



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO®

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC



**FRUCTANOS DE ALTO GRADO DE POLIMERIZACIÓN: SU PAPEL COMO  
INDUCTORES DEL SISTEMA DE DEFENSA EN AGUACATE *HASS* (*Persea  
americana*) Mill**

TESIS PROPUESTA A LA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

PRESENTA

**MÉDICO CIRUJANO ALINE MINERVA CASTAÑEDA ANDRADE**

DIRECTOR

**DRA. MARTINA ALEJANDRA CHACÓN LÓPEZ**

CO- DIRECTOR

**DRA. ROSA ISELA ORTIZ BASURTO**

Tepic, Nayarit

Agosto de 2021




"2021, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"


Tepic, Nayarit, **15/Octubre/2021**


**CONSEJO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**  
**No. Oficio CMCA: T17-2021**


**M.C. Luz del Carmen Romero Islas**  
**JEFE DE LA DIV. DE EST. DE POSG. E INV.**  
**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC**  
**PRESENTE**

Por este conducto comunico a usted que el Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos ha designado como revisores de la tesis del alumno **M.D. Aline Minerva Castañeda Andrade** con número de control **M19400005**, cuyo título es **"Fructanos de alto grado de polimerización: su papel como inductores del sistema de defensa en aguacate Hass (*Persea americana*) Mill"**, a los miembros que a continuación se enlistan, mismos que han evaluado y aprobado el contenido del manuscrito para obtener el grado de Maestro(a) en Ciencias en Alimentos y que firman de conformidad.

  
Dra. Martina Alejandra Chacón López  
(Presidente)

  
Dra. Rosa Isela Ortiz Basurto  
(Secretario)

  
Dr. Ulises Miguel López García  
(Vocal)

  
Dra. Selenie Aguilera Aguirre  
(Vocal suplente)

Por lo anterior, le solicito se sirva elaborar los oficios correspondientes para **AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE TESIS**. Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**Excelencia en Educación Tecnológica®**

  
**Dr. Jorge Alberto Sánchez Burgos**  
**Presidente del Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos**

c.c.p. Expediente





Instituto Tecnológico de Tepic

Tepic, Nayarit, 04/octubre/2021

No. Oficio: 25-598-2021

Asunto: Constancia Originalidad de Trabajo de Tesis

**A QUIEN CORRESPONDA:**

Por medio de la presente se CERTIFICA que una vez analizado mediante el uso del Software PLAGIARISM v. 1740, el trabajo de tesis "FRUCTANOS DE ALTO GRADO DE POLIMERIZACIÓN: SU PAPEL COMO INDUCTORES DEL SISTEMA DE DEFENSA EN AGUACATE HASS (Persea americana) Mill" para obtener el grado de Maestro (a) en Ciencias en Alimentos de la C. MÉDICO CIRUJANO ALINE MINERVA CASTAÑEDA ANDRADE con numero de control M19400005 cuenta con un nivel de originalidad Excelente según lo definido en el Procedimiento para la Verificación de Originalidad, por lo cual se determina que no constituye un plagio.

Es importante mencionar que de los trabajos de tesis se publican articulos en revistas Indizadas y/o arbitradas por lo que las técnicas utilizadas son citadas frecuentemente.

Se extiende la presente para los fines que mejor convengan al interesado.

Sin mas por el momento envío saludos cordiales

**ATENTAMENTE**

Excelencia en Educación Tecnológica®  
Sabiduría Tecnológica, Pasión de nuestro espíritu®

  
**MANUEL ÁNGEL URIBE VÁZQUEZ**  
**DIRECTOR**



OCTM/lca  
Cep. Archivo DEPI





Instituto Tecnológico de Tepic

Tepic, Nayarit, **26/octubre/2021**

No. Oficio: 25-708-2021

Asunto: Autorización de impresión

**MED. CIRUJANO ALINE MINERVA CASTAÑEDA ANDRADE  
PRESENTE**

De acuerdo con el reglamento de los Institutos tecnológicos dependientes de la Dirección General de Educación Superior Tecnológica de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la comisión revisora le hizo a su trabajo de Tesis de Maestría en Ciencias en Alimentos; denominado "Fructanos de alto grado de polimerización: su papel como inductores del sistema de defensa en Aguacate Hass (*Persea americana*) Mill."

La División de Estudios de Posgrado e Investigación le autoriza para que proceda a la impresión de la misma.

Sin más por el momento quedo de usted.

**ATENTAMENTE**

Excelencia en Educación Tecnológica.  
Sabiduría Tecnológica. Razón de Nuestro Espíritu.

**LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS  
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE TEPIC  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ccp. Archivo DEPI.



Av. Tecnológico #2595 Fracc. Lagos del Country C.P.63175

Tepic, Nayarit. Tel. 01 (311) 2119400 y 2119401 e-mail:

info@ittecnic.edu.mx

tecnm.mx | tepic.tecnm.mx







TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO®

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
POSGRADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

En la ciudad de Tepic, Nayarit, a 24 del mes de noviembre de 2021, el que suscribe alumno (a) **Aline Minerva Castañeda Andrade** del Programa de Maestría en Ciencias en Alimentos con número de control **M19400005**, manifiesta que todos los resultados derivados de sus estudios de posgrado y realizados bajo la dirección del (la) **Dra. Martina Alejandra Chacón López** pertenecen al Instituto Tecnológico de Tepic, por lo que cedo los derechos de los mismos a este instituto con fines académicos y de investigación. Así mismo manifiesto que es de mi conocimiento que si de estos resultados se originan patentes o publicaciones, participaré como coautor y de los beneficios que se deriven.

**ATENTAMENTE**

Médico Cirujano Aline Minerva Castañeda Andrade

## RESUMEN

Castañeda-Andrade, Aline Minerva MCA. Tecnológico Nacional de México campus Tepic. Fructanos de alto grado de polimerización: su papel como inductores del sistema de defensa en aguacate Hass (*Persea americana*) Mil. Agosto 2021. Director: Dra: Martina Alejandra Chacón López. Co-director: Rosa Isela Ortiz Basurto.

El aguacate es un fruto de alta importancia a nivel mundial, nacional y estatal, la producción se ve mermada hasta en un 50% debido a enfermedades como la antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (*C. gloeosporioides*). Una alternativa para combatirla es el empleo de inductores del sistema de defensa, tal como los fructanos de alto grado de polimerización (FAGP). Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el que los fructanos inducen el sistema de defensa. El objetivo de esta investigación es estudiar el efecto de los FAGP como inductores del sistema de defensa del aguacate Hass (*Persea americana* Mill) y sentar las bases para dilucidar el mecanismo por el cual induce el sistema de defensa.

En este proyecto se evaluó *in vitro* el efecto antifúngico de los fructanos, se encontró que los FAGP no poseen actividad antifúngica a ninguna de las concentraciones aplicadas, por el contrario favorecieron el crecimiento del hongo *C. gloeosporioides*, tampoco se observaron diferencias en los parámetros de germinación o esporulación. En experimentos *in vivo* tras la aplicación de los FAGP e inoculación de *C. gloeosporioides* en los frutos, se evaluó la aparición de los síntomas de la antracnosis con lo que se determinó colectar muestras en tiempos tempranos (0, 0.5, 1) intermedios (6 y 12 h) y tardíos (24, 72 y 120 h) para los análisis genéticos.

Se determinó que la concentración óptima de los FAGP fue de 20%; en los frutos bajo este tratamiento, se realizó la toma de muestra para extraer su RNA total y realizar un análisis de expresión genética mediante RT-PCR de los genes *MAPK3*, *MAPK6*, *NPR1* (asociados con la ruta de señalización de ácido salicílico) y *MYC2* y *ERF1* (asociados con la ruta del ácido jasmónico). Como tratamientos testigos de incluyeron Metil-Jasmonato al 0.1mM, ácido salicílico 5mM, agua destilada y frutos inoculados con *C. gloeosporioides*.

En los frutos tratados con FAGP al 20% se observó una incidencia del 80% y una severidad del 45% de la enfermedad ocasionada por *C. gloeosporioides*. Respecto a los análisis de expresión genética, los resultados mostraron que al aplicar los FAGP se indujo la expresión de los genes *MAPK6* y *NPR1*, presentando un patrón de expresión similar en las muestras de fruto inoculado con el patógeno. La expresión de estos genes se mantuvo hasta las 120 h, lo que apoya la teoría del "Sweet priming". De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación se concluye que los FAGP activan los sistemas de defensa del aguacate y son percibidos como un patógeno.

Palabras clave: aguacate, antracnosis, inductor, sweet priming, fructanos de agave.

## ABSTRACT

Castañeda-Andrade, Aline Minerva MCA. Tecnológico Nacional de México campus Tepic. High degree of polymerization fructans: their role as inducers of the defense system in Hass avocado (*Persea americana*) Mill. August 2021. Director: Dra: Martina Alejandra Chacón López. Co-director: Rosa Isela Ortiz Basurto.

The avocado is a fruit of high importance worldwide, national and state, production is reduced by up to 50% due to diseases such as anthracnose caused by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (*C. gloeosporioides*). An alternative to combat it is the use of inducers of the defense system, such as high degree of polymerization fructans (FAGP). However, the mechanism by which fructans induce the defense system is not known. The objective of this research is to study the effect of FAGPs as inducers of the defense system of the Hass avocado (*Persea americana* Mill) and to lay the foundations to elucidate the mechanism by which it induces the defense system.

In this project, the antifungal effect of fructans was evaluated *in vitro*, it was found that FAGPs do not have antifungal activity at any of the applied concentrations, on the contrary, they favored the growth of the fungus *C. gloeosporioides*, no differences were observed in the parameters of germination or sporulation. In *in vivo* experiments after the application of FAGP and inoculation of *C. gloeosporioides* in the fruits, the appearance of anthracnose symptoms was evaluated, with which it was determined to collect samples in early (0, 0.5, 1) intermediate times (6 and 12 h) and late (24, 72 and 120 h) for genetic analysis.

The optimal concentration of the FAGPs was determined to be 20%; In the fruits under this treatment, a sample was taken to extract their total RNA and perform a genetic expression analysis by means of RT-PCR of the genes *MAPK3*, *MAPK6*, *NPR1* (associated with the salicylic acid signaling pathway) and *MYC2* and *ERF1* (associated with the jasmonic acid pathway). As control treatments included 0.1mM Methyl-Jasmonate, 5mM salicylic acid, distilled water and fruits inoculated with *C. gloeosporioides*.

In the fruits treated with 20% FAGP, an incidence of 80% and a severity of 45% of the disease caused by *C. gloeosporioides* were observed. Regarding the genetic expression analysis, the results showed that when applying the FAGPs, the expression of the *MAPK6* and *NPR1* genes was induced, presenting a similar expression pattern in the fruit samples inoculated with the pathogen. The expression of these genes was maintained until 120 h, which supports the "*Sweet priming*" theory. According to the results obtained in this research, it is concluded that the FAGPs activate the defense systems of the avocado and are perceived as a pathogen.

Keywords: avocado, anthracnose, inducer, sweet priming, agave fructans.

## CONTENIDO

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN .....	2
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES .....	5
2.1. Generalidades del aguacate Hass ( <i>Persea americana Mill</i> ).....	5
2.2. Importancia económica .....	5
2.3. Pérdidas postcosecha en frutos de aguacate.....	5
2.4. Medidas para el control de enfermedades postcosecha .....	7
2.5. Alternativas para el control de la Antracnosis.....	8
2.6. Inductores del sistema de defensa vegetal .....	10
2.6.1. Rutas metabólicas activadas en respuesta a inductores de defensa vegetal	11
2.6.1.1. Inducción del sistema de defensa vegetal mediado por Ácido Salicílico	11
2.6.1.2. Inducción del sistema de defensa vegetal mediado por Ácido Jasmónico.....	13
2.6.2. Fructanos de agave de AGP y su papel como inductores.....	15
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN .....	20
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS .....	22
CAPÍTULO 5. OBJETIVOS .....	24
5.1. Objetivo General .....	24
5.2. Objetivos Específicos .....	24
CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
6.1. Material biológico .....	27
6.2. PRIMER ETAPA. Pruebas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> para determinar efecto de los fructanos .....	27



6.2.1.	Evaluación de distintos tipos de fructanos <i>in vivo</i> para determinar el mejor tratamiento en frutos de aguacate. ....	27
6.2.2.	Evaluación <i>in vivo</i> para determinar las concentraciones óptimas de FAGP para inhibir al patógeno según la severidad e incidencia. ....	28
6.2.3.	Evaluación del efecto antifúngico <i>in vitro</i> de los FAGP .....	29
6.2.3.1.	Determinación de inhibición del crecimiento micelial.....	29
6.2.3.2.	Determinación del número de esporas (Esporulación).....	30
6.2.3.3.	Evaluación del porcentaje de germinación .....	30
6.2.4.	Diseño experimental.....	31
6.2.5.	Análisis estadístico .....	32
6.3.	SEGUNDA ETAPA. Aplicación <i>in vivo</i> del tratamiento más efectivo de fructanos para la obtención de muestras para obtener el RNA total .....	32
6.3.1.	Extracción de RNA en las muestras bajo estudio.....	34
6.3.2.	Determinación de la integridad y concentración de RNA .....	35
6.3.3.	Tratamiento del RNA con DNasa I .....	35
6.3.4.	Similitud en genes de aguacate y diseño de oligonucleótidos.....	36
6.4.	TERCER ETAPA: Análisis de la expresión de genes mediante Transcripción reversa (RT-PCR).....	36
6.4.1.	Síntesis de cDNA .....	37
6.4.2.	PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	37
6.4.3.	Análisis de los patrones de expresión génica.....	38
CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		40
7.1.	PRIMER ETAPA. Pruebas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> para determinar efecto de los fructanos .....	40
7.1.1.	Evaluación de distintos tipos de fructanos <i>in vivo</i> para determinar el tratamiento más efectivo contra la antracnosis en frutos de aguacate. ....	40

7.1.2.	Determinación de las concentraciones óptimas de FAGP para inhibir al patógeno en el fruto en evaluaciones <i>in vivo</i> .....	42
7.1.3.	Evaluación del desarrollo de la antracnosis en frutos de aguacate	42
7.1.4.	Evaluación de la severidad e incidencia de la antracnosis en frutos de aguacate tratados con FAGP .....	45
7.1.5.	Evaluación del efecto antifúngico de los FAGP <i>in vitro</i> .....	46
7.1.5.1.	Determinación de inhibición del crecimiento micelial.....	47
7.1.5.2.	Determinación del número de esporas (Esporulación).....	49
7.1.5.3.	Porcentaje de germinación de esporas .....	51
7.2.	SEGUNDA ETAPA. Aplicación de los tratamientos <i>in vivo</i> para la obtención de RNA total .....	52
7.2.1.	Extracción de RNA total de las muestras bajo estudio .....	52
7.2.2.	Digestión con DNasa del RNA obtenido.....	56
7.2.3.	Búsqueda de genes que participan en la señalización de AS ó AJ en el genoma de aguacate .....	57
7.2.4.	Diseño de oligonucleótidos.....	58
7.2.5.	Comprobación de la hibridación de los Oligonucleótidos .....	59
7.3.	TERCER ETAPA: Análisis de la expresión de genes mediante Transcripción reversa (RT-PCR).....	60
7.3.1.	Análisis de la expresión de los genes <i>ERF1</i> , <i>NPR1</i> , <i>MYC2</i> , <i>MAPK6</i> y <i>ACT</i> mediante RT-PCR.....	60
CAPÍTULO 8.	CONCLUSIONES.....	70
CAPÍTULO 9.	PERSPECTIVAS.....	72
CAPÍTULO 10.	BIBLIOGRAFÍA .....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 2.1. Rutas de señalización del ácido salicílico como inductor del sistema de defensa vegetal.. .....	13
Figura. 2.2. Ruta de señalización del Ácido jasmónico para generar la inducción del sistema de defensa vegetal.. .....	14
Figura. 2.3. Estructura química de los Fructanos. ... <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
Figura. 6.1. Procedimiento general para la obtención de muestras de donde se extrajo el RNA total.....	34
Figura. 7.1. Frutos de aguacate con la aplicación de distintos tipos de fructanos a los 7 días postinoculación. ....	40
Figura. 7.2. Efecto de la aplicación de FAGP en frutos de aguacate a distintos días post inoculación (dpi) con <i>C. gloeosporioides</i> . ....	44
Figura. 7.3. Análisis del desarrollo de las lesiones tras la aplicación de los FAGP en frutos de aguacate.....	46
Figura. 7.4. Crecimiento in vitro de <i>C. gloeosporioides</i> con las diferentes concentraciones de FAGP en cajas de petri con medio PDA.....	48
Figura. 7.5. Efecto de los FAGP en la esporulación de <i>C. gloeosporioides</i> . ....	50
Figura. 7.6. Efecto de los FAGP en el porcentaje de germinación de esporas en <i>C. gloeosporioides</i> a las 9 h de haberse inoculado en discos de agar papa-dextrosa.....	51
Figura. 7.7. Electroforesis de extracción de RNA total .....	52
Figura. 7.8. Electroforesis de RNA total para para muestras del tiempo cero de FAGP 20%, AS y patógeno. ....	53
Figura. 7.9. Electroforesis de RNA total para muestras de los tratamientos .....	54
Figura. 7.10. Extracción de RNA total de las muestras inoculadas con patógeno en los tiempos 72 y 120 h.....	55
Figura. 7.11. Digestión del RNA con DNasa.. .....	56

Figura. 7.12. Amplificación de los genes ERF1, PR1, MYC2, MAPK6, ACT, MAPK3 a partir de DNA genómico. ....	60
Figura. 7.13. Expresión de los genes <i>ACT</i> , <i>NPR1</i> y <i>MAPK6</i> a tiempos cortos ...	63
Figura. 7.14. Expresión de los genes <i>ACT</i> , <i>NPR1</i> y <i>MAPK6</i> a tiempos intermedios. ....	63
Figura. 7.15. Expresión de los genes <i>ACT</i> , <i>NPR1</i> y <i>MAPK6</i> a tiempos largos. ..	64
Figura. 7.16. Expresión de los genes <i>MAPK6</i> y <i>NPR1</i> de los distintos tratamientos a los tiempos evaluados .....	66
Figura. 7.17. Modelo de activación del sistema de defensa por los FAGP en la célula .....	67

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 6.1. Diseño estadístico y variables de respuesta de la etapa 1 de experimentación.....	31
Cuadro 6.2. Tratamientos y concentraciones aplicadas en los frutos de aguacate .....	32
Cuadro 7.1. Porcentaje de severidad al aplicar distintos tipos de fructanos.....	41
Cuadro 7.2. Efecto in vitro de los FAGP sobre el crecimiento de C. gloeosporioides .....	49
Cuadro 7.3. Alineamientos de los genes propuestos para el diseño de oligonucleótidos.....	58
Cuadro 7.4. Diseño de oligonucleótidos para los análisis de expresión génica de genes específicos involucrados en las vías de señalización de AS o AJ. ....	59

## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**



## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El aguacate es un fruto originario de Mesoamérica que en los últimos años ha ganado popularidad a nivel mundial, debido a la gran aceptación por los consumidores (SIAP, 2018). Sin embargo, uno de los grandes problemas de este cultivo son las pérdidas postcosecha como consecuencia de la aparición de enfermedades; se ha reportado que las pérdidas pueden llegar a ser de hasta 50% del total de la producción (Serrano Carreón & Fentanes, 2007). México es el principal productor y exportador de este producto a nivel mundial, por lo que es una prioridad minimizar estas pérdidas buscando métodos alternativos inocuos.

Dentro de las principales enfermedades que atacan al aguacate está la antracnosis, que es causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* y la roña causada por el hongo *Sphaceloma perseae* (Rodríguez-López, et al., 2009).

Actualmente existe un gran número de fungicidas que se utilizan en los cultivos de aguacate para combatir enfermedades, desafortunadamente la concentración de los residuos que permanecen en los frutos puede ser mayor al límite permitido, lo que representa un riesgo potencial de toxicidad para los consumidores (Buzby, et al., 2014). Por ello, la búsqueda de alternativas que sean inocuas resulta apremiante.

Una alternativa interesante es el empleo de inductores del sistema de defensa del fruto, los cuales tienen la capacidad para activar genes que participan en este proceso. Entre estas moléculas se encuentra el quitosano, además de algunas hormonas que son sintetizadas por los sistemas vegetales como el ácido salicílico (AS) y el ácido jasmónico (AJ). En los últimos años se ha descrito que plantas como el agave son más resistentes a enfermedades, esta característica se atribuye a la presencia de fructanos (Mancilla-Margalli, 2006), por lo que se ha sugerido a los fructanos como inductores de resistencia en plantas, sin embargo a la fecha los estudios sobre este tema son escasos.

Los fructanos son polímeros de fructosa que se encuentran como reserva energética en algunas plantas, tales como las de Agave azul (*Agave tequilana*

*Weber var. Azul*). El estudio de los fructanos ha tomado importancia por los beneficios que producen en el organismo humano al consumirlos. Por otro lado, se ha descrito que moléculas de fructooligosacáridos, con estructuras basadas en hexosas y pentosas, tales como los fructanos, son capaces de inducir la defensa en frutos de uva (Salzman, et al., 1998) y en tabaco (Herbers, et al., 1996); aunque se menciona que los mecanismos por los cuales puede inducir esta defensa no se conocen.

Para proponer a los fructanos de agave como una alternativa valiosa para aminorar las pérdidas postcosecha del fruto de aguacate, mediante la inducción de su sistema de defensa, es necesario investigar su mecanismo de acción. Por lo que el propósito de esta investigación es estudiar el efecto de la aplicación de fructanos de agave de alto grado de polimerización (FAGP), para estudiar cómo son percibidos por el fruto, al inducirle resistencia. Tras la aplicación de los fructanos se llevó a cabo un análisis de la expresión de genes específicos que participan en el sistema de defensa del fruto de aguacate y que se inducen por la presencia del hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides*, o por la aplicación de las hormonas AS y AJ que median el sistema de defensa vegetal, con lo cual se podrá inferir cómo los fructanos actúan para inducir resistencia en el aguacate contra el patógeno.

## **CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES**

## **CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Generalidades del aguacate Hass (*Persea americana Mill*)**

La palabra aguacate proviene del náhuatl (Ahuacatl), que significa “testículos del árbol”, su nombre científico es *Persea americana* Mill, perteneciente a la familia de las lauráceas. El fruto es una drupa (fruto carnoso, con semilla), de forma oval, su peso varía entre 150 y 350 g, con un color en el epicarpio que va del verde claro al verde oscuro cuando se encuentra en estado de maduración fisiológica y de violeta a negro cuando se encuentra en madurez de consumo (SAGARPA, 2011).

### **2.2. Importancia económica**

México es el principal productor y exportador de aguacate, con una producción de 205 mil 439 t en 2019, contribuye con 3 de cada 10 t de la producción mundial. Los estados de mayor producción en México son Michoacán, Estado de México, Jalisco, Morelos y Nayarit (SIAP, 2019). La producción es mayormente exportada a destinos Estados Unidos, Japón, Canadá, España y Francia (CEDRSSA, 2017).

Actualmente, Nayarit cuenta con más de 7000 ha plantadas de aguacate, de las cuales 522 fueron sembradas en el año anterior, es decir, presentaron un aumento en 7.8%. Lo anterior se traduce en un aumento en la cosecha y producción de más del 25%. Los principales municipios productores son Tepic, San Pedro Lagunillas, Xalisco, Santa María del Oro, Jala, Ahuacatlán, Ixtlán del Río y San Blas. En 2017, la producción de aguacate en Nayarit fue de 36,036 t, lo que lo posiciona como el quinto estado productor a nivel nacional y logrando un aumento en la producción de más del 25% (SIAP, 2019).

### **2.3. Pérdidas postcosecha en frutos de aguacate**

No obstante, la elevada producción de aguacate, ésta se ve mermada por diversos factores, destacando tres como las principales causas que generan las pérdidas postcosecha del fruto: daños mecánicos, cambios de temperatura (daño por frío) y enfermedades provocadas por hongos (Cerdas-Araya, et al., 2006). Las pérdidas y

desperdicios de aguacate en países desarrollados va del 5 al 25%, mientras que en países en desarrollo el porcentaje puede aumentar a entre 20 y 50% (Arias Bustos & Moors, 2018).

Los daños mecánicos causan una lesión en el tejido lo que provoca una aceleración del proceso de maduración del fruto, además de permitir el paso de patógenos, disminuyendo así su vida comercial. Por otro lado el daño por frío no permite que se desarrollen adecuadamente las características esperadas en el fruto, como su color, textura y sabor, además la pulpa toma un color grisáceo que causa una pérdida del valor comercial del producto (Cerdas-Araya, et al., 2006).

En relación a las enfermedades, las más comunes en el aguacate son la roña del aguacate causada por el hongo *S. perseae*, causante de lesiones color café, tipo corcho, de forma irregular; la pudrición del pedúnculo por *Botryodiplodia theobroma*; la pudrición de la raíz causada por *Phytophthora cinamomi*; la pudrición del fruto causada por *Rhizopus stolonifer* o por *Dothiorella sacc* (Marais, 2006) y la antracnosis, causada por el hongo *C. gloeosporioides*. La antracnosis es considerada la de mayor afectación en la producción del aguacate, dado que puede generar desde un 20% hasta el 100% de pérdidas, dependiendo de las condiciones climáticas que prevalezcan en la región (Lemus-Soriano & Pérez-Aguilar, 2017; Rodríguez-López, et al., 2009).

La antracnosis se caracteriza por lesiones necróticas en el epicarpio y en la pulpa, y en etapas avanzadas la formación de masa conidial color naranja (Sharma, et al., 2017). En el aguacate se producen manchas circulares café oscuras en el pericarpio, daños por ablandamiento y pudrición del mesocarpio (Rodríguez-López, et al., 2009).

Este hongo presenta un crecimiento lento *in vitro*, produce colonias color gris claro a gris oscuro, su esporulación se ve favorecida cuando se cultivan en medio líquido jugo-V8 a 25°C bajo agitación constante. Su temperatura óptima de crecimiento es de 27±1°C, con una humedad relativa entre 80 y 100%, a un pH de 5.5 a 7.0 (Rodríguez-López, et al., 2009).

#### **2.4. Medidas para el control de enfermedades postcosecha**

Actualmente se aplican medidas eficaces para el control de las enfermedades en los productos agroalimentarios, entre ellas se encuentran actividades preventivas y correctivas, tal como la aplicación de plaguicidas (INTAGRI, 2017).

En aguacate, para el control del hongo *Colletotrichum spp.*, se recomienda un tratamiento integral (Agriculture and Nature Resources., 2017) en el que se debe realizar una planeación de actividades, que requiere prever acciones como la limpieza del terreno, mejoramiento del drenaje, podas sanitarias y aireación del árbol; Así mismo, se requiere considerar el control de plagas, enfermedades y un seguimiento hasta su comercialización, para detectar fallas y realizar las correcciones necesarias para producir frutos libres de la enfermedad (Tapia-Rodríguez, 2018).

Los métodos más usados para el control tanto preventivo como correctivo son los plaguicidas. Según la FAO, un plaguicida es cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas (Comisión del Codex Alimentarius, 1997).

Los plaguicidas que más se utilizan para el control de *Colletotrichum spp.* en el aguacate, son: Azoxistrobina, azufre elemental, oxiclورو de cobre, cyprodinil, fludioxonil, Folpet, hidróxido cúprico, óxido cuproso, piraclostrobina, sulfato de cobre, tiabendazol y el tribásico de cobre, así como también algunas combinaciones entre éstos (APEAM, 2016).

El uso de plaguicidas genera ciertos inconvenientes, entre los que se encuentran: alterar el balance de la naturaleza por desequilibrio de los sistemas ecológicos, generar resistencia de los patógenos, persistencia en los suelos, contaminación de mantos acuíferos y residuos peligrosos en los alimentos. Por lo anterior, los plaguicidas son uno de los mayores contaminantes en los ambientes naturales, pues representan un riesgo potencial para la biota y la salud humana (Narváez-Valderrama, et al., 2012).



Actualmente, existen recomendaciones acerca del uso de estas sustancias en los cultivos, incluso guías para su manejo y medidas preventivas para evitar que puedan generar algún problema a los aplicadores, transportistas y/o consumidores finales (Agriculture and Nature Resources., 2017; APEAM, 2016). Desafortunadamente en la práctica común, estos protocolos no se llevan a cabo de forma correcta, lo que genera los problemas ya mencionados.

Es por esto que se han investigado e implementado métodos alternativos a los plaguicidas convencionales, entre éstos se encuentran: los extractos de plantas, microorganismos como agentes de control biológico, tratamientos hidrotérmicos, manipulación genética y resistencia inducida (Landeró-Valenzuela, et al., 2016).

## **2.5. Alternativas para el control de la Antracnosis**

Se trata de medidas cuyo objetivo es alcanzar un adecuado control de patógenos en los cultivos, además de ser amigables con el medio ambiente, con la finalidad de disminuir los riesgos y consecuencias que los métodos convencionales generan. Entre las alternativas que se han propuesto están la implementación de métodos físicos, químicos y biológicos.

La administración de rayos ultravioleta (UV) es un método físico utilizado para el control de este patógeno. Se probó *in vitro* que la exposición durante tres días bajo rayos UV (longitud de onda de 312 nm) disminuye la actividad de enzimas de *C. gloeosporioides* con actividad lítica, como las celulasas y las pectinasas (Lakshmesha, et al., 2005).

También para el control de *Colletotrichum sp.*, se han utilizado plantas y extractos de plantas, tal como los glucosinolatos aislados de floretes de brócoli, que inhibieron la germinación de esporas de un *C. gloeosporioides* que fue aislado de mango (Lara-Viveros, et al., 2014). Así mismo, Loaiza y Rivera, utilizaron raíces de *Gliricida sepium*, con una disminución del 94% de la severidad de la antracnosis en frutos de papaya Hawaiana (Loaiza & Rivera, 2000).

El uso de aceites esenciales, como el de *Thyme vulgaris* L. fue utilizado en papaya contra *C. gloeosporioides* y tuvo un efecto fungicida de manera proporcional a las concentraciones del aceite empleadas (Landeró-Valenzuela, et al., 2016). Asimismo, se ha encontrado que el aceite de canela tiene efecto inhibitorio a bajas concentraciones (0.0015, 0.0025 y 0.005%) (Landeró-Valenzuela, et al., 2013).

En cuanto al tema de control biológico, se han buscado microorganismos antagonistas de *C. gloeosporioides*, como *Bacillus subtilis* y *Rodhotorula minuta* que presentaron actividad antagonista en ensayos *in vitro* contra el hongo (Bosquez-Molina, et al., 2010). En aguacate, se probó la levadura *Pichia anomala*, la cual disminuyó la incidencia de la antracnosis en 87.5%, también se probaron cepas de *Candida intermedia* obteniendo disminución de la incidencia entre el 25 y el 50% (Campos-Martínez, 2014).

Para el control de la antracnosis en aguacate, se han utilizado biofungicidas que se componen de extractos de plantas. Entre ellos se encuentran Bio Gober, que es un extracto de *Larrea tridentata* y aceite esencial de *Ricinus communis* obteniendo una incidencia del 75% y una severidad del 45%, respecto al control (eficacia de Abbott del 48%); Bio Gober Plus, que contiene extracto esencial de *Larrea tridentata*, dióxido de hidrógeno, y extracto de *Citrus spp.* obteniendo una eficacia de Abbott del 98%, con una incidencia del 5% y una severidad del 2% en comparación con un testigo. Otros ejemplos son Bio Equuss (extracto de *Equisetum arvense*, aceite esencial de *Ricinus communis*) y Bio Equus Plus (extracto de *Equisetum arvense*, dióxido de hidrógeno y extracto de *Citrus spp.*) (Lemus-Soriano & Pérez-Aguilar, 2017). Por otro lado, también se han aplicado extractos de ajo obteniendo un 65.2% de reducción de la enfermedad, extractos de cebolla con un 68.5% de reducción de la enfermedad (Reyes-Alemán, 1996).

Recientemente, se ha implementado el uso de inductores del sistema de defensa como alternativas a los fungicidas. Algunos inductores utilizados son el ácido  $\beta$ -aminobutírico no proteico (BABA), que tiene acción contra gran número de patógenos en plantas (Quaglia, et al., 2011). Así mismo, el AS, el ácido 2,6-

diclorosonicotínico, el ácido benzo1,2,3-tiadiazole-7carbotioico S metil ester y el AJ, son inductores contra *C. gloeosporioides* (Landro-Valenzuela, et al., 2016).

Por ser el tema de interés en esta investigación, a continuación, se describe de manera detallada cómo actúan los inductores del sistema de defensa vegetal.

## **2.6. Inductores del sistema de defensa vegetal**

Las plantas se encuentran en interacción constante con microorganismos tanto benéficos como patógenos, y para mantenerse sanas es necesario desplegar sus mecanismos de defensa. Los mecanismos de defensa que resultan en respuesta al patógeno, son denominados como defensa activa o inducida (Laredo Alcalá, et al., 2017; (Anderson, et al., 2004). Los inductores, también conocidos como elicitores, son moléculas capaces de inducir una respuesta inmune y estructural en contra de agentes patógenos (Bektas & Eulgem, 2015; Tripathi, et al., 2019) Estas respuestas se basan en desencadenar reacciones para la producción y regulación de enzimas, proteínas o barreras estructurales útiles para la defensa contra el patógeno.

Es importante estudiar los inductores de defensa ya que pueden ser un método alternativo para reemplazar el uso de plaguicidas en determinados cultivos. Entre los más estudiados se encuentran el quitosano y hormonas vegetales que regulan el sistema de defensa y que al ser aplicados de manera exógena son capaces de inducir este sistema, tal es el caso del ácido jasmónico y del ácido salicílico.

En la última década se han publicado diversos trabajos en relación a la aplicación del quitosano y se han planteado algunos mecanismos por los cuales se propone que induce la defensa vegetal. Se ha reportado que el quitosano activa algunas vías de señalización para inducir la expresión de genes que codifican para generar quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasa, fenilalanina amoniaco liasa(*PAL*) (Obianom, et al., 2019) y la fenilpropanoide entre otras, las cuales son enzimas que participan en el sistema de defensa mediante su participación en la producción de fenilpropanoides y otros compuestos como el dieno AFD que presentan actividad antifúngica (Xoca-Orozco, L.-Á., et al., 2018).

Con respecto al AJ, se ha reportado que esta hormona activa al factor de transcripción *MYC2*, que es un regulador de la transcripción de genes como *CHIB* (Basic Chinitasa), *PDF1.2* (Plant Defensin 1.2) y *VSP1* (Vegetative Storage Protein); éstos son reguladores positivos de genes como los que codifican para defensinas que responden al etileno, las cuales son moléculas importantes del sistema de defensa, pues se trata de péptidos antimicrobianos de respuesta rápida, altamente efectivos (Carolina, et al., 2010; Carvalhais, et al., 2017; Kazan & Manners, 2013).

Por su parte el AS activa las vías metabólicas para la producción de epicateína y genes que codifican para quitinasa y fenilalanina amoniaco liasa (*PAL*), que como ya se mencionó anteriormente participan en la biosíntesis de compuestos con actividad antifúngica (Djami-Tchatchou, et al., 2013; Glowacz, et al., 2017).

Para entender las rutas metabólicas que se despliegan al inducir el sistema de defensa vegetal las cuales son mediadas por el AS o el AJ; a continuación se explicará de manera detallada estas rutas metabólicas y los genes involucrados.

## **2.6.1. Rutas metabólicas activadas en respuesta a inductores de defensa vegetal**

### **2.6.1.1. Inducción del sistema de defensa vegetal mediado por Ácido Salicílico**

Se ha reportado que las respuestas de defensa mediadas por el AS son activadas cuando la planta es atacada por patógenos biotróficos y hemibiotróficos (Dotor-Robayo & Cabezas-Gutierrez, 2014). El reconocimiento del patógeno (por ejemplo, de *C. gloeosporioides*) se realiza en la membrana celular por medio de proteínas R, específicamente las del tipo CC-NBS-LRR (del inglés, coiled-coil nucleotide-binding site-leucine-rich-repeat) y TIR-NBS-LRR (del inglés, toll-interleukin-1 receptor-like) que activan la biosíntesis del AS (Dubey & Singh, 2018). En el caso de CC-NBS-LRR, activa las proteínas NDR1 y RIN4, las cuales son proteínas de membrana que regulan la señalización de proteínas R, las cuales

actúan como parte del sistema de defensa. Las proteínas TIR-NBS-LRR estimulan la producción de ácido salicílico por medio de las proteínas EDS1 y PD4 (Vlot, et al., 2009a).

Por otro lado, los patrones moleculares generales asociados a patógenos (MAMP's), que son moléculas propias de los patógenos, son percibidas por receptores de membrana, una vez que se asocian con los receptores, se activan las cascadas de señalización; dentro de los primeros actores de estas rutas están las proteínas *MAPK 3* y *6* las cuales se activan por fosforilación para a su vez inducir a los genes *NPR1* que son importantes en la síntesis del AS. Por lo anterior se considera que *NPR1* tiene una regulación positiva en la acumulación del AS. Contrariamente las *MAPK4* regulan negativamente al AS, deteniendo su acumulación, tal como se muestra en la Figura 2.1 (Vlot, et al., 2009b).

Adicionalmente, la acumulación de AS favorece la activación de enzimas como las catalasas y las ascorbato peroxidasas, que secundariamente provocan el aumento intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS). Lo anterior puede llevar a dos procesos paralelos: el primero, causa que en la célula por reacciones óxido-reducción, se generen residuos de cisteína a partir de la proteína oligomérica de *NPR1*, formando monómeros. Éstos se dirigen al núcleo, donde interactúan con factores de transcripción como *TGA* y *WRKY* para modular la expresión de genes, entre ellos algunos de la familia PR, que participan en la defensa de la planta. El segundo proceso, es la inducción de la Respuesta Hipersensible (HR), en la que se liberan ROS y moléculas como saponinas, fitoalexinas y proteínas PR, que generan lesiones necróticas en el tejido, como una medida del sistema de defensa para detener la diseminación de la infección (Figura 2.1) (Díaz-Puentes, 2012; Vlot, et al., 2009b).

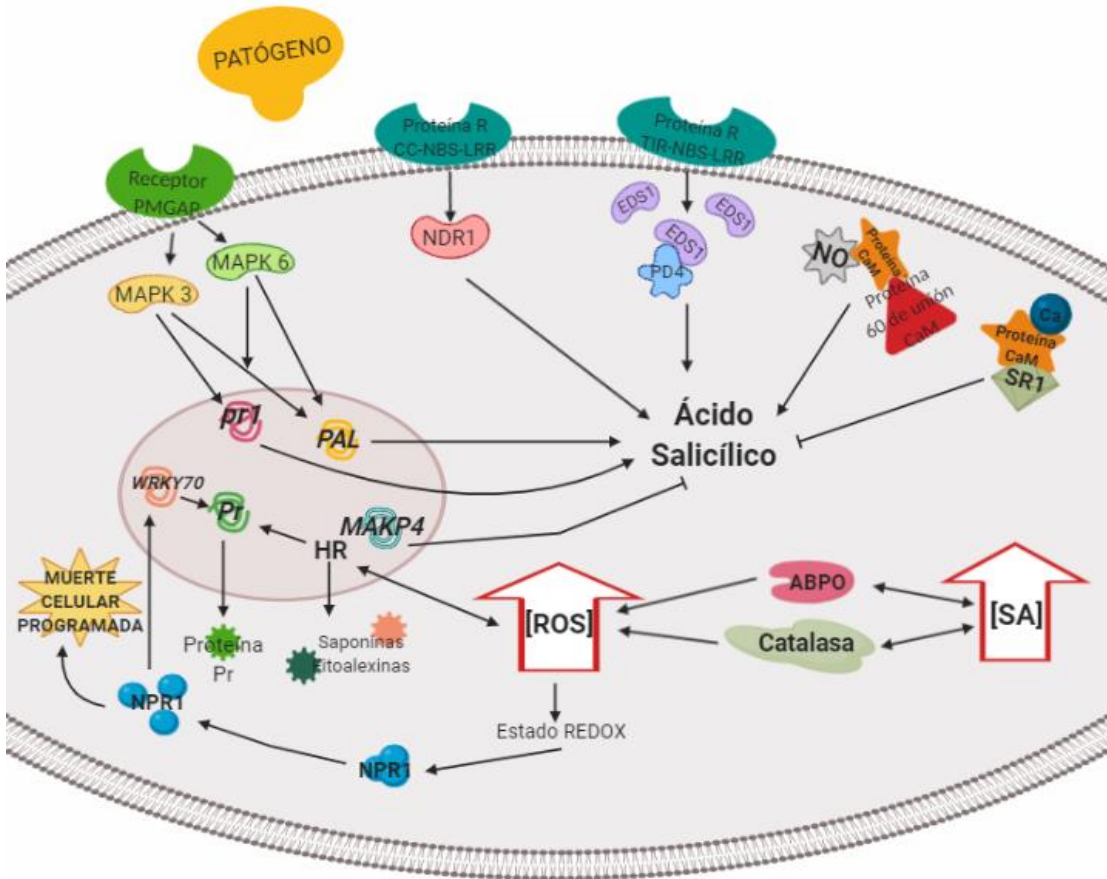


Figura. 2.1. Rutas de señalización del ácido salicílico como inductor del sistema de defensa vegetal. Modificado de Díaz-Puentes, 2012; Tripathi et al., 2019 & Vlot et al., 2009a.

### 2.6.1.2. Inducción del sistema de defensa vegetal mediado por Ácido Jasmónico

El AJ es una hormona que participa en distintos procesos del desarrollo y crecimiento vegetal, entre sus funciones más relevantes se encuentra la de señalización entre la planta y los organismos benéficos de las raíces, modulación de la apertura de estomas, inhibición del crecimiento de las raíces, germinación de semillas, entre otras (Laredo Alcalá, et al., 2017). Por otro lado, el AJ tiene gran importancia en la defensa contra patógenos necrotróficos y organismos herbívoros. La señalización de esta ruta está coordinada con la ruta de biosíntesis del etileno y suprimida por el AS y el ácido abscísico (ABA) (Carvalhais, et al., 2017). En la vía de señalización activada por el AJ, este se une a la isoleucina,



formando una hormona activa (3R, 7S) -jasmonoil-L-isoleucina (JA-Ile). En la Figura 2.2 se muestra que JA-Ile se une al complejo conformado por el receptor Col1 (Coronativa intensitiva1), la proteína JAZ (Proteína Jasmonato-Zim), la proteína NINJA (Novel interacto de Jasmonato dominio-Zim, TPL (Topless) y MYC2; cuando JA-Ile se une a este complejo, JAZ se ubiquitina, es decir, se marca para ser degradada por el proteosoma 26S. Lo anterior provoca que MYC2 sea liberado, permitiendo que se conjugue con MYC3 y MYC4; y se una a factores de transcripción del tipo bHLH (Carvalhais, et al., 2017) que regulan positivamente la transcripción de genes como *ERF1* (Factor de Respuesta al Etileno1) y *ORA59* (Arabidopsis Respuesta Octadecanoide AP2/ERF59). De esta forma al estar presente el AJ se induce el sistema de defensa (Figura 2.2) (Kazan & Manners, 2013; Liu, et al., 2019).

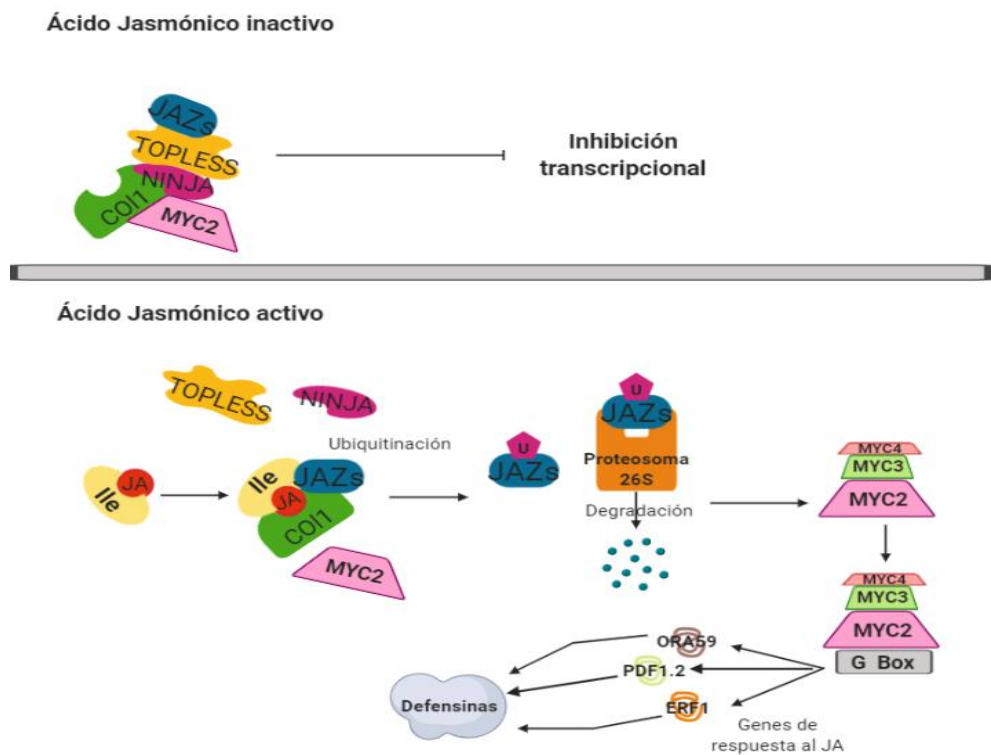


Figura. 2.2. Ruta de señalización del Ácido Jasmónico para generar la inducción del sistema de defensa vegetal. Modificado de Carvalhais et al., 2017; Hammond-Kosack & Jones, 1996; Kazan & Manners, 2013; Van der Ent, Van Wees, & Pieterse, 2009.

De esta manera, en la ruta del AS se desencadena por el ataque de patógenos biotróficos y hemibiotróficos pues éstos contienen componentes que son percibidos como patrones moleculares generales asociados a patógenos (MAMP's), que son percibidos por receptores que activan las MAPK cinasas, (Díaz-Puentes, 2009). Por su parte la ruta del AJ se activa principalmente por la interacción de la planta con organismos necrotrofos, por estrés por frío o por la acción de inductores de resistencia (Anderson, et al., 2004; Díaz-Puentes, 2012). Por otro lado y en relación a la inducción del sistema vegetal, en nuestro grupo de trabajo hemos observado que los fructanos de agave de alto grado de polimerización, actúan como inductores del sistema de defensa y dado que no existe evidencia del mecanismo de acción, es importante indagar sobre esto con base en lo reportado en la literatura sobre las bases moleculares que desencadenan la resistencia vegetal, donde las hormonas como AS y/o AJ son moléculas clave.

Por lo tanto, el interés de esta investigación se centra en la acción de los fructanos de alto peso molecular actuando como inductores de defensa vegetal (Mancilla-Margalli, 2006), ya que poco se sabe de los mecanismos que éstos activan.

### **2.6.2. Fructanos de agave de AGP y su papel como inductores**

Los fructanos son polímeros de fructosa que actúan como carbohidratos de reserva en plantas que pertenecen a la familia de los monocotiledóneas y dicotiledóneas. Se componen de residuos de  $\beta$ -furanosilofructosa, solubles en agua y se sintetizan a partir de la acumulación de sacarosa en vacuolas (Mancilla-Margalli, 2006).

Según el tipo de enlace entre los fragmentos de  $\beta$ -furanosilofructosa se pueden identificar 5 tipos de fructanos: inulina  $\beta(2-1)$ , levano  $\beta(2-6)$ , gramianos que contienen enlaces de los dos tipos anteriores, por lo que se consideran fructanos mixtos; neoinulina que contiene una fracción de glucosa entre dos furanosilofructosas unidos por enlaces  $\beta(2-1)$ , y levano conformado por enlaces  $\beta(2-1)$  y  $\beta(2-6)$  que unen los fragmentos de furanosilofructosa entre ellos y con una

molécula central de sacarosa, tal como se muestra en la Figura 2.3 (Mancilla-Margalli & López, 2006).

El grado de polimerización (GP), es decir, el número de monómeros de fructosa, presentes en la molécula, puede variar entre 2 y 80 unidades. Los fructanos se pueden clasificar de acuerdo a su GP en fructooligosacáridos, que son los fructanos con menor grado de polimerización (3-9), los de medio grado de polimerización (10-40) y alto grado de polimerización (>40 residuos unidos) (Espinosa & Ortiz, 2013; Montañez-Soto, et al., 2011).

La concentración y el tipo de fructanos en el agave varía según la especie y las condiciones climáticas en la que las plantas se cultiven, en el Cuadro 2.1 se muestra una tabla de los principales fructanos descritos en el agave, así como sus enlaces estructurales.

Cuadro 2.1. Tipos de fructanos en distintas especies de Agave y enlace químico presente en su estructura.

<b>Especie</b>	<b>Tipo de Fructano</b>	<b>Enlace estructural</b>
<i>Agave tequilana</i>	Inulina	$\beta(2-1)$
<i>Agave americana</i>	Inulina	$\beta(2-1)$
<i>Agave vera cruz</i>	Gramiano	$\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$
	Inulina	$\beta(2-1)$
<i>Agave tequilana</i>	Levano	$\beta(2-6)$
Weber var azul	Neoinulina	$\beta(2-1)$ , $\beta(2-6)$ y una fracción de glucosa.

A la fecha existen pocos reportes de los fructanos como inductores del sistema de defensa, pero existen algunos estudios en los que se describe que la aplicación de hexosas y pentosas pueden actuar como inductores del sistema de defensa (Salzman, et al., 1998; Tattersall, et al., 1997) cabe resaltar que los fructanos se componen de la unión de estas estructuras químicas.

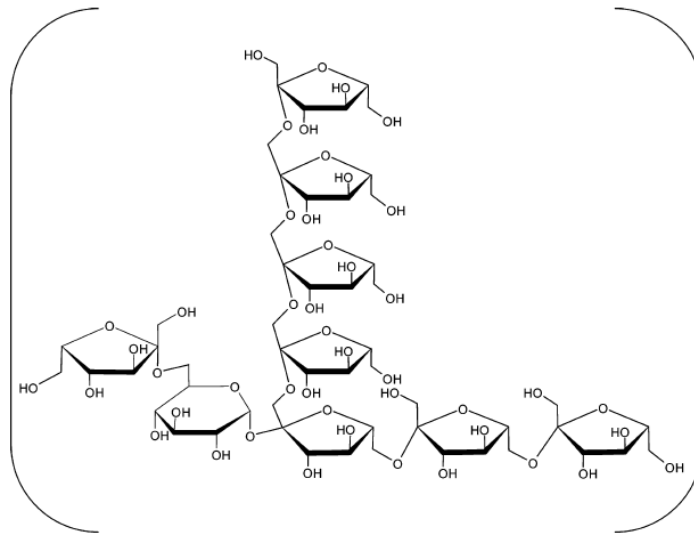


Figura. 2.3. Estructura química de los Fructanos. Propuesta por Mancilla-Margalli, 2006.

Existe la hipótesis de que una disminución en el potencial hídrico de la planta causado por la acumulación de carbohidratos solubles limita el crecimiento de patógenos; y finalmente, se considera la posible participación de fructanos en la expresión de genes de resistencia como proteínas relacionadas a patogénesis (quitinasas,  $\beta$ -glucanasas) a través de su catabolismo a azúcares simples (Mancilla-Margalli, 2006).

Tattershall en 1997 en un estudio realizado en uvas (*Vitis vinifera*), menciona que existe una relación entre la concentración de hexosas y pentosas (glucosas y sacarosas), la expresión de proteínas PR y la resistencia a la enfermedad causada por el hongo *Uncinula necator* (Tattersall, et al., 1997). Por otro lado Salzman encontró que los altos niveles de azúcares pueden generar una disminución en la susceptibilidad ante patógenos, lo que llamó el fenómeno de “Resistencia a altos niveles de azúcar”, así también menciona que la acumulación de hexosas aumenta la concentración de proteínas con propiedades antifúngicas tales como inhibidores de proteasa II, proteínas PR, taumatinas y quitinasas. Por lo anterior, se propone que los azúcares pueden actuar como reguladores de la expresión de

los genes que codifican para proteínas involucradas en la defensa vegetal.. Adicionalmente, Salzman et al., 1998 sugieren que las hexosas ayudan a preservar la estructura de las proteínas, por su ya conocido efecto de estabilizarlas contra la desnaturalización.

En un estudio en plantas de tabaco, se establece que la acumulación de hexosas en las hojas desencadena la formación de lesiones necróticas, es decir, se activa la HR. Se ha propuesto que el metabolismo de carbohidratos puede conducir a una situación celular que puede ser reconocido como el ataque de un patógeno (Herbers, et al., 1996), en el mismo trabajo se establece que se requieren de al menos  $4.5\text{mmol/m}^2$  de sacarosa para activar el sistema de defensa en tabaco.

De esta manera, se ha propuesto que la sacarosa puede ser considerado como un agente iniciador del estado de "*priming*", que es el proceso que prepara a la planta para generar una respuesta de defensa más rápida o con mayor intensidad, sin iniciar realmente esas respuestas de defensa antes de la condición de estrés (Bolouri Moghaddam & Van den Ende, 2012).

Estudios recientes hacen referencia a la "inmunidad dulce" (Sweet immunity), en la que se menciona que sacarosas exógenas pueden actuar como moléculas de señalización para iniciar y amplificar una señal más robusta que active el sistema de defensa (Ceusters, et al., 2016).

Por todo lo anterior y sustentado en observaciones preliminares en nuestro grupo de trabajo, los FAGP actúan como inductores de defensa al ser aplicados en aguacate, sin embargo no hay información en la literatura sobre este efecto, por ello esta investigación se enfocó en el análisis del mecanismo de acción de los FAGP, particularmente el determinar si los fructanos son percibidos por el sistema vegetal como un patógeno, desencadenando las respuestas de defensa mediadas por AS o bien, si se perciben como un inductor del sistema de defensa, desplegando las vías de señalización mediadas por AJ.

### **CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN**

### CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

El aguacate es un fruto de gran importancia a nivel mundial, nacional y estatal. Uno de los grandes problemas de este cultivo, son las pérdidas postcosecha que se generan por diferentes enfermedades, principalmente por la antracnosis. Los métodos tradicionales para el control de esta enfermedad son a base de fungicidas sintéticos, los cuales pueden generar residuos tóxicos en los productos vegetales, lo que representa un daño potencial a la salud humana, además que representan una fuente de contaminación en los suelos que permanece por largos períodos de tiempo. Por lo anterior surge la necesidad de buscar alternativas para el control postcosecha de la antracnosis, buscando que sean inocuas y amigables con el medio ambiente.

En nuestro grupo de trabajo se ha determinado que los fructanos de alto grado de polimerización, tienen la capacidad de inducir el sistema de defensa y por lo tanto inhibir el desarrollo de *C. gloeosporioides*, agente causal de la antracnosis en frutos de aguacate, sin embargo, existe poca información sobre su mecanismo de acción.

En este sentido, es conveniente dilucidar el mecanismo por el cual los fructanos ejercen esta acción, con el fin de proponer alternativas de control de la antracnosis que coadyuven a reducir las pérdidas postcosecha sin ocasionar daños al medio ambiente o a la salud. Es por ello que en esta investigación se plantea analizar el patrón de expresión de genes que se inducen de manera específica (por patógenos o por inductores de defensa) al aplicar fructanos en los frutos de aguacate para definir de qué manera el fruto percibe a los fructanos para inducir su mecanismo de defensa contra patógenos, específicamente, contra *C. gloeosporioides*, y con ello sustentar su aplicación para el control de este patógeno en frutos de aguacate.

## **CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS**



## **CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS**

Los fructanos de agave de alto grado de polimerización inducen el sistema de defensa del fruto de aguacate, activando las rutas de señalización mediadas por ácido salicílico, ya que pueden ser percibidos como patrones moleculares generales asociados a patógenos (MAMP's).

## **CAPÍTULO 5. OBJETIVOS**

## CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

Estudiar el efecto de los fructanos de *Agave tequilana* Weber var. Azul de alto grado de polimerización como inductores del sistema de defensa del aguacate Hass (*Persea americana* Mill).

### 5.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar mediante ensayos *in vivo* la incidencia y severidad de la antracnosis al aplicar los fructanos de alto grado de polimerización (FAGP).
2. Determinar mediante ensayos *in vitro* la capacidad antifúngica de los fructanos de alto grado de polimerización (FAGP).
3. Analizar por RT-PCR la expresión de una batería de genes mediados por AS o AJ expresados por efecto de la aplicación de los FAGP.
4. Aportar las bases para proponer un modelo del mecanismo de acción de los fructanos en la inducción del sistema de defensa del fruto de aguacate, con base en los patrones de expresión genética.

## **CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el cumplimiento de los objetivos planteados, el proyecto se dividió en tres etapas:

En la primera etapa, se probó el efecto de distintos tipos de fructanos para determinar si eran capaces de inducir el sistema de defensa del fruto de aguacate comprobado al ser retados con el hongo *C. gloeosporioides*. Se evaluaron fructooligosacáridos (FOS), inulina, fructanos de medio grado de polimerización (FMGP), fructanos de alto grado de polimerización (FAGP) y fructanos nativos (FNA), para determinar el más efectivo así como la concentración óptima para ser aplicada *in vivo* en frutos de aguacate evaluando la severidad e incidencia de la antracnosis. También, se evaluó *in vitro* el efecto antifúngico de los fructanos.

En la segunda etapa, se llevó a cabo la aplicación de la mejor concentración para inducir al sistema de defensa y se tomaron muestras del fruto para llevar a cabo los análisis de expresión genética, para lo cual se realizó la extracción de RNA total de los frutos de aguacate con el tratamiento de FAGP; se incluyeron como tratamientos testigos, Metil-Jasmonato (MeJ), ácido salicílico (AS), otro inoculando al hongo *C. gloeosporioides* y por último agua destilada. Se seleccionaron para su evaluación los genes *ERF1* y *MYC2* que son activados por AJ, así como *NPR1*, *MAPK3* y *MAPK6* que son activados por AS.

En la tercera etapa, se analizó por RT-PCR el patrón de expresión de los genes específicos, comparando los patrones obtenidos bajo la aplicación de AJ, AS, *C. gloeosporioides* y los FAGP. Con lo anterior, se propuso un posible mecanismo de como los fructanos están induciendo al sistema de defensa del aguacate.

## **6.1. Material biológico**

Se obtuvieron frutos de aguacate Hass (*Persea americana* Mill) en madurez intermedia, provenientes de una huerta aguacatera ubicada en el municipio de Xalisco, Nayarit.

El hongo *C. gloeosporioides* fue reactivado a partir de una cepa previamente aislada en nuestro grupo de trabajo proveniente de aguacate (*Persea americana*) variedad Hass.

Los fructanos de alto grado de polimerización obtenidos de Agave azul Weber fueron donados por la empresa Best Ground y Bioagaves de la costa.

## **6.2. PRIMER ETAPA. Pruebas *in vivo* e *in vitro* para determinar efecto de los fructanos**

### **6.2.1. Evaluación de distintos tipos de fructanos *in vivo* para determinar el mejor tratamiento en frutos de aguacate.**

Se evaluaron distintos fructanos de agave para determinar el más efectivo en los frutos de aguacate contra la antracnosis. Se probaron fructooligosacáridos (FOS), inulina, fructanos de medio grado de polimerización (FMGP), fructanos de alto grado de polimerización (FAGP) y fructanos nativos de agave (FNA), todos los fructanos fueron aplicados al 15%.

Se tomaron 3 frutos por tratamiento, en madurez intermedia, con un tamaño homogéneo, sin lesiones y aparentemente sanos. Se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar al aire libre.

Posteriormente se sumergieron durante 1 min en soluciones de los distintos fructanos, como control se incluyeron frutos sumergidos en agua destilada estéril. Los frutos se dejaron secar al aire libre y se permitió un tiempo de inducción de 1 h. Después se realizaron tres punciones por fruto, en las que se aplicaron 40  $\mu$ L de una solución de esporas de *C. gloeosporioides*, a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL. Se monitoreó la aparición de antracnosis haciendo observaciones en

los frutos a los días 0, 3, 6, 9 y 12 para valorar los tratamientos respecto a los controles. El experimento se realizó por triplicado.

Para establecer el efecto de los fructanos, se evaluó la incidencia y la severidad de la enfermedad en los frutos al ser retados con *C. gloeosporioides*.

Para determinar la severidad de la enfermedad, se midió el diámetro de la lesión y se calculó utilizando la ecuación 1:

$$\% Severidad = \frac{DLA}{DLC} * 100 \text{ (Ec 1)}$$

Donde:

DLA: Diámetro promedio de las lesiones en las heridas control.

DLC: Diámetro promedio de las lesiones en las heridas tratadas.

En donde el Diámetro de la lesión= Diámetro de la zona afectada-Diámetro de la herida.

Para el análisis de la incidencia de la enfermedad se registró del número de heridas inoculadas con el patógeno que desarrollaron la enfermedad, y se calculó utilizando la ecuación 2:

$$\% de incidencia = \frac{\text{no.de heridas infectadas}}{\text{no.de heridas totales}} * 100 \text{ (Ec 2)}$$

Con base en los resultados de incidencia y severidad, se determinó el mejor tratamiento de fructanos, para realizar pruebas posteriores.

### **6.2.2. Evaluación *in vivo* para determinar las concentraciones óptimas de FAGP para inhibir al patógeno según la severidad e incidencia.**

Una vez que se determinó que los FAGP fue el tipo de fructanos con mayor efecto en el control de la antracnosis, se probaron diferentes concentraciones de FAGP para definir la más adecuada para inducir la resistencia del fruto de aguacate contra *C. gloeosporioides*.

Se tomaron 50 frutos en madurez intermedia (entre fisiológica y de consumo, 60-80N), de tamaño homogéneos sin lesiones y aparentemente sanos. Se

desinfectaron los frutos sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar a aire libre.

Posteriormente se sumergieron durante 1 min en soluciones de fructanos a las siguientes concentraciones a 1.0, 1.5, 2, 5, 10, 15 y 20%, como control se incluyeron frutos inmersos en agua destilada. Los frutos se dejaron secar al aire libre y se permitió un tiempo de inducción de 1 h. Después se realizaron tres punciones por fruto, en las que se aplicaron 40  $\mu$ L de una solución de esporas de *C. gloeosporioides*, a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL. Se evaluaron los frutos a los días 0, 3, 6, 9 y 12 para valorar los tratamientos respecto a los controles. El experimento se realizó por triplicado.

Se evaluó la severidad e incidencia según las ecuaciones 1 y 2, respectivamente; y de acuerdo con los resultados se seleccionó la mejor concentración.

### **6.2.3. Evaluación del efecto antifúngico *in vitro* de los FAGP**

Para conocer si los fructanos tienen efecto antifúngico *per se*, se realizaron pruebas *in vitro* probando diferentes concentraciones de éstos, en estas pruebas se determinó la inhibición del crecimiento micelial, la esporulación y la germinación de esporas.

#### **6.2.3.1. Determinación de inhibición del crecimiento micelial**

Se probaron concentraciones de fructanos de 1.0, 1.5, 2, 5, 10, 15 y 20%, se incluyó un control sin FAGP y un control con FAGP sin hongo. En placas con PDA (agar papa dextrosa) se adicionaron los FAGP en las diferentes concentraciones (p/v). Se tomaron discos de 8 mm de diámetro de cajas con PDA con el hongo *C. gloeosporioides* desarrollado, y se sembraron individualmente en el centro de cada caja de *petri* previamente preparadas con las diferentes concentraciones de los FAGP. Las cajas con el hongo inoculado se incubaron por 11 días a 28°C. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Una vez que el hongo



se desarrolló, se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (%IMC), para ello se utilizó la ecuación 3 para cada concentración de FAGP utilizado:

$$\%IMC = \frac{\text{Diámetro colonia control} - \text{Diámetro colonia de tratamiento}}{\text{Diámetro colonia control} - \text{Diámetro del sacabocados}} \times 100 \text{ (Ec 3)}$$

#### **6.2.3.2. Determinación del número de esporas (Esporulación)**

Una vez transcurrido los 11 días del crecimiento del hongo en cada una de las concentraciones (incluyendo el control), se procedió a realizar una suspensión de esporas para determinar el parámetro de esporulación. Para ello se añadieron 10 mL de agua destilada estéril y se raspó la superficie con la ayuda de una varilla de vidrio estéril, estas suspensiones se filtraron a través de gasas estériles, depositándose después en tubos de ensaye.

Para el conteo de esporas se tomaron 50  $\mu$ L de las distintas soluciones y se colocaron sobre la cámara de Neubauer, se visualizaron a través de un microscopio óptico utilizando el objetivo 40X. En cada una de las suspensiones obtenidas se determinó el número de esporas/mL. Mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Cel}}{\text{mL}} = \frac{N}{80} \cdot 4 \cdot 10^6 \text{ (Ec 4)}$$

Donde:

N: Suma total de células contadas de 80 cuadrados (5x16)

80: Número de cuadrados contados en cada cámara

#### **6.2.3.3. Evaluación del porcentaje de germinación**

La germinación de esporas muestra el porcentaje de esporas que germinaron formando un tubo germinativo. Para su determinación, se tomaron 100  $\mu$ L de la suspensión de esporas y se añadieron a un disco de PDA (20 mm de diámetro) con los diferentes tratamientos de FAGP, una vez que se añadieron se observó al

microscopio la germinación de esporas. Se le dio un seguimiento durante 9 h con el objetivo 40X. Las esporas se consideraron germinadas cuando la longitud del tubo germinativo fue el doble del diámetro de la misma. Para realizar el cálculo del porcentaje de germinación se utilizó la ecuación 5.

$$\% \text{ germinación} = \frac{\text{No.de esporas germinadas}}{\text{No.de esporas totales}} \times 100 \text{ (Ec 5)}$$

#### 6.2.4. Diseño experimental

En la primera etapa se aplicó un diseño de bloques para la evaluación experimental, donde los factores fueron las diferentes concentraciones de los FAGP empleadas o los controles aplicados (agua y *C. gloeosporioides*); las variables de respuesta en las evaluaciones *in vitro* corresponden al porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (%ICM), la esporulación y la germinación de esporas (Cuadro 6.1). En las evaluaciones *in vivo* las variables de respuesta fueron el porcentaje de severidad e incidencia con respecto al control (Cuadro 6.1). Los bloques en el diseño son las repeticiones del experimento tal como se muestra en el Cuadro 6.1.

Cuadro 6.1. Diseño estadístico y variables de respuesta de la etapa 1 de experimentación.

<b>Diseño estadístico y variables de respuesta de la etapa 1</b>				
Factor/Bloque		Réplica		
		1	2	3
FAGP	1.00%	A B C D E	A B C D E	A B C D E
	1.50%	A B C D E	A B C D E	A B C D E
	2.00%	A B C D E	A B C D E	A B C D E
	5%	A B C D E	A B C D E	A B C D E
	20%	A B C D E	A B C D E	A B C D E
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	A B C D E	A B C D E	A B C D E

Se presentan las variables de respuesta en donde A, B, y C corresponden a la etapa *in vitro* (%ICM, esporulación y germinación, respectivamente); y donde D y E corresponden a la etapa *in vivo* (Severidad e incidencia)

### 6.2.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Se realizaron comparaciones de medias por Fisher LSD ( $p < 0.05$ ), empleando el programa estadístico STATISTICA 12.

### 6.3. SEGUNDA ETAPA. Aplicación *in vivo* del tratamiento más efectivo de fructanos para la obtención de muestras para obtener el RNA total

Una vez que se determinó cuál es la concentración de fructanos más efectiva para la inhibición de la antracnosis en el fruto, se realizó la aplicación de los FAGP al 20%, además, para indagar sobre la vía de señalización que inducen los fructanos, se adicionaron como testigos los tratamientos con metil-jasmonato (MeJ) al 0.1 mM y ácido salicílico (AS) al 5 mM, asimismo se incluyeron frutos sin tratar inoculados con *C. gloeosporioides* (P) y un tratamiento con agua destilada (C), todos los tratamientos se resumen en el Cuadro 6.2. La finalidad de incluir diferentes tratamientos testigo fue comparar la expresión de genes específicos que involucrados en las vías del AJ (*MYC2*, *ERF1*) o AS (*MAPK3*, *MAPK6*, *PR1*) con el tratamiento problema, lo cual aporta un indicio sobre la vía de señalización que se induce por fructanos. Aunado a lo anterior los tratamientos con agua y el fruto solo inoculado con el patógeno son fundamentales para determinar el comportamiento de los mismos genes en ausencia y presencia del patógeno.

Cuadro 6.2. Tratamientos y concentraciones aplicadas en los frutos de aguacate

Tratamiento	Concentración
Metil Jasmonato	0.1 mM
Ácido salicílico	5 mM
Fructanos	20%
<i>C. gloeosporioides</i>	$6 \times 10^6$ esp/mL
Agua destilada	---

A continuación, se describe la manera en que se aplicaron los tratamientos.

Se tomaron 50 aguacates en madurez intermedia, de tamaño homogéneo, sin lesiones visibles y aparentemente sanos. Para desinfectar los frutos, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar a aire libre. Se separaron en grupos de 10 frutos para la aplicación de los FAGP y los tratamientos testigo.

A los frutos seleccionados se les aplicaron los tratamientos por inmersión durante 1 min en soluciones de MeJ, SA, FAGP y agua destilada a las concentraciones mostradas en el Cuadro 6.2; posteriormente, se dejaron secar al aire libre, finalmente se les realizaron tres heridas por fruto de aproximadamente 5 mm con ayuda de un punzón. A los frutos correspondientes al patógeno, se les realizaron tres punciones por fruto y se inocularon con 40  $\mu$ L de una suspensión de  $1 \times 10^6$  esp/mL de *C. gloeosporioides*.

Para evaluar las respuestas tempranas y tardías durante la inducción del sistema de defensa, se tomaron muestras a tiempos cortos, intermedios y largos. Los tiempos cortos de muestreo fueron: 0, 0.5 y 1 h; los tiempos intermedios fueron 6, 12 y 24 h pos-tratamiento; los tiempos largos, 72 y 120 h pos-tratamiento. Los frutos fueron cortados en trozos de 0.5 cm a cada lado de las lesiones y con 0.5 cm de pulpa, inmediatamente se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (Figura 6.1).

Las muestras obtenidas de cada tratamiento a los diferentes tiempos seleccionados, se les evaluó la expresión de los genes *ERF1*, *MYC2*, *NPR1*, *MAPK3*, y *MAK6* por RT-PCR, para esto fue necesario obtener el RNA total de cada muestra.

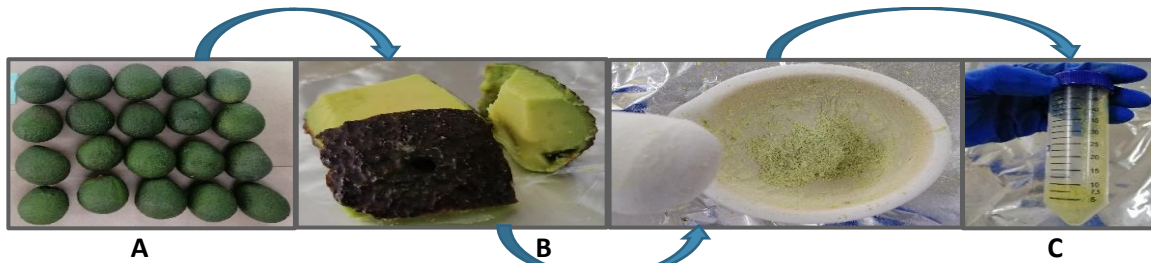


Figura. 6.1. Procedimiento general para la obtención de muestras de donde se extrajo el RNA total. **A:** aplicación de los tratamientos. **B:** obtención de las muestras. **C:** triturado y congelado de muestras **D:** almacenamiento de muestras.

### 6.3.1. Extracción de RNA en las muestras bajo estudio

De cada una de las muestras colectadas a los tiempos ya mencionados, se extrajo el RNA total partiendo en cada caso del tejido (exocarpio y endocarpio) de aguacate, éste se maceró en un mortero estéril con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que se colocó en un tubo estéril (Figura 6.1).

Posteriormente, se extrajo el RNA mediante el método de extracción de RNA propuesto por Djami-Tchatchou y Straker (Djami-Tchatchou & Straker, 2012), así como la cuantificación y determinación de la calidad del RNA extraído. Se tomaron 0.1 – 0.5 g de tejido previamente congelado con nitrógeno líquido, se agregó 0.5 – 1 mL de buffer de extracción previamente precalentado a 65 °C, al mismo tiempo, se adicionaron 30µL de β-mercaptoetanol, se mezcló en vórtex por 5 min; posteriormente se incubó a 65 °C por 5 – 10 min para lisar las células completamente. Después, se adicionaron 0.75 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vórtex y se centrifugó a 5000 rpm por 20 min a temperatura ambiente. Se tomó el sobrenadante y se adicionó ¼ del volumen con LiCl 10M, se incubó toda la noche (12 h) a -20 °C; transcurrido el tiempo se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min a 4 °C. Posteriormente se resuspendió la pastilla obtenida en 500 µL de buffer NaCl-SDS-TRIS-EDTA previamente precalentado a 60 °C y se incubó a 60 °C por 5 min, luego, se adicionaron 700 µL de cloroformo: alcohol isoamílico y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, el sobrenadante obtenido se colocó en un tubo nuevo y se añadió etanol al 100% para precipitar el RNA, manteniendo las muestras a – 70 °C por 1 h. Posteriormente se agregaron 850 µL de etanol y se centrifugó por 30 min

a 13 000 rpm a 4 °C, a continuación se realizó un lavado con 1 mL de etanol al 70 % y se centrifugó a 10 000 rpm por 2 min. Se dejó secar al aire libre en campana y se resuspendió en 50 – 100 µL de agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC), el cual es un compuesto que inactiva a las RNAsas . Finalmente el RNA obtenido se almacenó a -70°C hasta su uso.

### **6.3.2. Determinación de la integridad y concentración de RNA**

Para verificar la integridad del RNA total obtenido, se realizó un ensayo de electroforesis en geles de agarosa al 1%; las muestras fueron corridas a 75V. El RNA se tiñó con colorante Gel Red y se visualizó con un transiluminador con luz ultravioleta High Performance UVP, registrando la imagen en un fotodocumentador para su análisis.

Por otro lado se determinó la concentración del RNA utilizando un espectro genoma-nano, midiendo las muestras a una longitud de onda de 260 nm. Para verificar la pureza del RNA obtenido se tomó la relación de absorbancias 260/230 nm y 260/280 nm, este parámetro debe estar entre 1.8 y 2.0 para considerarse una muestra de RNA pura.

### **6.3.3. Tratamiento del RNA con DNasa I**

Para llevar a cabo el análisis de expresión genética, es importante que el RNA se encuentre libre de DNA. Para esto, se utilizó la enzima DNasa I, Amplification Grade (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del proveedor, las cuales se detallan a continuación:

Para la mezcla de reacción se tomó 1 µL de RNA total, 1 µL 10X DNase I Reaction buffer, 1 µL DNase Amplification Grade 1U/µL y agua DEPC hasta completar un volumen de 10 µL. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente se inactivó la enzima agregando 1 µL de EDTA 25 mM y se incubó a 65°C por 10 min.

Para verificar la integridad de las muestras de RNA total tratado con DNasa, las muestras obtenidas se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% a

75V, por 35 min. El RNA se tiñó utilizando el colorante Gel Red, y se visualizó mediante un transiluminador con luz ultravioleta adaptado a un equipo fotodocumentador Kodak Gel Logic 100 Imaging System.

Previo al análisis por RT-PCR se realizó el diseño de oligonucleótidos, indispensables para realizar la amplificación de cada gen. Los genes propuestos han sido estudiados en *Arabidopsis thaliana*, por lo que llevó a cabo un análisis de similitud de secuencias de cada uno de estos genes con el genoma de aguacate, con la finalidad de identificarlos en el genoma de interés y a partir de las secuencias de los genes propios del aguacate se diseñaron los oligonucleótidos para poder llevar a cabo la amplificación por PCR de los genes a evaluar.

#### **6.3.4. Similitud en genes de aguacate y diseño de oligonucleótidos**

La similitud de las secuencias se determinó utilizando el programa BLAST empleando la plataforma del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Una vez determinados los genes de mayor similitud para *MAPK3*, y *NPR1*, que son activados por el AS; así como, *MYC2* y *ERF1*, que son activados por el AJ, en el genoma de aguacate. Se procedió a realizar el diseño (secuencia) de los oligonucleótidos, para esto se usó el software NTIVector. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por una empresa especializada de acuerdo a las secuencias establecidas.

Una vez extraído el RNA, determinado su integridad, concentración y haber obtenido los oligonucleótidos específicos para cada gen, se procedió a realizar el análisis de la expresión génica por medio de la técnica RT-PCR.

#### **6.4. TERCER ETAPA: Análisis de la expresión de genes mediante Transcripción reversa (RT-PCR)**

Este procedimiento se realizó en dos pasos, primeramente, se llevó a cabo la obtención del cDNA de cada gen a evaluar y posteriormente el cDNA obtenido se empleó como templado para llevar a cabo la amplificación por PCR.

#### **6.4.1. Síntesis de cDNA**

Para realizar la síntesis del cDNA, es necesario realizar transcripción reversa, se utilizó RNA purificado y libre de DNA, utilizando la enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

En un tubo para PCR de 0.2 mL se realizó una mezcla con los siguientes componentes: 0.5 µL del oligo específico de cada gen, RNA tratado con DNasa, 0.5 µL dNTP'S 10 mM y agua libre de nucleasas. A continuación, la mezcla se incubó a 65°C por 5 min. Se colocó en hielo por 3 min y se centrifugó brevemente. Por otra parte, en un tubo para PCR de 0.2 mL, se añadieron los siguientes componentes: 2 µL de 5X First-Strand Buffer, 0.5 µL DTT 0.1M, 0.5 µL RNase OUT y 0.5 µL SSIII-RT.

El contenido de la segunda mezcla (3.5µL) se adicionó al primer tubo, se incubó a 55°C durante 50 min.. Para inactivar la enzima y detener la reacción de incubó a 70°C durante 15 min. El cDNA obtenido, se utilizó como molde para la amplificación mediante PCR de cada uno de los genes bajo estudio (*MAPK3*, *MAPK6*, *PR1*, *MYC2* y *ERF1*).

#### **6.4.2. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)**

Para la reacción de PCR se utilizó la enzima DreamTaq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific) de acuerdo con las especificaciones del proveedor.

En un tubo para PCR de 0.2 mL, se añadieron los siguientes componentes: 1 µL 10X DreamTaq Buffer, 0.25 µL dNTP'S 10 mM, 0.25 µL oligo Forward 10 µM y 0.25 µL Reverse 10 µM, 1 µL cDNA (100 ng) y DreamTaq DNA Polymerase 0.1µL y agua destilada estéril hasta completar 10 µL. La reacción de PCR se llevó a cabo tomando en cuenta la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos de cada gen específico, el programa que se empleó para la amplificación fue de 94°C durante 5 min, 30 ciclos (94°C durante 30 s, 60°C durante 30 s, 72°C durante 30 s) y finalmente 72°C durante 10 min.



Para verificar el nivel de amplificación de cada gen estudiado, los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% a un voltaje de 75V por 35 min y se visualizaron en un transiluminador UV, registrando la imagen en un fotodocumentador para su posterior análisis.

#### **6.4.3. Análisis de los patrones de expresión génica**

La intensidad de banda obtenida por PCR se considera proporcional a la cantidad de producto amplificado. Para comparar los niveles de expresión de cada gen, el análisis de la imagen de la banda del producto de PCR se midió mediante su intensidad por el software imageJ (National Institutes of Health, E.U.A.). Se realizó una medición semicuantitativa de las bandas de los productos PCR obtenidos para cada gen analizado y se compararon con la expresión de un gen constitutivo como la  $\beta$ -actina (gen control). Con el valor de intensidad relativa de los genes, los datos se normalizaron respecto al gen  $\beta$ -actina y se calcularon con la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de la intensidad} = \frac{\text{intensidad relativa del gen de interés}}{\text{intensidad relativa del gen constitutivo}} \quad (\text{Ec } 6)$$

En los análisis de expresión genética es imprescindible incluir un gen que pueda ser referencia de control de carga, con este fin se emplean genes que son constitutivos, es decir, que se están expresando todo el tiempo, tal es el caso del gen constitutivo  $\beta$ -actina. Ya que la expresión del gen de actina permanece relativamente constante, esta relación indica directamente la variación de expresión de los genes problema (Salazar-Montes et al., 2013).

A partir de los patrones obtenidos en la expresión de los genes evaluados bajo el tratamiento con los FAGP, se realizó una comparación con los genes que se han reportado que se inducen en respuesta al AJ o AS para discriminar cuál es la ruta de señalización que los fructanos inducen para generar la resistencia en el fruto contra el patógeno.

De acuerdo a los datos obtenidos del análisis se propuso un modelo de acción de los fructanos para la inducción del sistema de defensa.

## **CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. PRIMER ETAPA. Pruebas *in vivo* e *in vitro* para determinar efecto de los fructanos

#### 7.1.1. Evaluación de distintos tipos de fructanos *in vivo* para determinar el tratamiento más efectivo contra la antracnosis en frutos de aguacate.

Existe en la literatura evidencia que distintos tipos de fructanos pueden inducir el sistema de defensa en algunos frutos (Ceusters, et al., 2016; Rensburg, et al., 2020; Svara, et al., 2020; Tarkowski, et al., 2019; Tattersall, et al., 1997), por lo que se procedió a aplicar FOS, inulina, FMGP, FAGP y FNA en frutos de aguacate para después inocularlos con el hongo *C. gloeosporioides*. Una vez infectados, se evaluó el desarrollo de la enfermedad. En la Figura 7.1 se muestran los síntomas de la antracnosis en los frutos al día 7 post-inoculación. Se puede observar que el control inoculado con *C. gloeosporioides*, presenta una lesión color negra, circular, con presencia de micelio, se aprecia ablandamiento de la pulpa y la formación de cavernosidades; como se puede notar, la antracnosis se desarrolla de manera similar al control en los tratamientos de FOS, Inulina, FMGP y FNA, en contraste con el tratamiento de FAGP donde se aprecia una delimitación de la enfermedad, se puede observar el micelio característico de *C. gloeosporioides*, pero la lesión no se extiende y no hay ablandamiento de pulpa.



Figura. 7.1. Frutos de aguacate con la aplicación de distintos tipos de fructanos a los 7 días postinoculación.

Se midió la severidad de las lesiones de los frutos, el análisis estadístico de los datos indica que todos los fructanos, a excepción de los FOS, presentaron diferencias significativas respecto al control, es decir, todos los tratamientos tuvieron un menor desarrollo de las lesiones. Se observó que en frutos de aguacate, los FAGP tuvieron un mejor efecto (Cuadro 7.1), pues en este tratamiento se presenta una severidad de la enfermedad del 44.93%, o sea que disminuyó en un 55% la severidad de las lesiones. En orden de eficacia están los FMGP con 44% de disminución de la severidad, FNA (41%) e inulina (37%). Los FOS fue el tratamiento con menor efecto, pues solo lograron disminuir en un 6%, la severidad de las lesiones.

Cuadro 7.1. Porcentaje de severidad al aplicar distintos tipos de fructanos.

<b>Porcentaje de severidad al aplicar de distintos tipos fructanos</b>		
Tratamientos	Diámetro de la lesión	%Severidad
Control	12.98 ± 1.6 B	
FOS	11.89 ± 1.38 B	93.14
Inulina	7.05 ± 1.38 A	62.91
FMGP	6.51 ± 1.38 A	56.52
FAGP	4.18 ± 1.38 A	44.93
FNA	6.4 ± 1.38 A	58.79

Se presentan las medias ± desviación estándar (P= 0.000240) Las letras mayúsculas diferentes entre filas muestran diferencias significativas.

Se ha reportado que al aplicar inulina y FOS a hojas de *A. thaliana* e infectarlas con *B. cinerea*, se observó una disminución de casi el 20% de las lesiones en comparación con hojas sin tratar (Rensburg, et al., 2020); lo anterior es comparable con los resultados obtenidos, pues se encontró una disminución de la severidad de la antracnosis del 37% en aguacates tratados con inulina. En el mismo estudio, se utilizaron oligosacáridos encontrando que este fue su mejor tratamiento, pues logró una disminución del 32% en la severidad de las lesiones,

contrario a lo que se encontró en el presente proyecto, pues los FOS, presentaron casi nula disminución en la severidad de las lesiones. Las diferencias entre los resultados pueden deberse a que los tratamientos se aplicaron a distintos modelos vegetales, los cuales pueden responder de diferente manera a estas moléculas.

Como ya se mencionó anteriormente, los FAGP resultó ser el mejor tratamiento en frutos de aguacate, por lo que fue el tratamiento elegido para los análisis posteriores. Una vez determinado a los FAGP como el mejor tratamiento, se evaluaron distintas concentraciones de éste para determinar la más adecuada en el control de la enfermedad en los frutos.

### **7.1.2. Determinación de las concentraciones óptimas de FAGP para inhibir al patógeno en el fruto en evaluaciones *in vivo***

Para determinar la mejor concentración para inhibir la antracnosis en el fruto, se probaron diferentes concentraciones de FAGP: 1, 1.5, 2, 5, 10, 15 y 20%. Las pruebas mostraron que a los 7 días después de la inoculación (dpi) con el hongo, en todas las concentraciones utilizadas se observó una disminución de los síntomas de la antracnosis ocasionada por el patógeno de manera dosis-dependiente, a concentraciones altas (15 y 20%), los síntomas fueron menos severos (Figura 7.2). Un hallazgo interesante fue que a la concentración de 20%, se observó la formación de una película que favoreció a la apariencia visual del fruto, mostrándose brillante, además se pudo observar de manera visual un retraso en la maduración y el deterioro postcosecha del fruto.

Debido a lo anterior, se seleccionaron para la evaluación de los parámetros de severidad e incidencia de la antracnosis las concentraciones de 15 y 20% de FAGP.

### **7.1.3. Evaluación del desarrollo de la antracnosis en frutos de aguacate**

La antracnosis es una enfermedad que ataca a distintos frutos tropicales, entre ellos el aguacate. Se ha reportado que en cada fruto esta enfermedad tiene un comportamiento y características distintas, inclusive éstas pueden variar según la variedad y cultivar del fruto (Mulkay, et al., 2010). Debido a lo anterior, se realizó

un seguimiento de la enfermedad causada por *C. gloeosporioides* en aguacate Hass, con la finalidad de conocer la evolución natural de la enfermedad a lo largo del tiempo y lograr determinar los tiempos de muestreo para los análisis genéticos, tema central de este proyecto.

Siguiendo el desarrollo de la enfermedad, en la Figura 7.2 A se muestra que al tercer día post inoculación en el sitio de punción, comienza a formarse el micelio del hongo; a los 5 días, aparece la lesión característica de la antracnosis en la periferia del sitio de punción (Figura 7.2 B); y a los 7 días, se evidencia el avance de la enfermedad con un crecimiento considerable de la lesión (Figura 7.2 C), adicionalmente, se aprecia la formación de cavernosidades y ablandamiento de la pulpa. Con base en el comportamiento de la enfermedad en los frutos bajo estudio, se estableció (para evaluar los patrones de expresión de genes involucrados en el sistema de defensa vegetal) una ventana de 0 a 120 dividida en tiempos cortos (0, 0.5 y 1 horas post-tratamiento), intermedios (6,12 y 24 horas post-tratamiento) y largos (72 y 120 horas post-tratamiento). Con este análisis de expresión se espera conocer si la defensa del fruto permanece activa en los tiempos intermedios y largos en respuesta a los FAGP o si se induce solo en tiempos cortos, ya a estos tiempos se empieza a apreciar el desarrollo del hongo (día 3) y se observan los síntomas de la enfermedad (día 5).

El muestreo en los tiempos cortos se fundamenta en que las plantas y frutos requieren de respuestas rápidas y eficaces en contra de agentes que puedan generar daño a sus estructuras (Rodríguez-López, et al., 2009). Los sistemas de defensa se activan de inmediato en la interacción fruto-patógeno, sin embargo, la respuesta de cada sistema vegetal es variable y resulta importante hacer un análisis (con base en los niveles de expresión genética) de la temporalidad de la activación del sistema de defensa.

Con el fin de investigar cuánto tiempo permanece la activación del sistema de defensa, se contemplaron tiempos de muestreo intermedios y largos, sustentados como ya se mencionó en cómo se fue desarrollando la enfermedad en el fruto.

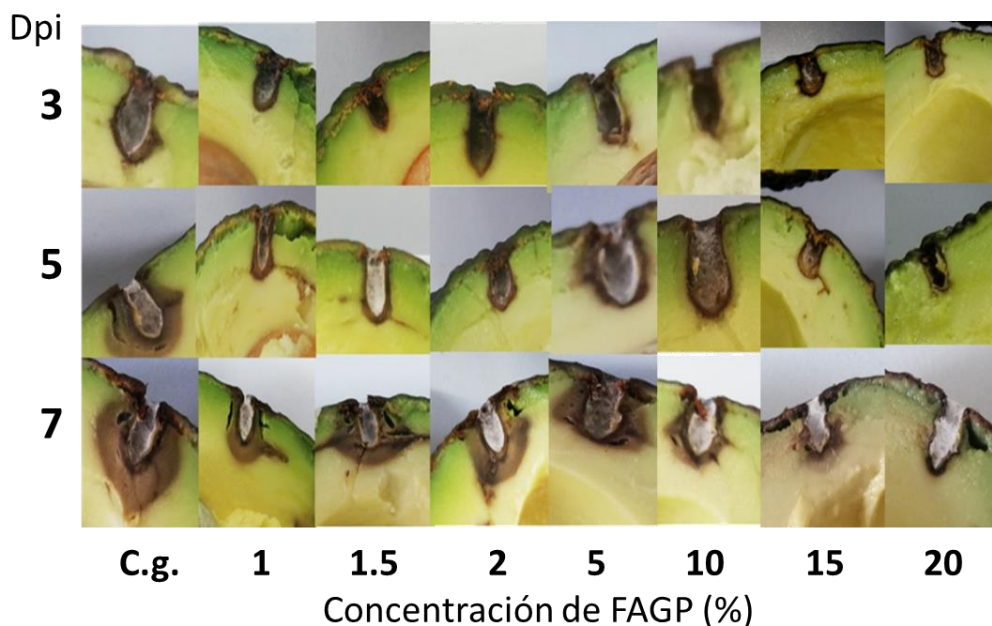


Figura. 7.2. Efecto de la aplicación de FAGP en frutos de aguacate post inoculación con *C. gloeosporioides*. (Dpi: días postinoculación).

Cabe señalar que el desarrollo de la antracnosis en los frutos de aguacate (Figura 7.2), coincidió con los resultados encontrados por Rodríguez-López et al., 2009, donde se menciona que la fase asintomática de la infección por *C. gloeosporioides* en frutos de aguacate, es en las primeras 48 h post inoculación y que a partir de este momento se desarrollan hifas necrotróficas que degradan las paredes celulares cercanas al sitio de infección. Debido a lo anterior, se decidió que los tiempos intermedios para evaluación de la expresión fueran 6, 12 y 24 h; ya que en esta fase del desarrollo de la enfermedad, aún se considera asintomática pero en el fruto ya se generan cambios a nivel molecular para el ataque contra la enfermedad.

#### **7.1.4. Evaluación de la severidad e incidencia de la antracnosis en frutos de aguacate tratados con FAGP**

Para evaluar la severidad e incidencia de la antracnosis en los frutos una vez tratados e infectados con el hongo, se monitoreó el desarrollo de la enfermedad a los días 3, 5 y 7 pos-inoculación, con la aplicación de las concentraciones de FAGP del 15 y 20%, las cuales resultaron ser las más efectivas para el control del hongo. En los frutos se midió el diámetro de las lesiones y la ocurrencia de la enfermedad. Al día 7 del desarrollo de la enfermedad, se encontró que los frutos tratados con FAGP al 20% presentaron una incidencia del 80%, para los tratados con FAGP al 15% hubo una incidencia de la enfermedad del 100%. Por otro lado, para la severidad se presentó un 65.95 y 55% para los FAGP al 15 y al 20%, respectivamente. Lo anterior indica que los fructanos tienen la capacidad de inducir el sistema de defensa del fruto de aguacate. Tarkowski, et al., 2019, reportaron que al aplicar fructanos tipo inulina en hojas *A. thaliana* e infectarlas con *B. cinerea* se mostró una disminución entre el 19 y el 22% en la severidad de la enfermedad (Tarkowski, et al., 2019).

Los resultados revelan diferencias significativas entre los tratamientos y el control ( $p=0.0001$ ). En la Figura 7.3, se muestra que el diámetro de las lesiones es menor en la concentración del 20%. Debido a que se presentaron mejores resultados al aplicar la concentración al 20%, se eligió esta concentración de FAGP para realizar los análisis de expresión genética para evaluar genes específicos, que son regulados por AJ o AS y de esta manera poder avanzar en el entendimiento del mecanismo por el cual los fructanos pueden activar el sistema de defensa del aguacate contra el hongo fitopatógeno *C. gloesporioides*.



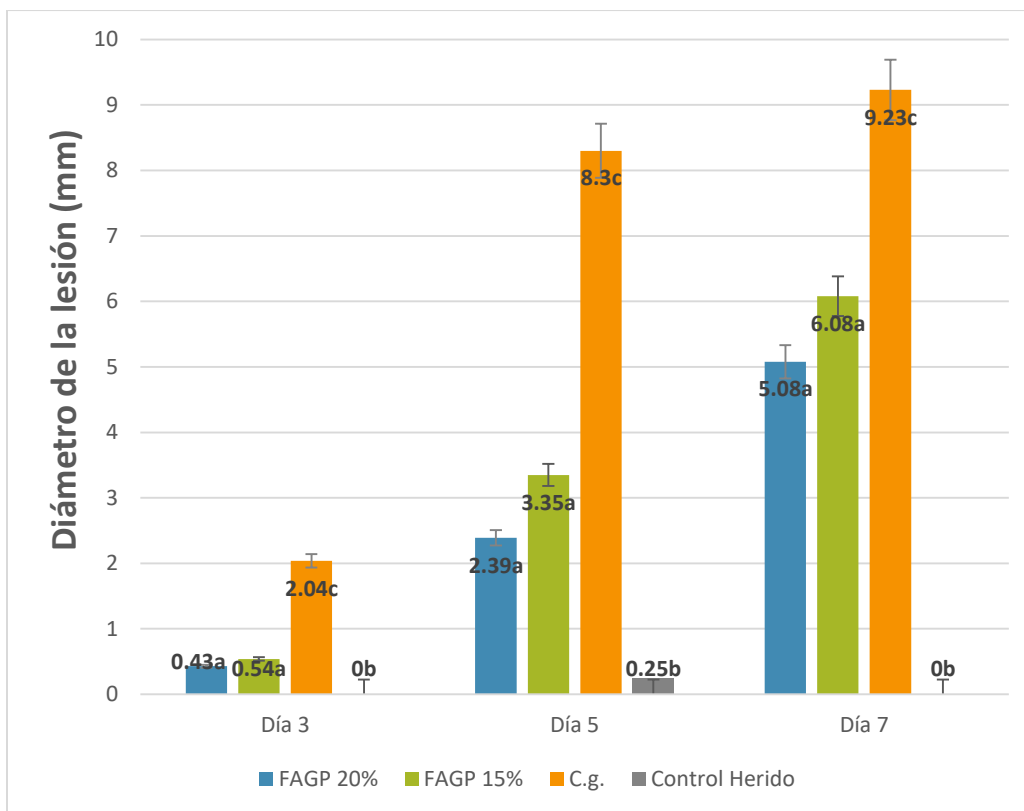


Figura. 7.3. Análisis del desarrollo de las lesiones tras la aplicación de los FAGP en frutos de aguacate. Se presentan las medias  $\pm$  desviación estándar ( $p=0.00$ ). Las letras minúsculas diferentes entre tratamientos muestran diferencias significativas (Fisher  $LSD < 0$ ).

#### 7.1.5. Evaluación del efecto antifúngico de los FAGP *in vitro*

Una vez que se mostró que los FAGP presentaron un efecto en el control de la antracnosis en pruebas *in vivo*, la interrogante en este punto fue si este biopolímero podría actuar directamente sobre el hongo, para ello se realizaron pruebas *in vitro* para poder determinar si los fructanos además de su capacidad inductora del sistema de defensa vegetal, presentaban actividad antifúngica, para ello se midieron los parámetros de inhibición del crecimiento micelial, porcentaje de esporulación y germinación de esporas de *C. gloeosporioides* crecido en diferentes concentraciones de FAGP.

#### 7.1.5.1. Determinación de inhibición del crecimiento micelial

El crecimiento del hongo *C. gloeosporioides* en presencia de los FAGP mostraron un crecimiento algodonoso y con una coloración del micelio de color blanco, estas características corresponden con las de este fitopatógeno. Cabe destacar que el crecimiento del hongo fue mayor al añadirle los FAGP en sus distintas concentraciones respecto al control, tal como se muestra en la Figura 7.4. Lo anterior ha sido descrito por Cerón en 2006 (Cerón Rincón, et al., 2006), quien encontró que *C. gloeosporioides f. alatae* presentó un mayor crecimiento en medios con una alta concentración de sacarosa, tal como el medio Czapeck y una modificación del mismo con ñame, lo que le brindó una mayor concentración de azúcares. Esto puede sugerir que el hongo tiene mayor afinidad para el aprovechamiento de los azúcares presentes en los medios enriquecidos con FAGP, los cuales si bien, están enriquecidos de fructanos con grado de polimerización mayor a 30, representando un 12.47 %, también contienen 46.48 % de fructanos de medio GP (10-30 unidades), 34.48% de fructo-ligosacaridos (Gpa-9) y 6.56 % de residuos de fructosa, glucosa y sacarosa; y por lo tanto y agregando la estructura ramificada de las agavinas, las cuales presentan mayor sitios de hidrólisis que los fructanos lineales, se explica el mayor crecimiento del hongo.

Las pruebas estadísticas mostraron que existen diferencias significativas entre todos los tratamientos respecto al control. La comparación de medias nos muestra que a todas las concentraciones existe un efecto positivo en el crecimiento del hongo, es decir, tuvo mayor desarrollo. Es posible observar que a mayor concentración de FAGP, hay un mayor crecimiento del hongo, inclusive las mayores concentraciones (10, 15 y 20%) completaron el crecimiento de la caja a los 11 días, mientras que el control y concentraciones más bajas tardaron hasta 14 días en completarse (Cuadro 7.2), esto nos indica que el hongo está aprovechando a los fructanos como fuente de carbono. Los resultados obtenidos en este trabajo son dispares a los reportados por Martínez-Ortega et al., en 2018, quienes reportan que al utilizar fructanos de agave al 25% contra *Salmonella*

*typhimorium* obtuvieron inhibición en el crecimiento de ésta (Martínez-Ortega, et al., 2018). Las diferencias obtenidas entre ambas investigaciones, pueden explicarse debido a las diferencias fisiológicas entre los microorganismos evaluados, posiblemente *C. gloeosporioides* aprovecha de manera más eficiente a los azúcares presentes, que la bacteria *S. typhimorium*.

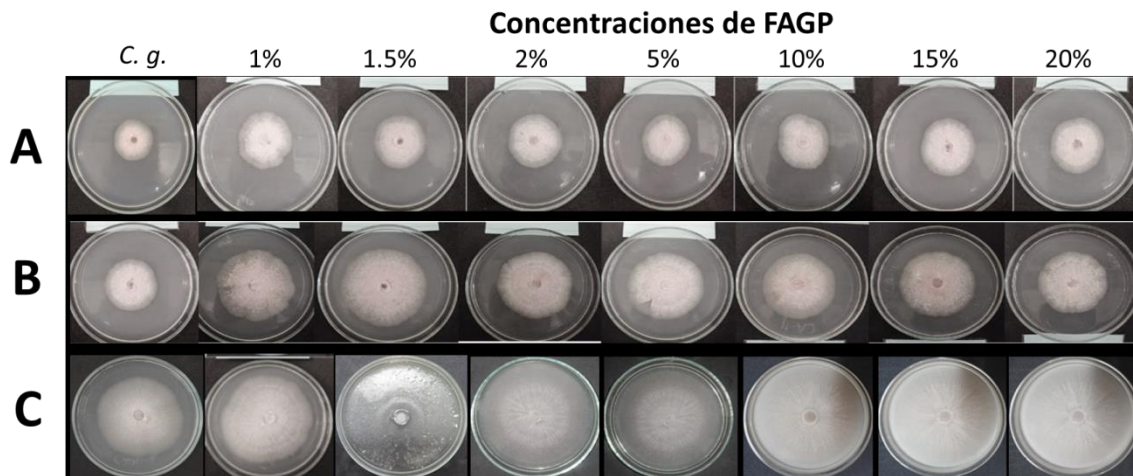


Figura. 7.4. Crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides* con las diferentes concentraciones de FAGP en cajas de petri con medio PDA. **A:** 5 días de desarrollo; **B:** 7 días de desarrollo; **C:** 11 días de desarrollo

Las pruebas *in vitro* demostraron que los FAGP no poseen actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides*. Esto es similar a lo reportado al evaluar el crecimiento de *B. cinérea* tras la aplicación de fructanos tipo levano, pues se encontró que el crecimiento del hongo fue mayor comparado con el control sin fructanos (Rensburg, et al., 2020). Estos resultados son interesantes y relevantes ya que sugieren que los fructanos actúan como inductores del sistema de defensa y pueden mejorar la respuesta inmune en el fruto, activando diferentes vías de señalización involucradas en la defensa, más que inhibir directamente el crecimiento del hongo.

Cuadro 7.2. Efecto in vitro de los FAGP sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides*

<b>Inhibición del crecimiento micelial</b>		
Tratamiento	Crecimiento micelial (mm)	%ICM
<i>C. gloeosporioides</i> (control)	90±1.18ab	
FAGP 1%	84.75±0.75c	-10
FAGP 1.5%	89±0.75a	-16
FAGP 2%	89.30.87a	-16
FAGP 5%	89±0.75a	-16
FAGP 10%	90±0.87a	-17
FAGP 15%	90±0.87a	-17
FAGP 20%	90±0.75a	-17

Se presentan las medias ± desviación estándar (p=0.000). Las letras minúsculas diferentes entre filas muestran diferencias significativas entre los resultados.

#### 7.1.5.2. Determinación del número de esporas (Esporulación)

El proceso de esporulación es otro parámetro importante para evaluar el desarrollo de los hongos. Al evaluar el efecto de los FAGP sobre la esporulación de *C. gloeosporioides*, se observó que no tuvieron efecto sobre este parámetro. Es posible observar en la Figura 7.5 que existe una ligera disminución en la esporulación con las concentraciones de 5, 10 y 15%, sin embargo, estadísticamente estas diferencias no resultaron significativas.

La concentración evaluada de esporas por mL en el control fue de  $15.1 \times 10^9$ , en los tratamientos la concentración varió según las concentraciones aplicadas, pero estuvieron en el rango de  $10^9$ , se apreció una disminución hasta  $13.4 \times 10^9$  esporas/mL, pero estadísticamente la reducción en la esporulación no resultó significativa en ninguna de las concentraciones de FAGP evaluadas.

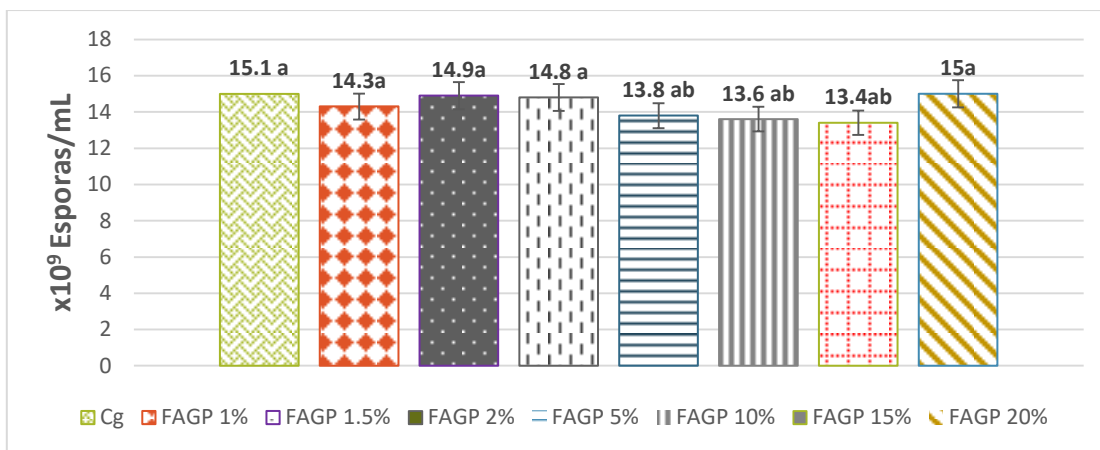


Figura. 7.5. Efecto de los FAGP en la esporulación de *C. gloeosporioides*. Se presentan las medias  $\pm$  desviación estándar ( $p=0.001$ ). Las letras minúsculas diferentes entre columnas muestran diferencias significativas entre los resultados (Fisher LSD $<0.05$ )

En un estudio reciente se evaluaron a los fructanos para valorar el crecimiento de *B. cinerea in vitro*, encontrando que no existen diferencias en la esporulación y germinación de esporas, respecto a los tratamientos sin fructanos, lo que concuerda con los hallazgos de esta investigación (Rensburg, et al., 2020).

Existen algunos compuestos orgánicos que sí muestran un efecto antifúngico, tal es el caso del quitosano de bajo peso molecular que al ser evaluado *in vitro* sobre la esporulación de *Colletotrichum* sp. aislado de aguacate, muestra una relación inversa entre la concentración del tratamiento y el % de esporulación. Al utilizar una concentración de 1.5% de quitosano, se obtuvo una disminución en la esporulación entre 29 y 51% (Xoca-Orozco, L. A., et al., 2018). Otro estudio muestra una disminución del 84.2% al utilizar quitosano de peso molecular medio al 1.5% (Bautista-Baños, et al., 2003). Esto se debe a que la actividad antifúngica del quitosano se basa en la modificación de la permeabilidad de la membrana plasmática debido a la interacción de los grupos amino libres positivamente cargados con las macromoléculas de la pared celular del hongo, desestabilizando los procesos de transporte en ambos sentidos (Xoca-Orozco, L. A., et al., 2018). Los fructanos no poseen grupos amino libres u otra característica que le permita

desestabilizar la pared celular del hongo, por lo que difieren con los hallazgos ya mencionados.

### 7.1.5.3. Porcentaje de germinación de esporas

Los resultados de la germinación de esporas fueron similares entre las distintas concentraciones de FAGP utilizadas y el control como se puede observar en la Figura 7.6. Lo anterior muestra que los fructanos no afectan los procesos de desarrollo del hongo y las esporas producidas germinan sin problema. Los hallazgos resultan relevantes ya que el efecto que estarían ejerciendo los FAGP es el de inductor del sistema de defensa del sistema vegetal ya que no estarían actuando directamente sobre la inhibición del hongo sino “despertando” a nivel molecular los proceso por los cuales el fruto, en este caso de aguacate se hace más resistente al ataque del hongo *C. gloeosporioides*.

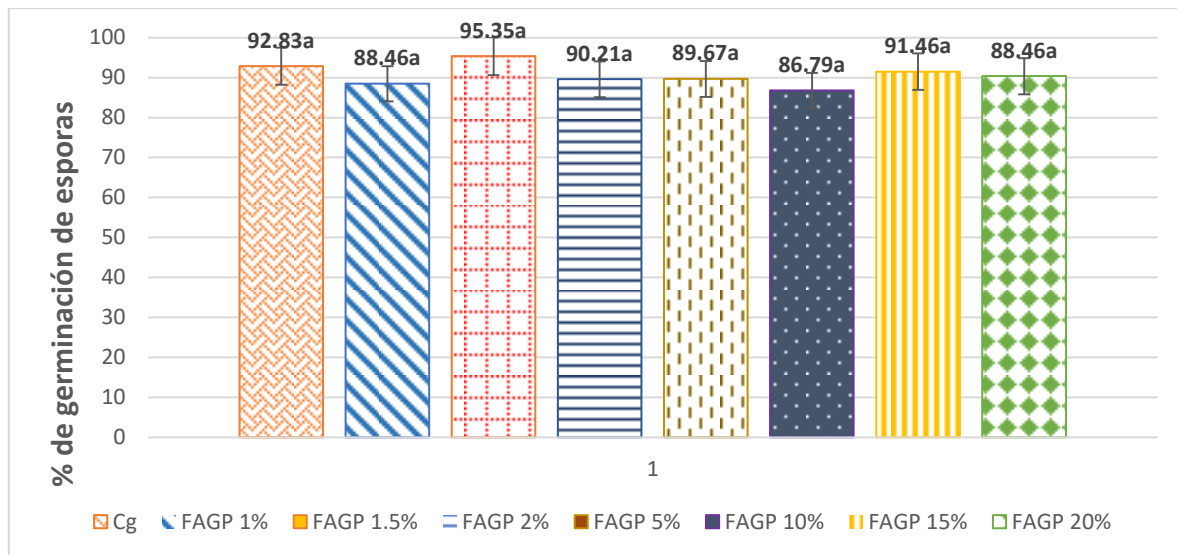


Figura. 7.6. Efecto de los FAGP en el porcentaje de germinación de esporas en *C. gloeosporioides* a las 9 h de haberse inoculado en discos de agar PDA. Se presentan las medias  $\pm$  desviación estándar ( $p=0.2$ ). Las letras minúsculas diferentes entre columnas muestran diferencias no significativas entre los resultados (Fisher LSD $<0.05$ )

## 7.2. SEGUNDA ETAPA. Aplicación de los tratamientos *in vivo* para la obtención de RNA total

Se aplicaron los FAGP y los tratamientos testigo a los frutos, se tomaron las muestras a los diferentes tiempos seleccionados y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción de RNA, tal como se describe a continuación.

### 7.2.1. Extracción de RNA total de las muestras bajo estudio

Se realizaron pruebas para la extracción de RNA con el reactivo TriZol empleándose de acuerdo a las especificaciones del fabricante, con este método no se logró obtener RNA íntegro, esto debido a que las muestras contenían tanto epicarpio como exocarpio, este último que constituye la cáscara del fruto contiene un alta concentración de compuestos fenólicos mismos que son capaces de degradar al RNA, como se muestra en la Figura 7.7. Estos problemas de extracción han sido descritos desde el 2012, por Djami-Tchatchou. Se menciona que la gran cantidad de metabolitos secundarios tales como polisacáridos y compuestos fenólicos co-precipitan junto con los ácidos nucleicos. Lo anterior, se previene con la adición de  $\beta$ -mercaptoetanol como agente reductor, CTAB como detergente y cloroformo-alcohol isoamílico en lugar de fenol, para remover proteínas (Djami-Tchatchou & Straker, 2012). Otras investigaciones muestran que otros frutos con alto contenido de polisacáridos y compuestos fenólicos también presentan estos problemas de extracción (Martínez-López, et al., 2013). Debido a lo anterior, se procedió a estandarizar otro método de extracción.

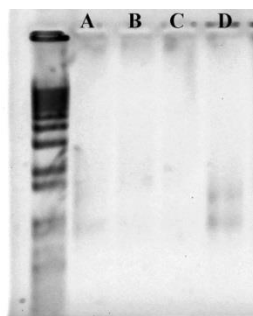


Figura. 7.7. Electroforesis de extracción de RNA total con el método TriZol para las muestras del tiempo cero de los tratamientos Control agua (A), FAGP al 20% (B), Ácido salicílico (C) y patógeno (D).

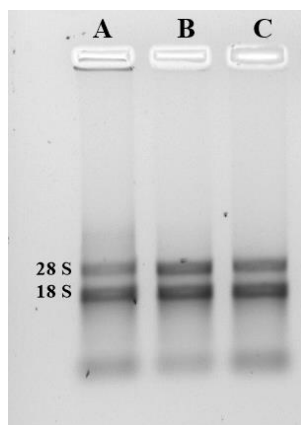


Figura. 7.8. Electroforesis de RNA total para para muestras del tiempo cero de FAGP 20% (A), AS (B) y patógeno (C).

Se estandarizó la metodología de extracción de RNA total con el método propuesto por Djami-Tchatchou (Djami-Tchatchou & Straker, 2012) para tres muestras del tiempo cero (FAGP 20%, AS y patógeno) y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar la presencia de RNA con las bandas 28S y 18S (Figura 7.8), las cuales muestran la presencia de RNA ribosomal (Martínez-Hernández, et al., 2010). La integridad del RNA se puede evidenciar por la presencia de los fragmentos correspondientes a los RNA's ribosomales, ya que este RNA es el más abundante en la célula, se asume por tanto que al estar presentes estas bandas de manera definida los RNA's mensajeros se encuentran de la misma manera íntegros.

Una vez que se estandarizó la metodología con las muestras presentadas en la Figura 7.8, se obtuvo el RNA del total de todas las muestras. En la Figura 7.9 se muestran los geles de agarosa con las extracciones de RNA total de todas las muestras en estudio. Se puede apreciar el RNA de las muestras obtenidas del tratamiento control agua (1) AS (2), AJ (3), las inoculadas con el patógeno *C. gloeosporioides* (4) y los FAGP 20% (5), en donde los carriles que van del A – H, corresponden a los tiempos de obtención de las mismas, 0, 0.5, 1, 6, 12, 24, 72 y 120 h, respectivamente.



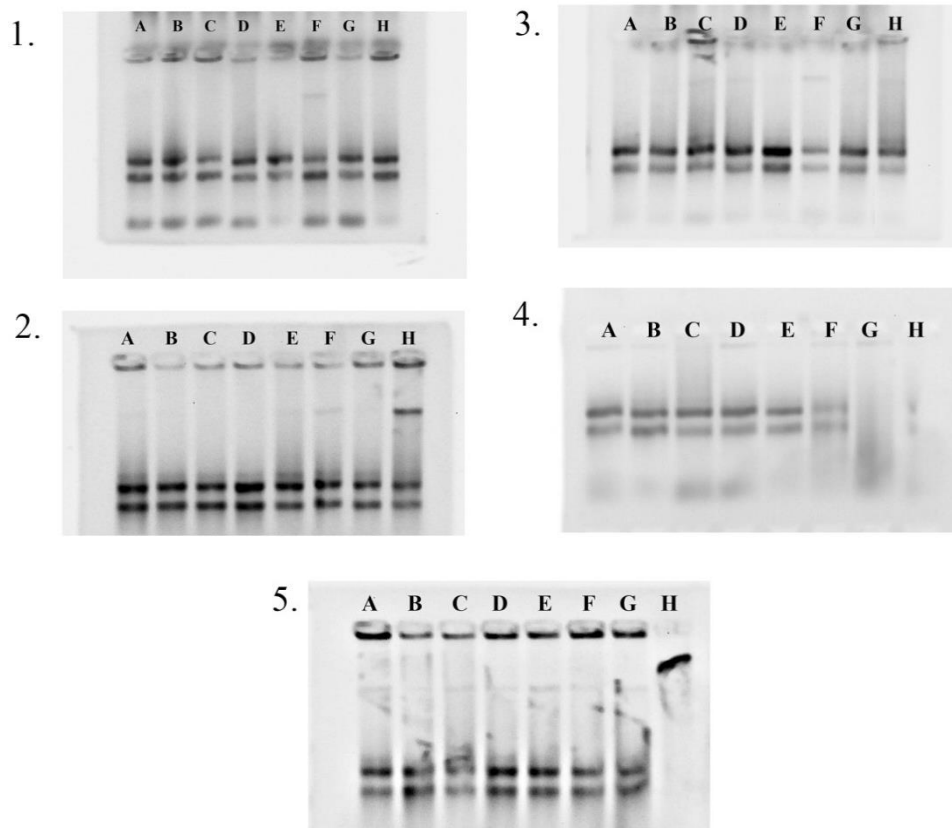


Figura. 7.10. Electroforesis de RNA total para muestras de los tratamientos: Control agua (1), AS (2), AJ (3), inoculadas con el patógeno (4) y FAGP al 20% (5). Los carriles de la A-H, corresponden a los tiempos 0, 0.5, 1, 6, 12, 24, 72 y 120 h, respectivamente.

En la Figura 7.9.5, en los carriles G y H se aprecia un barrido, lo que indica la presencia de material genético degradado, estas muestras corresponden a los frutos que fueron inoculados con *C. gloesporioides* a los tiempos de 72 y 120 h después de ser inoculados, es decir cuando la enfermedad ya comenzaba a desarrollarse dañando el tejido vegetal, se repitió la extracción de ambas muestras en repetidas ocasiones, sin lograr obtener RNA íntegro, tal como se muestra en la Figura 7.10.

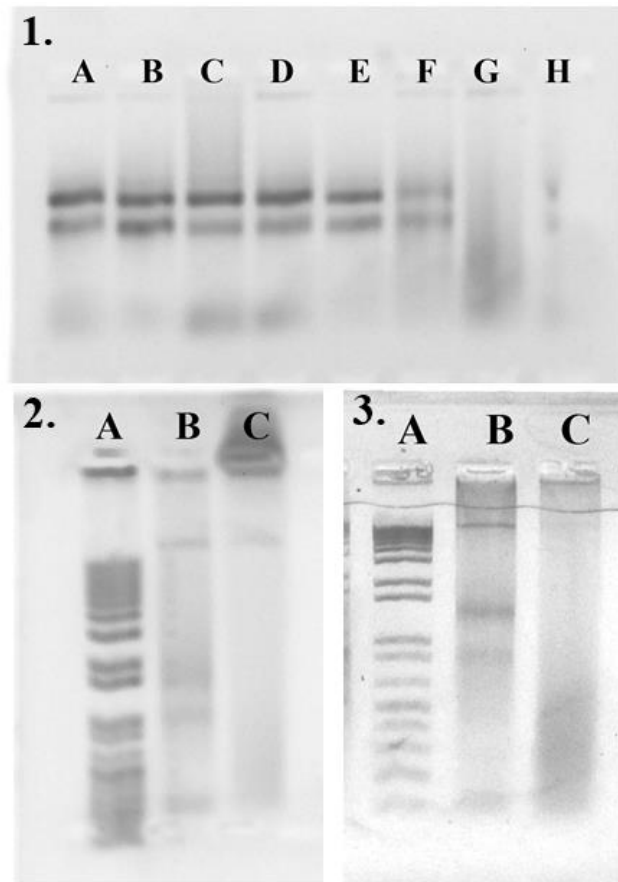


Figura. 7.11. Extracción de RNA total de las muestras inoculadas con patógeno en los tiempos 72 (1G, 2B y 3B) y 120 (1H, 2C y 3C) horas.

La ausencia de RNA viable en las muestras del patógeno a las 72 y 120 h, es debido a que la fase asintomática de la enfermedad ha concluido y comienza la acción de enzimas degradadoras de pared, tales como cutinasas y pectinasas; pues en este punto comienza la fase necrotrófica de la enfermedad (Rodríguez-López, et al., 2009). Por consiguiente las muestras de los frutos inoculados con el patógeno colectadas a los tiempos 72 y 120 h no se utilizaron para los análisis de expresión genética.

### 7.2.2. Digestión con DNasa del RNA obtenido

Una vez obtenido el RNA de todas las muestras, se procedió a realizar una digestión con la enzima DNasa I (Invitrogen) ya que es indispensable que los muestras de RNA que serán empleadas para evaluar la expresión de genes se encuentren completamente libres de DNA y así evitar falsos positivos. A continuación, en la Figura 7.11, se muestra la digestión de dos muestras para el tiempo 0 h, de las muestras control (**A** y **B**) y FAGP al 20% (**C** y **D**). En los carriles A y C, se observa una banda en la región superior (indicada con flecha), que corresponde al DNA presente en la muestra, misma que no se observa en los carriles B y D; lo que habla de una correcta degradación del DNA contaminante. El proceso de digestión con DNasa fue aplicado a todas las muestras bajo estudio. Posteriormente se realizó la síntesis del cDNA a partir del RNA obtenido y se almacenó a -20°C hasta la realización de las RT-PCR's.

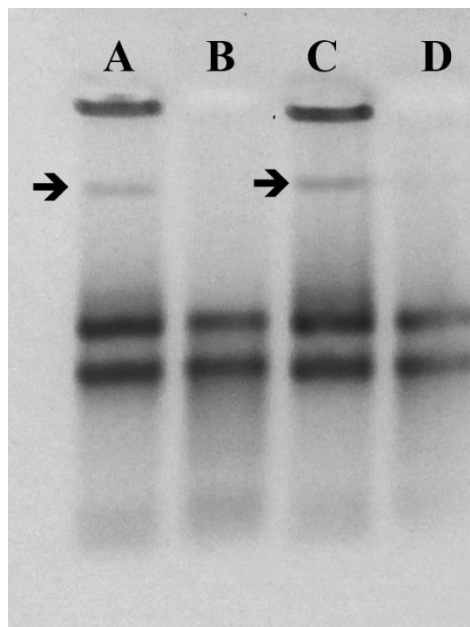


Figura. 7.12. Digestión del RNA con DNasa. Muestras del tratamiento con control agua a los tiempos 0 (A) y 0.5 (C) h sin tratar, así como las muestras tratadas con DNasa (B y D).

A la par de la obtención y limpieza del RNA se realizó una investigación bibliográfica para sustentar la selección de los genes a evaluar, así como la búsqueda de la presencia de éstos en el genoma del aguacate y el diseño de oligonucleótidos, tal como se describe a continuación.

### **7.2.3. Búsqueda de genes que participan en la señalización de AS ó AJ en el genoma de aguacate**

Las vías de señalización mediadas por AS o AJ involucradas en la activación del sistema de defensa vegetal, han sido reportadas en plantas modelo como *A. thaliana*. Para extrapolar el modelo a otros casos como el aguacate, es necesario realizar una búsqueda de los genes clave en la señalización del AS o AJ, previamente reportados (en *A. thaliana*) para corroborar que se encuentran en el genoma de aguacate, lo que sustentaría que estos procesos se pudieran estar llevando de manera similar. Para llevar a cabo esto es necesario realizar una comparación de las secuencias de los genes de interés mediante un análisis BLAST (Basic Local Alignment Searching Tool).

El análisis BLAST es una herramienta que nos permite realizar comparaciones entre secuencias, estas pueden ser de distintos genomas, individuos, etc; con la finalidad de encontrar similitud entre ellos. Durante este estudio se llevó a cabo este análisis para determinar que los genes de interés *NPR1*, *MAPK3* y *MAPK6* mediados por AS y *ERF1* y *MYC2* mediados por AJ, y que participan en respuestas de defensa, tengan un gen similar en aguacate.

Se realizó la búsqueda en el genoma del aguacate (*P. americana* Mill) de los genes bajo estudio que han sido identificados previamente *A.thaliana* utilizando la base de datos del NCBI. Las secuencias seleccionadas en aguacate fueron también comparadas con el genoma del tomate (*Solanum lycopersicum*), debido a que una gran parte de este genoma se encuentra anotado, lo que aporta la ventaja de conocer la función del gen en un fruto climatérico como lo es el aguacate. Se eligieron las secuencias con mayor similitud a ambos genomas (*Arabidopsis* y tomate), tal como se muestra en el Cuadro 7.3.

Cuadro 7.3. Alineamientos de los genes propuestos para el diseño de oligonucleótidos.

Porcentaje de similitud de genes de <i>Arabidopsis</i> en el genoma de aguacate					
Ruta	Nombre	Descripción	Posición	Query cover (%)	Porcentaje de identidad (%)
Ácido jasmónico	ERF1	ethylene response factor 1	240244 a 240518	28	74.1
	MYC2	Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding family protein	91866 a 92449	100	67.17
Ácido Salicílico	PR1	pathogenesis-related protein 1	73189 a 73289	26	77.23
	MAPK6	MAP kinase 6	339637 a 339976	35	80.29
	MAPK3	MAP kinase 3	728365 a 730116	60	74.53

#### 7.2.4. Diseño de oligonucleótidos

Se realizó el diseño de oligonucleótidos con base en las secuencias obtenidas con los análisis BLAST en el genoma del aguacate y se diseñaron los oligonucleótidos para los análisis de expresión génica se utilizó el software Vector NTI, considerando una longitud del producto mayor a 100, una temperatura de fusión (Tm) entre 55 y 60°C; y una proporción entre guaninas y citosinas (GC%) mayor al 50% (Cuadro 7.4). Éstos se enviaron a la empresa SIGMA Aldrich para su síntesis. La secuencia de los nucleótidos diseñados se muestran en el cuadro 7.4.

Cuadro 7.4. Diseño de oligonucleótidos para los análisis de expresión génica de genes específicos involucrados en las vías de señalización de AS o AJ.

Diseño de oligonucleótidos para los análisis de expresión génica						
Ruta	Gen	Producto esperado	Secuencia	Longitud	GC%	Tm
AS	ERF1	593	GTTCGACAGAGACATTGGGGT	21	52.3	60
	ERF1 reverse		CGAGCAAGCTCACTGGATTTG	21	52.3	59.9
	MYC2	828	ACTGTGAACGTGTGAGGCAA	20	50	60.1
	MYC2 reverse		TTCGCTGGCTTTCTACCTCG	20	55	60.1
AJ	MAPK3	419	CAGCTTCTCCGTGGGCTAAA	20	55	60
	MAPK3 reverse		TAACTGCTGGCGTGGATGTT	20	50	60
	MAPK6	942	TCTCACATGATCACGCAGGG	20	55	59.8
	MAPK6 reverse		CCGAGTATGCAACCCACTGA	20	55	59.7
	PR1	215	GGATGCAACACTCTGGTGGA	20	55	59.9
	PR1 reverse		CGTTGTTGCACCTGACCCTA	20	55	60.2

### 7.2.5. Comprobación de la hibridación de los Oligonucleótidos

Es importante llevar a cabo la comprobación de la funcionalidad de los oligonucleótidos, esto es, verificar que sus secuencias hibridan en el genoma del aguacate y que por lo tanto pueden ser empleados para investigar su patrón de expresión en el este fruto. Para llevar a cabo lo antes mencionado se obtuvo DNA genómico de aguacate el cual sirvió como molde para llevar a cabo la amplificación de los fragmentos por PCR. En la Figura 7.12 se observa el fragmento amplificado de los genes *ERF1*, *NPR1*, *MYC2*, *MAPK6* y *ACT* en los carriles A, B, C, D y E, respectivamente. Para el gen *MAPK3* (carril F), no se obtuvo ninguna amplificación, por lo que este gen no se pudo incluir en la obtención de los patrones de expresión.

En la Figura 7.12 se puede observar que las bandas obtenidas, corresponden al número de pares de base de los productos esperados, los cuales fueron declarados en el cuadro 7.9.

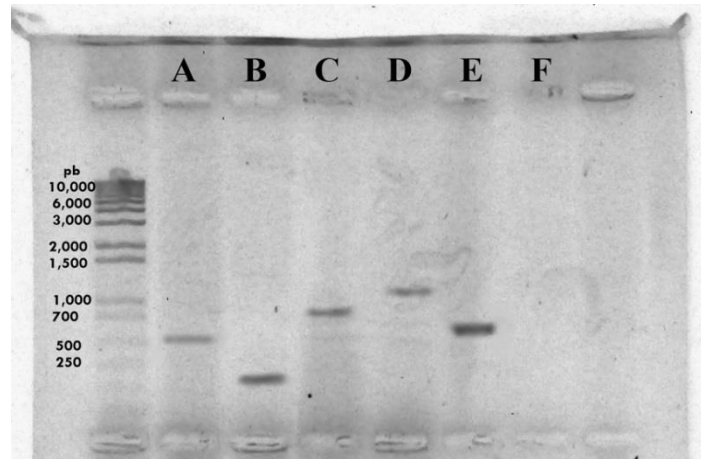


Figura. 7.13. Amplificación de los genes *ERF1* (A), *PR1* (B), *MYC2* (C), *MAPK6* (D), *ACT* (E), *MAPK3* (F) a partir de DNA genómico.

Con este resultado se comprobó que los primers (a excepción de *MAPK3*) son funcionales y adecuados para investigar la expresión de cada uno de ellos en respuesta a los FAGP.

### 7.3. TERCER ETAPA: Análisis de la expresión de genes mediante Transcripción reversa (RT-PCR)

#### 7.3.1. Análisis de la expresión de los genes *ERF1*, *NPR1*, *MYC2*, *MAPK6* y *ACTINA* mediante RT-PCR.

Se realizó el análisis de RT-PCR para analizar la expresión de los genes *ERF1*, *NPR1*, *MYC2*, y *MAPK6*. La expresión de estos genes fue evaluada a tiempos cortos (Figura 7.13), tiempos intermedios (Figura 7.14) y tiempos largos (Figura 7.15). Así mismo, se estableció el gen de actina como control de carga, pues la actina, es una proteína constitutiva, por lo que se utilizó para determinar que las muestras tuvieran una cantidad homogénea de material genético y así, obtener resultados confiables en los patrones de expresión.

En las Figuras 7.13, 7.14 y 7.15, se muestra la expresión del control de carga (a tiempos cortos, intermedios y largos, respectivamente), correspondiente al gen de

ACTINA, en donde se puede apreciar que la amplificación de este gen fue homogénea para todas las muestras a todos los tiempos, esto indica que la concentración de RNA empleada para detectar el nivel de expresión de cada gen en cada muestra-tiempo fue similar y por consiguiente, los resultados de expresión obtenidos son confiables.

Los genes dependientes de la ruta del AJ, *MYC2* y *ERF1*, no amplificaron después de la aplicación de los FAGP, lo que sugiere que no se expresaron en respuesta al tratamiento. La importancia de evaluar estos genes en este proyecto, es debido a que codifican para proteínas clave involucradas en la vía de señalización mediada por el AJ; por ejemplo el gen *MYC2* forma un complejo de transcripción con otras moléculas (MED25) que activan la transcripción de los genes regulados por AJ (Liu, et al., 2019); por su parte, el gen *ERF1*, se ha mencionado como un gen de respuesta inmediata que se induce tras la infección de patógenos necrotróficos y regula la expresión de genes de defensa como *PDF1.2* y *b-CHI* (Lorenzo & Solano, 2005). Dado que estos genes clave en la ruta del AJ no se expresaron en respuesta a los FAGP, se puede argumentar que la inducción del sistema de defensa en el fruto de aguacate por esta molécula, no sigue la vía de AJ.

Por otro lado, *MAPK6* y *NPR1* son genes que tienen un rol central en la vía de señalización del AS, hormona que regula en plantas, la defensa sistémica adquirida. En la Figura 7.13, se puede observar la amplificación de los genes *MAPK6* y *NPR1* a los tiempos de 0, 0.5 y 1 horas después de la aplicación de los tratamientos. Para el gen *MAPK6*, se aprecia que todos los tratamientos en el tiempo 0 tienen una baja expresión y que a partir del tiempo 0.5 las muestras que fueron inoculadas con el patógeno, aumentan la expresión del gen. Las muestras tratadas con AS y FAGP siguen el mismo patrón de expresión en los tiempos cortos que las muestras inoculadas con el patógeno, aunque la expresión del gen aumenta en menor proporción.

*MAPK6* coordina las respuestas de defensa de la ruta de señalización del AS (BT, et al., 2019). Se ha demostrado que *MAPK6* puede ser inducido por distintos



elicitores, tal como la flagelina en *A. thaliana*, pues se ha probado que éste se activa rápidamente al detectar MAMPs (Genot, et al., 2017). Otros estudios sugieren que *MAPK6* es un componente de la cascada involucrada en la transducción de la señal que media la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dudziak, et al., 2019), una molécula mensajera involucrada en el estallido oxidativo y la formación de radicales hidroxilo altamente reactivos, cuya función es atacar directamente al patógeno (Camarena-Gutiérrez, 2007).

Por su parte el gen *NPR1*, se expresó de una forma similar en las muestras tratadas con FAGP al 20% y en las inoculadas por el patógeno, expresándose desde el tiempo 0 y aumentando la expresión en el tiempo 0.5 h, para posteriormente disminuir en el tiempo 1h, sin dejar de expresarse en ambos tratamientos, como se muestra en la Figura 7.13. Para ambos genes, los tratamientos con AJ y el control con agua, mantuvieron una baja expresión durante los tres tiempos, lo cual era de esperarse ya que los genes *MAPK6* y *NPR1* no están mediados por AJ y el agua o actúa como una molécula inductora.

El gen *NPR1*, funciona como coactivador transcripcional, es decir, tras detectar un estímulo por patógenos, *NPR1* se reduce a monómeros en el citosol para después ingresar al núcleo e interactuar con el factor de transcripción TGA y TCP para activar la expresión de proteínas que tienen propiedades antimicrobianas (Palmer, et al., 2019). Por lo anterior, el gen *NPR1* es un gen clave al igual que *MAKP6* en la ruta de señalización mediada por el AS.

El resultado anterior confirma que el fruto responde a la infección del hongo a través de la vía de señalización del AS, aumentando de manera importante la expresión del gen *MAPK6* y en menor proporción pero también con inducción el gen *NPR1* activándose ambos en tiempos cortos, lo cual es indicativo que el fruto responde de inmediato al estímulo que representan los FAGP.

**Expresión de los genes *ACT*, *NPR1* y *MAPK6* a tiempos cortos de aplicación de los tratamientos**

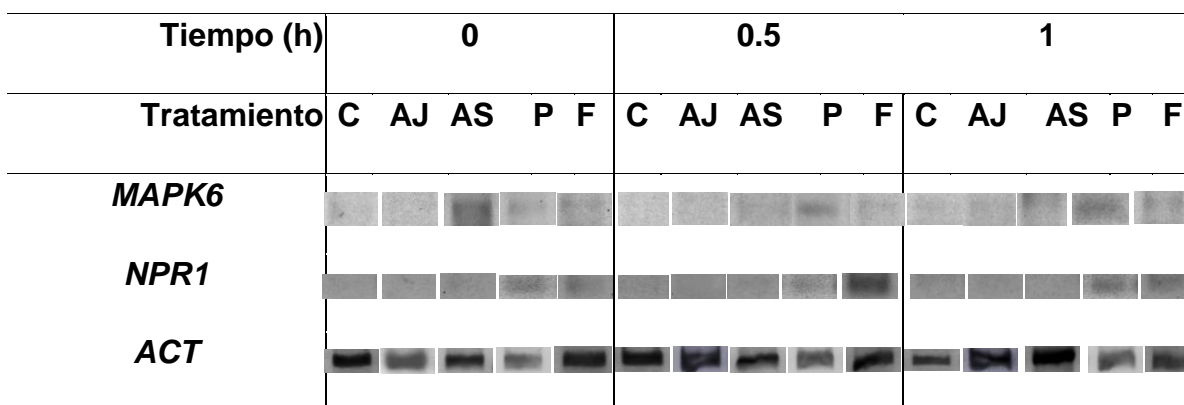


Figura. 7.14. Expresión de los genes *ACT*, *NPR1* y *MAPK6* a tiempos cortos (0, 0.5, 1 horas) de los tratamientos Control (**C**), ácido jasmónico (**AJ**), ácido salicílico (**AS**), inoculación del patógeno (**P**) y FAGP al 20% (**F**).

Durante la evaluación de los tiempos intermedios (Figura 7.14), se observa que en los tratamientos con AJ y control agua, gen *MAPK6* se mantienen sin expresión; En los tratamientos con AS, muestras inoculadas con el patógeno y FAGP, el gen continúa expresado. Es importante destacar que la expresión en FAGP se mantiene baja pero constante, con lo cual se puede hipotetizar que los fructanos han inducido un estado de *priming*, manteniendo al fruto “alerta” ante el ataque de potenciales patógenos.

**Expresión de los genes *ACT*, *NPR1* y *MAPK6* a tiempos intermedios de aplicación de los tratamientos**

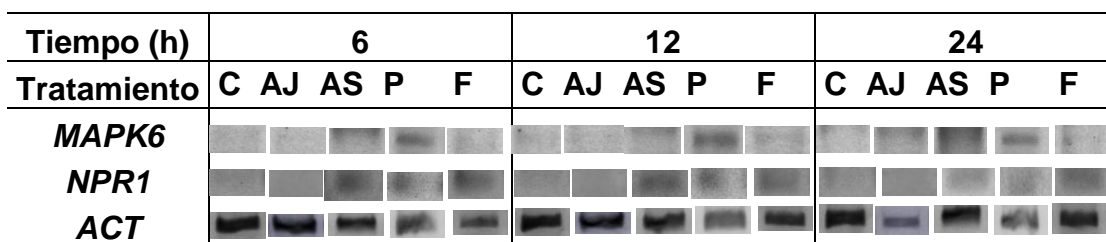


Figura. 7.15. Expresión de los genes *ACT*, *NPR1* y *MAPK6* a tiempos intermedios (6, 12 y 24 horas) de los tratamientos Control (**C**), ácido jasmónico (**AJ**), ácido salicílico (**AS**), inoculación del patógeno (**P**) y FAGP al 20% (**F**).

En la evaluación de tiempos largos que se muestra en la Figura 7.15, se puede observar que en la expresión del gen *NPR1*, el tratamiento con AS presenta una disminución de la expresión continua, lo mismo sucede con el gen *MAPK6*. Respecto al tratamiento con FAGP algo muy interesante se puede observar, pues la expresión de ambos genes, *MAPK6* y *NPR1* se mantuvo hasta el tiempo 72 y en el tiempo 120 aumenta ligeramente, indicando que los FAGP mantienen activo el sistema de defensa del fruto.

**Expresión de los genes *ACT*, *NPR1* y *MAPK6* a tiempos largos de aplicación de los tratamientos**

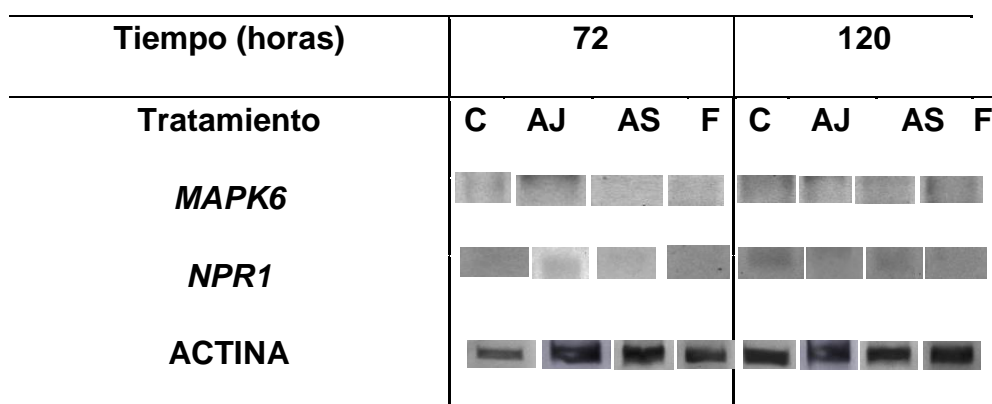


Figura. 7.16. Expresión de los genes *ACTINA*, *NPR1* y *MAPK6* a tiempos largos (72 y 120 horas) de los tratamientos Control (C), ácido jasmónico (AJ), ácido salicílico (AS), inoculación del patógeno (P) y FAGP al 20% (F).

Con el fin de que los patrones de expresión obtenidos no solo fueran cualitativos, los resultados se analizaron de manera semicuantitativa y para fines explicativos se extrapolaron a un gráfico que se muestra en la Figura 7.16. Es posible observar que en la amplificación del gen *MAPK6*, los fructanos tienen un comportamiento similar a una infección producida por el hongo *C. gloeosporioides*, en la que hay un aumento gradual de la expresión del gen y alcanza su pico máximo a las 12 h después de la aplicación de los fructanos y la inoculación del patógeno (Figura 7.14). Posteriormente hay una disminución marcada de la expresión de *MAPK6* en

el tiempo 24 a 72 h y después se mantiene con una baja expresión, en ambos tratamientos (inoculación con el patógeno y los FAGP), lo que concuerda con la evolución natural de la enfermedad, pues es cuando inicia la fase sintomática de la enfermedad y probablemente se esté llevando una interacción fruto-patógeno compatible (Djami-Tchatchou, et al., 2013). Es de llamar la atención que en las muestras del tratamiento con FAGP, se presente una disminución gradual pero menos marcada que en las muestras a las que se les inoculó el patógeno, lo anterior, apoya la teoría del “*priming*” (Tarkowski, et al., 2019), en la que se propone que los azúcares, pueden generar una preparación a nivel celular sin agotar los recursos con la finalidad de generar una respuesta más rápida o mayor en contra de patógenos (Svara, et al., 2020). Nuestros resultados están acordes con esta teoría ya que refleja cierta preparación por parte del fruto para contrarrestar la presencia de fitopatógenos, ya que mantiene expresados los genes de defensa en menor proporción que en la infección por el hongo *C. gloeosporioides* para mantener en alerta el sistema de defensa del fruto y presentar una respuesta más rápida y eficiente en cuanto se detecte la presencia de algún patógeno. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Rensburg, quien encontró que los fructanos tipo levanos son capaces de inducir inmunidad en *Arabidopsis* ante el ataque de una infección fúngica y que mantiene un “*priming*”, con mayor fuerza que la inulina (Rensburg, et al., 2020).

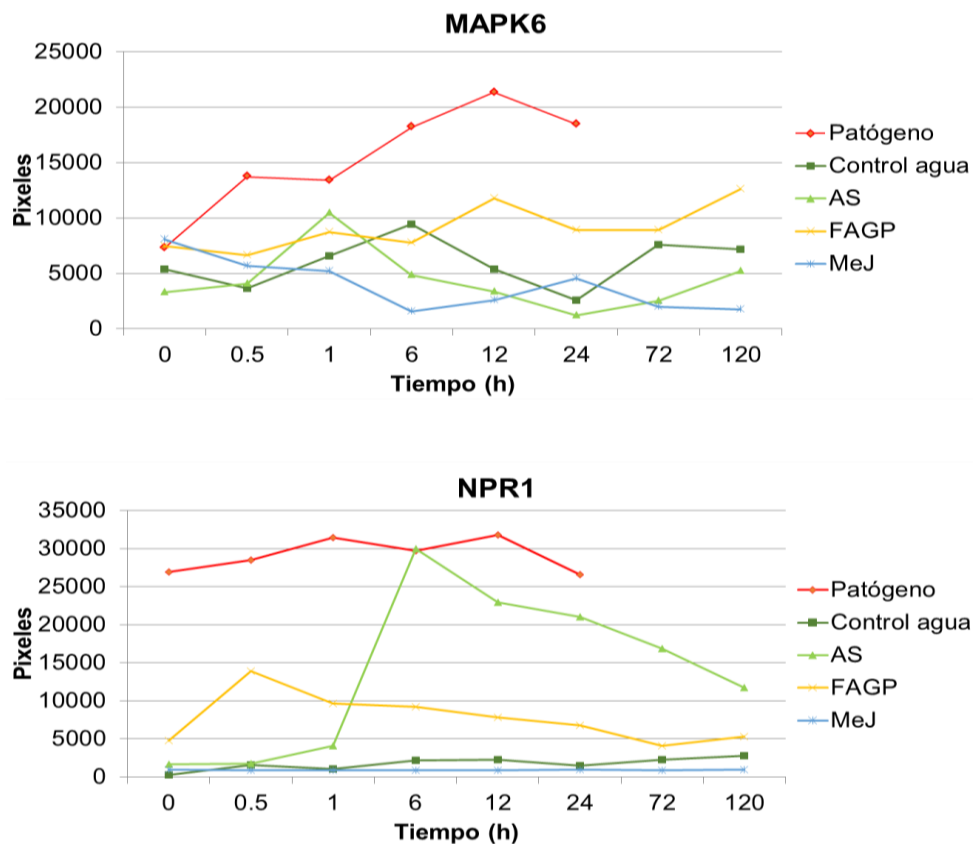


Figura. 7.17. Expresión de los genes MAPK6 y NPR1 de los distintos tratamientos a los tiempos evaluados

Para la expresión del gen *NPR1*, nuevamente podemos observar que el tratamiento con los FAGP al 20% presentan un comportamiento similar a las muestras inoculadas con el patógeno y con el tratamiento con AS, ya que presenta un aumento desde el tiempo 0.5 h y disminuye gradualmente, sin dejar de expresarse hasta el tiempo 120 h.

De manera interesante, lo anterior contrasta con el patrón de expresión en la muestra control agua, en donde *NPR1* se expresa hasta el tiempo de 72 h y en una proporción muy baja, esto se puede explicar debido a que al estar libre de enfermedad, podría expresarse para llevar a cabo otras funciones ajenas a la defensa, tales como modificaciones postraduccionales de proteínas o en la regulación positiva de la transcripción del DNA (Mou, et al., 2003) . De igual forma

que el gen *MAPK6*, la expresión de *NPR1*, se mantiene hasta el tiempo 120 h, reforzando la teoría del “*priming*” por carbohidratos, en la que también se menciona que los fructanos podrían generar una acumulación de glucosas y sacarosas en la célula, para su utilización en la síntesis de metabolitos secundarios, de los cuales muchos poseen actividad antifúngica (Svara, et al., 2020).

Los genes *MAPK6* y *NPR1*, mantuvieron su expresión en respuesta a FAGP al 20%, por lo que podemos sugerir que los FAGP activan la ruta del AS posiblemente mediante el reconocimiento como MAMPs de manera similar al reconocimiento de moléculas específicas de un patógeno. Algunas investigaciones proponen que los fructanos al llegar al epicarpio del fruto sufre transformaciones por exohidrolasas fructosílicas que los hace ser reconocidos como MAMPs, activando así las rutas para del sistema de defensa del fruto (Rensburg, et al., 2020).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se sugiere el modelo presentado en la Figura 7.17 para explicar la forma que los FAGP podrían ser percibidos por el fruto.

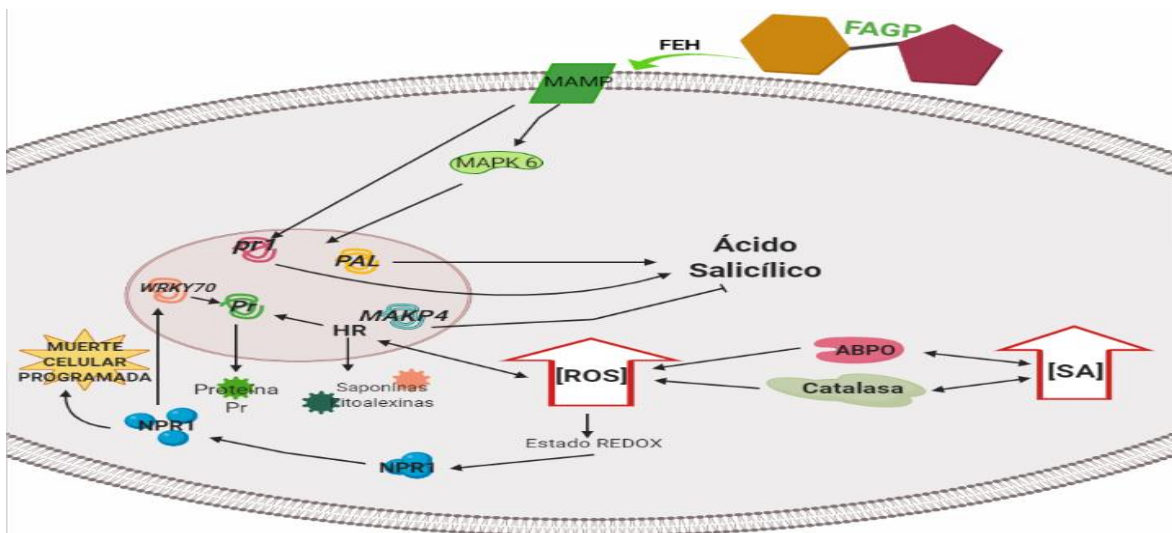


Figura. 7.18. Modelo de activación del sistema de defensa por los FAGP en la célula, Modificado del sistema propuesto por de Díaz-Puentes, 2012; Tripathi et al., 2019 & Vlot et al., 2009a.

Se propone que los FAGP al estar en contacto con la pared celular del fruto, pueden ser transformados por enzimas exohidrolasas fructosílicas que generan modificaciones en la molécula que hace que la célula vegetal los reconozca MAMP's, de tal manera que se estaría generando la cascada de señalización para la activación de la ruta dependiente del AS (Figura 7.17) con la consecuente activación de los sistemas de defensa de la manera que ya se ha descrito.

## **CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES**



## CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

- Entre los diferentes tipos de fructanos evaluados (fructooligosacáridos, inulina, fructanos de medio grado de polimerización y fructanos nativos), sólo los FAGP mostraron capacidad de actuar como inductores del sistema de defensa del fruto de Aguacate Hass.
- Los FAGP no presentaron actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides* ya que generaron un mayor crecimiento *in vitro* del hongo, sin encontrar diferencias significativas en la esporulación y germinación de las esporas.
- Los frutos de aguacate tratados con FAGP al 20% presentan una disminución del 45% en la severidad de la antracnosis causada por *C. gloeosporioides*, comparado con frutos sin tratamiento.
- Los FAGP inducen y mantienen la expresión de los genes *MAPK6* y *NPR1*, involucrados en la vía de señalización del AS, por lo que se propone que los FAGP son percibidos por el fruto como patógenos.

## **CAPÍTULO 9. PERSPECTIVAS**

## CAPÍTULO 9. PERSPECTIVAS

- Para complementar los datos obtenidos recomendaría realizar la aplicación de FAGP en aguacate, pero extendiendo el tiempo de inducción hasta 24 o 48 h, pues existen reportes que mencionan que un tiempo de inducción largo puede mejorar la respuesta a los patógenos.
- Realizar análisis fisicoquímicos a los aguacates tratados para determinar si existe diferencia entre los frutos tratados con FAGP y los que no.
- Probar los FAGP en otros frutos con exocarpio más delgado, pues muchos de los estudios publicados con resultados exitosos, son en frutos como manzana, lechuga y tabaco, lo que nos hace pensar que el exocarpio juega un papel importante en la penetración de los FAGP, debido al tamaño de la molécula.
- Evaluar la expresión de los genes *MAPK6* y *NPR1* en tiempos más largos, para determinar cuánto tiempo puede permanecer el fruto en estado de “*priming*”, después de la aplicación de los FAGP.
- Analizar las propiedades de los FAGP y su capacidad para formar películas, para optimización de la formulación y su posterior aplicación a distintos frutos postcosecha.

## **CAPÍTULO 10. BIBLIOGRAFÍA**

## CAPÍTULO 10. BIBLIOGRAFÍA

- Agriculture and Nature Resources. (2017). *Avocado. Pest management guidelines for agriculture*. University of California. <http://ipm.ucanr.edu/PMG/selectnewpest.avocado.html>
- Anderson, J. P., Badruzsauhari, E., Schenk, P. M., Manners, J. M., Desmond, O. J., Ehlert, C., Maclean, D. J., Ebert, P. R., & Kazan, K. (2004). Antagonistic Interaction between Abscisic Acid and Jasmonate-Ethylene Signaling Pathways Modulates Defense Gene Expression and Disease Resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(12), 3460–3479. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025833>
- APEAM. (2016). *Listado de plaguicidas recomendados para el cultivo del aguacate* (02 ed.). <https://plaguicidas.apeamac.com/ArchivoPDF.aspx>
- Arias Bustos, C., & Moors, E. H. M. (2018). Reducing post-harvest food losses through innovative collaboration: Insights from the Colombian and Mexican avocado supply chains. *Journal of Cleaner Production*, 199, 1020–1034. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2018.06.187>
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. (2003). Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(03)00117-0)
- Bektas, Y., & Eulgem, T. (2015). Synthetic plant defense elicitors. *Frontiers in Plant Science*, 5, 804. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00804>
- Bolouri Moghaddam, M. R., & Van den Ende, W. (2012). Sugars and plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany*, 63(11), 3989–3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers129>
- Bosquez-Molina, E., Jesús, E. R., Bautista-Baños, S., Verde-Calvo, J. R., & Morales-López, J. (2010). Inhibitory effect of essential oils against

- Colletotrichum gloeosporioides and Rhizopus stolonifer in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 57(2), 132–137. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2010.03.008>
- BT, M., K, S., GW, L., KS, L., & VP, K. (2019). The mitogen activated protein kinase (MAPK) gene family functions as a cohort during the Glycine max defense response to Heterodera glycines. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 137, 25–41. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2019.01.018>
- Buzby, J. C., Wells, H. F., & Hyman, J. (2014). *The Estimated Amount, Value, and Calories of Postharvest Food Losses at the Retail and Consumer Levels in the United States*. [www.ers.usda.gov](http://www.ers.usda.gov)
- Camarena-Gutiérrez, G. (2007). LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN DEFENSA DE LAS PLANTAS CONTRA PATÓGENOS. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 12(1), 25–30.
- Campos-Martínez, A. (2014). *Identificación de levaduras y evaluación de su capacidad para inhibir a Colletotrichum spp. causante de la antracnosis en aguacate (Persea americana Mill)* [Instituto Politécnico Nacional]. [https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/14687/Tesis\\_2014\\_Angel\\_Campos\\_Martínez.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/14687/Tesis_2014_Angel_Campos_Martínez.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Carolina, A., Arias, R., & Zamora Espitia, H. M. (2010). Plant Defensins and Their Potential Use as Pest Control in Agriculture. *Acta Biol. Colomb*, 15(3), 33–46. <http://defensins.bii.a-star.edu.sg/>
- Carvalhais, L. C., Schenk, P. M., & Dennis, P. G. (2017). Jasmonic acid signalling and the plant holobiont. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 42–47. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2017.03.009>
- CEDRSSA. (2017). *Caso de exportación: El aguacate*. [http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/54Exportación\\_aguacate.pdf](http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/54Exportación_aguacate.pdf)
- Cerdas-Araya, M. M., Montero-Calderón, M., & DÍA-CORDERO, E. (2006). *Manual de*

manejo pre y poscosecha de aguacate (*Persea americana*).  
[http://www.mag.go.cr/biblioteca\\_virtual\\_ciencia/aguacate-2006.pdf](http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/aguacate-2006.pdf)

Cerón Rincón, L. E., Higuera, B. L., Sánchez, J., Bustamante, S., & Buitrago, G. (2006). CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE *Colletotrichum gloeosporioides* f. *alatae* DURANTE SU CULTIVO EN MEDIOS LÍQUIDOS. *Acta Biológica Colombiana*, 11(1), 99–109.

Ceusters, N., Van den Ende, W., & Ceusters, J. (2016). *Exploration of Sweet Immunity to Enhance Abiotic Stress Tolerance in Plants: Lessons from CAM* (pp. 145–166). [https://doi.org/10.1007/124\\_2016\\_1](https://doi.org/10.1007/124_2016_1)

Comisión del Codex Alimentarius. (1997). *LIMITES MAXIMOS DEL CODEX PARA RESIDUOS DE PLAGUICIDAS*. <http://www.fao.org/waicent/faostat/pest-residue/pest-s.htm>

Díaz-Puentes, L. N. (2009). Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2), 32–55.  
<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=179214945004>

Díaz-Puentes, L. N. (2012). Resistencia Sistémica Adquirida Mediada por el Ácido Salicílico. *Biología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 257–267. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1692-35612012000200030&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1692-35612012000200030&lng=en&nrm=iso&tlng=es)

Djami-Tchatchou, A. T., Allie, F., & Straker, C. J. (2013). Expression of defence-related genes in avocado fruit (cv. Fuerte) infected with *Colletotrichum gloeosporioides*. *South African Journal of Botany*, 86, 92–100.  
<https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2013.02.166>

Djami-Tchatchou, A. T., & Straker, C. J. (2012). The isolation of high quality RNA from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill.). *South African Journal of Botany*, 78, 44–46. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.04.009>

- Dotor-Robayo, M. Y., & Cabezas-Gutierrez, M. (2014). Mecanismos de Resistencia Sistémica en Plantas. *Acta Iguazu*, 3(2), 1–19. <http://e-revista.unioeste.br/index.php/actaiguazu/article/view/10277>
- Dubey, N., & Singh, K. (2018). *Role of NBS-LRR Proteins in Plant Defense BT - Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction* (Singh, A. & I. K. Singh (eds.); pp. 115–138). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_5)
- Dudziak, K., Zapalska, M., Börner, A., Szczerba, H., Kowalczyk, K., & Nowak, M. (2019). Analysis of wheat gene expression related to the oxidative stress response and signal transduction under short-term osmotic stress. *Scientific Reports 2019 9:1*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39154-w>
- Espinosa, R., & Ortiz, R. (2013). Estabilidad térmica del grado de polimerización y cuantificación parcial de azúcares en fructanos de agave tequilana, obtenidos por ultrafiltración - Dialnet. In *Ciencias agropecuarias Handbook: Congreso Interdisciplinario de Cuerpos Académicos* (1st ed., pp. 42–50). <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4782719>
- Genot, B., Lang, J., Berriri, S., Garmier, M., Gilard, F., Pateyron, S., Haustraete, K., Straeten, D. Van Der, Hirt, H., & Colcombet, J. (2017). Constitutively Active Arabidopsis MAP Kinase 3 Triggers Defense Responses Involving Salicylic Acid and SUMM2 Resistance Protein. *Plant Physiology*, 174(2), 1238. <https://doi.org/10.1104/PP.17.00378>
- Glowacz, M., Roets, N., & Sivakumar, D. (2017). Control of anthracnose disease via increased activity of defence related enzymes in ‘Hass’ avocado fruit treated with methyl jasmonate and methyl salicylate. *Food Chemistry*, 234, 163–167. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.04.063>
- Herbers, K., Meuwly, P., Frommer, W. B., Metraux, J. P., & Sonnewald, U. (1996). Systemic Acquired Resistance Mediated by the Ectopic Expression of Invertase: Possible Hexose Sensing in the Secretory Pathway. *The Plant Cell*,



8(5), 793–803. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.5.793>

INTAGRI. (2017). Antracnosis en el Cultivo de Aguacate. *Serie de Fitosanidad*, 81(Artículos técnicos de INTAGRI), 4. <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/antracnosis-en-el-cultivo-de-aguacate>

Kazan, K., & Manners, J. M. (2013). MYC2: The Master in Action. *Molecular Plant*, 6(3), 686–703. <https://doi.org/10.1093/mp/sss128>

Lakshmesha, K. K., Lakshmidevi, N., & Mallikarjuna, S. A. (2005). Changes in pectinase and cellulase activity of *Colletotrichum capsici* mutants and their effect on Anthracnose disease on capsicum fruit. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 38(4), 267–279. <https://doi.org/10.1080/03235400500094100>

Landero-Valenzuela, N., Marcelo Lara-Viveros, F., Andrade-Hoyos, P., Alfonso Aguilar-Pérez, L., & Javier Aguado Rodríguez, G. (2016). Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. *Rev. Mex. Cienc. Agríc*, 7, 1189–1198. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v7n5/2007-0934-remexca-7-05-1189.pdf>

Landero-Valenzuela, N., Niego-Angel, D., Téliz-Ortíz, D., Alatorre-Rosas, R., Orozco-Santos, M., & Ortíz-García, C. F. (2013). Potencial antifúngico de extractos de cuatro especies vegetales sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya*) en poscosecha. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología*, 4(1), 47–62. <http://oaji.net/articles/2017/4924-1495453202.pdf>

Lara-Viveros, F. M., Nieto-Ángel, D., Nava-Díaz, C., Gutiérrez-Alonso, G., Ayala-Garay, Ó. J., Aguilar-Pérez, L. A., & Martínez-Damián, T. (2014). Efecto del glucorafano aislado de floretes de brócoli sobre la germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(2), 141–147. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0187-](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0187-)

73802014000200005&lng=es&nrm=iso

- Laredo Alcalá, E. I., Martínez Hernández, J. L., Iliná, A., Guillen Cisneros, L., Hernández Castillo, F. D., Laredo Alcalá, E. I., Martínez Hernández, J. L., Iliná, A., Guillen Cisneros, L., & Hernández Castillo, F. D. (2017). Aplicación de ácido jasmónico como inductor de resistencia vegetal frente a patógenos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(3), 673. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i3.40>
- Lemus-Soriano, B. A., & Pérez-Aguilar, D. A. (2017). MANEJO DE LA ANTRACNOSIS DEL AGUACATE CON BIOFUNGICIDAS. V *Congreso Latinoamericano Del Aguacate*, 5. [http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias\\_VCLA/2017/Memorias\\_VCLA\\_2017\\_PG\\_135.pdf](http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias_VCLA/2017/Memorias_VCLA_2017_PG_135.pdf)
- Liu, Y., Du, M., Deng, L., Shen, J., Fang, M., Chen, Q., Lu, Y., Wang, Q., Li, C., & Zhai, Q. (2019). MYC2 Regulates the Termination of Jasmonate Signaling via an Autoregulatory Negative Feedback Loop. *The Plant Cell*, 31(1), 106–127. <https://doi.org/10.1105/TPC.18.00405>
- Loaiza, J. E., & Rivera, G. (2000). Potencial biocida de extractos de *Gliricidia sepium* contra patógenos del cultivo de papaya (*Carica papaya*). *Agronomía Costarricense*, 24(1), 29–36. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43624103>
- Lorenzo, O., & Solano, R. (2005). Señalización de Ácido Jasmónico e interacciones con otras hormonas. *Biojournal of Cience and Technology*. <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Jasmonico.pdf>
- Mancilla-Margalli, N. Alejandra, & López, M. G. (2006). Water-Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns from *Agave* and *Dasyilirion* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7832–7839. <https://doi.org/10.1021/jf060354v>
- Mancilla-Margalli, Norma Alejandra. (2006). *Caracterización molecular de fructanos en Agave y Dasyilirion spp., identificación de fructosiltransferasas y*

su expresión en *Pichia pastoris* [Instituto Politécnico Nacional.].  
[http://www.ira.cinvestav.mx:86/tesis/mancilla\\_2006.pdf](http://www.ira.cinvestav.mx:86/tesis/mancilla_2006.pdf)

Marais, L. J. (2006). Avocado Diseases of Major Importance Worldwide and their Management. In *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II*.  
[https://doi.org/10.1007/1-4020-2607-2\\_1](https://doi.org/10.1007/1-4020-2607-2_1)

Martínez-Hernández, A., Mena-Espino, M., Herrera-Estrella, A., & Martínez-Hernández, P. (2010). Construcción de bibliotecas de ADNc y análisis de expresión génica por RT-PCR en agaves. *Revista Latinoamericana de Química*.

Martínez-López, A. A., Leshner, J. M., & Jiménez-García, M. E. (2013). Comparación de tres métodos para la extracción de ARN total a partir de hojas de cacao. *Bioteconología Vegetal*, 13(2).  
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/100>

Martínez-Ortega, E. A., López-Briones, J. S., Rodríguez-Hernández, G., Ramírez-Orozco, R. E., & Franco-Robles, E. (2018). Antibacterial activity of agave fructans against salmonella typhimurium. *Natural Product Research*.  
<https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1548446>

Mitsuhara, I., Iwai, T., Seo, S., Yanagawa, Y., Kawahigasi, H., Hirose, S., Ohkawa, Y., & Ohashi, Y. (2008). Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Molecular Genetics and Genomics* 279:4, 279(4), 415–427. <https://doi.org/10.1007/S00438-008-0322-9>

Montañez-Soto, J., Venegas-González, J., Vivar-Vera, M., & Ramos-Ramírez, E. (2011). EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS FRUCTANOS CONTENIDOS EN LA CABEZA Y EN LAS HOJAS DEL Agave tequilana Weber AZUL. *Bioagro*, 23(3), 199–206.

Mou, Z., Fan, W., & Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance Regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113(7), 935–

944. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00429-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00429-X)

- Mulkay, T., Paumier, A., Aranguren, M., & Herrera, O. (2010). Diagnóstico de las enfermedades fungosas de mayor incidencia durante la poscosecha de la papaya (*Carica papaya* L.), el mango (*Mangifera indica* L.) y el aguacate (*Persea americana* Miller) en tres localidades frutícolas de Cuba. *Revista CitriFrut*, 27(2). [http://www.actaf.co.cu/revistas/revista\\_citrifruta/Citrus\\_2010/RCA4\\_27\\_2\\_2010.pdf](http://www.actaf.co.cu/revistas/revista_citrifruta/Citrus_2010/RCA4_27_2_2010.pdf)
- Narváez-Valderrama, J. F., Palacio-Baena, J. A., & Molina-Pérez, F. J. (2012). Persistencia de plaguicidas en el ambiente y su ecotoxicidad. *Gestión y Ambiente*, 15(3), 27–38. <http://www.bdigital.unal.edu.co/35839/1/36278-151112-1-PB.pdf>
- Obianom, C., Romanazzi, G., & Sivakumar, D. (2019). Effects of chitosan treatment on avocado postharvest diseases and expression of phenylalanine ammonia-lyase, chitinase and lipoxygenase genes. *Postharvest Biology and Technology*, 147, 214–221. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2018.10.004>
- Palmer, I. A., Chen, H., Chen, J., Chang, M., Li, M., Liu, F., & Fu, Z. Q. (2019). Novel Salicylic Acid Analogs Induce a Potent Defense Response in Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 3356, 20(13), 3356. <https://doi.org/10.3390/IJMS20133356>
- Quaglia, M., Ederli, L., Pasqualini, S., & Zizzerini, A. (2011). Biological control agents and chemical inducers of resistance for postharvest control of *Penicillium expansum* Link. on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 59(3), 307–315. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2010.09.007>
- Rensburg, H. C. J. van, Takács, Z., Freynschlag, F., Öner, E. T., Jonak, C., & Ende, W. Van den. (2020). Fructans Prime ROS Dynamics and Botrytis cinerea Resistance in Arabidopsis. *Antioxidants* 2020, Vol. 9, Page 805, 9(9),

805. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9090805>

Reyes-Alemán, J. C. (1996). APLICACION DE PRODUCTOS ALTERNATIVOS PARA EL CONTROL DE *Colletotrichum gloeosporioides* EN FRUTOS DE AGUACATE 'RINCOATL. *Avocado Source*. [http://www.avocadosource.com/journals/cictamex/cictamex\\_1996/ecologia\\_96.pdf](http://www.avocadosource.com/journals/cictamex/cictamex_1996/ecologia_96.pdf)

Rodríguez-López, E. S., González-Prieto, J. M., & Mayek-Pére, N. (2009). La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc en aguacatero (persea americana Mill.): Aspectos Bioquímicos y genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(1), 53–63. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092009000100007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092009000100007)

SAGARPA. (2011). *Aguacate. Monografía de cultivos*. <http://www.sagarpa.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Monografias/Monografía del aguacate.pdf>

Salzman, R. A., Tikhonova, I., Bordelon, B. P., Hasegawa, P. M., & Bressan, R. A. (1998). Coordinate Accumulation of Antifungal Proteins and Hexoses Constitutes a Developmentally Controlled Defense Response during Fruit Ripening in Grape. *Plant Physiology*, 117(2), 465–472. <https://doi.org/10.1104/pp.117.2.465>

Serrano Carreón, L., & Fentanes, E. G. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos un reto multidisciplinario. *Academia Mexicana de Ciencias*, 58(1), 77–88. [https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/58\\_1/PDF/controlBiologico.pdf](https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/58_1/PDF/controlBiologico.pdf)

Sharma, G., Maymon, M., & Freeman, S. (2017). Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. *Scientific Reports*, 7(1),

15839. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15946-w>

SIAP. (2018). *ATLAS AGROALIMENTARIO 2012-2018* (Primera ed). SAGARPA. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018)

SIAP. (2019). *Boletín mensual de producción aguacate (Enero- Octubre)*.

Svara, A., Tarkowski, Ł. P., van Rensburg, H. C. J., Deleye, E., Vaerten, J., De Storme, N., Keulemans, W., & Van den Ende, W. (2020). Sweet immunity: The effect of exogenous fructans on the susceptibility of apple (*malus × domestica* borkh.) to *venturia inaequalis*. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(16), 1–16. <https://doi.org/10.3390/IJMS21165885>

Tapia-Rodríguez, A. (2018). *DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE ANTRACNOSIS (Colletotrichum gloeosporioides Penz.) EN AGUACATE (Persea americana Mill.) EN EL ESTADO DE MÉXICO*. [Universidad Autónoma del Estado de México]. [http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/98814/TESIS\\_FINALATENAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/98814/TESIS_FINALATENAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Tarkowski, Ł. P., de Poel, B. Van, Höfte, M., & Van den Ende, W. (2019). Sweet immunity: Inulin boosts resistance of lettuce (*lactuca sativa*) against grey mold (*botrytis cinerea*) in an ethylene-dependent manner. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(5). <https://doi.org/10.3390/ijms20051052>

Tattersall, D. B., Van Heeswijck, R., & Hsj, P. B. (1997). Identification and Characterization of a Fruit-Specific, Thaumatin-Like Protein That Accumulates at Very High Levels in Conjunction with the Onset of Sugar Accumulation and Berry Softening in Grapes'. In *Plant Physiol* (Vol. 114). [www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)

Tripathi, D., Raikhy, G., & Kumar, D. (2019). Chemical elicitors of systemic acquired resistance—Salicylic acid and its functional analogs. *Current Plant Biology*. <https://doi.org/10.1016/J.CPB.2019.03.002>

Vlot, A. C., Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2009a). Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology*, *47*(1), 177–

206. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>

Vlot, A. C., Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2009b). Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 177–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>

Xoca-Orozco, L.-Á., Aguilera-Aguirre, S., Vega-Arreguín, J., Acevedo-Hernández, G., Tovar-Pérez, E., Stoll, A., Herrera-Estrella, L., & Chacón-López, A. (2018). Activation of the phenylpropanoid biosynthesis pathway reveals a novel action mechanism of the elicitor effect of chitosan on avocado fruit epicarp. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.12.023>

Xoca-Orozco, L. A., Aguilera-Aguirre, S., López-García, U. M., Gutiérrez-Martínez, P., & Chacón-López, M. A. (2018). Efecto del quitosano en el control in vitro de *Colletotrichum* sp., y su influencia en la calidad poscosecha en frutos de aguacate Hass. *Revista Bio Ciencias*, 5(1), 20. <https://doi.org/10.15741/REVBIO.05.01.13>

Xoca-Orozco, L. Á., Cuellar-Torres, E. A., González-Morales, S., Gutiérrez-Martínez, P., López-García, U., Herrera-Estrella, L., Vega-Arreguín, J., & Chacón-López, A. (2017). Transcriptomic analysis of avocado hass (*Persea americana* Mill) in the interaction system Fruit-Chitosan-*Colletotrichum*. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00956>