



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO
FACULTAD DE QUIMICA
MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE
LOS ALIMENTOS**

**“EVALUACION DE LOS EFECTOS INHIBITORIOS DEL CAPSIDIOL, SOBRE
LA PUDRICION CAFÉ O MORENA EN FRUTOS DE DURAZNO (*Prunus persica*)
PROVOCADA POR *Monilinia fructicola*.”**

**TESIS QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
IBQ. ANASTACIO PALACIOS MARMOLEJO**

**DIRIGIDO POR:
M. en C. JOSE LUIS MORENO HERNANDEZ DUQUE**

SINODALES

M. en C. JOSE LUIS MORENO HERANDEZ DUQUE
Presidente


Firma

Dr. EDMUNDO LOZOYA GLORIA
Secretario


Firma

Dr. NETZAHUALCOYOTL MAYEK PEREZ
Vocal



Firma

Dr. EUGENIO M. PEREZ MOLPHE BALCH
Suplente


Firma

Dr. SALVADOR PEREZ GONZALEZ
Suplente


Firma


M. en C. GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES
Director de la facultad

Dr. SERGIO QUESADA ALDANA
Director de Investigación y posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre de 2001
México

No Adq. H66280
No. Título TS
Clas. 634.259
P1531
Ej. 1

**EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DE
BIOLOGIA MOLECULAR, DEL DEPARTAMENTO DE QUIMICA DEL
CENTRO BASICO DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE AGUASCALIENTES,
BAJO LA DIRECCION DEL M. en C. JOSE LUIS MORENO HERNANDEZ
DUQUE.**

RESUMEN

La inducción de la síntesis de la fitoalexina capsidiol se obtuvo mediante la inoculación de celulasa de *Trichoderma* sp. en frutos de chile (*Capsicum annuum*) variedad Poblano. La extracción se realizó utilizando cloroformo y para facilitar su purificación se utilizaron cartuchos de rezorian y cromatografía en capa fina. El rendimiento obtenido de capsidiol fue de 4 mg/kg de fruto de chile inducido. La concentración de la solución madre de capsidiol que se utilizó para los bioensayos fue de 0.66 mM. El hongo *Monilinia fructicola* se aisló a partir de frutos de duraznero (*Prunus persica*) que presentaban los síntomas característicos de la pudrición café provocada por este hongo. Los cuerpos fructíferos del hongo se utilizaron para realizar bioensayos in vitro y para inducir su crecimiento y esporulación en medio de cultivo. Las esporas se utilizaron para realizar los bioensayos en fruto. En los bioensayos in vitro se determinó la capacidad fungitóxicas o fungistática del capsidiol sobre *M. fructicola*, observándose una inhibición del crecimiento del hongo en los discos impregnados con la fitoalexina del 100%. En los bioensayos en frutos se determinó la capacidad del capsidiol para inhibir la pudrición café en frutos de durazno, provocada. Se comprobó que un tratamiento previo de los frutos de durazno, con el extracto madre de capsidiol a una concentración de 0.66 mM, inhibió el crecimiento del hongo en un 100% y la pudrición café en frutos de durazno. En los frutos infectados, la síntesis de etileno fue hasta dos veces mayor que los frutos inoculados con esporas, previo tratamiento con capsidiol. Se detectaron dos compuestos volátiles (denominados A y B) cuya concentración presentó una variación significativa en frutos infectados con respecto a frutos que no aparecieron los síntomas. La concentración de azúcares solubles en diferentes partes del fruto infectado, presentó variaciones considerables con respecto de los frutos que no desarrollaron síntomas de la enfermedad.

SUMMARY

The induction of the Capsidiol phytoalexin, was realized by in peper fruits (*Capsicum annuum*) var. Poblano, whit inoculation of celulase of *Trichoderma sp.*, the Capsidiol was extrated whit cloroform, to fcility Capsidiol purification, we used Rezorian cartridge, before of thin layer chromatography. Capsidiol purified was a rate of 4 mg per kg de induced fruits. With the above result we Capsidiol mother solution utilized in bioensayes was 0.66 mM. The fungus *Monilinia fructicola* was isolalted from infected peach fruits (*Prunus persica*) whit presence of characteristic rot brown sintomatology, after that we colected the fungus fruitful corpus which we utilized to realice in vitro bioensayes. In vitro bioensayes consisted en the fungitoxic or fungistatic capacity of Capsidiol on *M. fructicola*. We observed fungus growth inhibition when we utilized capsidiol impregnated disc. The fruit bioensayes consisted in capacity determination of the capsidiol to inhibith the growth of peach fruits rot brown, caused by fungus *M. fructicola*. Was probed a previous traitment of peach fruit, with extract capsidiol contained, getting from chilli fruit elicited with cellulase, inhibits in a 100% the fungy growth and the rot brown on peach fruits. In the fruits infected, the ethylene synthesis, in was two times major than the inoculated fruits with spores, previous traitment with capsidiol. Were determinated other two volatile compounds (nominated A and B) in which concentration a significant variation was presented in fruits infected in repect to other fruits that no presented symtoms. The soluble sugar concentration in different parts of the infected fungy, uncrested considerably on the infection please.

DEDICATORIAS

A mis Padres:

J. de Jesús y Ma. del Rosario

**Por enseñarme que el camino que requiere mayor sacrificio es el que cultiva los
mejores frutos**

A mi Esposa:

Ma de los Angeles

**Por brindarme todo su cariño y apoyo, y además por compartir conmigo mis triunfos
y mis derrotas**

A mis Hijos:

Itzél y Ricardo

Por ser un motivo de inspiración de vida y superación

A mis Hermanos

J. de Jesús, Cecilia, Ma del Rosario, Ma. Magdalena, Juan y Lupita.

**Especialmente para Ricardo quien desafortunadamente ya no se encuentra entre
nosotros.**

Por todo su apoyo para seguir adelante

A mis Abuelitas:

Juanita y Magdalena quien ya falleció

Quienes con su experiencia me han enseñado el camino de la vida

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a:

- A Dios por permitirme vivir.
- A mi asesor el Maestro José Luis Moreno por conducirme con su experiencia y paciencia a la realización de este trabajo.
- A Carmelita Rubio por todo su apoyo, por ser una buena guía durante la investigación y por se una gran amiga.
- A Magda por su apoyo y su amistad
- A Carmelita Campos por ser siempre una persona muy servicial
- Al Ing Miguel Arreola por todo su apoyo.
- A Lety Morones por su gran amistad.
- A mis compañeros de la maestría por compartir grandes momentos
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por brindarme una beca para seguir estudiando.
- A la Universidad Autónoma de Querétaro, por abrir sus puertas para que jóvenes con inquietud se superen.
- A la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por permitirme el uso de sus instalaciones.
- A todos mis amistades y personas que de alguna u otra manera influyeron en mi para seguir adelante.

6.6. Cuantificación de azúcares solubles.	57
VII. DISCUSION	62
VIII. CONCLUSIONES	65
IX. IMPORTANCIA DE LOS NUEVOS HALLAZGOS Y SUS APLICACIONES	66
X. BIBLIOGRAFIA	67

INDICE DE CUADROS

CUADRO	TITULO	PAGINA
1	Parámetros estadísticos de cada una de los tratamientos con respecto la producción de etileno de los frutos de durazno	47
2	Determinación de la diferencia estadística entre medias aplicando la prueba de <i>t-student</i> para muestras independientes con un nivel de significancia <i>p</i> menor o igual que 0.05, aplicado a la producción de etileno.	47
3	Determinación de los parámetros estadísticos para la cuantificación del compuesto A.	51
4	Análisis estadístico mediante la prueba de comparación de medias de <i>t-student</i> para muestras independientes con un nivel de significancia <i>p</i> menor o igual a 0.05, para la cuantificación del compuesto A.	51
5	Determinación de los parámetros estadísticos para la cuantificación del compuesto B.	55
6	Análisis estadístico mediante la prueba de comparación de medias de <i>t-student</i> para muestras independientes con un nivel de significancia <i>p</i> menor o igual a 0.05, para la cuantificación del compuesto B.	55
7	Determinación de los parámetros estadísticos para la cuantificación de azúcares solubles.	59
8	Análisis estadístico mediante la prueba de comparación de medias de <i>t-student</i> para muestras independientes con un nivel de significancia <i>p</i> menor o igual a 0.05, para la cuantificación de azúcares solubles.	60

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	PAGINA
1	Ruta biosintética de los isoprenoides.	12
2	Mecanismo de acción de sesquiterpeno ciclasas.	14
3	Ciclo biológico de <i>Monilinia fructicola</i> .	21
4	Cromatografía en capa fina del capsidiol.	32
5	Microfotografía de la cepa de <i>Monilinia fructicola</i> aislada en el laboratorio.	34
6	Prueba de inhibición del crecimiento de <i>Monilinia fructicola</i> por el capsidiol <u>in vitro</u> .	36
7	Estado de los frutos al tercer día de iniciado el bioensayo en frutos de durazno.	38
8	Estado de los frutos al quinto día de iniciado el bioensayo.	39
9	Estado de los frutos al octavo día de iniciado el bioensayo.	40
10	Estado de los frutos infectados al doceavo día de iniciado el bioensayo.	41
11	Momificación de los frutos infectados.	42
12	Cromatogramas de frutos de durazno, tanto infectados como sanos.	44
13	Diferencias en la producción de etileno.	46
14	Diferencias estadísticas en la producción de etileno.	48
15	Producción del compuesto denominado "A".	50
16	Diferencias estadísticas en la producción del compuesto denominado "A".	52
17	Producción del compuesto denominado "B".	54
18	Diferencias estadísticas en la producción del compuesto denominado "B".	56
19	Determinación de la concentración de azúcares solubles.	58
20	Diferencias estadísticas de la concentración de azúcares solubles.	61

I. INTRODUCCION

Las plantas de interés agrícola se encuentran constantemente amenazadas por situaciones adversas de tipo abiótico, como son las lesiones de tipo mecánico provocadas por heladas, granizo, vientos ó sequía; así como por factores bióticos como las plagas y enfermedades. Dentro de los daños provocados por enfermedades, se encuentran los producidos por el ataque de hongos que en ocasiones causan severas pérdidas económicas e indirectamente la mala nutrición y la muerte de vidas humanas. Entre dichas pérdidas, sobresale la hambruna causada por el hongo del tizón tardío de la papa en Irlanda a mediados del siglo XIX que provocó, de 1845 a 1847, la muerte de miles de personas y la emigración de gran parte de la población obrera Irlandesa, que dependía económicamente de este cultivo como su principal fuente de alimentación (Agrios, 1986).

A pesar del desarrollo tecnológico del siglo XX, que ha permitido la elaboración de potentes fungicidas, no se han logrado comprender los mecanismos de patogenicidad, ni se han podido evitar las pérdidas provocadas por estos patógenos en una buena parte de la producción agrícola, lo que sigue siendo un problema en el ámbito mundial (Choi, 1992). Los hongos atacan a todos los vegetales, tanto silvestres como cultivados y su incidencia y persistencia han dificultado su control en cultivos agrícolas, como es el caso, del cultivo del durazno que es atacado por *Monilinia fructicola*, hongo que produce la enfermedad denominada pudrición café o morena del fruto.

Las plantas presentan una resistencia natural al ataque microbiano y el establecimiento de la enfermedad es la excepción más que la regla. La adaptación evolutiva de los hongos fitopatógenos les ha permitido la capacidad para romper las defensas de algunas plantas, lo que les permite la invasión y colonización de una o varias especies vegetales (Lamb, 1989).

En general, las plantas han desarrollado una serie de mecanismos involucrados en la defensa contra organismos fitopatógenos y la resistencia es el resultado de la acción conjunta de estos mecanismos (Mendoza, 1991). Existen cambios bioquímicos inducidos por la presencia del patógeno, los cuales proporcionan a la planta una forma de limitar la invasión posterior del agente patogénico; entre éstos se encuentra la producción de fitoalexinas, que son compuestos de bajo peso molecular y de estructura diversa que se acumulan en las plantas en respuesta a infección o estrés y se les han atribuido propiedades antifúngicas y antibacterianas (Bailey y Mansfield, 1982; Goodman, 1986; Rhodes, 1994).

Las plantas de chile y tabaco; producen la fitoalexina capsidiol como respuesta al ataque de patógenos y bajo ciertas condiciones de estrés (Chapell, 1992; Moreno, 1992; Egea, 1996; García-Pérez, 1998).

II. ANTECEDENTES

2.1. Interacción planta-hongo fitopatógeno

Las plantas son resistentes a una gran mayoría de microorganismos patogénicos potenciales que se encuentran en su ambiente. Solo en una minoría de casos se involucra una interacción verdadera planta-patógeno, en la cual los patógenos han desarrollado mecanismos efectivos para destruir la maquinaria de defensa de algunas especies de plantas en particular, dando como resultado la colonización de la planta (Vera-Estrella, 1994; Staskawics, 1995). El amplio uso de variedades resistentes ha incrementado la selección y disminuido el tiempo del desarrollo de variantes de patógenos (De Wit, 1992). Además, en el caso de los frutos la susceptibilidad a ciertos patógenos limita la vida postcosecha de muchos de ellos (Fisher, 1991).

2.1.1. Conceptos de patogenicidad y virulencia aplicado a hongos.

Los términos de patogenicidad, virulencia, agresividad y mortandad están comúnmente relacionados con la resistencia genética de las plantas a los hongos patógenos y son algunas veces usados como términos complementarios sobre el patógeno para conceptos pertenecientes a resistencia sobre el hospedero u hospedante. Estos términos pueden ser usados para caracterizar al patógeno con base a la aparición de lesiones individuales, la cantidad de lesiones sobre una planta o la habilidad de patógenos para causar enfermedad en una población de plantas (Shaner, 1992). El tipo de infección puede ser tomada como la expresión visible de la reacción del huésped al patógeno y una medida de ello es la susceptibilidad del huésped o de la patogenicidad del patógeno (Kotoujansky, 1987). La presentación de resultados ha sido facilitada por el uso de los términos avirulento, semivirulento, moderadamente virulento, y virulento para describir el alcance de la infección, correspondientes a las clases de reacción del huésped (Fraser, 1985). Los tipos de infección están basados sobre los síntomas (clorosis y necrosis) y señales de la planta (Woodman, 1986).

2.1.2. Procesos de infección de los hongos

Los procesos de infección incluyen: a) relaciones previas para la entrada del hongo, b) estímulo, c) mecanismos de penetración y d) el establecimiento del hongo en la planta.

Algunos mecanismos de resistencia a enfermedades son los siguientes: primeramente las características de resistencia que están relacionadas al ambiente complejo planta-hongo o peculiaridades morfológicas del hospedero y el patógeno que limitan o influyen los procesos de infección.

a). Relaciones previas de la entrada del hongo

El hongo alcanza a la planta de manera pasiva, ya sea en forma de espora o como fragmentos de hifa que pueden ser transportados por el aire, por corrientes de agua, por insectos u otros animales o por un crecimiento activo a través del suelo como los hongos de la flora del suelo. Existen procesos con varias actividades sobre la superficie de las plantas, tales como la germinación de esporas, crecimiento de la hifa, formación de apresorios, etc. que pueden ser inhibidas o estimuladas por el huésped. (Goodman, 1986; Boller, 1995).

b). Estímulo.

La mayoría de los hongos fitopatógenos requieren la presencia de la planta para que las esporas puedan germinar. Se ha reportado que el hongo reactiva la síntesis de RNA ribosomal en la germinación de esporas (Boller, 1995). Los estímulos físicos dirigen el crecimiento de la hifa principal, mientras que la difusión de sustancias (estímulos químicos) detiene el crecimiento de la hifa, con lo cual comienza la formación del apresorio (Matta, 1972; Goodman, 1986).

c). Mecanismos de penetración.

La penetración al huésped por el hongo puede ocurrir: a) directamente a través del contacto con la superficie, b) por medio de aperturas naturales y c) a través de heridas. Este es un proceso activo (Edwards, 1970; Sargent, 1973).

(d). El establecimiento del hongo en la planta.

Solo si el hongo fitopatógeno entra en una relación de parasitosis con la planta se lleva a cabo la infección. Entonces, se ha iniciado la patogénesis. Como una consecuencia de la infección, la célula huésped incrementa el citoplasma, resultando en un incremento aparente en el retículo endoplásmico rugoso y en la concentración de ribosomas. Esto probablemente explica el incremento en la capacidad de la célula infectada para la síntesis de proteínas. Aunque los rearrreglos de la estructura fina a la interfase entre el patógeno y el huésped es poco entendida hasta ahora (Bracker, 1973; Bushnell, 1975; Goodman, 1986).

2.2. Defensas de las plantas.

La iniciación de las respuestas de defensa requiere del reconocimiento de las señales derivadas de la interacción planta-hongo, llamados incitadores. Esto puede ser mediado por receptores, los cuales son específicos para ciertas señales y por lo tanto, inician la transmisión intracelular de la señal. Subsecuentemente, la conversión de esta señal a través de una cascada de transducción de señales resulta en la inducción de una respuesta particular de la célula, tales como la activación de genes de defensa (Vera-Estrella, 1994; Nennsteil, 1996). La resistencia de la planta puede ser determinada por su capacidad para inactivar las toxinas del hongo. Sin embargo, en algunas situaciones, un metabolito producido por la planta es inactivado por el hongo (Goodman, 1986).

2.2.1. Percepción y transducción de señales microbianas.

Receptores. La percepción selectiva de señales microbianas implica la existencia de receptores específicos. Para las señales hidrofílicas, los receptores se encuentran en la superficie de la membrana celular. Algunos sitios con gran selectividad y especificidad para algunas de las señales microbianas han sido identificados sobre la superficie de las células de las plantas y sobre sus membranas; éstos sitios son los primeros candidatos para los quimiorreceptores. Dentro de éstos sitios receptores se encuentran: D-glucanos, D-glicopéptidos, D-oligómeros de quitina y receptores para codificación de genes de avirulencia; éstos últimos no han sido totalmente determinados (Boller, 1995; Nennsteil, 1996).

Segundos mensajeros y fosforilación protéica. La transducción de señales microbianas procede de largas rutas de quimio percepción microbiana (Boller, 1995; Nennsteil, 1996; Vera-Estrella, 1994, Roby, 1990). Existen diferentes tipos de quimiorreceptores, que pueden operar a través de diferentes cadenas de transducción de señales. Los principales cambios que ocurren son los siguientes: cambios en el potencial de membrana y un incremento en la concentración de iones intracelulares (Ehrhardt, 1992); protein quinasas y protein fosfatasas (Felix, 1991); producción de oxígeno activo (Apostol, 1989); proteínas G, fosfolipasa C y

1,4,5-trifosfato inositol (Toyoda, 1993); oxidación de lípidos (Gundlach, 1992), señales sistémicas (Ryals, 1994), desensibilización y estado refractario (Felix, 1993).

2.2.2. Interacción de señales microbianas.

Supresores. En interacciones planta-patógeno, es lo más interesante de las plantas para reconocer los elicitores microbianos; en contraste, los patógenos camuflagean sus elicitores y previenen su percepción, mediante la síntesis de compuestos llamados supresores. Aunque la importancia de estos ha sido discutida frecuentemente, poco es lo que se conoce acerca de su naturaleza química. Algunos glucanos solubles de hongos sirven para actuar como supresores contra el reconocimiento de los componentes de la pared celular de las plantas y se han reportado algunos supresores que inhiben la síntesis de fitoalexinas (Jakobek 1993, Volpin, 1994). Un establecimiento de simbiosis mutualista puede también depender de la supresión de las defensas del huésped (Boller, 1995).

Efecto sinergista. Los elicitores pueden actuar sinérgicamente y entonces, sus efectos combinados pueden ser más grandes, dado que con resultado de la suma de los efectos individuales. Por ejemplo los elicitores oligo-galacturonídicos endógenos inducen en forma sinérgica la síntesis de fitoalexinas con elicitores exógenos; además, los factores endógenos por heridas, también llamados factores competitivos, son necesarios para la acumulación de fitoalexinas en respuesta a elicitores de glucano (Davis, 1987; Graham, 1994; Boller, 1995).

2.2.3. Significado de las señales microbianas para las plantas.

Reconocimiento de agentes: información. Algunos sistemas quimiorreceptores reconocen compuestos que se encuentran distribuidos en los microorganismos. Estas moléculas pueden señalar la presencia de hongos, pero probablemente las plantas no pueden calificar la naturaleza del microorganismo. La capacidad quimiosensorial para tales moléculas puede conferir información básica; sin embargo, es necesario una mayor información para que la planta pueda reconocer si se trata de un agente patógeno o de un microorganismo mutualista (Goodman, 1986; Boller, 1995).

Reconocimiento de patógenos: defensa. El paradigma clásico de la quimiopercepción de la planta es el modelo del elicitador, de acuerdo al cual los elicitores de patógenos inducen la acumulación de fitoalexinas o una respuesta hipersensitiva (HR) (Darvill, 1984; Boller, 1995; Staskawics, 1995).

Una de las primeras respuestas visibles a la penetración y colonización del hongo es la formación de una papila. El desarrollo de la papila se considera como un fenómeno de resistencia del huésped, porque esto parece representar una barrera inicial contra los parásitos invasores (Goodman, 1986). Las respuestas tempranas de la planta en una relación compatible planta-hongo pueden ser caracterizadas por un incremento del retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias del huésped. Estos constituyentes citoplásmicos pueden ser mejor observados en células jóvenes que en células maduras o células dañadas. Una asociación entre el retículo endoplásmico y el haustorio del hongo es también típica del complejo compatible huésped-patógeno. El núcleo del huésped está, en muchos casos, en la vecindad del haustorio y, en algunos otros, a su alrededor. Sin embargo, el haustorio y el núcleo siempre permanecen separados. En muchas enfermedades de plantas, el primer daño visible es también en los cloroplastos. Estos usualmente incrementan su tamaño cuando ocurre la infección y en las membranas de los cloroplastos puede haber ruptura y los tilacoides se encuentran dispersos. Como un síntoma tardío de patogénesis, el sistema membranal completo de la célula huésped es fracturado y se observa el inicio de los procesos de senescencia que terminan con la muerte de la célula.

Estudios ultraestructurales y fisiológicos de incompatibilidad y reacciones no-hospedante revelan diversos mecanismos de defensa y de resistencia a infecciones por hongos. La reacción de hipersensibilidad (HR) del huésped (muerte rápida de las células penetradas del huésped) parece ser el evento primario visible en la secuencia asociada con la resistencia del huésped a la infección. Aún en este tipo de reacción, se observa un retardo visible en el crecimiento del hongo y del daño al haustorio acompañado del daño a la célula huésped. Esto hace difícil demostrar en forma concluyente cual entidad es afectada inicialmente. Se ha sugerido que en un complejo incompatible huésped-patógeno, el patógeno es dañado inicialmente (no visible, quizás, como una alteración de la permeabilidad de la membrana del hongo) y se observa además un daño en la membrana del huésped. Por lo cual, la HR del huésped es una consecuencia, no la causa, de la resistencia observada a la infección. Una evidencia indirecta sugiere que la síntesis de

compuestos tóxicos para el patógeno afecta la inducción de necrosis de ambos tejidos y la síntesis de fitoalexinas (las cuales son características de la HR) (Érsek *et al.*, 1973). La necrosis se produce en células que son dañadas o que están bajo un estrés prolongado (Lenon *et al.*, 1991), además de ser un proceso no fisiológico que involucra una inflamación de la célula, lisis y la salida de los contenidos celulares (Cohen, 1993), no está normalmente asociada con el desarrollo, y no requiere la actividad de proteasas y nucleasas que controlan el desensamblamiento celular, y no opera a través de la transducción de señales que dependen de la expresión genética, y no requiere Ca^{2+} o cambios en la fosforilación de proteínas (Goodman, 1986; Pannell, 1997; Bailey, 1990).

La resistencia del huésped es mas conocida como un fenómeno de reconocimiento de una entidad que no pertenece a sí mismo. La necrosis (hipersensibilidad) estimula la síntesis de RNA a altos niveles en un complejo incompatible huésped-patógeno en comparación con uno compatible. El dato se interpreta como una demostración de que el RNA está involucrado directamente en la reacción de resistencia del huésped (Goodman, 1986; Pannell, 1997; Staskawics, 1995).

La germinación, formación de apresorio, penetración del huésped, desarrollo del haustorio en la célula huésped, formación de hifa secundaria que se alarga e inicia el apresorio y haustorio secundario, y el sobrecrecimiento de la hifa sobre la superficie del huésped. La formación y alargamiento de la hifa secundaria se consideran como evidencias de que el huésped y el patógeno han establecido una relación compatible y que la patogénesis ha iniciado.

Ninguno de los diferentes tipos de incompatibilidad o reacción de resistencia influyen la germinación de esporas o la formación del apresorio. La morfogénesis del patógeno durante los procesos de infección es inhibida específicamente de acuerdo al genotipo incompatible involucrado en esta interacción planta-hongo. Dicha interacción esta directamente ligada con la respuesta hipersensitiva (HR) (Goodman, 1986; Staskawics, 1995). Muchos de estos resultados de estudios histológicos, y sus bases bioquímicas permanecen sin ser concluidas. Las respuestas de las plantas son caracterizadas por la temprana acumulación de compuestos fenólicos en el sitio de infección lo que limita el desarrollo del patógeno, dando como resultado una muerte celular rápida (hipersensibilidad) (Nicholson, 1992).

2.2.4. Metabolitos secundarios

Los tejidos de plantas infectadas o parcialmente infectadas y tejidos resistentes (“hipersensibles”), se ha visto que acumulan sustancias que son conocidas como metabolitos secundarios (fenólicos, flavonoides, coumarinas, terpenoides, esteroides, auxinas, y etileno) además de mostrar incrementos en la respiración y la activación de peroxidasas y otras enzimas fenólicas (Goodman, 1986; Nicholson, 1992; Bostock, 1999; Vera-Estrella, 1994; Bailey, 1990).

2.2.4.1. Ruta biosintética de isoprenoides en plantas.

Los isoprenoides son una gran familia de compuestos, con cerca de 20,000 miembros identificados. Las estructuras de los isoprenoides son diversas, van desde una cadena de hidrocarburos relativamente simples hasta algunos que son más complejos, con estructura de anillos conocidas. Algunos isoprenoides que son comúnmente usados (ej. hule y mentol), otros que no son tan usuales (ej. las fitoalexinas sesquiterpénicas antimicrobianas ipomoeamerona y capsidiol), y otras son conocidas por los fisiólogos vegetales como vitales para el crecimiento y desarrollo de las plantas (ej. Acido giberelico y esteroides) (Benveniste, 1986; McGarvey, 1995). El bloque constructor es el isopreno de cinco carbonos y la polimerización de dos moléculas de isopreno difosforilato producen geranil difosfato (GPP), un intermediario lineal C₁₀ que puede ser convertido a cíclico y los productos finales representan los monoterpenos, usados en otros polímeros. La adición de una tercera unidad de isopreno a GPP genera farnesil difosfato (FPP), el cual también puede ser convertido a productos cíclicos o lineales que representan los clásicos sesquiterpenos (Figura 1) (Chapell, 1995). La polimerización y el ciclo de la diferenciación química puede conducir a la producción de otras clases de isoprenoides nombrados de acuerdo al número de unidades de isopreno que tienen lugar durante la biosíntesis. El término isoprenoide se refiere a los orígenes biosintéticos de esta familia de compuestos e inclusive, de todos los compuestos derivados de una o más unidades de isopreno. Varios pasos importantes de la ruta biosintética de los isoprenoides pueden estar localizados en compartimentos intracelulares y pueden estar integrados a través del transporte de metabolitos y de mecanismos de regulación de reacción (Gray, 1987).

RUTA BIOSINTETICA DE LOS ISOPRENOIDES

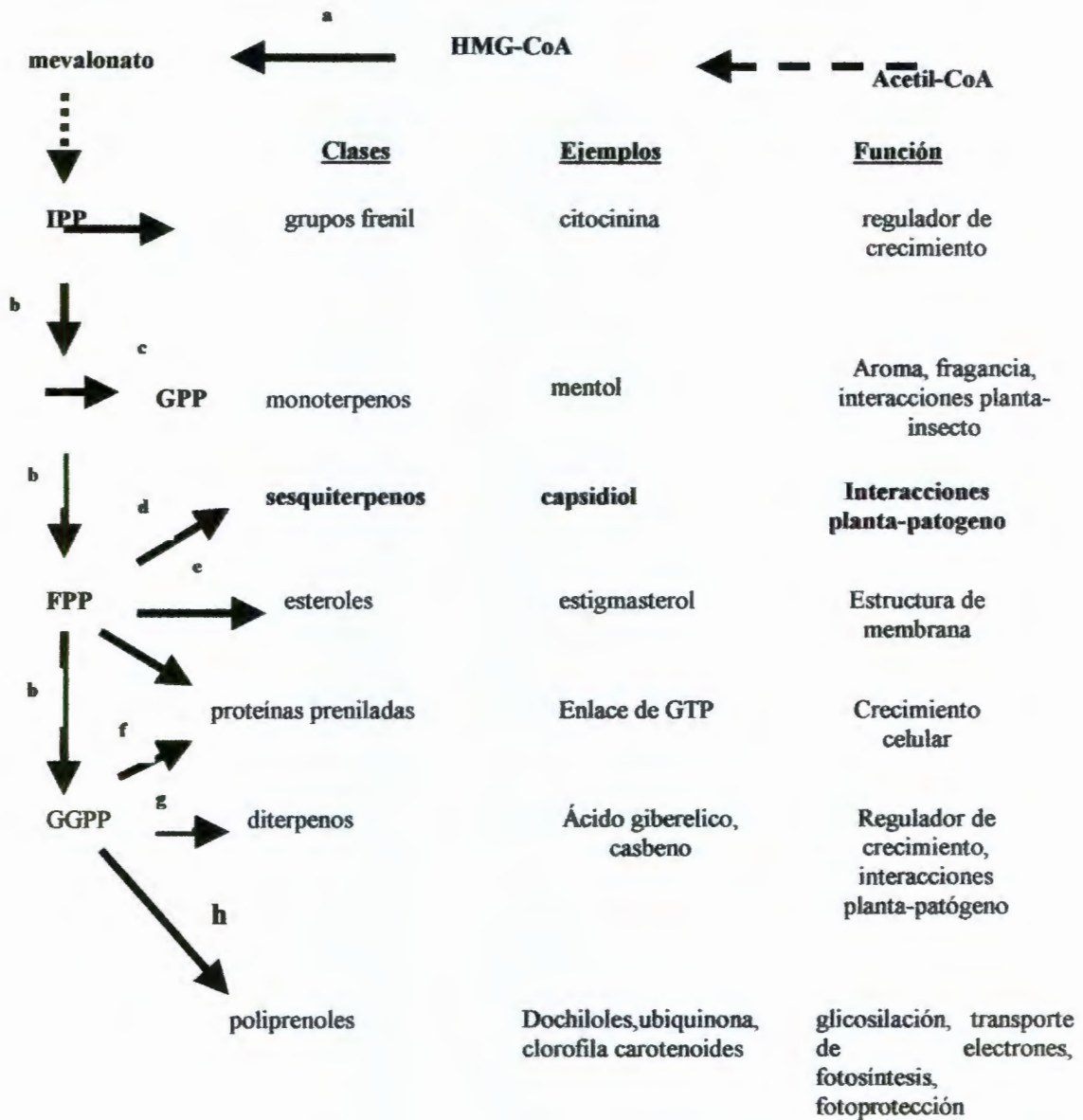


Figura2 ruta biosintética de los isoprenoides, con los productos de mayor significado fisiológica. Enzimas: (a) 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) reductasa, (b) frenaltransferasas, (c) monoterpeno sintetasa, (d) sesquiterpeno sintetasa, (e) escualeno sintetasa, (f) frenal:protein sintetasa, (g) diterpeno sintetasa, y (h) fitoeno sintetasa.

Los isoprenoides de plantas comprenden un grupo estructuralmente diverso de compuestos que pueden ser divididos en metabolitos primarios y secundarios. Los isoprenoides que son metabolitos primarios incluyen esteroides, carotenoides, reguladores del crecimiento y los substitutos de poliprenol de dicales, quinonas y proteínas. Estos compuestos son esenciales para la integridad de la membrana, fotoprotección, orquestación de programas de desarrollo y el acoplamiento de sistemas bioquímicos esenciales para sistemas membranales específicos. Los isoprenoides se clasifican como metabolitos secundarios que incluyen monoterpenos, sesquiterpenos, y diterpenos. Los compuestos de esta categoría son considerados secundarios debido a que estos no son esenciales para la viabilidad; sin embargo, sirven como mediadores en interacciones importantes entre las plantas y su ambiente (Stoessl, 1976; Gibson, 1983; Chapell, 1995).

La ruta biosintética de los isoprenoides en algunos casos ha sido referida como la ruta del mevalonato. El mevalonato es un intermediario de seis carbonos que se origina de la condensación secuencial de tres unidades de acetil-coA para generar 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) (Goldstein, 1990). De la HMG-CoA se obtiene el mevalonato en una reacción irreversible catalizada por la HMG-CoA Reductasa (HMGR) (Choi, 1992; McGarvey, 1995). El carbono seis del mevalonato es fosforilado y descarboxilado en forma secuencial para generar isopentil difosfato (IPP) por las enzimas mevalonato quinasa y mevalonato 5-difosfato descarboxilasa (Gray, 1987). La condensación de dimetil-alil pirofosfato (DMAPP) con un IPP genera geranil difosfato (GPP); la adición de una segunda unidad de IPP genera farnesil difosfato (FPP) y un tercer IPP genera geranilgeranil difosfato (GGPP) (Dogbo, 1988). Estas reacciones de polimerización son catalizadas por freniltransferasas, mediante un ataque directo a un carbocación de un sustrato molecular o un átomo de carbono rico en electrones con un doble enlace sobre la segunda molécula de IPP. Las enzimas responsables para la ciclización de GPP, FPP y GGPP son referidas como monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos ciclasas o sintetisas, y llevan a cabo, reacciones que son principales para la ruta principal de isoprenoides a productos finales en los diferentes monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos, respectivamente (Chapell, 1995).

Los isoprenoides también tienden a acumularse durante largos periodos del desarrollo, lo cual significa que las enzimas responsables de su biosíntesis están presentes

en baja concentración o tienen un bajo porcentaje de conversión (porcentaje de conversión de sustrato a producto por molécula de enzima por unidad de tiempo).

La elicitación de fitoalexinas sesquiterpénicas ha servido para llevar a cabo investigaciones bioquímicas y moleculares del metabolismo de los isoprenoides (Bartley, 1994). Por ejemplo, cuando incitadores fúngicos son añadidos a cultivos de crecimiento rápido de células de tabaco en suspensión, los cultivos cesan la producción de esterol y se sintetizan y secretan sesquiterpenos antimicrobianos (Chapell, 1995). El declive en la biosíntesis de esterol está correlacionado con una supresión de la actividad de la enzima escualeno sintetasa y la inducción de la biosíntesis de sesquiterpenos con un incremento de la actividad de la enzima sesquiterpeno ciclasa. Los mecanismos de inducción de una enzima y la supresión de la otra han sido interpretados como un factor importante para controlar el flujo de carbón, desde los sustratos hasta la formación de productos intermedios y productos finales (Bartley, 1994; Chapell, 1995).

2.2.4.1.1. Ruta biosintética de las fitoalexinas sesquiterpénicas

Muchas modificaciones secundarias ocurren después de la síntesis de los productos cíclicos a partir de las moléculas de isopreno, hasta la formación de las moléculas de sesquiterpenos de los cuales se derivan las fitoalexinas que pertenecen a este grupo mediante las siguientes modificaciones de la molécula que pueden incluir; hidroxilación, metilación, demetilación, hidratación y reducción (Thai *et al.*, 1999) (Figura 2).

Fitoalexinas. Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular y de estructura diversa que se acumulan en las plantas en respuesta a infección o a estrés. A estos compuestos se les han atribuido propiedades antifúngicas y antibacterianas y se ha demostrado que también se acumulan durante infecciones vírales (Bailey; 1982; Goodman, 1986; Kúc 1995; Nicholson, 1992). Están considerados dentro de los metabolitos secundarios, derivan de rutas biosintéticas primarias y una de las características de estos compuestos es que no se encuentran normalmente en las plantas, solo se producen cuando hay ataque por patógenos o bajo ciertas condiciones de estrés (Bowels, 1990).

MECANISMOS DE ACCION DE SESQUITERPENO CICLASAS

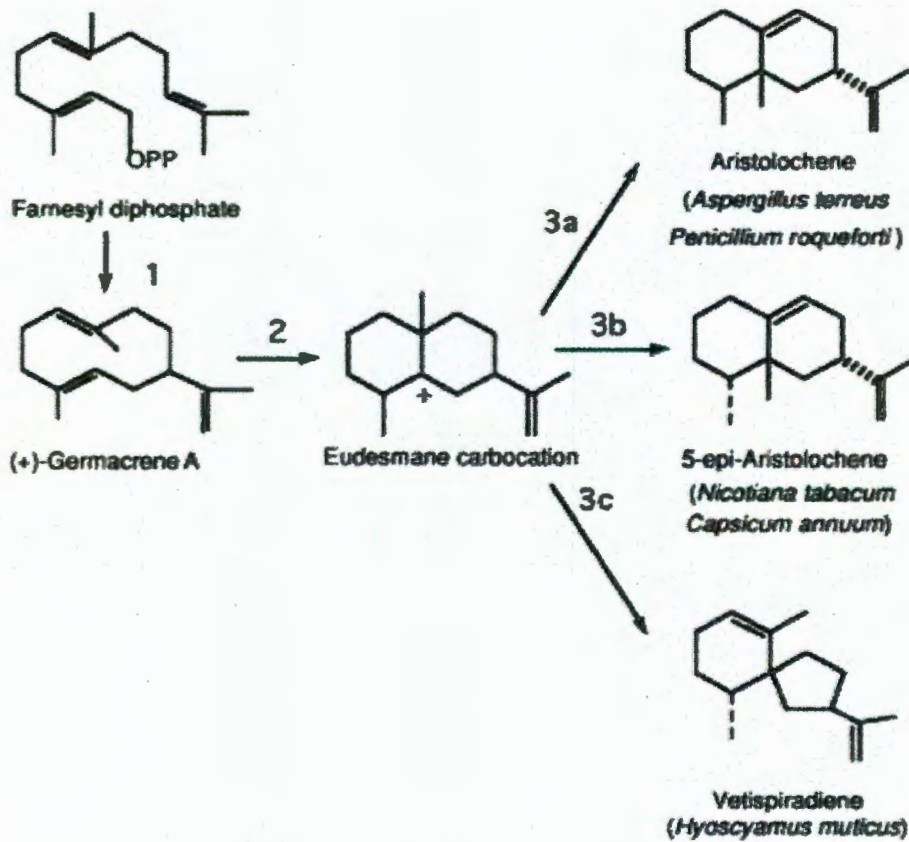


Fig 2.- Mecanismos de acción de sesquiterpene ciclasas. En esta figura se muestra el mecanismo de ciclización del farnesil pirofosfato de 3 ciclasas, entre las que se encuentra el vetispiradieno sintetasa involucrada en la síntesis de la fitoalexina vetispiradieno y la 5-epi-aristolocheno sintetasa involucrada en la síntesis de capsidiol. La reacción 1 y 2 son comunes para las tres ciclasas. 3a (ciclase de hongos), 3b (ciclase de tabaco y chile) y 3c (ciclase de *hyoscyamus murtics*)

Químicamente las fitoalexinas se pueden encontrar dentro de los siguientes grupos:

1) Fenólicos

a) Fenoles simples, ej. Acido cloragenico

b) Flavonoides, ej. Floretina, pisatina, faseolina, pterocarpanos.

c) Coumarinas, ej. Metoximeleina.

2) Poliacetilenos, ej. Safinól.

3) Isoprenos

a) Terpenoides, ej. Ipomeamarona, risitina, fituberina, lubimina, gosipol, **capsidiol**.

b) Esteroides, ej. α -solanina, α -chaconina.

El término fitoalexina fue usado primeramente por Müller (1940) y deriva de la naturaleza no específica de las sustancias antimicrobianas (alexinas) producidas por plantas (fiton) durante una infección (Goodman, 1986). Son más comunes en plantas compuestas; sin embargo, algunas plantas no relacionadas producen fitoalexinas del mismo tipo, como en el caso de la vid, cacahuate y el pino Scott que producen estilbenos (Rhodes, 1994).

Se conocen más de 350 fitoalexinas reportadas en aproximadamente 30 familias de plantas (Kúc, 1995). Pertenecen a clases químicas diferentes entre las que se encuentran las del tipo furanocumarinas, flavonoides, poliacetilenos glucosinolatos y terpenoides (Rhodes, 1994). Algunos tipos de fitoalexinas son característicos de ciertas familias de plantas, como es el caso de las Solanáceas, que producen fitoalexinas sesquiterpénicas. La estimulación (elicitación) de fitoalexinas es un mecanismo aún no comprendido. Para la inducción tanto in vivo como in vitro, se han reportado más de 200 factores distintos entre los que se encuentran, microorganismos, glucanas, oligopectinas, glucoproteínas, ácidos grasos, celulasas, glucanasas, pectinasas, luz ultravioleta, metales pesados, bajas temperaturas etc. Por lo tanto, es difícil relacionar una estructura con la inducción de fitoalexinas. Su síntesis parece ser el resultado de una perturbación metabólica provocada por los estimuladores, que es traducida en una señal de alarma, que dan como resultado el inicio de la cascada de eventos que tienden entre otras cosas a la formación y acumulación localizada de fitoalexinas (Kúc, 1995; Goodman, 1986). Algunos autores señalan que las plantas tienen el potencial para sintetizar fitoalexinas y que la infección de hongos y otros estrés determinan su síntesis por las plantas (Goodman, 1986; Boller, 1995).

En las plantas de chile y tabaco que pertenecen a la familia de las Solanáceas, se produce la fitoalexina sesquiterpénica Capsidiol (Chapell, 1995; Egea, 1996; Lozoya, 1995), mientras en papa se producen las fitoalexinas sesquiterpénicas Risitina y Fituberol (Kúc 1995). En el caso del chile, se ha encontrado que produce una fitoalexina sesquiterpénica denominada capsidiol, la cual produce ciertos efectos fungitóxicos sobre algunos hongos fitopatógenos. (Egea, 1996; Moreno, 1997)

Los incitadores de fitoalexinas pueden ser fácilmente derivados de cultivos de hongos cerca del final o después de la fase de crecimiento logarítmico, cuando los productos de degradación están usualmente presentes en los filtrados de los cultivos (Goodman, 1986). La sensibilidad de los hongos infectivos a la producción de fitoalexinas después de la inoculación parece ser un factor importante para la resistencia de enfermedades. Los hongos y las bacterias pueden degradar fitoalexinas, aparentemente mediando la toxicidad de estos compuestos. Es conocido que las plantas huésped también pueden metabolizar fitoalexinas (Goodman, 1986). Las fitoalexinas pueden acumularse dentro de las células vivas que han sido afectadas por el ingreso de patógenos y debido al progreso de la enfermedad, estos compuestos se acumulan en células muertas o deshidratadas. Cuando ocurre una mayor interacción han sido encontradas en tejidos que rodean el sitio de la infección original pero no necesariamente en las primeras células que hacen contacto con el patógeno (Nicholson, 1992)

2.3. El cultivo del duraznero en México

El duraznero (*Prunus persica*), perteneciente a la familia de las Rosáceas, es un árbol originario de China. La mayoría de las variedades se cultivan básicamente en las zonas templadas entre los 30 y 40° de latitud al Norte, o donde las temperaturas invernales son lo suficientemente bajas para satisfacer las necesidades de frío y permitir un crecimiento del follaje y floración normales durante la primavera. Por hibridación se han obtenido nuevas variedades capaces de producir con necesidades muy bajas de frío o con resistencia a los inviernos benignos.

El fruto del duraznero es muy apreciado como complemento alimenticio, se consume fresco o en conserva. Las variedades de pulpa blanda se prefieren para la preparación de dulces, zumos, jaleas y mermeladas; mientras que las de pulpa firme son apropiadas para el envasamiento ya sea de fruto entero o en trozos.

Las principales enfermedades del duraznero son la pudrición café o morena, causada por el hongo *Monilinia fructicola*, la roña y el mosaico. El mejor control de enfermedades e insectos es el uso de patrones resistentes. Para que una variedad sirva como patrón, se selecciona tomando en cuenta algunos factores importantes como disponibilidad de semilla, porcentaje de germinación, facilidad para injertarse y resistencia a las enfermedades.

La superficie nacional cultivada con durazno en el año agrícola 1990-1991 fue de 61,030 ha. Las entidades que presentaron mayor superficie de cultivo fueron: Zacatecas con 19,563 ha, Michoacán con 6,465 ha, Puebla 5,542 ha, Estado de México 3,517 ha, Chihuahua 2,626 ha, Chiapas 2,592 ha y Oaxaca con 2,402 ha. Las superficies anteriores representan el 70% del área de cultivo total.

La producción nacional de durazno, en el año agrícola de referencia (1990-1991), fue de 59,967 ton. Esta fruta se produjo en treinta entidades del país, destacando seis como las principales productoras con una participación conjunta de 66% de la producción nacional, estas fueron: Zacatecas (23%), Chihuahua (15%), Aguascalientes y Michoacán (8%), finalmente Puebla y Sonora (6% cada una) (INEGI, 1998).

2.4. Pudrición café del durazno (*prunus persica*)

Esta enfermedad ocurre en todo el mundo y en particular en los países donde se cultivan frutales de hueso y donde hay una suficiente precipitación durante el periodo de maduración de los frutos. Afecta a los duraznos, cerezos, ciruelos, albaricoques y almendros con casi la misma severidad. Las pérdidas que ocasiona la pudrición café son debidas principalmente a la pudrición de los frutos en los huertos, aunque pueden producirse pérdidas considerables durante el transporte y la venta en el mercado. El rendimiento disminuye también cuando la enfermedad destruye las inflorescencias durante la etapa de tizón del hongo. Cuando las infecciones son severas y en ausencia de buenos métodos de control, puede ocurrir que el 50 al 75% de los frutos se pudran en los huertos y que el resto sea infectado antes de que llegue al mercado (Agrios, 1986).

2.4.1. Síntomas.

Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen sobre las inflorescencias. En los pétalos, estambres o pistilos aparecen manchas café que se extienden con gran rapidez envolviendo

a toda la flor y a su pedúnculo. Cuando el clima es húmedo, los órganos infectados se cubren con los conidios pardos grisáceos del hongo y más tarde se arrugan y secan, quedando la masa putrefacta colgando del árbol durante algún tiempo. En las ramitas que portan las flores infectadas se desarrollan pequeños cánceres elípticos, profundos y de color café en torno al pedúnculo de la flor, los cuales en ocasiones cubren el tallo y ocasionan el tizón de esas ramitas. Cuando el clima es húmedo, sobre la superficie de la corteza aparece una sustancia gomosa y ramilletes grises de conidios (Agrios, 1986; Watt, 1994). Los síntomas de los frutos aparecen cuando estos se aproximan a su madurez. En ellos aparecen pequeñas manchas circulares de color café, las cuales se extienden con gran rapidez en todas las direcciones y, dependiendo del nivel de humedad, se cubren rápida o lentamente con ramilletes de conidios de color cenizo, los cuales brotan a través de la cáscara del fruto y se esparcen o disponen en anillos concéntricos sobre la superficie del fruto. Los frutos en los que se desarrolla una gran zona o pequeñas zonas putrefactas, se pudren hasta formar una masa seca y arrugada permaneciendo colgados del árbol, o bien caen sobre el terreno, donde se momifican, lo cual, sirve como un indicativo del lugar donde se esta presentando la enfermedad. Los principales síntomas son una pérdida rápida de agua hasta la deshidratación total del fruto, además de un encogimiento, arrugamiento y endurecimiento del mismo (Agrios, 1986; Horsfall, 1978; Roberts, 1984). En ocasiones, aparecen también pequeños cánceres sobre las ramitas o ramas que portan los frutos infectados.

2.4.2. *Monilinia fructicola*.

M. fructicola se cococio hasta hace poco tiempo como *Sclerotinia fructicola*. Además de *M. fructicola*, otras dos especies (*M. laxa* y *M. fructigena*) producen la pudrición café de los frutos de hueso. La primera especie aparece ocasionalmente en la costa Oeste y en el área de Wisconsin y Michigan en los Estados Unidos; la otra especie se encuentra exclusivamente en Europa, donde afecta a los manzanos de forma tan severa como a los frutos de hueso. Con diferencias sutiles, el desarrollo de la enfermedad ocasionada por ambas especies es esencialmente el mismo (Agrios, 1986).

2.4.2.1. Proceso infectivo.

El micelio del hongo produce cadenas de conidios elípticos del tipo *Monilinia* sobre hifas dispuestas en grupos o ramilletes. El hongo produce también microconidios (espermacios) en cultivo y en frutos momificados. Los microconidios se forman en cadenas sobre conidióforos en forma de botella y, aún cuando no germinen, al parecer intervienen en la fecundación del hongo. La etapa asexual (apotecio) se forma sobre la superficie del fruto momificado, el cual se encuentra parcial o totalmente enterrado en el suelo o en los restos de las plantas. Sobre un fruto momificado pueden formarse más de 20 apotecios. En frutos de esa condición aparecen pequeñas protusiones en forma de bulbo, las cuales se extienden hasta formar el estípite del cuerpo fructífero del hongo. Conforme este estípite emerge sobre el suelo, su porción superior se hincha y aparece una depresión en la punta. El desarrollo posterior de los costados de ese hinchamiento forma la “copa” apotecial, la cual tiene inicialmente la forma de un embudo y más tarde de un disco. La superficie superior o interior del apotecio se encuentra cubierta por miles de ascas cilíndricas entremezcladas con las parafisas. Cada una de las ascas contiene 8 ascosporas uniceluladas.

Desarrollo de la enfermedad. El patógeno inverna en forma de micelio o conidios sobre frutos momificados que se encuentran en el árbol o en el suelo, o bien en los cánceres de ramitas infectadas. En la primavera, el micelio de los cánceres en las ramitas y de los frutos momificados que se encuentran en el árbol o en el suelo produce nuevos conidios, mientras que el micelio del fruto momificado enterrado en el suelo produce varios apotecios, los cuales forman ascas y ascosporas. Tanto los conidios como las ascosporas producen infecciones en las inflorescencias. Los conidios son llevados por el viento, el agua de lluvia, las salpicaduras y los insectos hacia los verticilos florales. Las ascosporas que salen con fuerza del asca forman una “nube” blanca sobre el apotecio. Las corrientes de aire las llevan entonces hacia las flores. Los conidios y las ascosporas germinan y producen infección al cabo de unas cuantas horas (Figura 3). El micelio del hongo, en particular cuando el clima es húmedo, produce hifas cortas que se reúnen, ejercen presión hacia el exterior al nivel de la epidermis y forman numerosos ramilletes conidiales sobre los verticilos florales podridos y arrugados a partir de los cuales el hongo libera nuevas masas de conidios. Al mismo tiempo, el micelio del hongo avanza con gran rapidez hacia los

tejidos del pecíolo de las inflorescencias y de ahí al espolón del fruto y hacia las ramitas. En estas últimas, el micelio ocasiona la desintegración y el colapso de las células en torno al espolón del fruto y forma un cáncer profundo, de color pardo rojizo y en forma de escudo. La propagación del micelio puede llegar a cubrir las ramitas, las cuales después son rodeadas y mueren. En poco tiempo, la superficie del cáncer se cubre con varios ramilletes conidiales y los conidios de estos sirven como inóculo para que más tarde se produzca la infección del fruto durante el transcurso de la estación de crecimiento.

El hongo de la pudrición café no infecta directamente las hojas o la corteza, de ahí que los conidios y ascosporas que se formen vivan muy poco tiempo. Los apotecios se desintegran en poco tiempo, por lo tanto, no están presentes en ascosporas para poder infectar a los frutos cuando son susceptibles a la enfermedad. El lapso comprendido entre el momento en que las inflorescencias son infectadas por el hongo y cuando el fruto del mismo árbol puede llegar a infectarse, queda cubierto por los conidios que se forman en el cáncer de las ramitas durante la época de lluvias (Verano). Los frutos de algunos frutales de hueso con floración precoz son susceptibles a la infección, a diferencia de algunos árboles de floración tardía que pasan todavía por su etapa de floración o que ya la han concluido. En este último caso, los conidios que se forman en las flores de árboles de floración tardía son llevados por algún vector e infectan a los frutos de árboles de maduración precoz.

La susceptibilidad de los frutos a la infección aumenta con la maduración de éstos. Por lo común, los conidios penetran en los frutos a través de pinchaduras en las ramitas o bien a través de heridas producidas por los insectos o el granizo; pero en algunos dicha penetración se efectúa a través de los estomas o directamente a través de la cutícula de la planta. El hongo crece intercelularmente al principio y mediante la secreción de enzimas produce la maceración y el empardecimiento de los tejidos que ha infectado. El hongo se propaga con gran rapidez sobre los frutos y conforme avanza en el fruto, produce también ramilletes conidiales en la zona ya podrida, lo que facilita que los conidios puedan ser llevados a grandes distancias e infecten a otros frutos. Un fruto completo puede descomponerse totalmente al cabo de algunos días y puede ocurrir que se mantenga colgado al árbol o que caiga al suelo. Por lo común, los frutos que caen al suelo poco después de haber sido infectados se desintegran bajo la acción de hongos saprófitos y bacterias (Agrios, 1986). Los frutos que aun se mantienen suspendidos en el árbol, pierden humedad rápidamente, se arrugan. Al final de la estación de crecimiento, se transforman en

CICLO BIOLÓGICO DE *Monilinia fructicola*

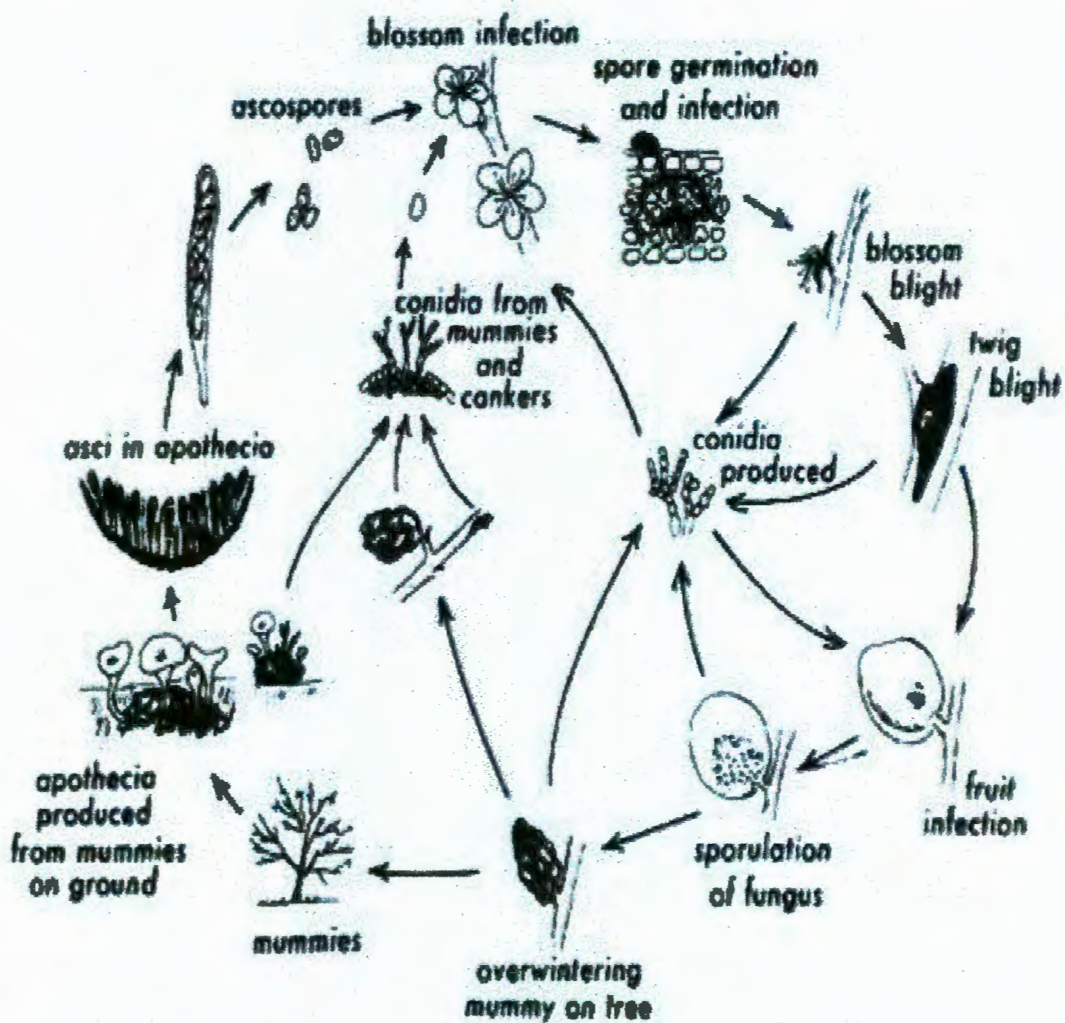


Figura 3. Ciclo Biológico de *Monilinia fructicola* en las diferentes etapas del desarrollo del fruto.

un cuerpo seco y deformado que presenta una superficie arrugada. La cáscara del fruto sigue siendo la cubierta protectora y debajo de ella los restos de las células del fruto se mantienen en su sitio debido a los filamentos miceliales del hongo que se encuentran estrechamente entrelazados y forman una superficie dura. Una vez que el fruto se ha momificado, puede caer al suelo, pero no es afectado por los microorganismos del suelo y puede persistir ahí durante dos o más años (Hong, 1997).

La infección de los frutos se produce también después de cosecharlos, almacenarlos y transportarlos. Los frutos infectados continúan pudriéndose después de haber sido cosechados y el micelio atacará directamente a los frutos sanos que entren en contacto con ellos. Los frutos sanos también son atacados en cualquier tiempo comprendido entre la cosecha y consumo por el hombre (Agrios, 1986; Watt, 1994).

2.4.3. Epidemiología

Como la mayoría de los hongos, la severidad de la pudrición café es dependiente de la humedad. En verano, durante la época de lluvias y alta humedad, se tiene un incremento en la incidencia de la enfermedad, lo que ocasiona epidemias de la pudrición café, dificultando su control (Horsfall, 1978). Los hongos pueden crecer lentamente a temperaturas cercanas a los 0 °C pero tienen un mejor desarrollo a temperaturas entre los 20 y 25 °C. Las esporas de los hongos requieren agua libre para germinar e infectar los tejidos y esta agua generalmente proviene del agua de lluvia. Períodos de 30 horas de humedad son requeridos para iniciar la infección del fruto y los frutos que son dañados por insectos son más susceptibles. El período de incubación de *Monilinia fruticola* sobre cerezos, se reduce en forma lineal, de 150 a 110 h cuando se incrementa la duración del ambiente húmedo de 6 a 18 h (Huber, 1992).

2.4.4. Control.

La pudrición café de los frutos de hueso se controla satisfactoriamente siguiendo los siguientes pasos: 1) Remover todos los frutos de los árboles y de los alrededores que hayan sido infectados antes y después de la cosecha. Es conveniente cortar las ramitas que portan las inflorescencias infectadas o los cánceres, para disminuir la cantidad de inóculo

disponible que pudiera producir infecciones en los frutos posteriormente en el transcurso de la estación de crecimiento y para eliminar cualquier fuente de esporas y micelio invernantes que pudieran producir infecciones en las inflorescencias y completando la fase de la enfermedad, que consiste en un tizón de las inflorescencias en la siguiente estación; 2) Destruir las variedades silvestres de *Prunus* sp. que se encuentran en la vecindad, debido a que en estos árboles puede permanecer el hongo; 3) Contar con buenos sistemas de ventilación y drenaje, lo cual permite un rápido secado de la superficie y 4) Aplicar un control de aspersión de fungicidas. Esto se logra aplicando aspersiones de 2 a 4 veces con un fungicida adecuado a partir del momento en que las yemas florales adquieren una tonalidad rosada, hasta la caída de los pétalos. Los fungicidas Captan, Benomyl, Diclone, Azufre y Thiram son los que se utilizan para el control de la enfermedad. A fin de controlar la pudrición café en los frutos en proceso de maduración, los fungicidas Captán, Thiram, Ferbam, Ziram, Benlate, Topsim-M, Deconil, Funginex, Ronilan, Rovral y Azufre humectable o polvos de Azufre, deben aplicarse sobre los árboles algunas semanas antes de la cosecha. Dado que la mayoría de las infecciones de los frutos inmaduros y muchos de los frutos ya maduros se originan en heridas producidas por pinchamientos de insectos, el control de estos ayuda también al control de la enfermedad (Agrios, 1986; Horsfall, 1978).

A fin de prevenir las infecciones durante la cosecha y durante el almacenamiento y transporte de los frutos, éstos deben seleccionarse y manipularse con el mayor cuidado para evitar pinchamientos y abrasiones de su cáscara, las cuales permiten que el hongo de la pudrición café penetre en ellos con mayor facilidad. Deben desecharse todos los frutos que muestren manchas debidas a la pudrición café. Las agarraderas y las cajas deben espolvearse por dentro y por fuera, en particular cuando el clima es húmedo, cada vez que sean utilizadas. La pudrición café de postcosecha puede reducirse al sumergir o remojar los frutos en una solución de Benomyl antes de almacenarlos, y también puede controlarse al enfriar o hidroenfriar los frutos antes de refrigerarlos de 0 a 3 °C (Agrios, 1986).

Desafortunadamente, la gran mayoría de los fungicidas tienden a producir cierto grado de resistencia de los patógenos, por lo que se deben administrar bajo un sistema de rotación. Existen dos áreas generales que afectan la resistencia en la practica: a) el manejo total de la cosecha y b) el uso de fungicidas sobre la cosecha. Estas dos medidas de protección integrada de cosechas y el uso de fungicidas que disminuyen la presencia de la enfermedad y la selección para resistencia a fungicidas (Staub, 1991).

III. OBJETIVOS DE LA TESIS

Objetivo general:

El objetivo general de este trabajo consiste en evaluar la capacidad fungicida o fungiestática del capsidiol sobre el hongo *Monilinia fruticola* que provoca la pudrición café o morena en frutos de durazno (*Prunus persica*).

Objetivos específicos:

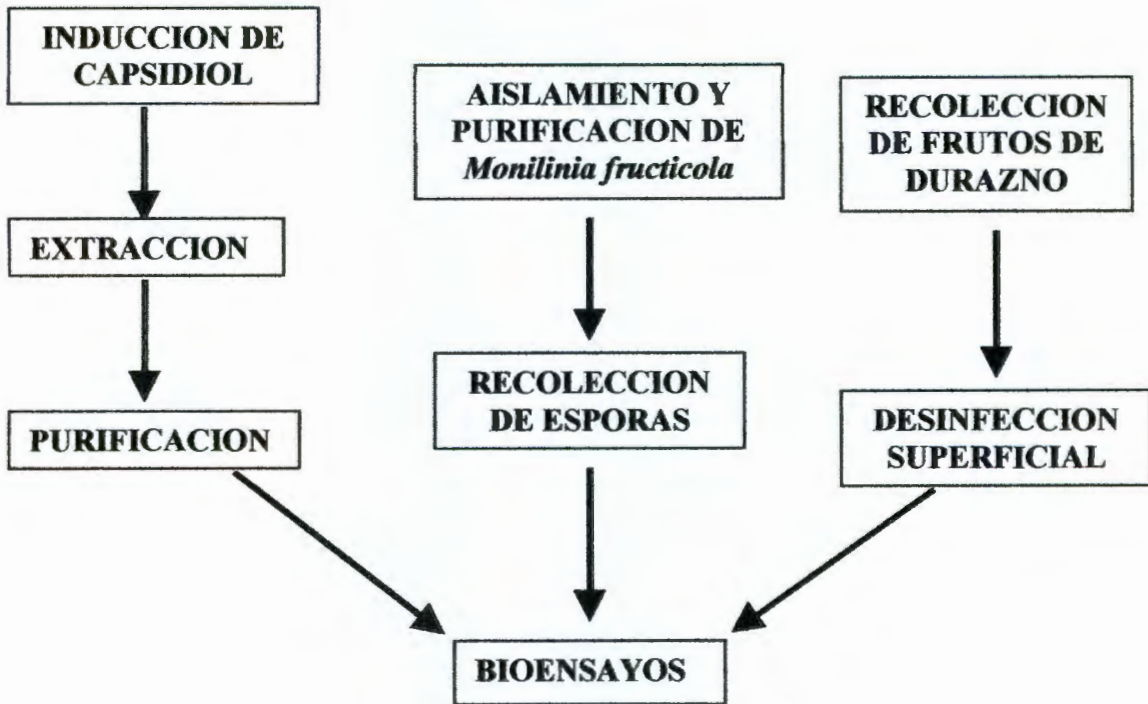
1. Optimizar el proceso de obtención y purificación de capsidiol a partir de frutos de Chile (*Capsicum annuum*).
2. Optimizar una metodología para la inducción, aislamiento y cuantificación de esporas de *Monilinia fruticola* a partir de frutos infectados.
3. Probar la capacidad inhibitoria del capsidiol en de *M. fruticola* in vitro.
4. Determinar la capacidad inhibitoria del capsidiol en el desarrollo de la pudrición café en frutos de Durazno.

IV. JUSTIFICACION E IMPORTANCIA CIENTIFICA O TECNOLOGICA

En la actualidad, las enfermedades provocadas por hongos son uno de los principales factores que limitan la productividad de las cosechas a nivel mundial, por lo que todo conocimiento generado en relación a la interacción planta-patógeno es de gran importancia en el proceso de búsqueda de estrategias de control de enfermedades en cultivos de importancia agrícola. En el caso del durazno, una de las principales enfermedades es la pudrición café o morena, provocada por el hongo *Monilinia fructicola*. Para controlar esta enfermedad, se han utilizado diferentes estrategias como la aplicación de fungicidas sintéticos y en algunos casos el control biológico; sin embargo, estas estrategias no se utilizan cuando el fruto esta en etapa de corte y las principales pérdidas ocurren en frutos en estado de maduración. En este trabajo se evaluarán los efectos del capsidiol obtenido a partir de frutos de chile, que es un fungicida de origen natural, sobre el desarrollo de la pudrición café en frutos de durazno. La disminución de la incidencia de la enfermedad redundará en un incremento en la producción y en la vida de anaquel, así como una disminución de costos y de la contaminación producida por la aplicación de agroquímicos.

V. METODOLOGIA

ESQUEMA GENERAL:



5.1. Inducción extracción y purificación de capsidiol.

La inducción del capsidiol se realizó en frutos sanos de chile (*Capsicum annum*), de la variedad Poblano, a los cuales se partieron por mitad y se introdujeron en una solución de celulasa del hongo *Trichoderma* sp. (Ocean Clean) a una concentración 0.1gL^{-1} . Los frutos tratados se incubaron durante 48 h a temperatura ambiente. La extracción se hizo utilizando como solvente cloroformo en una relación de volumen 1:1 con la solución de inducción. La solución de cloroformo se concentró hasta la evaporación total del solvente dentro de una campana de extracción. El precipitado resultante se resuspendió en 20 mL de una solución de etanol al 70% y se filtró a través de un cartucho de Rezorian (Rezorian A-161, Reagent Grade 5mL, SUPELCO, USA). Se realizaron 3 lavados con una solución de etanol al 70% al cartucho en el que se realizó la filtración, para arrastrar el capsidiol que pudiera haber quedado en el cartucho. Después la solución del filtrado se secó, dentro de una campana de extracción y calentamiento a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una parrilla con control de temperatura. El residuo se resuspendió en éter etílico anhidro, el cual se utilizó para cromatografía en placa fina con Silica Gel (G- 60) se utilizó una placa de 0.5 mm de espesor, 5 cm de ancho X 20 cm de largo. La cromatografía se corrió utilizando como fase móvil una mezcla de acetato de etilo-ciclohexano en una relación 1:1 v/v. Para revelar, se roció una parte de la placa (aproximadamente 1 cm de ancho) con una solución de vanillina (3.75 % en metanol absoluto y acidificado con 0.5% de ácido sulfúrico concentrado), utilizando de un compresor de aire, con una presión de 0.5 kgcm^{-2} aproximadamente y posterior aplicación de calor a la parte de la placa que fue rociada con la solución de vanillina en una parrilla a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se raspó la parte de la banda que correspondió al R_f del capsidiol y que no fue revelada, se resuspendió en una solución de acetato de etilo (grado reactivo). El procedimiento anterior se siguió por cuatro veces, hasta la obtención de una sola banda que correspondió al capsidiol. La pastilla obtenida se pesó para su posterior cuantificación. Para la obtención de la solución que se utilizó para el bioensayo, sólo se hizo la extracción con cloroformo y este se evaporó totalmente. Posteriormente el residuo se resuspendió en agua destilada estéril, a esta solución se le llamó "solución madre".

5.2. Recolección y aislamiento de *Monilinia fruticola*.

El hongo se aisló a partir de frutos de durazno colectados en el Centro Comercial Agropecuario de Aguascalientes, México que presentaban los síntomas característicos de la pudrición café. Se tomó micelio del hongo que se encontraba en los frutos y se cultivaron en una caja de Petri que contenía agar-papa-dextrosa (APD) como medio de cultivo, durante cinco días, en una estufa a una temperatura de 30 °C. Para la identificación, se colocaron cuerpos fructíferos del hongo sobre una gota de medio de cultivo APD, suspendida sobre un portaobjetos dentro de una caja Petri. Una vez desarrollado el hongo, se observó en un microscopio de contraste de fases (AXIOPLAN), acoplado a un software (Videk Harmony S/N; OPT4031 K00044; versión 4.03, BioScan, Inc., USA). La recolección de esporas se realizó de la siguiente manera; a las cajas Petri que contenían una cantidad considerable de cuerpos fructíferos del hongo se les añadió agua destilada estéril, después de 20 min se hizo un raspado con una varilla de vidrio estéril sobre la superficie de la placa, las esporas se recolectaron en un frasco de plástico y se guardaron a -20 °C.

5.3. Bioensayo in vitro.

Se colocó micelio del hongo aislado, en una caja Petri con medio de cultivo APD. Una vez que comenzó el crecimiento del hongo, se colocaron pequeños discos de papel filtro distribuidos geoméricamente dentro de la placa en forma de cuadrado, tres de ellos se impregnaron con una solución de capsidiol al 0.6 mM disuelto en éter etílico obtenido de la purificación por raspado de bandas en cromatografía en capa fina, y el disco restante se tomó como testigo mediante la impregnación con éter etílico y la caja se incubó durante cinco días en una estufa a una temperatura de 30 °C.

5.4. Recolección de frutos de durazno (*Prunus persica*) variedad Criollo.

La recolección se realizó en el Municipio de Sombrerete Zacatecas, este municipio se localiza al noroeste de Estado de Zacatecas, colindando con el estado de Durango y se ubica a una altura de 1,800 metros aproximadamente sobre el nivel del mar tiene un clima semi-humedo, en este lugar el cultivo de durazno es de temporal. Los frutos se colectaron al

azar en una huerta de aproximadamente 10 ha, escogiéndose aquellos que estuvieran en madurez comercial, tomando como referencia el color del fruto y que no manifestaran ningún síntoma de enfermedad o daño mecánico.

5.5. Desinfección de frutos.

La desinfección se realizó con una solución de cloro al 1% durante 15 min, después se hicieron varios lavados con agua destilada estéril hasta la eliminación del cloro residual.

5.6. Bioensayos en frutos.

Los frutos se dividieron en cuatro tratamientos y se utilizaron 10 frutos por tratamiento:

- 1) **Frutos mas esporas.** Los frutos fueron inoculados con un millón de esporas, en la concavidad formada en el sitio de unión al pedúnculo.
- 2) **Frutos con capsidiol mas esporas.** Los frutos se sumergieron primero en una solución de capsidiol a una concentración de 0.66 mM; posteriormente se les inoculó la misma cantidad de esporas que en el tratamiento anterior.
- 3) **Frutos con capsidiol.** Los frutos solo se sumergieron en la solución de capsidiol.
- 4) **Frutos control.** Los frutos se sumergieron en agua destilada estéril.

Los frutos se colocaron individualmente sobre una caja Petri previamente desinfectada; después, se cubrieron con vasos de polietileno de 340 mL se incubaron por un período de 12 días a temperatura ambiente bajo condiciones de humedad saturada con la ayuda de un fragmento de algodón estéril y humedecido con agua estéril, el cual se colocó a un lado del fruto dentro del vaso.

5.7. Medición de variables:

5.7.1. Medición de la producción de Etileno.

Se hicieron mediciones cada 24 h a partir de las 48 h del inicio del experimento, hasta el octavo día, extrayendo gas del interior del vaso con la ayuda de una jeringa. La determinación se realizó en un cromatógrafo de gases (Varian Areograph Series 1400, USA) con una columna empacada (15% FFAP Chrom W A/W 8/100, con dimensiones de 2 m de largo por $\frac{1}{8}$ de pulgada de diámetro), utilizando como gas acarreador nitrógeno, con un flujo de 30 mLmin^{-1} y un detector de ionización en flama. Las temperaturas de operación fueron: inyector $120 \text{ }^\circ\text{C}$, columna $80 \text{ }^\circ\text{C}$, y detector $120 \text{ }^\circ\text{C}$. El volumen de inyección fue de $200 \text{ }\mu\text{L}$ por muestra. Se inyectó una muestra con un estándar de etileno al 6 % v/v disuelto en nitrógeno y bióxido de carbono.

5.7.2. Cuantificación de azúcares solubles.

Para la determinación de azúcares se realizaron cuatro tratamientos idénticos a los del bioensayo, y la determinación se realizó al quinto día a partir del día en que se inició el bioensayo.

5.7.2.1. Cuantificación de azúcares solubles en frutos en los que se desarrolló la enfermedad.

Se incubaron por separado frutos con esporas, para que ocurriera el desarrollo de la enfermedad; una vez que se presentaron los síntomas, se tomaron muestras de tres partes diferentes del fruto: 1) la región en la cual se desarrolló el crecimiento del micelio, 2) la frontera de la zona del fruto en que se presentaron los síntomas con la zona en la que aparentemente no existía invasión por parte del micelio, y 3) la zona del fruto lejana al crecimiento del micelio. Para la determinación de los azúcares, se pesaron 0.5 g de tejido de cada una de las partes del fruto por separado, se depositaron en un mortero de porcelana y se añadió 10 mL de agua destilada, se hizo una homogenización del tejido y se filtró. Posteriormente, se tomaron 0.5 mL de la solución filtrada y se le añadió 0.1 mL de enzima

invertasa, se calentó la solución en baño María a 30 °C durante 20 min. Para la cuantificación, se llevo a cabo, el método del ácido di-nitro-salicílico (DNS), utilizando un espectro UV-visible (Varian DMS 80) en el cual se hicieron las lecturas a 540 nm. Cada vez que se realizó la lectura en el espectrofotometro, se calibró con un blanco, el cual se preparo a partir de agua tridestilada. Para la cuantificación de azúcares previamente se realizó una curva estándar utilizando glucosa anhidra.

5.7.2.2. Cuantificación de azúcares solubles en frutos en los que no hubo desarrollo de la enfermedad.

Para la determinación de los azúcares en los demás grupos en los que no existió el desarrollo de la enfermedad, solo se tomó tejido de la parte del ecuador de los frutos y se procedió a realizar el mismo procedimiento descrito en el caso anterior.

5.8. Tratamiento Estadístico

Para la el montaje del experimento se tomaron frutos al azar, los cuales se dividieron en cuatro tratamientos, cada tratamiento contenía 10 frutos. Para encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se evaluaron algunas de las variables continuas resultantes del experimento, principalmente los gases derivados de la actividad metabólica de los frutos, se utilizo la comparación de medias de t-student, para muestras simples e independientes con un nivel de significancia p menor de 0.05. Para la realización del análisis estadístico se utilizo en paquete Estadístico Statistica.

VI. RESULTADOS

6.1. Inducción, extracción y purificación del capsidiol.

Se logró inducir la síntesis de capsidiol a partir de frutos de chile, utilizando como incitador celulasa de *Trichoderma* sp. después de un período de incubación de 48 h. La extracción y purificación se realizó en diferentes etapas como se muestran en la Figura 4. El Rf del capsidiol fue de 0.33 en el sistema cromatográfico utilizado y presentó una coloración azul al ser revelado con la solución de vanillina.

6.2. Cuantificación del capsidiol.

La cuantificación del capsidiol se realizó utilizando el capsidiol recuperado por raspado de bandas de cromatografía, obteniendo un rendimiento de 4 mg kg^{-1} de chile inducido con celulasa. El cálculo de la concentración de capsidiol que se utilizó para los bioensayos en frutos, se determinó a partir del cálculo obtenido por cuantificación por cromatografía, resultando en una concentración aproximada de 0.66 mM de capsidiol.

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DEL CAPSIDIOL

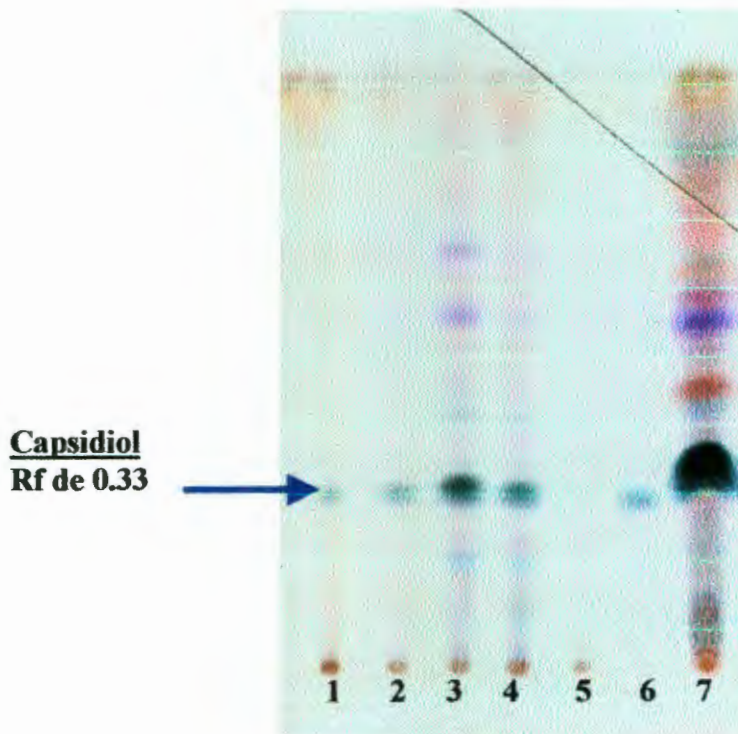


Figura 4. Cromatografía en capa fina del capsidiol en sus diferentes etapas de purificación. El carril 1 es el segundo raspado de banda. El carril 2, es el tercer raspado de banda. El carril 3 después de pasar la solución madre por el cartucho de Resorian. El carril 4, es el primer raspado de banda; el carril 5, es el quinto lavado de la solución madre que se hizo pasar por el cartucho de Resorian. El carril 6, es el cuarto y último raspado de banda. El carril 7 es el extracto madre concentrado, evaporado y disuelto en éter.

6.3. Aislamiento de *Monilinia fructicola*.

Como ya se mencionó en la metodología, el hongo se aisló a partir de frutos infectados colectados en el mercado y que presentaban síntomas característicos de la pudrición café o morena provocada por el hongo *Monilinia fructicola*. La identificación se realizó por comparación de las características morfológicas del hongo aislado, con las reportadas en la literatura (Agrios, 1986; Hong *et al.*, 1997). El micelio del hongo produjo cadenas de conidios elípticos del tipo *Monilinia* sobre hifas dispuestas en grupos o ramilletes, tal como se muestra en la Figura 5. Estas características, son las que nos ayudaron a determinar que efectivamente la enfermedad que presentaban los frutos recolectados era provocada por *Monilinia fructicola*.

MICROGRAFÍA DE *Monilinia Fructicola*

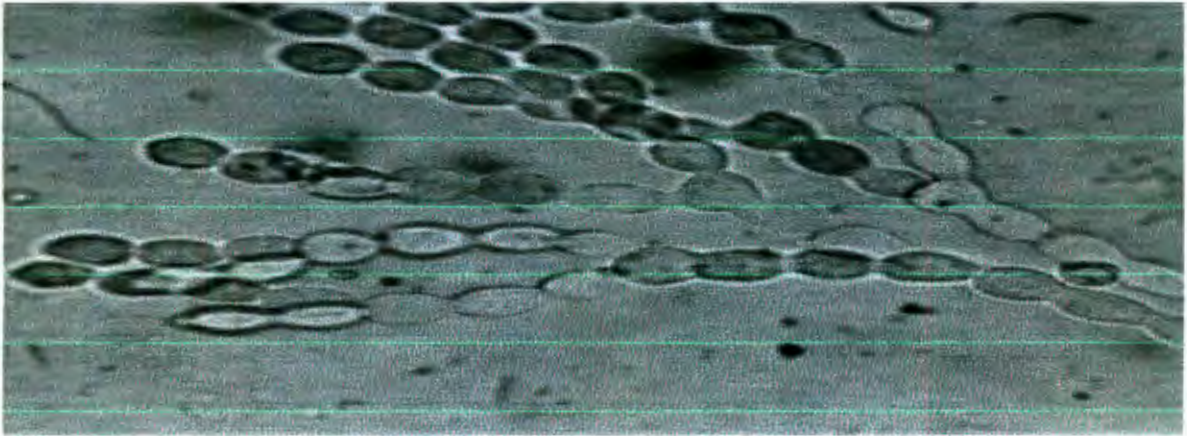


Figura 5. Micrografía 40X de *Monilinia fruticola*, en la cual es posible observar el micelio del hongo con ramilletes de conidios, los cuales son característicos de esta especie y sirven para su identificación. microscopio de contraste de fases (AXIOPLAN), acoplado a un software (Videk Harmony S/N: OPT4031 K00044, versión 4.03, de BioScan, Inc)

6.4. Bioensayos.

6.4.1. Determinación de la susceptibilidad de *Monilinia fructicola* al capsidiol in vitro.

Para la determinación de la susceptibilidad *in vitro*, se impregnaron pequeños discos de papel filtro con una solución de capsidiol, colocándolos en diferentes zonas de la caja petri, en la cual se hizo crecer previamente la cepa aislada. Como control, se utilizó un disco sin capsidiol. En la figura 6 se observa la inhibición del crecimiento del hongo en la periferia de los discos impregnados con capsidiol, dado que no existe ningún desarrollo del hongo en esa zona se puede determinar que el grado de inhibición es del 100%.

**PRUEBA DE INHIBICION DEL CAPSIDIOL SOBRE EL DESARROLLO DE
Monilinia fruticola IN VITRO**

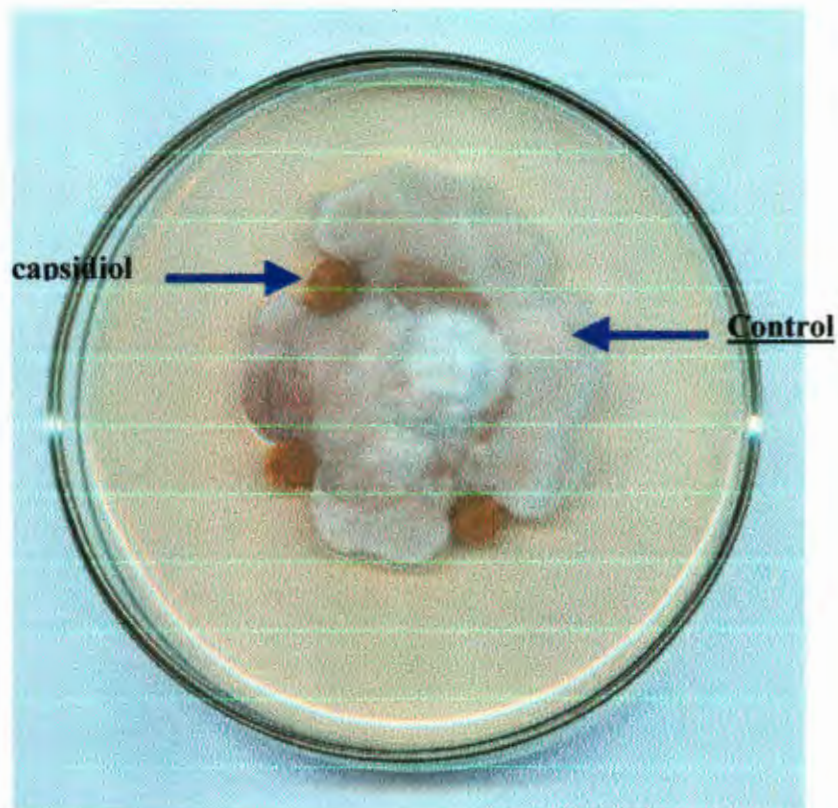


Figura 6. Prueba in vitro de la susceptibilidad de *Monilinia fruticola* al capsidiol. Se puede observar el grado de inhibición en la periferia de los discos impregnados con capsidiol a diferencia del crecimiento sobre el disco control. El hongo no es capaz de crecer sobre la superficie que contiene la fitoalexina, lo que es indicativo de inhibición total del crecimiento del hongo por la presencia de capsidiol.

6.4.2. Bioensayos en frutos de durazno.

En los bioensayos realizados se encontró que el grupo de frutos que fueron inoculados con esporas presentaron una gradual aparición de los síntomas característicos de la pudrición café. Los frutos presentaron al tercer día de iniciado el bioensayo, el desarrollo de una zona necrótica en el sitio en donde se inocularon las esporas (Figura 7) a diferencia de los demás tratamientos en los que se aprecian los frutos sin ningún daño visible sobre todo en el tratamiento al que se le inocularon esporas previo sumergimiento en la solución de capsidiol. El aumento de los síntomas característicos de la pudrición café y el crecimiento de la zona necrótica en los frutos pertenecientes al tratamiento con esporas fue gradual, y se puede observar en la Figura 8 que la zona necrótica se ha incrementado considerablemente. Además se observan la aparición cuerpos fructíferos del hongo sobre la superficie del fruto que fue infectada; Mientras que los frutos inoculados con esporas, previo tratamiento con capsidiol, no presentaron síntomas de la pudrición café, ni el desarrollo de cuerpos fructíferos sobre la superficie de los frutos, lo cual nos da un indicativo que existe un grado de inhibición del desarrollo de la enfermedad. A medida que transcurrió el tiempo los síntomas de la pudrición café se fueron acrecentando y el desarrollo de *Monilinia fructicola*, fue más visible y determinante, como se muestra en la Figura 9. En la que es posible observar el grado de desarrollo sobre el tratamiento de frutos que fueron inoculados con esporas, a diferencia de los demás tratamientos los cuales no presentan ningún síntoma del desarrollo de la enfermedad. En la Figura 10 se muestran solo los frutos que desarrollaron la enfermedad y en los cuales se puede observar un inicio de momificación debida a su deshidratación, lo cual es un síntoma característico del desarrollo de esta enfermedad. Por ultimo en la Figura 11 se puede observar la momificación total del fruto y la presencia de un gran numero de cuerpos fructíferos sobre su superficie.

ESTADO DE LOS FRUTOS AL TERCER DIA DE INICIADO EL BIONESAYO



Figura 7. Estado de los frutos al tercer día del experimento. En esta fotografía se muestra el inicio de la aparición de los síntomas característicos de la pudrición café, en el grupo al que se le inocularon esporas sin ningún tratamiento previo se observa el desarrollo de una zona necrotica en el lugar en el que se inocularon las esporas de *Monilinia fructicola*, a diferencia de los demás grupos, sobre todo al que se le inocularon esporas previo tratamiento con capsidiol, en donde no se observa el desarrollo de ningún síntoma.

ESTADO DE LOS FRUTOS AL QUINTO DÍA DE LA INOCULACIÓN DE ESPORAS

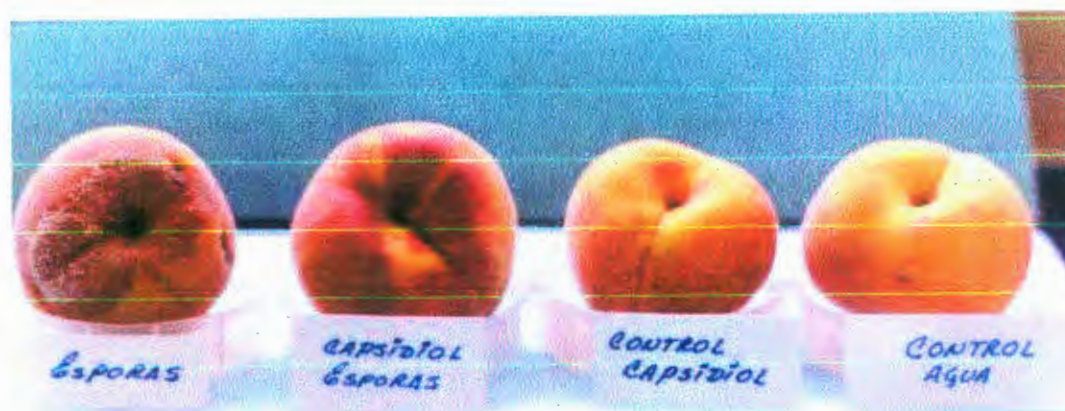


Figura 8. Estado de los frutos al quinto día de iniciado el bioensayo,. Se muestra un incremento en los síntomas en los frutos que fueron inoculados con esporas de *Monilinia fructicola*. En comparación con frutos que también fueron inoculados pero previamente fueron sometidos en la solución de capsidiol. Además, se hace visible la aparición de cuerpos fructíferos sobre la superficie del fruto infectado que son característicos de este hongo.

ESTADO DE LOS FRUTOS AL OCTAVO DÍA DE LA INOCULACIÓN DE ESPORAS



Figura 9. Resultados visuales del bioensayo al octavo día. Los frutos inoculados con esporas presentan un desarrollo total sobre la superficie de los frutos, en donde se observan una gran cantidad de cuerpos fructíferos del hongo *Monilinia fructicola*. A diferencia del grupo que recibió tratamiento previo con capsidiol, en el cual se observa una inhibición del desarrollo de la enfermedad, como es de esperarse los demás grupos no presentan ningún síntoma o daño fisiológico.

ESTADO DE LOS FRUTOS INFECTADOS AL DOCEAVO DÍA DEL EXPERIMENTO



Figura 10. Frutos infectados al doceavo día. En esta fotografía se puede observar el inicio de la momificación de los frutos lo cual, es una característica muy particular originada por el desarrollo de la enfermedad café o morena en frutos de durazno. Provocada por *Monilinia fruticola*. También se observan una gran cantidad de cuerpos fructíferos del hongo sobre la superficie de los frutos.

MOMIFICACIÓN DE LOS FRUTOS INFECTADOS



Figura 11. Frutos momificados. En esta fotografía se puede observar la momificación de los frutos de durazno provocada por *Monilinia fructicola*, donde existe una deshidratación total del fruto, y el desarrollo de una gran cantidad de cuerpos fructíferos sobre su superficie.

6.5. Determinación de variables

6.5.1. Cromatogramas.

En la Figura 12 se observan los cromatogramas obtenidos a partir de frutos infectados y de frutos que no presentaron síntomas de la enfermedad. El pico que corresponde al etileno en los frutos que presentaron la enfermedad, presenta una área mayor, a diferencia de los frutos que no presentaron síntomas. Además del pico de etileno, en los cromatogramas se encontraron otros dos picos que corresponden a compuestos volátiles denominados como “A” y “B”, los cuales presentan diferencias de alturas entre los frutos que desarrollaron los síntomas de enfermedad y los frutos que no la presentaron.

CROMATOGRAMAS DE LOS FRUTOS DE DURAZNO, TANTO INFECTADOS COMO SANOS

Cromatograma de fruto no infectado

Cromatograma de fruto infectado

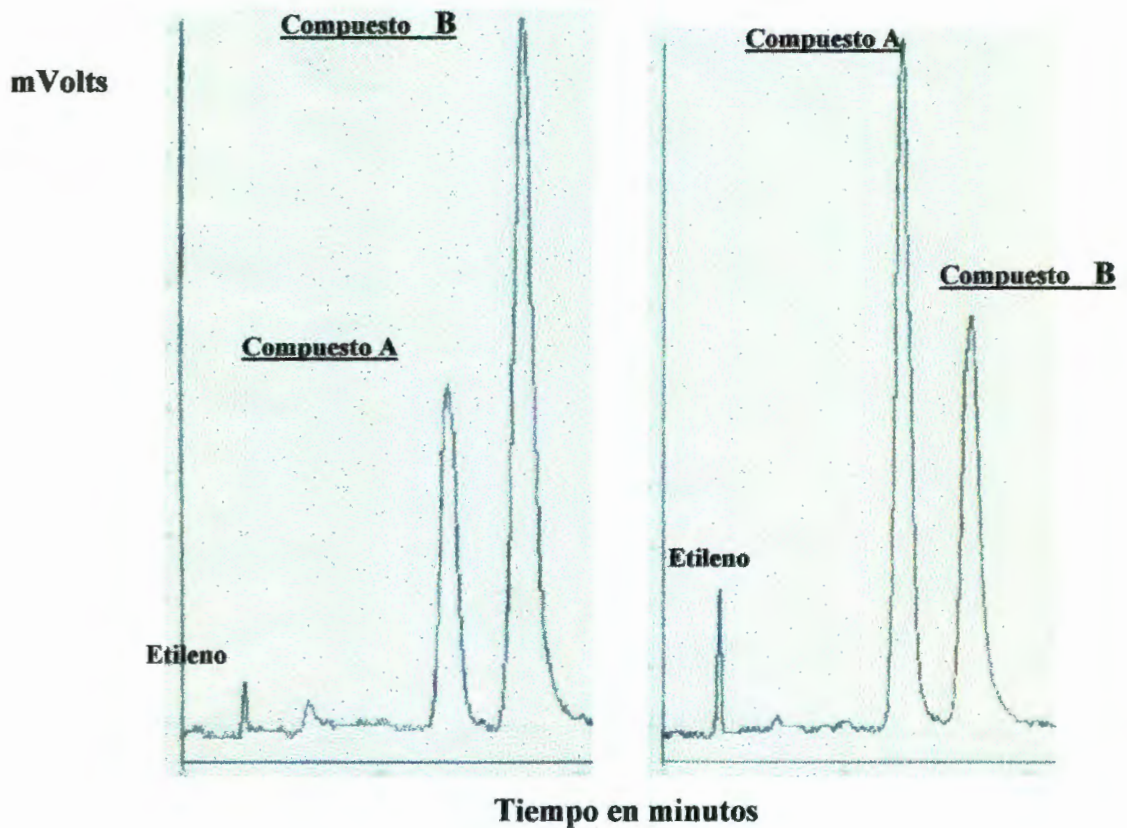


Figura 12. Cromatogramas de frutos infectados y no infectados. Se puede observar que el etileno se produce en mayor concentración en los frutos infectados, lo mismo que el compuesto volátil A, a diferencia del compuesto volátil B que se presenta en mayor concentración en frutos sanos.

6.5.1. Cuantificación de etileno.

La cuantificación de etileno se realizó por determinación de áreas bajo la curva de los cromatogramas, en relación con un estándar de etileno de concentración conocida. En la figura 13 y 14 se muestran las diferencias en cuanto a la producción de etileno de los diferentes bioensayos en frutos. Se puede ver gráficamente que el tratamiento al que pertenece a los frutos infectados presentó la mayor producción de etileno ha diferencia de los demás tratamientos.

GRÁFICA DE LA PRODUCCIÓN DE ETILENO PARA LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

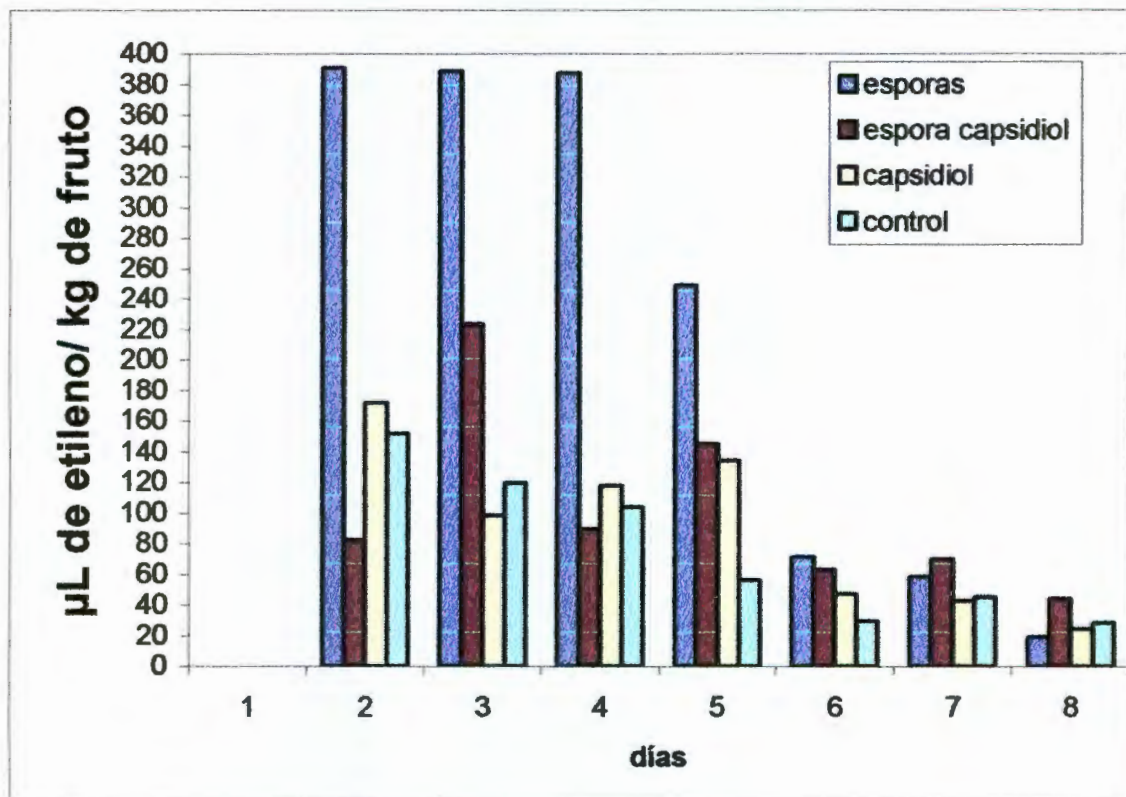


Figura 13. Gráfica de la producción de etileno, con respecto al tiempo de los cuatro grupos de bioensayos en frutos. Donde se observa una diferencia entre los frutos en los que hubo aparición de la enfermedad, la cual, corresponde el tratamiento 1; que son frutos a los que se les inoculo una concentración conocida de esporas, con los que no presentaron síntomas, entre los que se encuentran los tratamientos 2; que corresponde a los frutos que se sumergieron en la solución madre de capsidiol y posteriormente se les inoculo una concentración de esporas, tratamiento 3; al que pertenecen los frutos que solo se sumergieron en la solución madre de capsidiol, y el tratamiento 4; que son los frutos que se utilizaron como control. La diferencia en la producción de etileno es apreciable sobre todo en los primeros tres días del bioensayo.

Por otro lado en la tabla 2 se muestra el resultado estadístico de cada uno de los tratamientos en lo que se refiere a su media y su desviación estándar respectivamente, El análisis estadístico de la prueba *t-student* para muestras independientes se muestra en la tabla 3 en la cual se puede apreciar que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo 1 que esta representado por el tratamiento 1 con respecto al grupo 2 que esta representado por los tratamientos 2, 3 y 4, aplicando dicha prueba de comparación de medias con un nivel de significancia *p* menor o igual a 0.05. El resultado del análisis estadístico se puede apreciar de forma gráfica en la figura 14.

Cuadro 1. Parámetros estadísticos de cada una de los tratamientos con respecto la producción de etileno de los frutos de durazno

Tratamiento	Media (μL etileno/kg fruto)	Desviación estándar
Tratamiento 1	388.77	1.738
Tratamiento 2	131.82	79.59
Tratamiento 3	124.89	24.31
Tratamiento 4	129.29	37.91

Cuadro 2. Determinación de la diferencia estadística entre medias aplicando la prueba de *t-student* para muestras independientes con un nivel de significancia *p* menor o igual que 0.05, aplicado a la producción de etileno.

Tratamientos	Media Grupo 1	Media Grupo 2	Valor <i>t-student</i>	Grados de libertad	Nivel de significancia <i>p</i>
Tratamiento 1 vs Tratamiento 2	388.77	131.825	5.59	4	0.005
Tratamiento 1 vs Tratamiento 3	388.77	124.896	18.75	4	0.00004
Tratamiento 1 vs Tratamiento 4	388.77	129.290	11.84	4	0.0003

Nota: el grupo uno esta integrado por el tratamiento 1, y el grupo dos lo integran los tratamientos 2, 3 y 4.

GRAFICA DE LAS DIFERENCIAS ESTADISTICAS DE LA PRODUCCION DE ETILENO ENTRE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

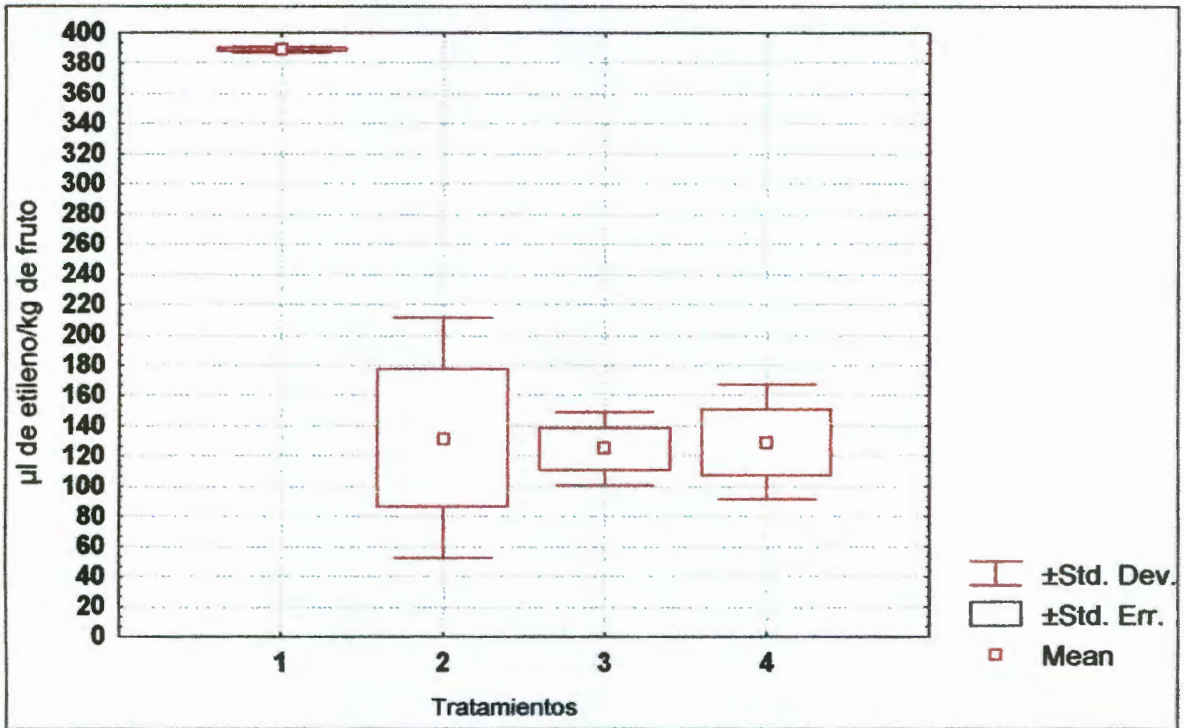


FIGURA 14. Gráfica que muestra las diferencias estadísticas de la producción de etileno entre los diferentes tratamientos: en esta gráfica se representan las diferencias estadísticas entre los frutos que presentaron síntomas (tratamiento 1; frutos con esporas), con los frutos en los que no se presentaron síntomas (tratamiento 2; frutos con esporas mas capsidiol, tratamiento 3; frutos con capsidiol, y tratamiento 4; frutos control). Para la obtención de las diferencias estadísticas se utilizo el paquete Statistica , mediante una comparación de medias de t-student para muestras independientes se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento 1 con los tratamientos 2, 3, y 4 a un nivel p de significancia menor o igual a 0.05.

6.5.2. Cuantificación del compuesto A.

Otras de las variantes que se obtuvieron durante la obtención de los cromatogramas, fue la producción de un compuesto designado personalmente como compuesto A. El compuesto A tubo una mayor concentración en el tratamiento que pertenecía a los frutos infectados con esporas, en los primeros cinco días del experimento su concentración fue elevada a comparación de los demás tratamientos, pero disminuyó considerablemente a partir del sexto día, inclusive alcanzando niveles más bajos los otros tratamientos. Lo cual se presenta de forma gráfica en la figura 15, en la cual se determina la concentración de este compuesto en milivolts por día del bioensayo.

**GRAFICA DE LA PRODUCCION DEL DENOMINADO COMPUESTO "A" PARA
LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS**

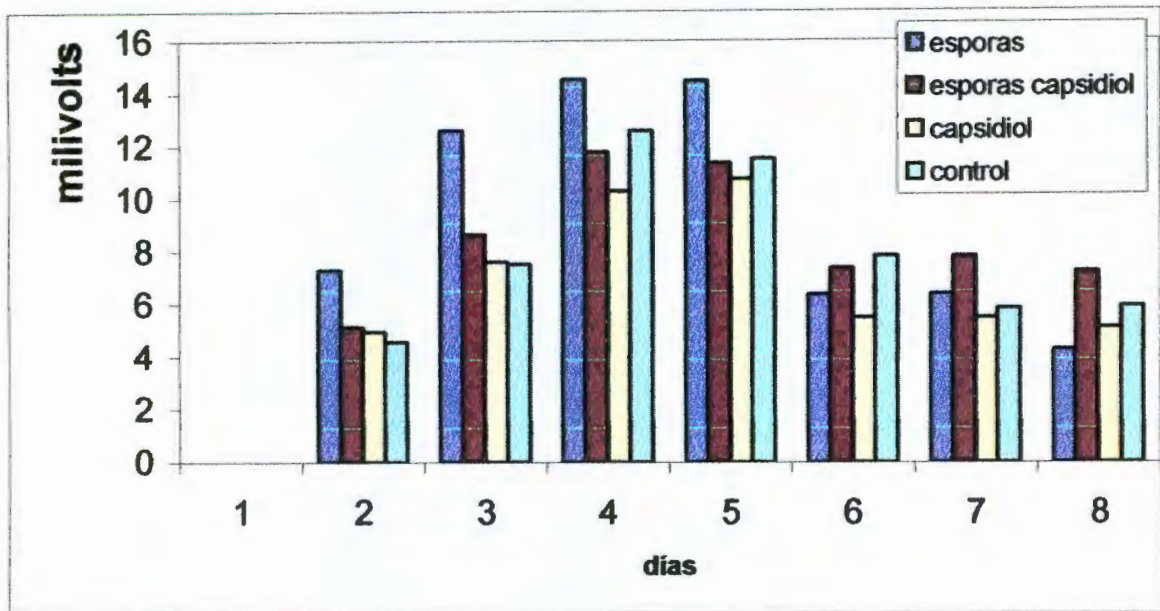


FIGURA 15. Gráfica de La producción del compuesto A para los diferentes tratamientos, en donde se puede observar una mayor concentración en los frutos que presentaron infección, tratamiento 1; que son frutos a los que se les inoculo una concentración conocida de esporas, a diferencia con los que no presentaron desarrollo de infección, entre los que se encuentran los tratamientos 2; que corresponde a los frutos que se sumergieron en la solución madre de capsidiol y posteriormente se les inoculo una concentración de esporas, tratamiento 3; al que pertenecen los frutos que solo se sumergieron en la solución madre de capsidiol, y el tratamiento 4; que son los frutos que se utilizaron como control. Todos los grupos presentan una producción máxima entre el cuarto y quinto día del bioensayo, pero se aprecia una mayor producción en los frutos que desarrollaron síntomas de la enfermedad.

Se realizó un estudio estadístico con la finalidad de encontrar diferencias estadísticas entre los diversos tratamientos. En la tabla 4 que muestran los parámetros estadísticos como son; la media y la desviación estándar de cada uno de los tratamientos, dados por la cuantificación del compuesto A en milivolts por kg de fruto. Además en la tabla 5 se muestra un análisis estadístico en el cual se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento 1 con los demás tratamientos, aplicando la prueba de comparación de medias de *t*-student para muestras independientes y con un nivel de significancia *p* menor o igual a 0.05. En la figura 16 se puede observar gráficamente las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Cuadro 3. Determinación de los parámetros estadísticos para la cuantificación del compuesto A.

Tratamiento	Media (milivolts)	Desviación estándar
Tratamiento 1	13.88	1.09
Tratamiento 2	10.59	1.70
Tratamiento 3	9.55	1.70
Tratamiento 4	10.34	1.61

Cuadro 4. Análisis estadístico mediante la prueba de comparación de medias de *t*-student para muestras independientes con un nivel de significancia *p* menor o igual a 0.05, para la cuantificación del compuesto A.

Tratamientos	Media del Grupo 1	Media del Grupo 2	Valor <i>t</i> -student	Grados de Libertad	Nivel de significancia <i>p</i>
Tratamiento 1 vs. Tratamiento 2	13.88	10.59	2.81	4	0.048
Tratamiento 1 vs. Tratamiento 3	13.88	9.55	3.70	4	0.021
Tratamiento 1 vs. Tratamiento 4	13.88	10.34	3.14	4	0.035

Nota: El grupo 1 comprende al tratamiento 1; y el grupo 2 comprende a los tratamientos 2, 3 y 4.

**GRAFICA DE LAS DIFERENCIAS ESTADISTICAS DE LA PRODUCCION DEL
DENOMINADO COMPUESTO "A" ENTRE LOS DIFERENTES
TRATAMIENTOS**

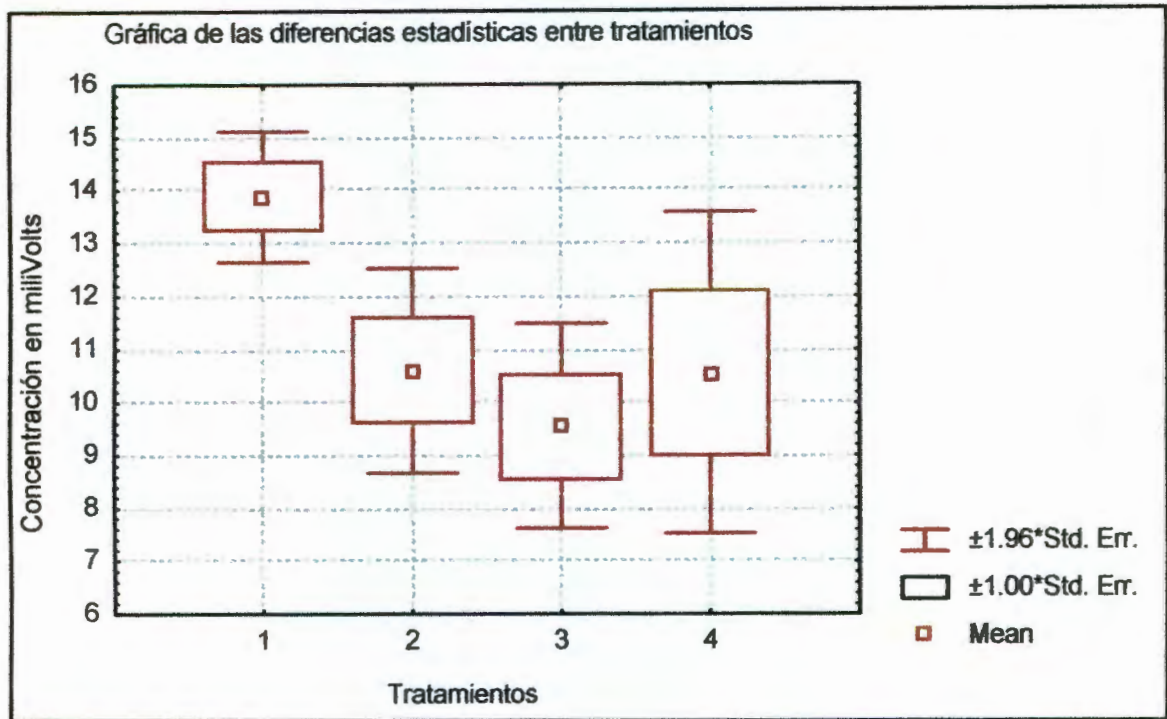


Figura 16. En esta gráfica se muestra las diferencias estadísticas en cuanto a la producción del compuesto A: el tratamiento 1 corresponde a los frutos que fueron inoculados con esporas; el tratamiento 2 corresponde a los frutos que fueron inoculados con esporas previo sumergimiento en la solución de capsidiol; el tratamiento 3 son los frutos que solo se sumergieron en capsidiol y el tratamiento 4 son los frutos control. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas aplicando la prueba estadística *t-student* para muestras independientes de acuerdo a la comparación de cada una de las medias, del tratamiento 1 con respecto a los demás tratamientos con un nivel de significancia *p* menor de 0.05.

6.5.3. Cuantificación del compuesto B.

El análisis de la producción del compuesto B se derivó del resultado de los cromatogramas durante el bioensayo con los frutos de durazno. En la figura 17 se muestra gráficamente las diferencias en cuanto a la producción de este compuesto, en donde se observa una mayor concentración en los tratamientos en los que los frutos no desarrollaron los síntomas de la enfermedad sobre todo en el cuarto y quinto día del bioensayo.

**GRAFICA DE LA PRODUCCIÓN DEL DENOMINADO COMPUESTO “B” PARA
LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS**

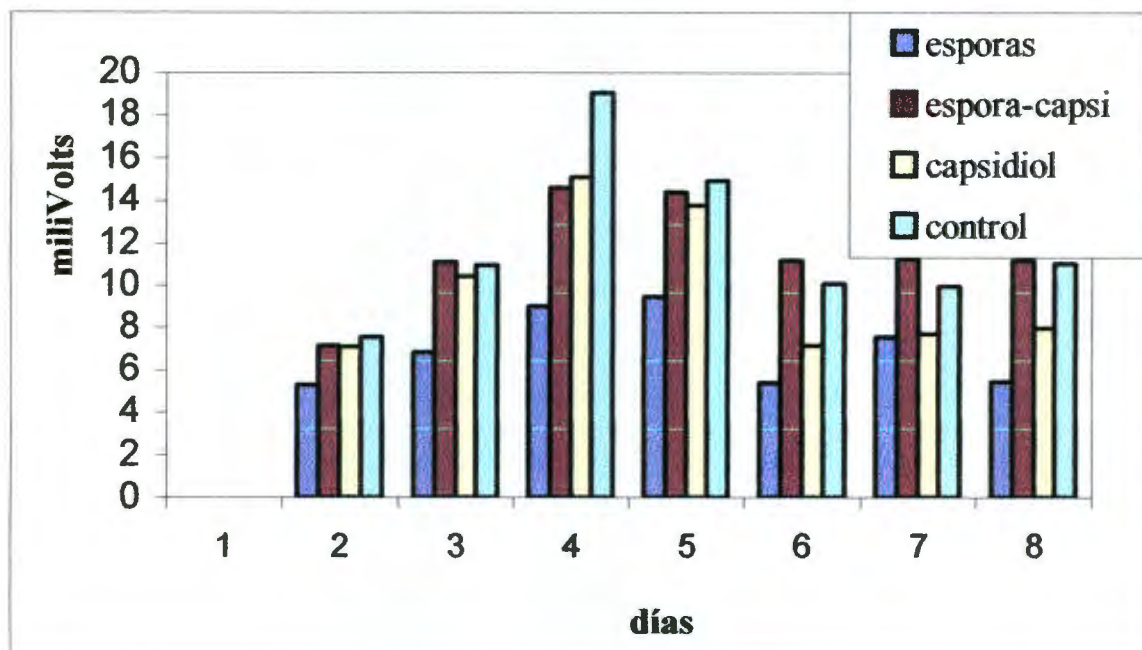


FIG. 17. Gráfica de la concentración del compuesto B para los diferentes tratamientos en donde se observan diferencias en cuanto a su producción entre los frutos infectados tratamiento 1; que son frutos a los que se les inoculo una concentración conocida de esporas, con los que no presentaron síntomas y los frutos que no presentaron síntomas, entre los que se encuentran los tratamientos 2; que corresponde a los frutos que se sumergieron en la solución madre de capsidiol y posteriormente se les inoculo una concentración de esporas, tratamiento 3; al que pertenecen los frutos que solo se sumergieron en la solución madre de capsidiol, y el tratamiento 4; que son los frutos que se utilizaron como control.. Es posible observar que la mayor producción se presento entre los días 4 y 5 del bioensayo y que posteriormente decreció para todos los tratamientos

Para tratar de encontrar diferencias estadísticas se obtuvieron los parámetros estadísticos como son la media y la desviación estándar de cada uno de los tratamientos respectivamente que se muestran en la tabla 6. Para determinar si existían tales diferencias se aplicó la prueba de *t-student* para muestras independientes con un nivel de significancia *p* menor o igual a 0.05, haciendo un comparativo de medias entre el grupo 1 al que correspondía el tratamiento 1 con respecto al grupo 2 integrado por los tratamientos 2, 3 y 4, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa mediante la aplicación de esta prueba, lo cual se puede apreciar en la tabla 7.

Cuadro 5. Determinación de los parámetros estadísticos para la cuantificación del compuesto B.

Tratamiento	Media (milivolts)	Desviación estándar
Tratamiento 1	6.85	1.94
Tratamiento 2	10.96	3.74
Tratamiento 3	10.90	4.03
Tratamiento 4	12.52	5.91

Cuadro 6. Análisis estadístico mediante la prueba de comparación de medias de *t-student* para muestras independientes con un nivel de significancia *p* menor o igual a 0.05, para la cuantificación del compuesto B.

Tratamientos	Media del Grupo 1	Media del Grupo 2	Valor <i>t-student</i>	Grados de Libertad	Nivel de significancia <i>p</i>
Tratamiento 1 vs. Tratamiento 2	6.85	10.96	-1.69	4	0.17
Tratamiento 1 vs. Tratamiento 3	6.85	10.90	-1.56	4	0.19
Tratamiento 1 vs. Tratamiento 4	6.85	12.52	-1.58	4	0.19

Nota: El grupo 1 corresponde al tratamiento 1, y el grupo 2 lo integran los tratamientos 2, 3 y 4.

**GRAFICA DE LAS DIFERENCIAS ESTADISTICAS DE LA PRODUCCION DEL
DENOMINADO COMPUESTO "B" ENTRE LOS DIFERENTES
TRATAMIENTOS**

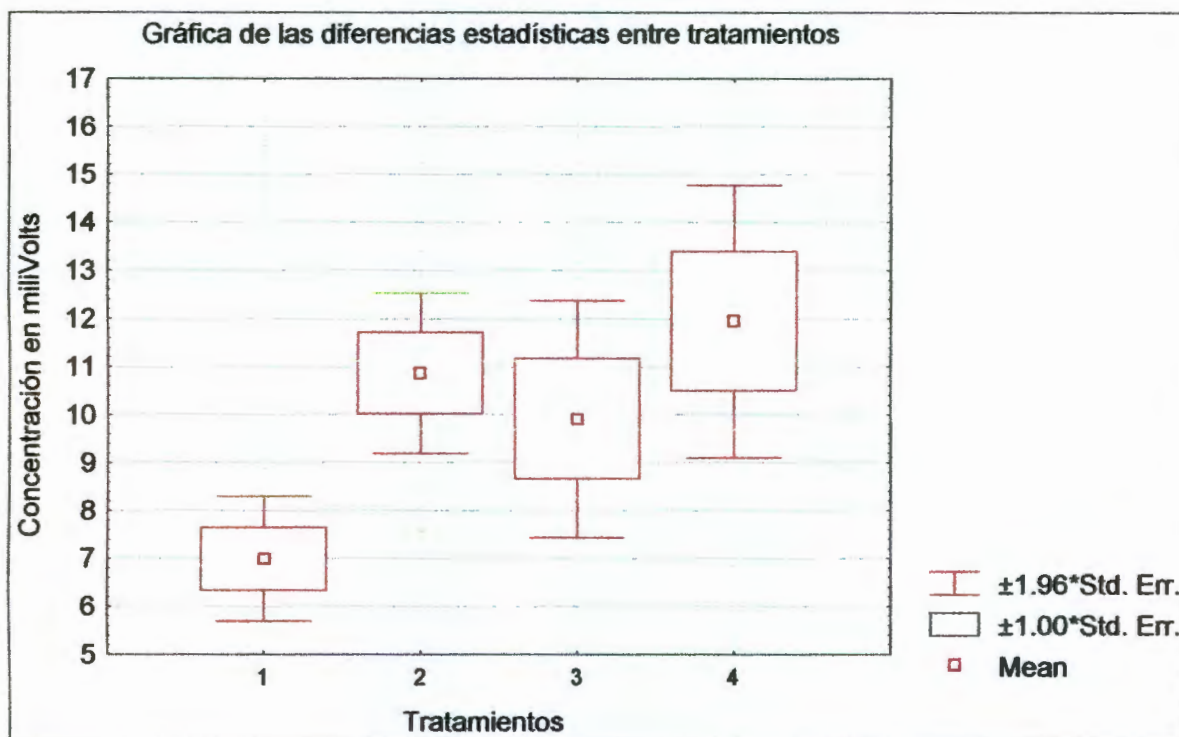


Figura 18. Gráfica de diferencias estadísticas en la producción del compuesto B. En esta gráfica se muestran las diferencias obtenidas en la producción del compuesto denominado como B para los diferentes tratamientos, a los cuales corresponden: tratamiento 1 frutos inoculados con esporas; tratamiento 2 frutos inoculados con esporas previo tratamiento con solución de capsidiol; tratamiento 3 frutos sumergidos en solución de capsidiol y tratamiento 4 frutos control. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas aplicando la prueba estadística *t-student* para muestras independientes de acuerdo a la comparación de cada una de las medias, del tratamiento 1 con respecto a los de los demás tratamientos con un nivel de significancia *p* menor o igual a 0.05.

6.6. Cuantificación de azúcares solubles.

Otro parámetro importante fue la determinación de azúcares solubles, se cuantifico tanto en frutos que presentan síntomas los cuales pertenecían al tratamiento 1 como en los que no presentaron que comprendían a los tratamientos 2, 3, y 4. Según se muestra en la figura 19 se puede apreciar que existe una disminución de la concentración de estos azúcares en los frutos que presentaron síntomas de la enfermedad tanto en las zonas cercanas al crecimiento del hongo así como en las partes mas lejanas del mismo, en comparación con los demás frutos de los otros tratamientos los cuales no presentaron los síntomas.

GRÁFICA DE CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES SOLUBLES, PARA LOS MUESTREOS EN ZONAS DIFERENTES PARA FRUTOS INFECTADOS Y EN FRUTOS SANOS

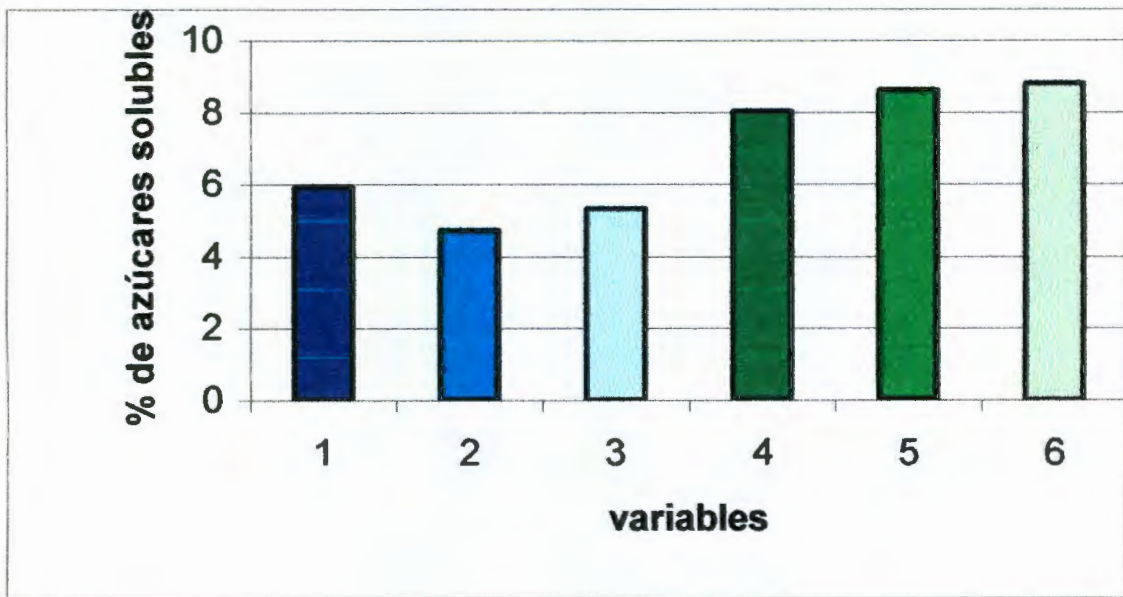


Figura 19. Esta gráfica corresponde a la determinación de azúcares solubles, en frutos infectados de diferentes partes de los que no presentaron síntomas (Tratamiento 1): variable 1: espora-frontera (corresponde al sitio donde existe crecimiento del hongo o sobre la superficie del fruto infectado); variable 2: frontera durazno (es la zona que se encuentra entre las fronteras del tejido que presenta síntomas y el tejido sin síntomas aparentes en los frutos infectados); variable 3: lejano-frontera (es el tejido sin síntomas aparentes que se encuentra lejos de la zona de infección en los frutos infectados). La variable 4 (Tratamiento 2): corresponde a los frutos inoculados con esporas previo tratamiento con capsidiol. La variable 5 (Tratamiento 3): corresponde a los frutos que solo se sumergieron en capsidiol. La variable 6 (Tratamiento 4): conforma los frutos que solo se sumergieron en agua destilada.

Para tratar de encontrar diferencias estadísticas significativas se determinaron los parámetros estadísticos de cada uno de los tratamientos, los cuales se muestran en la tabla 7. Se aplicó la prueba de comparación de medias t-student con un nivel de significancia p menor o igual que 0.05, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el grupo 1 al que pertenecen al tratamiento 1 (variables 1, 2 y 3) y el grupo 2 integrado por los tratamientos 2, 3, 4 (variables 4, 5 y 6 respectivamente), dichos resultados se muestran en la tabla 8. En la figura 20 se puede apreciar las diferencias estadísticas de forma gráfica entre cada uno de los tratamientos.

Cuadro 7. Determinación de los parámetros estadísticos para la cuantificación de azúcares solubles.

Variable	Media (% de azúcares solubles)	Desviación estándar
Variable 1	5.90	0.30
Variable 2	4.72	0.61
Variable 3	5.30	0.44
Variable 4	8.02	0.23
Variable 5	8.60	1.19
Variable 6	9.12	1.04

Nota: El tratamiento uno se dividió en tres variables (variable 1, variable 2 y variable 3), a los tratamientos 2, 3 y 4 sólo se les asignó las variables consecutivas (variable 4, variable 5 y variable 6) respectivamente. Con la finalidad de asignar las mismas variables que en la figura 19.

Cuadro 8. Análisis estadístico mediante la prueba de comparación de medias de *t-student* para muestras independientes con un nivel de significancia *p* menor o igual a 0.05, para la cuantificación de azúcares solubles.

Variables	Medias Grupo 1	Medias Grupo 2	Valor <i>t-studen</i>	Grados de Libertad	Nivel de significancia <i>p</i>
Variable 1 vs. Variable 4	5.90	8.02	-9.68	4	0.001
Variable 1 vs. Variable 5	5.90	8.60	-4.32	4	0.012
Variable 1 vs. Variable 6	5.90	9.12	-2.97	4	0.041
Variable 2 vs. Variable 4	4.72	8.02	-8.85	4	0.001
Variable 2 vs. Variable 5	4.72	8.60	-5.59	4	0.005
Variable 2 vs. Variable 6	4.72	9.12	-3.92	4	0.017
Variable 3 vs. Variable 4	5.30	8.02	-9.59	4	0.001
Variable 3 vs. Variable 5	5.30	8.60	-5.07	4	0.007
Variable 3 vs. Variable 6	5.30	9.12	-3.48	4	0.025

Nota: El grupo uno contiene las medias de las variables 1, 2 y 3 (Tratamiento 1), y el grupo 2 lo integran las medias de las variables 4 (Tratamiento 2), 5 (Tratamiento 3) y 6 (Tratamiento 4).

GRAFICA DE LAS DIFERENCIAS ESTADISTICAS DE LA CONCENTRACION DE AZUCARES SOLUBLES, PARA LOS MUESTREOS EN ZONAS DIFERENTES PARA FRUTOS INFECTADOS Y EN FRUTOS SANOS

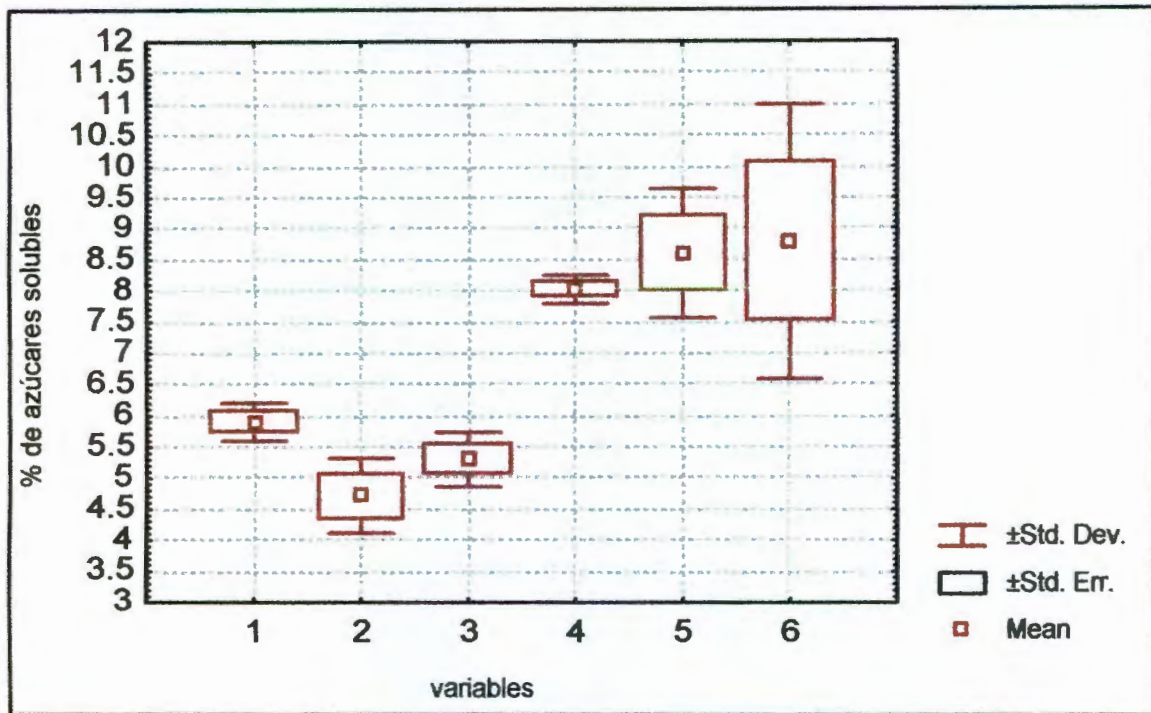


Figura 20. Gráfica que muestra las diferencias estadísticas entre los tratamientos en cuanto al contenido de azúcares solubles. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas aplicando la prueba de comparación de medias *t-student* para muestras independientes y con un nivel de significancia *p* menor o igual a 0.05, donde se encontró que las variables 1, 2 y 3 (grupo 1: frontera-espora, grupo2: frontera-durazno, y grupo 3: lejano-frontera) que corresponden a frutos infectados (Tratamiento 1), tienen diferencias estadísticamente significativas con las variables 4 (Tratamiento 2), 5 (Tratamiento 3), y 6 (Tratamiento 4) que corresponden a frutos que no presentaron síntomas.

VII. DISCUSIONES.

En las plantas de chile y tabaco que pertenecen a las familias de las solanaceas se produce una fitoalexina sesquiterpénica, llamada capsidiol (Chappell, 1992; Kuc, 1995). Se han desarrollado diversas metodologías para su inducción, purificación y cuantificación (Brooks, 1986; Egea 1996; García-Pérez, 1998). Aunque se han reportado varios métodos, aun no es posible obtener grandes cantidades de esta fitoalexina, en nuestro caso el uso de los cartuchos de Rezorian nos facilitó su purificación debido a que se retenían los pigmentos más hidrofóbicos y esto nos permitió posteriormente obtener el capsidiol por raspado de bandas con menos dificultad, y así poder cuantificarlo. Para preparar la solución madre para los bioensayos, no se realizaron todos los pasos de purificación, únicamente se realizó una extracción con cloroformo, esto con el fin de tener la mayor concentración de capsidiol en la solución de aplicación para los frutos. La concentración que se mencionó en la metodología, se obtuvo del rendimiento de capsidiol a partir de frutos de chile y después de su purificación, por lo que es posible que la cantidad que se encontraba en la solución madre sea un poco mayor.

Algunos investigadores reportaron que el capsidiol presenta efectos inhibitorios sobre algunos hongos fitopatógenos (Egea, 1996, Moreno, 1996), también se ha encontrado que el capsidiol a una concentración de 3.75 mM es fungiestático y a 5 mM es fungitóxico para el caso de *Phytophthora capsici* el cual es el causante de la marchitez del chile (*Capsicum annuum*), estos datos fueron reportados por Egea (1996), para el experimento se utilizó una solución con una concentración aproximada de capsidiol de 0.66 mM, la cual es mucho menor que la utilizada por el autor.

La capacidad del capsidiol para inhibir el desarrollo de *Monilinia fructicola* in vitro ha sido, reportada por Moreno (1992). En el experimento realizado se probaron los efectos del capsidiol como un agente fungitóxico o al menos fungistático sobre la cepa aislada de *Monilinia fructicola*, tanto in vitro como en frutos de durazno, se demostró que efectivamente, esta fitoalexina, presentó un efecto inhibitorio en el crecimiento del hongo y en el desarrollo de la enfermedad, como se puede ver claramente en las figuras 4, 5, 6 y 7. En los frutos pertenecientes al tratamiento 1 (frutos inoculados con esporas sin tratamiento previo con capsidiol), se presentaron síntomas de enfermedad, llegando hasta un estado de momificación que es una característica típica de la pudrición café o morena que provoca *M fructicola* en frutos de durazno como lo describen algunos autores (Agrios, 1986; Watt,

1994; Hong, 1997), así como también lo demuestra la micrografía del hongo aislado. Lo que nos indica que *Monilinia fructicola* no tiene la capacidad de detoxificar al capsidiol que se encuentra impregnado en los frutos y es un limitante para su desarrollo, lo cual lo convierte en un hongo que es susceptible a la presencia de capsidiol si se compara con la capacidad que tiene *P. capsici* de detoxificar al capsidiol.

Otro factor determinante entre los frutos que desarrollaron la enfermedad, en contraste con los frutos sanos fue la diferencia en la producción de etileno, la producción de este compuesto en los frutos infectados fue hasta dos veces mayor que la de los frutos que no desarrollaron la enfermedad, aunque existe mucha controversia en cuanto al papel que juega el etileno en la respuesta de las plantas al ataque de patógenos (Goodman et al, 1986; Biale, 1990; Dixon, 1990; Pannell, 1997), existe una pequeña evidencia de que la síntesis de etileno induce la expresión de los genes de defensa, aunque parece ser más un síntoma que una señal (Dixon, 1990), se ha reportado que la producción de etileno para frutos de durazno va desde 10 hasta 100 $\mu\text{l}/\text{kg}\cdot\text{hr}$ de fruto, en el pico climatérico (Looney et al, 1974; Rader, 1992; Brady, 1993), estos datos se obtienen mediante la maceración del tejido de los frutos. En nuestro caso para cuantificar la producción de etileno, se determino de los gases que se encontraban dentro de el vaso y no del tejido de los frutos, por lo que la diferencia que se encuentran entre los determinaciones hechas en el bionsayo y los reportes de la bibliografía de la producción de etileno, varían por lo antes mencionado. Solo cabe destacar que la intención era determinar las diferencias en cuanto a la producción de etileno entre los frutos sanos y los frutos que desarrollaron la enfermedad, encontrándose que la diferencia entre la producción de etileno de los frutos enfermos respecto a los sanos fue muy amplia en los primeros días del experimento, que es cuando solo una parte del fruto presentaba síntomas característicos de la enfermedad, pero a medida que la enfermedad se desarrolló la producción de etileno decreció en forma dramática, hasta llegar a valores más bajos que los frutos que no desarrollaron la enfermedad. Mediante un análisis estadístico se pudo determinar que existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la producción de etileno entre los frutos sanos (Tratamiento 2, 3 y 4) y los frutos que desarrollaron la enfermedad (Tratamiento 1), para lo cual se hicieron comparaciones de medias de aplicando la prueba de *t-student* para muestras independientes con un nivel de significancia *p* menor o igual a 0.05. Esta prueba nos ayuda a determinar diferencias estadísticas entre tratamientos cuando se cuanta con un número de muestras limitado.

Otro dato importante fue la producción de los compuestos denominados “A” y “B”, posiblemente estos compuestos que fueron encontrados en el gas muestreado, corresponden a compuestos que son responsables del sabor y del aroma de los frutos de durazno dentro de los que se encuentran las lactonas (Romani y Jennings, 1971; Molina, 1973; Takeoka, 1988; Brady 1993), y principalmente beta y gama decalactonas (Chapman, 1991; Molto, 1999) es un dato importante sobre los cambios metabólicos que ocurren cuando se desarrolla la enfermedad, en los frutos infectados, se observó una mayor producción del compuesto A con respecto al compuesto B, y al igual que el etileno disminuyó su concentración cuando el desarrollo del hongo fue casi total sobre la superficie del fruto, lo cual ocurrió a partir del sexto día del experimento. Por otro lado al hacer un análisis estadístico de la producción del compuesto A se encontraron diferencias estadísticamente significativas, al hacer la comparación de medias aplicando misma prueba estadística que para la cuantificación de etileno entre el tratamiento 1 con respecto a los tratamientos 2, 3 y 4. Sin embargo no fue posible encontrar diferencias estadísticas entre los tratamientos al aplicar la misma prueba estadística de t-student, para la cuantificación del compuesto B, pero si se observan algunas diferencias en cuanto a su producción sobre todo en los días 3 y 5 del bioensayo, tal como se puede observar en la figura 19. La producción de estos dos compuestos nos indica que probablemente ocurran cambios a nivel molecular provocados por la presencia del hongo, en cuanto a la activación y apagado de los genes involucrados en su síntesis.

La concentración de sólidos solubles en durazno que han alcanzado su madurez fisiológica es del 10%, de los cuales del 65 al 80% son azúcares (Brady, 1993) La presencia de azúcares solubles en los frutos enfermos es un dato de mucha importancia, al parecer el desarrollo del hongo propició una disminución de azúcares solubles, siendo que se esperaba que la concentración de estos fuese mayor por el proceso de degradación del hongo sobre las células del fruto, no solo las partes cercanas al punto donde se desarrolló la enfermedad presentaron una disminución de azúcares con respecto a los frutos sanos, sino también las partes lejanas de la zona de infección. Por lo que es posible suponer que la presencia del hongo induzca a las células del fruto a consumir la mayor cantidad de nutrientes, para tratar de limitar el avance de la enfermedad. Al realizar un análisis estadístico aplicando la misma prueba que en los casos anteriores, se encontró que existen diferencias estadísticamente significativos entre el tratamiento 1 con respecto a los demás tratamientos.

VIII. CONCLUSIONES

1. El uso de cartuchos de Rezorian, facilita el proceso de purificación del capsidiol, disminuyendo en gran medida el uso de reactivos y trabajo de laboratorio, además de disminuir las pérdidas de capsidiol por el raspado de bandas.
2. Se ha demostrado que existe un grado de susceptibilidad de *Monilinia fructicola* al capsidiol in vitro, el cual inhibe su crecimiento.
3. El capsidiol actúa como fungicida sobre *Monilinia fructicola*, inhibiendo la pudrición café provocada por este hongo en frutos de durazno.
4. La síntesis de etileno se incrementa en los frutos infectados, el cual nos sirve como un indicativo de las diferencias metabólicas que se llevan a cabo entre los frutos infectados y los que no presentaron síntomas.
5. Al igual que lo que sucedió con el etileno, las diferencias en cuanto a la síntesis de los compuestos denominados como A y B, nos proveen información sobre los cambios metabólicos que ocurren en los frutos cuando estos son atacados por patógenos, en este caso por el hongo *M. fructicola*.
6. En los frutos infectados se encontró una disminución de azúcares reductores, principalmente en la frontera entre el desarrollo del hongo y el tejido sano, a diferencia de los frutos que no presentaron los síntomas de la enfermedad, lo que nos da un indicativo de las diferencias metabólicas entre los frutos sanos y los frutos infectados.

IX. IMPORTANCIA DE LOS NUEVOS HALLAZGOS Y SUS APLICACIONES

Se comprobó que el capsidiol tiene propiedades fungitóxicas sobre *Monilinia fructicola* y es capaz de inhibir su crecimiento in vitro, así como en frutos de durazno, no permitiendo el desarrollo de la pudrición café o morena, la cual ocasiona grandes pérdidas económicas a los productores de este cultivo, sobretodo en regiones como el municipio de Sombrerete Zacatecas, en donde la producción de durazno es prácticamente su única fuente de ingreso. Si las condiciones del clima son favorables para el desarrollo de esta enfermedad, puede llegar a destruir toda la cosecha, ya que su ciclo biológico, le permite atacar desde las inflorescencias hasta los frutos una vez cosechados disminuyendo su vida de anaquel. Con los resultados obtenidos se demostró que el capsidiol es capaz de proteger a los frutos contra la pudrición café, lo que ayudaría a mantenerlos por un tiempo más prolongado en su forma natural, a un costo razonable y accesible para el consumidor. En el caso de los frutos algunas normas oficiales no permiten el uso de fungicidas previo a la cosecha, debido a que son de origen sintético y su uso indiscriminado puede llegar a ocasionar problemas de salud en la población. En el caso del capsidiol no existe tal problema, por ser de origen natural. Los fungicidas que actualmente se utilizan para la protección de los plantíos y de las cosechas se les ha considerado como una fuente de contaminación tanto para la flora microbiana del suelo como para el medio ambiente, ocasionando problemas de salud en la población rural que se expone por tiempos prolongados al compuesto. En el caso del capsidiol, se ha demostrado en laboratorio que hongos saprófitos, que son benéficos para el suelo, son capaces de degradarlo. Este trabajo puede servir de base para la utilización del capsidiol en el campo y su uso podría ampliarse a otros cultivos, en los que frecuentemente su producción se ve mermada por el ataque de hongos fitopatógenos, como es el caso del cultivo de la papa, ajo, cereales, leguminosas entre otros.

X. BIBLIOGRAFIA

- Agrios GN. 1986. *Fitología*. Editorial Limusa. México, pag. 348-353
- Anderson MS, Muehlbacher M, Street IP, Proffit J, Poulter CD. 1989. Isopentenyl diphosphate: dimethylallyl diphosphate isomerase: an improved purification of the enzyme and isolation of the gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 264:19169-75.
- Apostol I, Heinstein PF, Low PS. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of culture plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiol.* 90:109-16.
- Bailey BA, Dean JFD and Anderson JD. 1990. An Ethylene Biosynthesis-Inducing Endoxylanase Elicits Electrolyte Leakage and Necrosis in *Nicotiana tabacum* cv Xanthi Leaves. *Plant Physiol.* 94: 1849-1854.
- Bailey JA and Mansfield, JW(eds.). 1982. *Phytoalexins.*, J.W. Wiley, N.Y., 334 p
- Bartley GE, Scolnik PA. 1994. Molecular biology of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:287-301.
- Benveniste P. 1986. Sterol biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:275-308.
- Boller T. 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 46:189-214.
- Bostock RM, Wilcox SM, Wang G. 1999. Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit phenolics acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 54:37-50.
- Bracker CE, Littlefield LJ. 1973. Structural concepts of the host-pathogen interfaces. En: *Fungal pathogenicity and the plant's response*. Byrde RJW, Cutting CV (eds.) Academic Press, London, and New York, pp. 159.
- Brady CJ. 1993. Stone fruit. En Seymour, et al (editores), *Biochemistry of fruit ripening*. Published by Chapman y Hall, London. Pag. 379.
- Brooks CJW, Watson DG, and Freer IM. 1986. Elicitation of capsidiol accumulation in suspended callus cultures of *Capsicum annuum*. *Phytochem.* 25:1089-1092.

- Brushnell WR, Bergquist SE. 1975. Aggregation of host cytoplasm and the formation of papillae in haustoria in powdery mildew of barley. *Phytopathology*. 65: 310-18.
- Chapell J and Facchini PJ. 1992. Gene Family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(22):11088-92.
- Chapell J. 1995. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 46:521-47.
- Chapman G, Morvant R, Forbus W. 1991. Physical and chemical changes during of maturation of peaches. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 39:867-870.
- Choi D, Ward BL and Bostock RM. 1992. Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *The Plant Cell*. 4:1333-44.
- Cohen JJ. 1993. Apoptosis. *Immunol. Today*. 14:126-130.
- Davis KR, Hahlbrock K. 1987. Induction of defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments. *Plant Physiol*. 85:1286-90.
- Darvill AG, Albersheim P. 1984. Phytoalexins and their elicitors a defense against microbial infections of plants. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 35: 243-75.
- Dixon RA and Lamb CJ, 1990, Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:339-67.
- Dogbo O, Laferrière A, D'Harlingue A, Camara B. 1988. Carotenoid biosynthesis: isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA*. 85:7054-58.
- Doke N, Garas NA, Kuc'J. 1979. Partial characterization and aspects of the mode of action of a hypersensitivity-inducing factor (HIF) from *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol*. 15:127-40.
- Edwards HH, Allen PJ. 1970. A fine-structure study of the primary infection process during infection of barley of barley by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Phytopathology* 60:1504-9.
- Egea C, Alcizar MD and Candela ME. 1996. Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Plant*. 98: 737-42.

- Ehrhardt DW, Atkinson EM, Long SR. 1992. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* 256:998-1000.
- Ersek T, Barna B and Király Z. 1973. Hypersensitivity and the resistance of potato tuber tissues to *Phytophthora infestans*. *Acta Phytopath. Hung.* 8:3-12.
- Felix G, Grosskopf DG, Regenass M, Bolter T. 1991. Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:8831-34.
- Felix G, Regenass M, Bolter T. 1993. Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells. Induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant J.* 4:307-16.
- Fisher RL, Bennett AB. 1991. Role of Cell Wall Hydrolases In Fruit Ripening. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42:675-703.
- Fraser RSS. 1990. Genes for resistance to plant viruses. *CCR Citr. Rev. Plant Sci.* 3:257-94.
- García-Pérez MA, Egea C and Candela ME. 1998. Defense response of pepper (*Capsicum annuum*) Suspension cells to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Plant.* 103:527-533.
- Gibson RW, Pickett JA. 1983. Wild potato repels aphids by release of aphid alarm pheromone. *Nature.* 302:608-9.
- Goldstein JL, Brown MS. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 343:425-30.
- Goodman RN, Király Z and Wood KR. 1986. The biochemistry and physiology of plant disease. University of Missouri Press. Columbia.
- Graham MY, Graham TL. 1994. Wound-associated competency factors are required for the proximal cell responses of soybean to the *Phytophthora sojae* well glucan elicitor. *Plant Physiol.* 105:571-78.
- Gray JC. 1987. Control of isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Adv. Bot. Res.* 14:25-91.

- Gundlach H, Muller MJ, Kutchman TM, Zenk MH. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:2389-93.
- Hong CX, Michailides TJ and Holtz BA. 1997. Potencial of sporulation of nectarine fruit infected and mummified by *Monilinia fructicola*. *Phytopathology.* 87:S43.
- Horsfall JG, Ellis BC. 1978. *Plant Disease An Advanced Treatise.* Vol. II. Ed. ACADEMIC PRESS. U.S.A. pp. 375.
- Huber L, Gillespie TJ. 1992. Modeling Leaf Wetness In Relation To Plant Disease Epidemiology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:553-77.
- INEGI. 1998. Cultivos Perennes de México. VII Censo Agropecuario. pp. 75-80.
- Jakobek JL, Smith JA, Lindgren PB. 1993. Suppression of bean defense responses by *Pseudomonas syringea*. *Plant Cell.* 5:57-63.
- Kotoujansky A. 1987. Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot erwinias. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25:405-30.
- Kúc J. 1995. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 275- 297.
- Lamb CJ, Lawton MA, Dron M and Dixon RA. 1989. Signal and Transduction Mechanisms for Activation of Plant Defenses against Microbial Attack. *Cell* 56: 215-224.
- Lennon SV, Martin CJ and Cotter TG. 1991. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Proliferation.* 24:203-214.
- Looney, N.E., McGlasson, W.E. and Goombe, B.G. (1974. Control of fruit ripening in peach *Prunus persica*: action of succinic acid-2, 2-dimethylhydrazide and (2-chloroethyl) phosphonic acid. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1, 77-86.
- Matta A. 1972. Microbial penetration and immunization of uncongential host plants. *Ann. Rev. Phytopath.* 9:387-410.
- McGarvey DJ, Croteau R. 1995. Terpenoid metabolism. *The Plant Cell.* 7:1015-26.
- Mendoza ZC. 1991. Resistencia bioquímica de plantas a hongos y bacterias. Ed. Dpto. de Parasitología, U.A.CH.
- Molina P, Soler A, Cambronero J. 1973. Componentes volátiles del aroma del melocoton (*Prunus persica*). *Anales de bromatología.* 25:403-410.

- Molto E, Selfa E, Ferriz J, Conesa E, Gutierrez A. 1999. An aroma sensor for assessing peach quality. *J. Agric. Engng Res.* 72:311-316.
- Moreno Hernández-Duque JL, Lizalde VH, Herrera Estrella L, Lozoya Gloria E. 1992. Estudio de la producción de fitoalexinas de la planta de chile (*Capsicum annum*) como mecanismo de defensa ante el ataque de patógenos. XIX Congreso Nac. de Fitop. Soc. Mex. de Fitop. pp: 168.
- Moreno Hernández-Duque JL, Gutiérrez R, Lozoya Gloria E. 1996. Efectos inhibitorios de capsidiol de chile sobre diferentes especies de hongos fitopatógenos. III Congreso Nacional de Biotecnología, U.A.CH.
- Nennsteil D, et al. (1996) Physical Stresses in Plants. Eds, Grillo, S. And Leone, A. Germany. pp. 261-270.
- Nicholson RL, Hammerschmidt R. 1992. Phenolics Compounds And Their Role In Disease Resistance, *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:369-389.
- Pennell RI and Lamb C. 1997. Programmed Cell Death in Plants. *The Plant Cell.* 9: 1157-68.
- Rader M, 1992, Ethylene in postharved technology. En Ros Kender A. A. (editor), Postharver technology of Horticultural crops. University California, Division agriculture and natural resources. Publicación 3311.
- Rhodes MJC. 1994. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Molecular Biology* 24: 1-20.
- Roberts DA, Boothrond CW. 1984. Fundamentals of plant pathology, 2nd ed. pp 28-31.
- Roby D, Broglie K, Cressman R, Biddle P, Chet I, Broglie R. 1990. Activation of a Bean Chitinase Promoter in Transgenic Tabacco Plants by Phytopathogenic Fungi. *The Plant Cell.* 2: 999-1007.
- Romani RJ, and Jennings WG. 1971. Stone fruits. In *Biochemistry of fruits and their products*, (ed A.C. Hulme), Academic Press, London, pag 441.
- Ryals J, Uknes S, Ward E. 1994. Systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 104:1109-12.
- Sargent JA, Tommerup IC, Ingram DS. 1973. The penetration of a susceptible letuce variaty by the downy mildew fungus *Bremia lactucae* Regel. *Physiol. Plant Path.* 3:231-39.

- Shaner G, Stromberg EL, Lacy GH, Baker KR, and Pirone TP. 1992. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annu. Rev. Phytopath.* 30:47-66.
- Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones DG. 1995. Molecular Genetics of Plant Disease Resistance. *Science.* 268:661-70.
- Stoessl A, Stothers JB, Ward EWB. 1976. Sesquiterpenoid stress compounds of the *solanaceae*. *Phytochemistry.* 15:855-73.
- Takeoka GR, et al. 1988. Nectarin volatiles: vacuum steam distillation versus head space sampling. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 36:553-560.
- Thai L, et al . 1999. Farnesol is utilized for isoprenoid biosynthesis in plant cells via farnesyl pyrophosphate formed by successive monophosphorilation reactions. *Biochemistry.* 96:13080-13085.
- Toyoda K, Shiraishi T, Yamada T, Ichinose Y, Oku H. 1993. Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism in pea in response to fungal signals. *Plant Cell Physiol.* 34:729-35.
- Vera-Estrella R, Higgins VJ, Blumwald E. 1994. Plant Defense Response to Fungal Pathogens. *Plant Physiol.* 106: 97-102.
- Volpin H, Elkind Y, Ojon Y, Kapulnik Y. 1994. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiol.* 104: 683-89.
- Watt BA, 1994. Brown Rot of Stone Fruits. *Plant Pathologist.* Spring, Maine.