunson, H.; Ratcliffe, N.; y Spencer-Phillips, P. (1999). Identification of volatiles generated by potato tubers (*Solanum tuberosum* CV: Maris Piper) infected by *Erwinia carotovora*, *Bacillus polymyxa* and *Arthrobacter* sp. Plant Pathology. 48, 345-351.

Dellaporte, S.; Word, J. y Hicks, J. (1983). A plant DNA miniprep. Plant Molecular Biology Reporter. 1,19-21.

Denby, K.; Kumar, P. y Kliebenstein, D. (2004). Identification of *Botrytis cinerea* susceptibility loci in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal. 38, 473-486.

Doyle, J. y Doyle, L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12,13-15.

Engel, W.; W. Bahr y P. Schieberle.(1999). Solvent assisted flavour evaporation a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *European Food Research Technology*. 209, 237-241.

FAO. (2004) <http://www.fao.org>

Franciolis, S.; Buxaderas, S. y Pelleun, P.(1999). Influence of *Botrytis cinerea* on the polysaccharide composition of xarel.lo must and cara base wines. *American Journal of Enology and Viticulture*.

Frairé-Cordero, M.L.; Yañez-Morales, M.J.; Meto-Angel, D. y Velázquez-Galvez, G. (2003). Hongos parásitos en el fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) en postcosecha y algunos aspectos fisiológicos del fruto en anaquel. *Journal of Phytopathology*. 21(1)

Fiedler, K.; Schütz, E. y Geh, S. (2001). Detection of microbial volatile organic compound produced by moulds on various materials. *International Journal of Hygieneand Enviromental Healt*. 204(2), 111-121.

Gachon, C. y Saindrenan, S. (2004). Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42, 367-371.

García, Y. (2007). Manual de cromatografía de gases.

González, J.; Reyes, F.; Salas, C.; Santiago, M.; Codriansky, N.; Coliheuque, N y Silva, H. (2006). *Arabidopsis thaliana*: A model host plant to study plant-pathogen interaction using Chilean field isolates of *B.cinerea*. *Biological Research*. 39, 221-228.

Graham, D.; Hamilton, G.; Quinn, C. y Ruthven, A. (1981). Sumary of result of experiments on the control of potato tuber fungal disease gangrene dry rot and skin spot

with various chemical substances, 1966-80. *Biomedicina y Ciencias biológicas*. 24(2), 147-158.

Gramemnos, W.; Ammerman, E.; Keil, H.; Harries, V.; Bayer, H.; Sauter, H y Muller, B. (2002). US patent 6414031.

Griffith, R., Jayachandram, K., Shetty, K., Whitstine, W. y Furton, G. (2007). Differentiation of toxic molds via headspace SPME-GC/MS and canine detection. *Sensors*. 7, 1496-1508.

Holt, R. (2001). Mechanisms effecting analysis of volatile flavour components by solid phase microextracction and gas chromatography. *Journal of Chromatography*. 937, 107-114.

INFROAGRO (2002). [htt://www.infroagro.com](http://www.infroagro.com)

Jelen, H.; Krawczyk, J.; Larsen, T.; Jarosz, A. y Golebniak, B. (2005). Volatile compounds present in strawberries infected with *Phytophthora cactorum*, especially those responsible for characteristic off-odour of such fruits were the subject of this study. *Letters in Applied Microbiology*. 40(4), 2255-2259.

Klein, B.; J. Bosset y R. Gauch. (1990). Comparison of four extraction, concentration and injection techniques for volatile compounds analysis by GC-MS: an application to the study of the volatile flavor of swiss emmentaler cheese. *Flavour science and technology*. 209-212.

Klimyuk, V.; Carrol, B.; Thomas, C. y Jones, J. (1993). Álcali treatment for rapid preparation of plant material for realible PCR analysis. *Plant Journal*, 3(3), 243-252.

Kuzniak, E. y Sklodowska, M. (1999). The effect of *Botrytis cinerea* infection on ascorbato-glutathione cycle in tomato leaves. *Plant Science*. 148, 69-76.

Kulakiotu, E.; Thanassoulopoulus, C. y Stfakiotakis. (2004). Biological control of *Botrytis cinerea* by volatiles of Isabella grapes. *Phytopathology*. 94, 924-931.

Larsen, M. y L. Poll. (1990). Quick and simple extraction methods for analysis of aroma compounds in fruit products. *Flavour science and technology*. 209-212.

López, M. y Macías-Rodríguez, L. (2001). SPME-GC-MS of microbial volatile organic compounds (MVOC) related to Agave tequilaza Weber var. azul diseases. En las memorias del CAM-201: The IIIrd International Congress on Crassulecean Acid Metabolism. Queensland, Australia del 24-28 de Agosto del 2001.

Macías-Rodríguez, L.; López, M. y Luna-Torres, G. (2001). Composición química del fruto de fresa. En: Avances en el cultivo de la fresa. Editores: E., Quero y M. G. López. Primera edición.

Malvick, D.K, Grunden, E.(2005). Isolation of fungal DNA from plant tissue and removal of amplification inhibitors. *Molecular Ecology Notes*. 5, 958-960.

March, R., Richardsand, D. y Ryan, R. (2006). Volatile compounds from six species of truffle headspace analysis and vapor analysis at high mass resolution. *International Journal of Mass Spectrometry*. 249, 60-67.

Martley, P.; Abad, D.; Shebayan, J.; Musa, R. y Sanni, A. (2001). Integrated management of *Striga hermonthica* in sorghum using a mycoherbicide and host plant resistance in the Nigerian sudano-saholian savanna. *Journal of Weed Biology and Vegetation Management*. 44(3), 157-162.

Martin, F.; Delaruelle, A. y Hilberty, J. (1990). An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizae. *Mycology. Research*. 94, 1059-1064.

Mathur, S. y Utkhede, R. (2002). Development of a dot blot technique for rapid identification of *Botrytis cinerea*, the causal organism of grey mould in greenhouse tomatoes. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 77(5), 604-608.

Matich, A; Rowan, D; y Banks, N. (1996). Solid phase microextracción for quantitative headspace sampling of apple volatiles. *Analisis Chemistry*. 68, 4114-4118.

Miller, K.; Poole, C. y Pawlowski T. (1996). Classification of the botanical origin of cinnamon by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Chromatographia*. 42, 639-646.

Molina, G.; De La Rotta, F. y Enrique, T. (2004). Incidencia de infecciones quiescentes de *Botrytis cinerea* en flores y frutos de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*). *Agronomía colombiana*. 22, 101-109.

Mookherjee, B.; Patel, S.; Trenkle, R. y Jin, B. (2001). Aroma of living flowers and fruits from earth to heaven (microgravity). 32nd International Symposium of Essential Oils (ISEO), Wroclaw, Poland (September 9-12).

Mookherjee, B., Trenkle, R.; Wilson, R.; Zampino, M.; Sands, K y Mussinan, C. (1986). Fruits and flowers: live vs. dead-which do we want? Flavors and fragrances: a world perspective. The 10th international congress of essential oils, fragrances and flavors. Washington D.C. 415-424.

Moore, N.; Hargreaves, P.; Pegg, K. y Irwin, J. (1991). Characterization of strains of *Fusarium oxysporum* y *fusarium Cubense* by production of volatiles. *Australian Journal of Botany*. 39, 161-166.

Müller-Ribeau, F.; Berger, B. y Yegen, O. (1995). Chemical composition and fungitoxic properties to phytopatogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 43, 2262-2266.

Nilssona, T.; Larsenb, T.; Montanarella, L. y Madsena, J. (1996). Application of headspace solid-phase microextraction for the análisis of volatile metabolites emitted by *Penicillium* species. *Journal of Microbiological Methods*. 25(3), 245-255.

Pelayo-Zaldivar, C.; Ebeler, S. y Kader, A. (2005). Cultivar and harvest date effects on flavour and others quality attributes of California strawberries. *Journal of Food Quality*. 28, 78-97.

Peng-Ying, Z.; Kao-Shan, C.; Pei Qing, H.; Sheng-Hao, L. y Wan-Feng, J. (2008). Effects of crop development on the emission of volatile in leaves of *Lycopersicon esculentum* and its inhibitory activity to *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*. *Journal of integrative plant biology*. 50(1), 84-91.

Plassard, C.; Mousain, D. y Salsac, L. (1982). Estimation of mycelial growth of basidiomycetes by means of chitin determination. *Phytochemistry*. 21, 345-348.

Rha, E.; Hong, J.; Myeong, O.; Young, R.; Chang-Won, L. y Kim, J. (2001). Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters*. 201, 105-109.

Rigotti, S.; Gindro, K.; Richter, H. y Viret, O. (2002) Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers Fr. in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) using PCR. *FEMS Microbiology Letters*. 209, 169-174.

Ruzsanyi, V.; Sielemann, S. y Baumbach, J. (2002). Determination of microbial volatile organic compounds using IMS with different ionisation sources. *Internacional Journal of Ion Mobility Spectrometry*. 5(3), 138-142.

SAGARPA. (2002) <http://www.sagarpa.org.mx>

Spilvallo, R.; Novero, M.; Cinzia, M.; Simone, B. y Bonfante, P. (2007). Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative Bursa in *Arabidopsis thaliana*. *New phytologist*. 175(3), 417-424.

Smith, C. y Boyko, E. (2007). The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: Current status. *Entomologia Experimentalis Applicata*. 122(1), 1-16.

- Stahl, P. y Klug, M. (1996). Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. *Applied And Enviromental Microbiology*. 62 (11), 4136-4146.
- Staples, R. y Mayer, A. (1995). Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. *FEMS Microbiology Letters*. 134, 1-7.
- Stinson, M.; Ezra, D.; Hess, W.; Sears, J y Strobel, G. (2003). An endophytic *Gliocladium* *sp* of cardifolia producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Science*. 165(4), 913-922.
- Sutter, E.G. y Preece, J.E. (1991). Aclimatization of micropropaged plants to the greenhouse and field. *Micropropagation Technology and Aplications*.7, 93.
- Ten Have, A.; Oude, W.; Wubben, J., Visser, J. y van Kan, J. (2001). *Botrytis cinerea* Endopolygalacturonasa Genes Are Differentially Expressed in Varios Plant Tissue. *Fungal Genetics and Biology*. 3, 97-195.
- Utkhede, R. y Koch, C. (2004). Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *BioControl*. 49, 305-313.
- Utkhede, R.; Bogdanoff, C. y McNevin, J. (2001). Effect of biological and chemical treatments on *Botrytis* ítem canker and fruti yield of tomato under greenhouse condition. *J. Plant Pathology*. 23, 253-259.
- Vikram, A.; Prithiviraj, B., Hamzehzarghan, H. y Kushalappa, AC. (2004). Volatile metabolite profiling to discriminate diseases of McIntosh apple inoculates with fungal pathogens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84, 1333-1340.
- Viret, O., Keller, M., Gunta, J. y Cole, M. (2004). *Botrytis cinerea* Infection of Grape Flowers: Light and Electron Microscopical Studies of Infection Sites. *Phytopatology*. 94, 850-857.

Vivanco, J.; Cosio, E.; Loyola-Vargas, V. y Flores, H. (2005). Mecanismos químicos de defensas en las plantas. *Investigación y Ciencia*. 68-75.

Wu, S.; Krings, U.; Zorn, H. y Berger, R. (2005). Volatile compounds from the fruiting bodies of beefsteak fungus *Fistulina hepatica*. *Food Chemistry*. 92(2), 221-226

Yang, X. y T. Peppard. (1994). Solid-phase microextraction for flavor analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 42: 1925-1930.